

Abraão Moratelli Prado

**COMPARAÇÃO ENTRE ENXERTO GENGIVAL LIVRE E
ENXERTO DE FIBROBLASTOS DE CULTURA PRIMÁRIA
SUPLEMENTADA COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS:
ESTUDO EM RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Título
de Doutor em Odontologia.
Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto
Magalhães Benfatti
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elena Riet
Correa Rivero

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Prado, Abraão

Comparação entre enxerto gengival livre e enxerto de fibroblastos de cultura primária suplementada com plasma rico em plaquetas: estudo em ratos / Abraão Prado ; orientador, Cesar Augusto Magalhães Benfatti, coorientador, Elena Riet Rivero, 2019.

143 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2019.
Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Enxerto gengival livre. 3. Fibroblastos. 4. Cultura primária. I. Magalhães Benfatti, Cesar Augusto. II. Riet Rivero, Elena. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Abraão Moratelli Prado

**COMPARAÇÃO ENTRE ENXERTO GENGIVAL LIVRE E
ENXERTO DE FIBROBLASTOS DE CULTURA PRIMÁRIA
SUPLEMENTADA COM PLASMA RICO EM PLAQUEETAS:
ESTUDO EM RATOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 30 de Maio de 2019.

Prof. Elena Riet Correa Rivero, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Cesar Augusto Magalhães Benfatti, Dr.
Orientador

Prof. Ricardo de Souza Magini, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Luismar Marques Porto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Mabel Cordeiro, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Leticia Bins Ely, Dr.^a

Este trabalho é dedicado a Deus,
minha esposa e minha filha.

MINHA HISTÓRIA

No ensino médio, nos reuníamos na biblioteca em véspera de prova para estudar e eu sempre me prontificava a ensinar a matéria para meus colegas. Acredito que é ensinando que se aprende. Após a entrada na faculdade, comecei a admirar ainda mais o que é ser um professor. Eu sempre olhava para os professores e pensava: “um dia quero ser igual”. Engraçado que os professores influenciam na decisão de qual profissão seguir e também qual especialidade fazer. Isso aconteceu comigo antes de entrar na graduação, quando decidi trocar de medicina para odontologia, e durante o curso, na minha escolha de que área iria trabalhar.

Nas primeiras fases tive a oportunidade de estagiar na ortodontia com o prof. Daltro, foi meu primeiro contato com a clínica odontológica. Até a quarta fase eu acreditava que seria pediatra e ortodontista (risos). As fases foram passando e não consegui realizar outros estágios, pois a carga horária era alta e precisava trabalhar. Um dos meus empregos era de taxista, trabalhava nos finais de semana. Um dia trabalhando no aeroporto eu encontrei o professor Guilherme da Dentística. Depois disso eu passei a leva-lo para o aeroporto nas madrugadas. Nessas viagens aprendi muito com ele e passei a admirar ainda mais o “ser professor”. Também tive a oportunidade de trabalhar num Congresso de Endodontia organizado pelos professores Mara e Felipe, onde eu buscava e levava os preletores, foi uma experiência incrível.

Quando eu estava no sexto período tive a oportunidade de estagiar na especialização de Prótese Dentária com os professores Cláudia, Diego e Luiz Garbeloto. Aprendi muito nesse estágio e realmente comecei a gostar da área. Então, me candidatei a ser bolsista voluntário da disciplina, fui encaminhado para auxiliar no projeto de mestrado da Karla Nunes. Durante as férias, dentro do laboratório de pesquisa da odonto, cuidando da máquina de ciclagem (esfria água/ aquece água), conheci o doutorando Ernesto. Ele estava precisando terminar a pesquisa para voltar ao seu país. Eu me prontifiquei a ajudá-lo. Foi quando eu aprendi a usar o sistema Exakt e conheci o professor Cesar. Acredito que a partir de então tudo começou a se encaixar. Eu desenvolvi minha pesquisa de TCC, orientado pelo prof Diego, dentro do CEPID, uma pesquisa de satisfação dos pacientes com próteses fixas sobre implantes, na disciplina do prof. Bianchini.

Foi um caminho sem volta, cada dia gostava mais da área de reabilitação oral e também de fazer pesquisa. Por isso, decidi fazer a

prova para o mestrado durante meu último semestre da graduação. Alguns dias após a notícia de aprovação no mestrado, o prof. Magini me falou da pesquisa que ele gostaria que eu desenvolvesse. A confiança que o prof. Magini depositou em mim foi muito importante. Eu comecei a trabalhar no projeto durante o mestrado, mas só consegui terminar agora, seis anos depois. O caminho não foi fácil, muitos problemas enfrentamos, mas conseguimos! Muitas pessoas me ajudaram. Sem contar, na ajuda da professora Elena da Patologia, que abriu o laboratório para o processamento histológico e imunohistoquímico das minhas amostras, sem contar os ensinamentos e inúmeras correções do meu artigo.

Não poderia deixar de registrar do contato que tive durante o mestrado e o doutorado com o professor Antonio Carlos, o qual impactou muito a minha vida. Devido aos conhecimentos que ele transmitia em suas aulas, a sua humildade de nos receber em sua casa para estudar a bíblia, dos diversos conselhos que me deu, sem contar nas oportunidades profissionais que surgiram devido a sua indicação.

Ao longo da minha jornada acadêmica tive experiências com diferentes tipos de pesquisas - clínicas, em humanos e animais, e laboratoriais, com células, bactérias e testes mecânicos. Acredito que tudo isso foi devido ao meu orientador, o prof Cesar. Um professor que me inspira muito, ele sabe muito e é apaixonado pela pesquisa científica. Também tive oportunidade de dar aulas teóricas e práticas para graduação e especialização. Deixo aqui um destaque para o prof Magini, minha referência para as aulas teóricas, ele realmente tem o dom da oratória.

Acredito que finalizo o doutorado com uma boa bagagem e muito aprendizado. Agradeço a todos que participaram deste processo. Agora é me preparar para o que vem pela frente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Todo-Poderoso, o Alfa e o Ômega, o Princípio e o Fim, o criador da vida.

À minha esposa, que está ao meu lado, nos momentos difíceis e nos momentos bons. Além de que me deu uma filha linda.

À minha família, meus pais e meus irmãos, que sempre me apoiaram e me incentivaram.

Aos meus professores do CEPID, Cesar, Magini, Antonio Carlos e Bianchini, que me ensinaram muito e me deram a oportunidade de estudar e crescer profissionalmente.

Aos professores que ajudaram para que a pesquisa acontecesse, o professor Adair do LANDI, a professora Elena da Patologia Bucal e o professor Luismar da EQA.

A todos meus colegas de pós-graduação Ernesto, João, Gunther, Ivan, Bernardo, Artur, Juan, Maurício, Gil, Carol, Leticia, Daniel Espanhol, Camilo Colombiano e o Jair Mexicano, juntos trabalhamos, aprendemos e nos divertimos. Também aos colegas Raí, Manuela e Orestes, que me ajudaram no projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que participaram da minha histórica acadêmica, a qual eu relatei anteriormente, professores e colegas, MUITO OBRIGADO! Sem vocês eu não teria conseguido chegar aqui.

Ao CEPID, que nos últimos anos foi minha segunda casa.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade de aprendizado e contribuição para a minha formação profissional.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!!!

Minha energia é o desafio,
minha motivação é o impossível,
e é por isso que eu preciso ser,
à força e a esmo,
inabalável.

Augusto Branco

PRADO, A. M. Comparação entre enxerto gengival livre e enxerto de fibroblastos de cultura primária suplementada com plasma rico em plaquetas: estudo em ratos 2019. 143p. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração: Implantodontia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta cicatricial de ratos a enxerto de fibroblastos gengivais provenientes de cultura primária suplementada com PRP e semeados em matriz de celulose bacteriana (MCB) e matriz dérmica acelular humana (MDA - Surederm®). Inicialmente foi realizada uma cirurgia de remoção de um pequeno explante de tecido conjuntivo/epitelial da mucosa oral de rato. Logo em seguida, foi realizada a técnica de obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Então, se realizou a cultura primária de fibroblastos em meio suplementado com PRP, substituindo o Soro Fetal Bovino. Depois de estabelecida a cultura celular, as células foram semeadas nas matrizes e somente então se iniciaram os procedimentos cirúrgicos. Foram realizados defeitos cirúrgicos na mucosa jugal dos ratos com um bisturi circular. Os ratos foram divididos em 06 grupos: I-controle negativo (apenas criação do defeito); II-controle positivo (enxerto gengival livre obtido do palato); III-MCB; IV-fibroblastos em MCB; V-MDA; VI-fibroblastos em MDA. Quinze dias após as cirurgias de enxertia, foram realizadas avaliações clínicas, verificando a regularidade do epitélio e a presença de úlcera, rubor e edema. Foi realizada a biópsia da área operada. Foram obtidos cortes histológicos para coloração em Hematoxilina e Eosina e para realização da técnica imunohistoquímica com os anticorpos anti- α -SMA (marcador de miofibroblastos), e PAN-Cytokeratin (marcador de células epiteliais). A avaliação histológica considerou se ocorreu a reepitelização completa da área operada e classificou o novo epitélio em fino ou regular, com cristas epiteliais e/ou queratina. Também se realizou a contagem de vasos sanguíneos, células inflamatórias e miofibroblastos. O número de células foi obtido dentro de uma mesma área e classificado em leve, regular ou intenso, e uma análise estatística pelo teste exato de Fisher foi realizada. Os resultados clínicos demonstraram que os grupos testados não apresentaram úlcera e apresentaram epitélio regular, sem rubor e sem edema. Os resultados histológicos demonstraram que estes grupos apresentaram um epitélio regular com cristas epiteliais e queratina, com miofibroblastos presentes

no tecido conjuntivo. A técnica de engenharia tecidual realizada obteve resultados clínicos e histológicos semelhantes à técnica de enxerto gengival livre. A cultura primária de fibroblastos suplementada com PRP além de favorecer o processo de cicatrização, viabiliza a técnica para utilização em humanos. As duas matrizes testadas podem ser usadas como arcabouço celular, sendo a MDA a matriz mais indicada em enxertos gengivais livres.

Palavras-chave:

Cultura primária de fibroblastos; enxerto gengival livre; matriz celulose bacteriana; matriz dérmica acelular.

Comparison between free gingival graft and primary culture fibroblasts supplemented with platelet-rich plasma: study in rats

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate in vivo the healing response of rats grafted with gingival fibroblasts from primary culture, seeded in bacterial cellulose matrix (MCB) and human acellular dermal matrix (MDA - Surederm ®). Initially, surgery was performed to remove a small connective / epithelial tissue explant from the oral mucosa of the rat. Soon after, the technique of obtaining the Rich Plasma in Platelet (PRP) was carried out. Then, the primary culture of fibroblasts was performed in medium supplemented with PRP, replacing Fetal Bovine Serum. After the cell culture was established, the cells were seeded in the matrices and only then the surgical procedures began. Surgical defects were performed in the oral mucosa of the rats with a circular scalpel. The rats were divided into 6 groups: I-negative control (defect creation only); II-positive control (free gingival graft obtained from the palate); III-MCB; IV-fibroblasts in MCB; V-MDA; VI-fibroblasts in MDA. Fifteen days after the grafting surgeries, clinical evaluations were performed, evaluating the regularity of the epithelium and the presence of ulcer, flushing and edema. The biopsy of the surgical area was performed. Histological sections were obtained and stained with Hematoxylin and Eosin; and immunohistochemically with anti- α -SMA antibody (myofibroblast marker), and PAN-Cytokeratin (epithelial cell marker). The histological evaluation considered whether a complete reepithelialization of the operated area occurred and then classified the new epithelium as thin or regular, with epithelial ridges and/or keratin. Counting of blood vessels, inflammatory cells and myofibroblasts was also performed. The number of cells was obtained within the same histological area and classified as mild, regular or intense, and a statistical analysis applying Fisher exact test was performed. Clinical results showed that the tested groups had no ulcer and had regular epithelium, no flushing and no edema. Histological results demonstrated that these groups had a regular epithelium with epithelial ridges and keratin and with myofibroblasts present in the connective tissue. The performed tissue engineering technique obtained clinical and histological results similar to the free gingival graft technique. The primary culture of fibroblasts supplemented with PRP besides favoring the cicatrization process, allows the technique for use in humans. The

two matrices tested can be used as a cellular scaffold, MDA being the most indicated matrix in free gingival grafts.

Keywords:

Primary Culture of fibroblasts; free gingival graft; bacterial cellulose matrix; acellular dermal matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Triângulo da Engenharia de tecidos

Figura 2 - Animal posicionado sobre a mesa cirúrgica.

Figura 3 - Imagem de microscópio de fase invertida do explante de fibroblastos proliferando sobre a placa

Figura 4 - Membrana de Celulose Bacteriana MCB (InteLAB - UFSC)

Figura 5 - Defeito criado em mucosa jugal direita

Figura 6 - Ilustração do enxerto gengival livre proveniente do palato.

Figura 7 - Amostra após a biópsia

Figura 8 - Macroscopia: corte da peça histológica

Figura 9 - Fotos da área operada após 15 dias da cirurgia

Figura 10 - Lâminas histológicas e imunohistoquímica

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1 - Atividade metabólica dos fibroblastos de gengiva de rato

Tabela 1 - Descrição dos grupos com o número de sítios operados

Tabela 2 - Resultados da avaliação clínica dos grupos

Tabela 3 - Resultados da avaliação histológica dos grupos

Tabela 4- Resultados da avaliação imunohistoquímica dos grupos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MDA - Matriz dérmica acelular

MBC - Membrana de Celulose bacteriana

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

HE - Hematoxilina e Eosina

IL - Interleucina

LANDI - Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação

LP - Ligamento Periodontal

MEC - Matriz Extracelular

NGF - Fator de crescimento neural

O₂ - Oxigênio

pH - Potencial hidrogeniônico

PRP - Plasma rico em plaquetas

SFB - Soro Fetal Bovino

TNF - Fator de necrose tumoral

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

HAp - Hidroxiapatita

SUMÁRIO

Capítulo I	1
INTRODUÇÃO	23
REVISÃO LITERATURA	25
OBJETIVOS	56
METODOLOGIA.....	56
RESULTADOS.....	68
DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	95
PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	96
Capítulo II	99
ARTIGO CIENTÍFICO	100
MANUSCRIPT	123

Capítulo I

INTRODUÇÃO

O sucesso em longo prazo e estabilidade na função e estética em interfaces de dentes e implantes está diretamente correlacionado com a presença de tecido mole saudável ao redor dos mesmos. A ausência de tecido queratinizado pode facilitar agregação de placa bacterina ao redor de dentes e implantes, além de levar à recessão da margem gengival em regiões estéticas. O periodonto mais espesso é menos propenso a essas reações, estendendo-se também para os implantes dentários, onde afirma-se que a presença de gengiva está fortemente correlacionada com saúde ideal dos tecidos moles e duros (KENNEDY et al., 1985; WENNSTROM et al., 1983).

Hoje em dia, os implantes funcionalmente carregados em um estado adequado de saúde e estética tornaram-se um pré-requisito para o sucesso a longo prazo de restauração do implante, sendo cada vez mais preocupante a necessidade do tecido queratinizado ao redor do implante para manter estabilidade e saúde do tecido (BLOCK et al., 1990).

Com o objetivo de melhorar tanto o volume de tecido queratinizado quanto o contorno dos tecidos moles em torno de dentes e implantes, vários procedimentos foram desenvolvidos. Enxertos autógenos utilizando enxerto gengival livre e enxerto de tecido conjuntivo têm sido amplamente usados com bons resultados clínicos (CANEVA et al., 2013).

Com o passar dos anos, aumentou-se a procura pela descoberta de um meio adequado de substituição tecidual que não necessitasse de uma segunda área doadora. Esta tentativa deve-se ao fato de que alguns inconvenientes podem estar relacionados à necessidade de uma segunda cirurgia. Conforme citado por Coura, G. (2004) a área doadora pode apresentar desde uma própria limitação tecidual, até o desenvolvimento de cicatrizes e áreas de hemorragia que podem levar a morbidade e desconforto pós-operatório, isso podendo ser bastante prejudicial ao paciente.

Como alternativa a esses procedimentos que demandam um sítio doador, gerando morbidade e desconforto ao paciente, tem-se algumas opções de materiais alogênicos, como a matriz dérmica acelular, inicialmente usada para cobrir queimaduras e depois introduzida para aumentar mucosa queratinizada. No entanto, a celulose bacteriana, que também vem sendo utilizada na medicina para uma série de indicações, na odontologia é aplicada para recuperação de tecido periodontal (GALGUT, 1990), tornando-se uma alternativa potencial

para necessidade de ganhos de tecido mole ao redor de dentes e implantes.

Langer et al., 1993 alavancaram o tema de engenharia tecidual com o objetivo de regenerar tecidos perdidos, porém, só posteriormente os estudos foram levados à área da Odontologia na tentativa de restabelecer esses tecidos. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de verificar qual o melhor biomaterial a ser utilizado para armazenar células e fatores de crescimento, podendo possibilitar a regeneração almejada.

Para a utilização destes materiais de origem alógena, e objetivando o restabelecimento de tecido mole periodontal (gengiva e ligamento periodontal), faz-se necessária a aquisição de células adequadas para tal (COURA et al., 2005). Os fibroblastos gengivais são fundamentais na produção e manutenção do ligamento periodontal (TEN CATE, 1989), portanto, são as células mais adequadas para estudos e testes *in vitro* visando um arcabouço ideal para a reconstrução dos tecidos moles periodontais.

Bem como demonstrado por Pini Prato et al. (2003), fibroblastos cultivados sobre uma matriz de ácido hialurônico resultaram em grande sucesso quando a membrana foi transportada ao sítio receptor do paciente. Pode-se observar clinicamente o restabelecimento de mucosa ceratinizada e posteriormente houve confirmação histológica e sucesso dos testes.

Conforme citado por Neto (2010, p.25) os arcabouços devem apresentar algumas características específicas para que seu funcionamento se dê de maneira adequada: resistência mecânica para a adesão celular, biocompatibilidade e reabsorção pelo organismo sem causar qualquer tipo de alteração, porosidade para o estabelecimento da cultura celular, possibilitar adesão e multiplicação celular e, finalmente, serem capazes de carrear fatores de crescimento.

Simplificadamente e corroborando com a proposição de Ueda et al. (2000), uma tríade deve ser estabelecida para a produção de um tecido *in vitro*, que assim se define: (1) cultivo celular adequado, (2) fatores de crescimento para guiar a proliferação e vascularização e (3) um arcabouço celular biocompatível (MUSCHLER; NAKAMOTO; GRIFFITH, 2004)

A partir dessa análise, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* a resposta cicatricial de ratos a enxerto de matriz de celulose bacteriana (MCB) e de matriz dérmica acelular (MDA) associada à cultura primária de fibroblastos suplementada com Plasma Rico em Plaquetas (PRP).

REVISÃO LITERATURA

REPARO E REGENERAÇÃO

O processo de fechamento de uma lesão pode se dar por duas vias: a regeneração ou o reparo. A regeneração consiste em uma resposta na qual o tecido neoformado recapitula totalmente a arquitetura tecidual após a ocorrência de uma lesão, com a manutenção das propriedades mecânicas e funcionais. Esse processo ainda é pouco compreendido, porém ocorre em alguns organismos eucariontes, como salamandras, insetos, poríferos e equinodermos (GURTNER *et al.*, 2008; REINKE; SORG, 2012). Nos mamíferos há relatos escassos de processos de regeneração, porém, no ano de 2012, foi demonstrada pela primeira vez a capacidade de autotomia de pele em mamíferos (murinos *Acomys*) e a posterior regeneração total deste tecido (SEIFERT *et al.*, 2012).

Em humanos, um dos poucos processos regenerativos conhecidos ocorre nas falanges dos dedos após amputação, sendo esse processo mais frequente em crianças (SHIEH; CHENG, 2015). Curiosamente, o processo de regeneração de pele é descrito nos humanos apenas em fetos de até 24 semanas. Após esse período ocorre somente o processo de reparo tecidual (LARSON; LONGAKER; LORENZ, 2010; LO *et al.*, 2012; YATES; HEBDA; WELLS, 2012).

O processo de reparo consiste em fechar as lesões por meio da formação de cicatrizes. Cicatrizes consistem em um aglomerado de matriz extracelular (MEC) desorganizada e, apesar de fecharem a lesão, não reconstituem características essenciais dos tecidos. No caso da pele, por exemplo, cicatrizes frequentemente apresentam ausência de elasticidade, folículos pilosos, glândulas, terminações nervosas e pigmentação (REINKE; SORG, 2012). Especula-se que a formação de um tecido cicatricial, em detrimento de um processo de regeneração, tenha surgido evolutivamente conferindo uma vantagem ao prevenir infecções por microrganismos nas feridas e evitar maiores deformações mecânicas ao tecido lesado (GURTNER *et al.*, 2008).

FASES DO REPARO TECIDUAL

O reparo de lesões cutâneas consiste em uma série gradual de eventos altamente complexos, que envolvem interações entre moléculas de MEC, mediadores solúveis, células residentes do tecido e do sistema imune, entre outros (SCHULTZ *et al.*, 2011). O processo de reparo é dividido didaticamente em três fases que se sobrepõem no tempo e no

espaço: inflamação, proliferação e remodelamento, as quais serão descritas a seguir.

Fase Inflamatória

A inflamação inicia imediatamente após a lesão. Nesta fase, componentes da cascata de coagulação, vias inflamatórias e o sistema imune, previnem infecções, perda de sangue e fluidos, além de removerem células mortas. As plaquetas, atraídas para a lesão, inibem a perda de fluidos, se agregam formando um coágulo e liberam compostos que atraem células do sistema imune (neutrófilos, macrófagos e mastócitos). A degranulação das plaquetas estimula a formação de um trombo de fibrina, o qual impede a hemorragia e acumula fatores secretados pelas plaquetas e células do sistema imune. Além disso, serve como um arcabouço para a migração de células inflamatórias e epiteliais (GURTNER et al., 2008; REINKE; SORG, 2012)

Fase Proliferativa

A fase proliferativa tem início dois dias após a lesão, persistindo por até dez dias, e consiste na formação de um novo tecido. Nessa fase ocorre a reepitelização da ferida, a formação do tecido de granulação e a angiogênese. Primeiramente, os queratinócitos das bordas das feridas migram sobre o tampão de fibrina e, juntamente com as células-tronco dos folículos e glândulas sebáceas próximas, auxiliam no processo de reepitelização (GURTNER et al., 2008).

Nesta fase ainda, ocorre a formação do tecido de granulação, com alta densidade de fibroblastos, granulócitos, macrófagos, capilares e feixes de colágeno desorganizado, substituindo o tampão de fibrina. Os fibroblastos desse tecido produzem colágeno e outras substâncias da MEC (fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e ácido hialurônico). A MEC serve como um arcabouço para adesão celular, além de regular crescimento, movimento e diferenciação celular na área lesada (SCHULTZ et al., 2011).

A angiogênese ocorre através da produção de fatores de crescimento, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), bFGF (fator de crescimento de fibroblastos básico) que estimulam a degradação da MEC, permitindo a proliferação e migração de células endoteliais para a vascularização da ferida.

Em etapas mais tardias da fase proliferativa, os fibroblastos presentes nas bordas da lesão se diferenciam em miofibroblastos (células contráteis que tendem a fechar a ferida), que são responsáveis pelo processo de retração. Os fibroblastos ainda interagem com miofibroblastos e produzem MEC, em sua maioria formada por colágeno, que constitui a maior parte da cicatriz madura. Também há possibilidade de marcar as proteínas da MEC, como a fibronectina e a tenascina (OPALENIK; DAVIDSON, 2005).

Fase de remodelamento

O terceiro estágio – remodelamento - tem início 2 ou 3 semanas após a lesão e pode durar mais de um ano. Nesta fase, a maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos presentes na ferida entram em apoptose, deixando uma massa de MEC com poucas células e muito colágeno do tipo III. Finalmente, ao longo de seis a doze meses essa MEC é remodelada com o auxílio de metaloproteinases de matriz (MMP) secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, e o colágeno III é substituído por colágeno I. Atualmente, mais de 20 tipos diferentes de MMPs humanas foram identificadas, as quais são classificadas em 5 grandes grupos de acordo com a especificidade do substrato e a sua homologia interna: collagenases, gelatinases, estromelisinases, tipo-membrana e outras, incluindo a matrilisina.

IMPORTÂNCIA DA MUCOSA CERATINIZADA

Após a extração de um determinado elemento dental, ocorre a reabsorção de tecido ósseo e gengiva queratinizada circundante, podendo ocorrer deficiência na mucosa durante a colocação de um implante subsequente, havendo assim a necessidade de criação de um tecido conjuntivo denso em torno do implante (SCHROEDER et al, 1981; BRÅNEMARK et al, 1969).

Warrer e colaboradores (1995) realizaram um estudo com macacos onde se verificou que a deficiência em mucosa queratinizada ao redor de implantes demonstrou mais recessão dos tecidos moles e uma maior perda de inserção. Segundo Mombelli (2000) a boa higiene bucal é um fator importante na manutenção da saúde peri-implantar e redução do risco de doença peri-implantar. Askin e colaboradores (2015) mostraram que o grupo com estreita mucosa queratinizada teve melhora significativa no índice de placa após o procedimento de enxertia gengival.

De acordo com Salvi e Lang (2004), os parâmetros clínicos comumente usados para monitorar o estado do tecido mole peri-implantar são inflamação dos tecidos moles peri-implantares, recessão do tecido marginal, profundidade de sondagem e nível de inserção. Os sinais clínicos de sangramento à sondagem, recessão da mucosa, aumento da profundidade de sondagem e perda de nível de inserção estão sempre presentes em peri-implantantites (WHEITZ-MAYFIELD, 2008).

Segundo Bouri Jr e colaboradores (2008) os locais de mucosa queratinizada estreita ao redor de implantes (<2mm) tiveram uma chance significativamente maior de hemorragia do que locais com ampla mucosa queratinizada (>2mm). Porém estudos de Kim e colaboradores (2009) apontaram que houve diferença insignificante de sinais de inflamação entre os grupos de mucosas queratinizadas estreitas e largas, onde a quantidade da mucosa queratinizada tem pouca influência sobre a inflamação na presença de uma boa higiene oral.

Estudos realizados por Kim e colaboradores (2009) apontaram que a quantidade de recessão gengival aumentou significativamente nos locais de implante com estreita mucosa queratinizada. Além da mucosa queratinizada, o biótipo dos tecidos moles, o nível da crista óssea, a profundidade da plataforma do implante e a posição vestibular do implante influenciam no nível de recessão gengival (ZIGDON; MACHTEI, 2008). Uma mucosa queratinizada, onde proporciona um colar de tecido conjuntivo denso, pode estabelecer uma vedação mais eficiente do tecido mole em torno dos implantes (MOON et al, 1999). Implantes com faixa mais ampla da mucosa queratinizada apresentaram uma maior média de profundidade de sondagem do que aqueles com faixa estreita de mucosa, onde consideraram que a sondagem mais rasa nas mucosas mais estreitas pode estar relacionada com a recessão dos tecidos moles, logo menos formação de bolsa pode ser mais comum em áreas de menor quantidade de mucosa queratinizada (ADIBRAD; SHAHABUEI, SAHABI, 2009).

Em relação à influência da mucosa queratinizada sobre o estado do tecido ósseo, Adibrad e colaboradores (2009) não observaram diferença significativa na perda de crista óssea entre os grupos de mucosas queratinizadas estreitas ou largas. No entanto, Bouri Jr e colaboradores (2008) avaliaram maior perda óssea média para os implantes com estreita faixa de mucosa queratinizada. O nível ósseo em torno dos implantes é afetado por múltiplos fatores, incluindo tabagismo, desenho do implante, qualidade e quantidade do tecido celular circundante, procedimentos cirúrgicos, carga oclusal, bem como

outros fatores, sendo difícil tomar conclusões do efeito da mucosa peri-implantar no nível ósseo peri-implantar (CHUNG et al, 2007).

ENXERTO GENGIVAL LIVRE

A utilização de um enxerto de tecido mole livre é indicada por exigências estéticas com o propósito de estabelecer uma harmonia em relação à saúde, altura, volume, cor e os contornos da gengiva com a denteção circundante, além de casos onde exista a dificuldade de remoção de placa bacteriana de forma eficiente ao redor de dentes e implantes cercados por mucosa fina, resultando em recessão. Controlar a inflamação do tecido é necessário para manter os níveis de fixação, apesar da largura dos tecidos queratinizados circundantes (DORFMAN; KENNEDY; BIRD, 1982).

Quando o objetivo consiste em somente aumentar a quantidade de tecido queratinizado, a técnica mais adequada permanece em enxerto gengival livre, quando também é desejada cobertura de raiz exposta, enxerto de tecido conjuntivo fornece resultados mais previsíveis (JAHNKE et al, 1993). O enxerto gengival livre autógeno pode ser dividido de acordo com a espessura do tecido doador em 3 categorias: Fina (0,5-0,8mm), média (0,9-1,4mm) e grossa (1,5 a >2mm). O enxerto fino oferece melhor combinação de cores, cura mais rapidamente, tem área doadora rasa, porém deve ser evitada sobre superfície radicular exposta (SULLIVAN; ATKINS, 1968). O enxerto de espessura média é indicado para todos os tipos de enxertia, menos para cobertura de raiz, a área doadora é mais profunda, o que pode causar mais complicações após a cirurgia. O enxerto gengival livre grosso pode ser usado para cobrir superfícies de raízes expostas, são mais resistentes a futuras recessões, porém têm aparência estética menos favorável por causa da cor e espessura incompatíveis com a gengiva adjacente.

Entre as possíveis indicações para o uso de enxerto gengival livre está aumento de dimensões gengivais, eliminação de freio, aumento da profundidade vestibular, melhoria de fatores anatômicos locais associados com a posição dos dentes, raízes proeminentes com deiscência e estabilização de recessão gengival progressiva (LANGER; CALAGNA, 1978). Apesar de sua capacidade de cobertura de raiz, o enxerto gengival livre não é adequado para áreas com exigência estética, pois o tecido enxertado mantém as características do seu local doador, podendo afetar a estética da região (KARRING; OSTERGAARD; LOE, 1971).

Bengazi (2013) realizou um estudo em cachorros onde analisou as alterações dimensionais em implantes orais seguinte de colocação de enxerto gengival livre em mucosa unicamente alveolar. Concluiu que o aumento da espessura da mucosa alveolar por meio de enxerto gengival livre em regiões sem mucosa queratinizada foi semelhante aos resultados dos implantes cercados com mucosa mastigatória, reduzindo a reabsorção esperada na crista óssea marginal e recessões gengivais.

Segundo Camargo (2000) existem duas situações clínicas em que o enxerto gengival livre tem vantagens sobre o enxerto conjuntivo subepitelial para cobertura de raiz, onde ambas têm a necessidade de um aumento na dimensão gengival apicocoronal. A primeira situação corresponde a zonas que apresentam diminuição da profundidade vestibular, onde utilizando enxerto gengival livre tem-se resultados mais favoráveis, assegurando o desenvolvimento de uma faixa adequada de gengiva em anexo. A segunda situação é quando se deseja cinco milímetros de tecido queratinizado para evitar a recessão nas áreas onde uma restauração com margens subgengivais está prevista. Problemas incluindo a cobertura das superfícies das raízes expostas anteriormente pode ser alcançado pelo enxerto gengival livre, pois permite um grande aumento apicocoronal da mucosa queratinizada.

ENGENHARIA TECIDUAL

A busca por uma regeneração tecidual de forma artificial foi sempre visada, objetivando, principalmente, uma menor morbidade do paciente quando submetido a uma cirurgia de enxertia. Inicialmente conceituado por Langer e Vacanti no ano de 1993, o termo “engenharia tecidual” vem cada vez mais sendo utilizado na área da saúde e tem como premissa a criação de materiais de origem artificial que contenham células, matrizes (“scaffolds”) e fatores de crescimento, para a utilização como substituto tecidual (LANGER E VACANTI, 1993). Estes elementos geralmente são representados com um triângulo, visto que a ausência de uma das pontas impede o estabelecimento e sucesso do biomaterial (LYNCH et al., 1991).

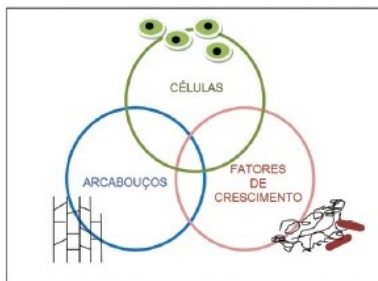


Figura 1 - Triângulo da Engenharia de tecidos

Segundo Ueda et al. (2000), os elementos necessários para a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos estão baseados na tríade: (1) cultivo de células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos, células-tronco, entre outras); (2) matrizes (arcabouços ou “scaffolds”) confeccionadas em colágeno, osso ou polímeros sintéticos e; (3) adição de mediadores solúveis, como fatores de crescimento e adesinas. As matrizes podem ter várias origens, como os polihidroxialcanoatos, o ácido polilático, ácido poliglicólico, policaprolactona (PEGO et al., 2003), hidrogéis à base de colágeno, polissacarídeos, ou ambos, tais como o alginato e a quitosana (LEE et al., 2000; PIEPER et al., 1999). As matrizes devem apresentar integridade estrutural para que novos tecidos se desenvolvam (LEE et al., 2000; STAMMEN et al., 2001).

A engenharia tecidual caracteriza-se pelo desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos para o restabelecimento da função de partes do corpo injuriadas ou defeituosas. Atualmente, concomitante aos avanços associados na medicina de transplantes, genética, engenharia biomédica e na engenharia de órgãos, a engenharia tecidual oferece a possibilidade de regeneração verdadeira, essencial para as estruturas humanas danificadas (ASSAEL, 2003). Dessa forma, as estratégias da engenharia tecidual, através do cultivo celular humano para aplicação clínica, estão sendo desenvolvidas em diferentes especialidades médicas para reposição de cartilagens, ossos, componentes cardiovasculares e pele (MALEKZADEH et al., 1998). A engenharia tecidual vem se mostrando mais presente e necessária no que diz respeito a reparo, substituição e regeneração de tecidos, aplicando princípios básicos de química, física e biologia às necessidades da medicina e odontologia (MUSCHLER; NAKAMOTO; GRIFFITH, 2004). A busca por técnicas minimamente invasivas - como é o caso da periodontia e implantodontia - fez com que a engenharia tecidual evoluísse de tal maneira, que apesar de suas limitações ainda existentes,

tecnologias de ponta vêm sendo aplicadas na busca da inovação e descoberta de novos biomateriais (IWATA, 2013).

Ueda et al. (2000) reafirmam a necessidade da tríade de elementos - células, arcabouços ou matrizes e mediadores (como os fatores de crescimento), como pré-requisitos para o sucesso de um biomaterial, este que, na maioria das vezes é derivado de polímeros biodegradáveis de origem sintética ou natural (RAI et al., 2007). Estas matrizes, também denominadas em inglês “scaffolds” devem se apresentar íntegras para que os tecidos se desenvolvam (LEE et al., 2000).

Usualmente a engenharia de tecidos busca realizar testes *in vitro* com a utilização de células capazes de se diferenciar em outros tipos celulares, como acontece com os osteoblastos e células do ligamento periodontal, os fibroblastos (LIN et al., 2008). Como alternativa às cirurgias de remoção de tecido autógeno para enxertia de tecido mole, testes com fibroblastos vêm sendo realizados pois são células capazes de serem cultivadas sobre matrizes biocompatíveis e essa associação é passível da utilização como substituto tecidual (PINI PRATO et al., 2000).

Apesar das dificuldades de estudos *in vitro* devido à necessidade de se obter um meio asséptico de trabalho e de pesquisadores treinados para a realização dos testes, há uma facilidade de padronização da cultura celular pois fatores como temperatura, pH, pressão osmótica, tensão de CO₂ e O₂ conseguem ser controlados precisamente. Além disso, o custo para realização deste tipo de estudo é baixo, o que permite o acesso facilitado à pesquisa (FRESHNEY, 1990).

A engenharia tecidual aponta para o reparo de tecidos e órgãos danificados, porém, não causa respostas imunológicas ou infecções, não necessita do uso de cadáveres e, principalmente, não mutila outras regiões do paciente. O cultivo de células é normalmente realizado em placas ou garrafas contendo meios de cultura que fornecem nutrientes para a viabilidade celular, *in vitro*. A dificuldade de transporte das células para um sítio receptor de um ser humano baseia-se no aspecto bidimensional que caracteriza a cultura, devido as células propagadas formarem uma monocamada nas placas ou garrafas de culturas. Os carreadores, que fornecem um aspecto tridimensional para cultura e proliferação celular, têm sido utilizados para apoio e invasão dos fibroblastos (ZACCHI et al., 1998).

O cultivo de fibroblastos em matrizes biocompatíveis pode ser uma opção nas terapias periodontais e periimplantares, que necessitam

de aumento de tecido gengival. Grande parte dos procedimentos cirúrgicos periodontais e perimplantares reconstrutivos necessita de áreas doadoras intrabucais de tecido mole, com a remoção de tecido doador do palato, áreas edêntulas, túber ou ambas. Tais procedimentos resultam em um pós-operatório doloroso e aumento do tempo cirúrgico (PINI PRATO et al., 2000).

A reposição do aparato periodontal através do cultivo celular mostra-se promissora. Pini Prato et al. (2000) relataram o caso de uma paciente que necessitou de procedimento cirúrgico periodontal para reposição de mucosa queratinizada previamente à reabilitação protética. Essa deficiência foi tratada por meio de técnicas de engenharia tecidual, que compreenderam o cultivo primário de fibroblastos, a partir da remoção cirúrgica de uma biópsia gengival de aproximadamente 2mm². Esses fibroblastos foram cultivados em uma matriz, uma membrana de ácido hialurônico, que foi transportada para o sítio receptor da paciente. Os autores conseguiram êxito na obtenção de mucosa queratinizada, confirmado através de análise macroscópica e histológica. Portanto, a possibilidade de obtenção de tecido através da cultura de células, *in vitro*, com utilização de carreadores pode diminuir o trauma e o tempo cirúrgico. Pini Prato et al. (2003) relataram o sucesso da técnica em 6 pacientes tratados através da engenharia de tecidos.

Lauer e Schimming (2001) apresentaram em seu trabalho a utilização de enxertos de mucosa oral através da engenharia de tecidos, utilizando-se células provenientes do palato duro. O estudo apresentou os resultados clínicos dos procedimentos cirúrgicos de enxertia de mucosa oral em vestíbulo após ressecção tumoral em 6 pacientes. Concluíram, a partir de evidências clínicas e imuno-histológicas, que o enxerto autógeno de mucosa oral, obtido por meio de engenharia de tecidos, pode ser utilizado para a cobertura de feridas na cavidade oral.

Cicatrização tecidual completa e diferenciação epitelial normal puderam ser observadas na área enxertada em um período pós-cirúrgico de 6 meses. Bordner e Grossman (2003) relataram o sucesso do uso de enxertos de mucosa em 11 pacientes, por meio de culturas autólogas de células da mucosa oral. Após 3 (três) semanas da colocação dos enxertos de mucosa cultivada, os sítios apresentaram-se ceratinizados e sem sinais de infecção. Foi encontrada uma mucosa saudável depois de 3 (três) meses. Os autores concluíram que os enxertos de mucosa cultivada são úteis em grandes defeitos da mucosa oral, principalmente após as patologias.

A aplicação de enxertos de mucosa oral gerada, *in vitro*, em defeitos da cavidade oral (LANGDON et al., 1991), em cirurgias periimplantares (UEDA et al., 1998), em procedimentos protéticos (BODNER; GROSSMAN, 2001) e em vestibuloplastias (RAGHOEBAR et al., 1995) tem sido utilizada com sucesso.

CULTURA CELULAR

A cultura de tecidos foi desenvolvida no início do século passado (HARRISON, 1907; CARREL, 1912) como um método para estudo do comportamento das células animais, eliminando as possibilidades de variações sistêmicas que podem acontecer em um estado fisiológico normal ou em condições de estresse, oriundas de um experimento. A técnica foi elaborada inicialmente através da fragmentação de tecidos, crescimento e migração celular ao redor dos fragmentos por meio de mitoses celulares.

O termo cultura de tecidos foi usado de uma maneira abrangente; no entanto, a cultura de tecidos inclui a cultura de órgãos e de células. A cultura de órgãos implica em uma cultura tridimensional de tecidos desagregados que permanece com algumas ou todas as características histológicas daquele tecido, *in vivo*. A cultura celular refere-se às culturas derivadas pela dispersão de células retiradas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular, pela desagregação enzimática, mecânica ou química. O termo cultura histotípica refere-se às células associadas em uma estrutura tridimensional, ou seja, o crescimento de uma monocamada celular, a agregação em suspensão ou a infiltração em uma matriz tridimensional, como o gel de colágeno. O termo organotípico implica nesses mesmos procedimentos, porém, utiliza células recombinantes de diferentes linhagens.

Desde o início do século XX o estabelecimento de culturas celulares e teciduais foram introduzidas como meios de análise do comportamento de células verificando suas interações, diferenciações e mecanismos de ação (FERREIRA, 2003). Para o cultivo celular, muitos estudos optam por realizar um cultivo primário de células que é aquele estabelecido a partir do crescimento de células provenientes do fragmento de tecido estudado e é amplamente utilizada em testes *in vitro* pois suas características fenotípicas e genotípicas se mantêm, caracterizando o tecido em questão por um período de tempo, antes de ocorrer a apoptose. Para o estabelecimento da cultura primária e das

linhagens subseqüentes são necessárias condições ideais de cultivo com suplementações (FRESHNEY, 2000).

O estabelecimento da subcultura normalmente irá implicar em subdivisão celular por meio do processo de tripsinização de modo que elas possam se soltar da base do frasco de cultura e assim serem transportadas para outro frasco para o crescimento celular. As subculturas consequentes são necessárias quando o crescimento celular ultrapassa a quantidade de substrato presente (FERREIRA, 2003).

Para que as características sejam replicadas e as células se mantenham vivas e viáveis para pesquisas *in vitro*, linhagens celulares contínuas são estabelecidas e as passagens celulares podem ser realizadas até oitenta vezes com chance destas células manterem seus aspectos iniciais. Contudo, estudos com fibroblastos demonstram que após a 5^a passagem estas culturas se estabilizam e assim permanecem até a 35^a passagem e de acordo com o estudo realizado por Kent et al. (1996) a viabilidade dos fibroblastos permaneceu acima de 90% até a 7^a passagem, enquanto nas passagens posteriores já era percebido o declínio da taxa, que na 10^a passagem já representava 87%.

Harrison (1907) escolheu os xenopus como fonte de tecidos, provavelmente por apresentarem sangue frio, assim, a incubação não seria um requisito necessário. Adicionalmente, a regeneração tecidual é mais comum em pequenos vertebrados e isso poderia ser vantajoso em estudos, *in vitro*. Embora essa técnica pudesse reluzir uma nova perspectiva de interesse nos estudos de cultura de tecidos, *in vitro*, poucos pesquisadores seguiram esse exemplo na seleção de espécies. A ciência médica interessava-se por animais de sangue-quente, pois o desenvolvimento de processos fisiológicos e patológicos estaria mais próximo do ser humano. A acessibilidade de diferentes tecidos, que se comportavam bem em culturas, fez com que o embrião de galinha fosse o material de escolha, porém, o desenvolvimento de animais experimentais, em especial os roedores geneticamente puros, levou essa espécie à vanguarda da cultura de tecidos. Enquanto os embriões de galinhas poderiam prover uma diversidade de tipos celulares em culturas primárias, os tecidos de roedores possuíam a vantagem de fornecer linhagens celulares contínuas (EARLE, 1943).

O desenvolvimento da tecnologia transgênica de ratos (PEAT et al., 1992), concomitante a uma experiência genética bem estabelecida, difundiu o uso de roedores geneticamente puros. A demonstração de que tumores humanos poderiam também dar origem a linhagens celulares contínuas, como as linhagens do tipo celular HeLa (GEY; COFFMAN; KUBICEK, 1952), aumentou o interesse em cultura de tecidos humanos.

O desenvolvimento da cultura de tecidos humanos ocorreu devido à necessidade de dois ramos extremamente importantes na pesquisa médica: a produção de vacinas antivirais e o entendimento de neoplasias.

O estudo, *in vitro*, com cultura de células é utilizado devido à facilidade de padronização da amostra, pois o pH, a temperatura, a pressão osmótica, a tensão de CO₂ e O₂ podem ser controlados de maneira precisa. A caracterização e homogeneidade da amostra com culturas celulares idênticas, além da economia no custo de reagentes que são utilizados em menor quantidade, são vantagens desse tipo de estudo. As desvantagens são a necessidade de um ambiente de trabalho asséptico e de treinamento do pesquisador (FRESHNEY, 1990).

A tecnologia de cultura de tecidos foi adotada em muitas situações rotineiras, por exemplo: a análise cromossômica de células derivadas do útero pode revelar desordens genéticas na criança que ainda está por nascer, infecções virais podem ser avaliadas quantitativamente e qualitativamente em cultura de células apropriadas do hospedeiro, efeitos tóxicos de fármacos e poluentes ambientais podem ser avaliados, etc. Desse modo, a cultura celular é uma tecnologia indispensável nos ramos das ciências biológicas, pois, fornece as bases para o estudo da proliferação celular, diferenciação e formação de produtos em condições cuidadosamente controladas.

Outras aplicações da cultura de tecidos incluem a cultura de células da epiderme (GREEN; KEHINDE; THOMAS, 1979) e células endoteliais formadoras de capilares (FOLKMAN; HAUDENSCHILD, 1980), além do uso de enxertos autógenos e cirurgias reconstrutivas utilizando as células do próprio paciente (BURT et al., 1989). Indica-se, em alguns casos de queimaduras, realizar uma biópsia da derme do paciente, propagar essas células em uma cultura primária e enxertar essas células cultivadas em matrizes tridimensionais nas áreas mais afetadas pelas queimaduras (BOYCE; HANSBROUGH, 1988).

Na área odontológica, um grande número de estudos experimentais sobre efeitos adversos extraídos dos materiais dentários foi publicado nas décadas de 50, 60 e 70. Nesse período, duas principais correntes na literatura podem ser distinguidas, uma conduzia estudos animais, em que os materiais eram aplicados da forma como seriam utilizados em pacientes e as reações teciduais eram observadas através de técnicas histológicas.

As técnicas experimentais envolvendo modelos animais, principalmente primatas não-humanos, foram melhoradas pela padronização das técnicas histológicas e procedimentos de avaliação

(LANGELAND et al., 1966; BAUME; HOLZ; FIORE DONNO, 1972). A segunda corrente concentrou-se em técnicas de cultura celular. Esses métodos tornaram-se disponíveis para a pesquisa odontológica durante a década de 1950, no Japão, e um dos pioneiros neste campo foi H. Kawahara (KAWAHARA; SHIOTA; YAMAKAWA, 1955). Tang et al. (1999) e Huang et al. (2002) avaliaram a citotoxicidade de cimentos adesivos ortodônticos em culturas, *in vitro*, de fibroblastos humanos obtidos da cavidade bucal.

Nota-se que desde o desenvolvimento dessa modalidade de estudo, essa disciplina destaca-se como um instrumento imprescindível e integrante em diversas áreas, como a genética molecular, a biotecnologia, a imunologia, a cirurgia, a bioengenharia e a fabricação de produtos farmacêuticos (LEON, 1993; MASTERS, 2000).

FIBROBLASTOS

Os fibroblastos são células encontradas em grande predominância no tecido conjuntivo, responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular (TEN CATE, 1989) e quando são submetidas a um procedimento de cultura celular, são estas que permanecem durante grande período de tempo com atividade viável, sendo assim consideradas as células proliferativas sobreviventes (COURA., 2004). Os fibroblastos que alcançam as regiões em processos inflamatórios ativos auxiliam na formação do tecido de granulação que é de suma importância para a contração final da ferida no processo de renovação epitelial. Considerados um dos mais importantes componentes para o reparo de feridas, os fibroblastos se proliferam e produzem colágeno e outros componentes essenciais para a reconstituição tecidual (LIU et al., 2002).

Em terapias peri-implantares e periodontais, o uso de matrizes associadas a fibroblastos passa a ser uma alternativa de grande potencial quando se objetiva diminuir a chance de morbidade, ou seja, reduzir os riscos de danos teciduais com uma segunda e invasiva cirurgia para remoção de tecidos do palato, túber ou áreas edentadas para enxertia de tecido mole (PINI PRATO et al., 2000).

Estudos *in vitro* vêm sendo realizados com o objetivo de verificar a sobrevivência dos fibroblastos gengivais humanos. Kent et al. (1996) realizaram testes *in vitro* com uma cultura de fibroblastos gengivais e puderam verificar que até a sétima passagem as células permaneciam viáveis numa porcentagem acima de 90 e o declínio de sua viabilidade começava a ocorrer a partir da oitava passagem. Isto permite com que

sejam estabelecidos protocolos quanto ao uso destas células, obtendo resultados satisfatórios em pesquisas *in vitro* e *in vivo*.

Há de se salientar uma grande vantagem da utilização de fibroblastos, pois são de fácil obtenção e manuseio em ambiente de cultura celular e apresentam grande capacidade proliferativa (NETO, 2010). Quando da utilização de fatores de crescimento associados aos fibroblastos, como por exemplo o PDGF, este é capaz de promover o aumento da proliferação destas células no ligamento periodontal, permitindo uma recuperação mais satisfatória ao paciente que apresenta algum tipo de lesão periodontal (FILHO, 2002).

ESTUDOS REALIZADOS *IN VITRO* COM FIBROBLASTOS

Os fibroblastos são células encontradas com alta predominância no tecido conjuntivo. Na obtenção de uma cultura celular, a partir de explantes de tecido conjuntivo, por desagregação enzimática ou mecânica, e mantida em meios de cultura suplementados com soro, os fibroblastos proliferam rapidamente e tornam-se o tipo celular predominante. Após algumas passagens, geralmente, apenas os fibroblastos são as células proliferativas sobreviventes. Uma das razões é que a maioria dos meios de cultura disponíveis otimiza e favorece as linhagens celulares fibroblásticas (SATO et al., 1994).

Kent et al. (1996) avaliaram os efeitos, *in vitro*, do número de passagens de uma cultura de fibroblastos humanos gengivais sobre a morfologia celular, viabilidade celular e expressão de citocinas. A análise compreendeu células da primeira até a décima passagem. A viabilidade celular permaneceu acima de 90% até a 7ª passagem. Os valores obtidos na 8ª, 9ª e 10ª passagens foram 86%, 93% e 87%, respectivamente. Foi observado um aumento do volume celular (tamanho celular) e um decréscimo na quantidade celular com o aumento da idade da cultura. O estudo demonstrou a expressão de IL-1 β , IL-6 e IL-8 na cultura de fibroblastos humanos gengivais e a ausência de expressão IL-1 α e TNF- α .

Essa mudança de volume (tamanho) celular também foi relatada por Pendergrass; Angello; Norwood (1989), que avaliaram aproximadamente 70 passagens das culturas de fibroblastos; os autores observaram volumes originais celulares de aproximadamente 2000 μm^3 , enquanto 5000 μm^3 foram os volumes de células em senescência. Além disso, verificaram perda da capacidade proliferativa em decorrência da idade da cultura. Isso não foi verificado por Kent et al. (1996), no

entanto, esses últimos autores trabalharam somente até a décima passagem.

Almeida-Lopes (1999) desenvolveu uma linhagem de fibroblastos de gengiva humana, propondo dois modelos de estudo *in vitro* um com meio de cultivo e SFB a 5% e o outro com 10% de SFB. Analisou a proliferação celular através da contagem do número de células existentes antes e depois de receberem irradiação com diodos lasers, operando em diferentes comprimentos de onda. Verificou-se que quando as células receberam irradiação com mesma irradiância e fluência, o comprimento de onda que induziu maior proliferação celular foi aquele situado na região do visível. No caso onde se manteve mesma fluência, mas diferente irradiância, o melhor resultado foi obtido com radiação no infravermelho. Em ambos os casos, os grupos irradiados apresentaram proliferação significativamente maior nos grupos irradiados quando comparados ao controle.

Woollons et al. (1997) avaliaram os danos aos DNA celulares de fibroblastos humanos causados por câmaras de bronzeamento (UVA e UVB) e pela exposição solar, pois a indução de mutações ao DNA é um pré-requisito para o desenvolvimento de cânceres de pele. Utilizando-se enzimas específicas de reparo de DNA (endonuclease T4 e endonuclease III) e o Ensaio do Cometa, avaliou-se a ação de duas diferentes câmaras de bronzeamento disponíveis comercialmente. Ficou estabelecido que esses aparelhos produzem diferentes tipos de dano ao DNA, associados à fotocarcinogênese de células humanas, e as evidências epidemiológicas existentes confirmam o risco potencial do uso desses aparelhos de bronzeamento artificial.

Sant'Anna et al. (2002) estabeleceram e caracterizaram uma linhagem contínua de células derivadas de ligamento periodontal (LP) humano. Essas células foram obtidas através da técnica do explante de tecido removido por raspagem do terço médio das raízes de terceiros molares extraídos de 3 (três) pacientes saudáveis. Posteriormente, as células foram caracterizadas através de microscopia óptica, padrão de crescimento, testes imunohistoquímicos, histoquímicos e enzimáticos. Morfologicamente, apresentaram aspecto fusiforme ou estrelado, compatível com células fibroblásticas. Houve marcação positiva para vimentina, osteonectina, fibronectina, sialoproteína óssea II e tenascina e negativa para anticorpos anti-citoqueratina (AE1/AE3), actina de músculo liso e colágeno III. A presença de nódulos mineralizados sintetizados, *in vitro*, pelas células foi confirmada pelo teste de Von Kossa. Esses resultados, em conjunto, indicaram que as células

cultivadas, denominadas FL2, eram derivadas de LP e, portanto, poderiam ser utilizadas em estudos *in vitro*.

Rossa Júnior; Martinez; Silvério (2002) avaliaram, *in vitro*, o efeito da nicotina sobre a viabilidade e a morfologia celular utilizando-se uma linhagem contínua de fibroblastos. Para tal, foram formados dois grupos experimentais segundo a dose (0 - controle, 10 μ g, 100 μ g, 0,5mg, 1mg de nicotina) e o tempo de condicionamento (1h e 24h). Cada um dos 12 orifícios de uma placa para cultura celular recebeu 2ml de meio de Eagle e 1ml de suspensão de meio de cultura contendo aproximadamente 1x10⁵ células/ml. Foi, então, acrescentada a solução de nicotina nas diferentes concentrações. Após o acondicionamento com o fármaco, nos dois períodos testados, as células foram coradas com Azul de Trypan a 0,4% e observadas em microscópio de observação direta. Quanto à morfologia, os resultados obtidos demonstraram, no grupo acondicionado por 1h, que os controles apresentaram diferenças estatisticamente significantes apenas em relação à maior dose de nicotina; no entanto, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o controle e todas as concentrações, após 24h de condicionamento. Quanto a viabilidade celular, um maior número de células não viáveis foi observado nas diferentes concentrações de nicotina em comparação aos controles, tanto após 1h quanto 24h de condicionamento ($p < 0,05$). Em ambos os períodos, houve uma tendência significativa de aumento do número de células não viáveis com o aumento da dose de nicotina ($p = 0,0053$; $p = 0,00001$ após 1h e 24h, respectivamente). Portanto, concluiu-se que a nicotina pode alterar *in vitro* a viabilidade e a morfologia de fibroblastos de forma proporcional à dose e ao tempo de exposição.

Andrighetti-Frohner (2003) avaliou a citotoxicidade e a genotoxicidade da violaceína, metabólito da bactéria *Chromobacterium violaceum*, sobre culturas de células VERO (fibroblastos de rins do macaco verde da África), células FRhK-4 (células fetais de rins de macacos *rhesus*), células Hep-2 (células de carcinoma de orofaringe humana) e células MA104 (fibroblastos obtidos a partir de rins embrionários do macaco *rhesus*). A viabilidade celular de seus controles negativos (onde a violaceína não foi empregada) permaneceu acima de 90% para todas as linhagens celulares. Os danos aos DNA celulares, determinados através do Ensaio do Cometa, encontrados com o uso do peróxido de hidrogênio a 200 μ m, foram de 153,33 \pm 12,81, 145,17 \pm 3,03, 142,83 \pm 5,06 e 131,33 \pm 4,63 para as células VERO, FRhK-4, MA104 e Hep-2, respectivamente. Os danos encontrados em seus controles negativos foram de 12,67 \pm 1,30, 20,50 \pm 0,58, 33,33 \pm 3,76 e

$\pm 23,67 \pm 6,84$ para as mesmas linhagens celulares. O estudo verificou que a violaceína teve efeito citotóxico e genotóxico, concentração-dependente, nas diferentes linhagens celulares.

Na década de 60, acreditava-se que o crescimento de fibroblastos 3T3 era diretamente controlado por fatores séricos. Nesta época a endocrinologia considerava os fibroblastos como células que não serviam de alvo para os hormônios clássicos porque foram falhas as tentativas de detectar a ação hormonal no controle da proliferação de mamíferos (HOLLEY e KIERNAN, 1968). Alguns anos mais tarde é que foi proposto que os fatores séricos que controlavam o crescimento das células 3T3 seriam na realidade o fator de crescimento, de natureza endócrina (ARMELIN, 1973).

MEIOS DE CULTURA CELULAR

Um meio de cultura é conceituado como um material (líquido ou gel) que tem por finalidade favorecer o crescimento de microrganismos, células, etc. Para que o crescimento celular seja adequado e o êxito seja obtido, é necessária a correta escolha do meio a ser utilizado, seja ele artificial ou natural e que a linhagem celular adequada seja associada ao meio escolhido.

Os experimentos de cultura celular começaram com a utilização de meios estritamente obtidos de fontes naturais que apresentavam condições variáveis e instáveis quando utilizados mais de uma vez. Devido a isso, os meios artificiais começaram a ser desenvolvidos e foi na década de 50 que houve a formulação do primeiro meio artificial, que tinha em sua composição diversos elementos essenciais como carboidratos e vitaminas (EAGLE, 1955).

Contudo, percebeu-se que o meio era insuficiente e acreditou-se da necessidade de utilização de soro para o fornecimento de mais nutrientes, uma vez que é fonte rica de aminoácidos, proteínas, carboidratos e gorduras. Foi descoberto que o soro viabilizava o fornecimento de fatores de crescimento e mais que isso, que o soro fetal era capaz de realizar a replicação celular e crescimento de células mais sensíveis, tornando-se assim, um meio muito conhecido (HORNSBY P., et al., 1983).

Os experimentos com cultura de tecidos tiveram início no princípio do século. Nesta época o meio de cultura era extraído de fontes naturais, como linfa e coágulos de plasma. Obviamente, a composição extremamente variável desses meios impedia a realização de dois experimentos nas mesmas condições. Esta limitação, aliada à

importância intrínseca de se identificar todos os componentes do meio de cultura necessários à sobrevivência e ao crescimento para cada tipo de célula, despertou o interesse precoce de se estabelecer o meio quimicamente definido. Somente na década de 50 é que se conseguiu formular o primeiro meio quimicamente definido, constituído por sais, vitaminas, aminoácidos, carboidratos e fatores séricos (EAGLE, 1955).

Esse meio era incapaz de garantir por si só o crescimento celular, sendo necessária, a presença de fatores séricos. Nesta época, acreditava-se que o soro era necessário para fornecer algum tipo de nutriente. Posteriormente, descobriu-se que a função do soro no meio de cultura era fornecer fatores de crescimento e não nutrientes. Esses últimos são fornecidos pela parte quimicamente definida do meio de cultura (ARMELIN, 1975).

Inicialmente, a busca do estabelecimento de quais os componentes do soro necessários à sobrevivência e crescimento de cada tipo de célula era feita através de tentativas de análise bioquímica dos componentes ativos isolados diretamente do soro. Esse tipo de estudo foi muito difícil e não produziu resultados práticos importantes. A dificuldade foi devida principalmente à complexidade e às baixas concentrações de cada hormônio presente no soro associado ao fato de que muitos destes fatores se ligam aos carregadores perdendo sua atividade quando dissociados e também ao sinergismo apresentado pelos diferentes fatores.

A substituição de um enfoque analítico por um enfoque sintético permitiu a realização de progresso significativo nesta área. Assim, mostrou-se ser possível a manutenção de células em meio de cultura sem soro, por diversas gerações. Neste experimento a presença do soro foi necessário antes e depois da tripsinização da cultura para o repique. Posteriormente, ao se adicionar ao meio de cultura uma mistura de hormônios e certa quantidade de fibronectina tornou-se possível garantir a sobrevivência de diversos tipos de células em total ausência de soro (ORLY e SATO, 1979).

Um meio comumente utilizado em pesquisas na área da Odontologia é o Soro Fetal Bovino (SFB), isto porque apresenta baixo custo e é capaz de carrear fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento e proliferação celular. O soro de origem bovina é utilizado, além dos motivos já citados anteriormente, pois permite que em estudos *in vitro* possa ser realizada a inibição por contato e é capaz de aumentar a viscosidade do meio fazendo a proteção celular em possíveis danos mecânicos (MEENAKSHI, A., 2013). Quando não

utilizado isoladamente, o SFB pode complementar meios que necessitem do mesmo.

O meio conhecido como Dulbecco ou DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) também está entre um dos mais utilizados. Com a presença de grande quantidade de aminoácidos e vitaminas, foi utilizado primariamente no cultivo de células embrionárias de ratos. Considerado como um meio basal, ou seja, não possui proteínas ou fatores de crescimento, é comumente associado ao SFB, estando assim enriquecido por fatores de crescimento (MEENAKSHI, A., 2013).

Na cultura de fibroblastos, é comum a utilização do meio DMEM seja ele acompanhado por uma suplementação ou não. É o que demonstra o estudo de Mazlyzam et al. (2008) onde os autores afirmam que o soro fetal bovino também é um dos suplementos mais utilizados na literatura para o estabelecimento de culturas *in vitro*, devido ao fato de o mesmo possuir fatores de crescimento diversos, citocinas, proteínas, hormônios e vitaminas que permitem a proliferação de fibroblastos de forma facilitada.

Apesar de sua eficiência na cultura de fibroblastos, há de se atentar para o fato de que há o risco, mesmo que mínimo, de uma possível transmissão de príons e outros vírus, devendo-se assim, optar por um outro meio de suplementação para que haja a possibilidade de utilização no ser humano (MAZLYZAM et al., 2008).

Devido a problemática do uso do SFB, opta-se muitas vezes pela utilização do plasma rico em plaquetas (PRP), este que além de permitir o aumento da concentração de fatores de crescimento no sangue, é altamente utilizado em pacientes com problemas ósseos ou periodontais, auxiliando no processo de recuperação, liberando grande quantidade de fatores essenciais e sendo biocompatível e de baixo custo ao paciente (TRAVASSOLI-HOJJATI et al., 2016).

PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Constituído basicamente por plasma, leucócitos e plaquetas, o plasma rico em plaquetas (PRP) é formado pela associação de fatores de coagulação com soro sanguíneo. Dentre os componentes presentes, as plaquetas são destaque por serem responsáveis pela liberação dos fatores de crescimento, cruciais para a iniciação do processo de reparo (MARX, 1999). Além da presença de componentes plasmáticos (plasma, leucócitos e plaquetas), a presença de proteínas como um dos componentes do PRP é crucial para que o mecanismo de cicatrização de tecidos conjuntivos se dê de forma correta (ARNOCZKY *et al.*, 2011).

O PRP é a porção plasmática caracterizada como material rico em fatores de crescimento como o PDGF e TGF- β que são importantes componentes para o reparo tecidual (FERREIRA, 2003).

O plasma rico em plaquetas (PRP) define-se como uma porção do plasma sanguíneo com uma concentração plaquetária superior aos níveis de referência, obtida através de protocolos de centrifugação (MARX, 2004). Estão presentes no PRP, fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante $\beta 1$ e $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e prostaglandina E2 (PGE2) (KASTEN *et al.*, 2008). Assim, o PRP caracteriza uma fonte autóloga de fatores de crescimento e apresenta diversas vantagens sobre as fontes geralmente utilizadas (soro de animais ou fatores de crescimento recombinantes), essencialmente por causa de sua pronta disponibilidade e seu potencial clínico seguro e eficaz.

Os fatores de crescimento relacionados ao PRP são pré-sintetizados e estocados nos grânulos α das plaquetas. A secreção destes fatores se inicia com o processo de formação do coágulo e consequente ativação plaquetária. Os grânulos se fundem com a membrana das plaquetas e os fatores são então secretados. Cerca de 95% dos fatores de crescimento pré-sintetizados são secretados dentro de 1 hora. Após a liberação inicial, as plaquetas sintetizam e secretam fatores de crescimento adicionais pelo menos, em média, sete dias restantes do seu ciclo de vida. Estudos têm demonstrado que as CTMs, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e células epidermais expressam receptores de membrana para os fatores de crescimento presentes no PRP. A ativação destes receptores resulta na expressão de sequências gênicas que controlam a proliferação celular, síntese de colágeno e formação de matriz extracelular, estimulando o processo natural de cicatrização (MARX, 2004).

O PRP demonstra ser efetivo na proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação celular e síntese de matriz extracelular, principalmente colágeno. Consequentemente, facilita o reparo tecidual, estimula a angiogênese, melhora a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou adiposos, bem como estimula a cicatrização de feridas (OKADA *et al.*, 1998).

Recentemente, o uso do PRP tem ganhado considerável popularidade no propósito de liberação de fatores de crescimento locais a fim de promover a regeneração óssea (FENG *et al.*, 2010). O PRP vem

sendo amplamente utilizado na área ortopédica, no tratamento de lesões em diversas disfunções ósseas, e também na área odontológica, em implantes dentários e cirurgias maxilofaciais. A sua utilização é segura e parece ter um efeito terapêutico benéfico, particularmente nas fases iniciais de formação óssea. Estudos têm demonstrado que melhores resultados *in vivo* são obtidos quando o PRP é utilizado juntamente com CTMs em biomateriais osteogênicos ou enxertos ósseos.

Obtido do sangue autógeno, o plasma rico em plaquetas vem sendo muito utilizado dentro da Odontologia conforme já demonstrado em estudos anteriores, principalmente por possuir propriedades de regeneração tecidual (MACEDO, A., 2004). A engenharia de tecidos vem observando grandes resultados no que diz respeito à reparação e regeneração tecidual em pacientes que necessitam de menor tempo para cicatrização e por meio da contribuição do PRP estes resultados vêm se consolidando através de pesquisas *in vitro* e *in vivo* (FERREIRA, 2012).

O primeiro fator de crescimento descoberto foi o NGF (fator de crescimento neural), descoberto em 1954, porém apenas posteriormente isolado e caracterizado (GREENE e SHOOTER, 1980). Em 1962, COHEN, trabalhando no isolamento de NGF, descobriu e isolou o EGF (fator de crescimento epidermal). Através dos estudos da endocrinologia clássica foram descobertos ainda as somatomedinas e o fator de crescimento de insulina. Um novo impulso foi dado ao estudo dos fatores de crescimento quando se descobriu que as células 3T3 podiam ser estimuladas por um fator de crescimento de fibroblastos presente em extratos de hipófise bovina (ARMELIN, 1973). Este trabalho, além de mostrar que os fibroblastos poderiam servir de células alvo para fatores hormonais, forneceu ainda um bom protocolo para testes de atividade dos fatores de crescimento. Posteriormente foi descoberto, a partir das plaquetas sanguíneas humanas, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), um fator peptídico para fibroblastos (ROSS et al, 1978).

Do plasma rico em plaquetas consegue-se obter diversos fatores de crescimento, dentre eles o PDGF que é o fator primário de crescimento no processo de regeneração e tem a capacidade de atrair células como os fibroblastos (NANNEY LB., 1990). Devido a isso, sabe-se que o PDGF tem papel fundamental no processo de reparo tecidual e cicatrização de lesões (ROSS et al., 1978).

Estudos recentes demonstram a capacidade de aceleração do reparo dos tecidos por meio do uso do PRP que através de seus fatores de crescimento - como PDGF, TGF- β s, IGF-I e II e BMPs - presentes

nas plaquetas, permitem que o processo se dê efetivamente (FILHO JS, 2002). Arnoczky *et al.* (2011) explicam a grande utilização do PRP na área odontológica corroborando com as proposições de diversos autores, ressaltando seu potencial reparador e regenerador, grande eficácia e a capacidade de trazer segurança ao paciente e ao cirurgião-dentista. Lekovic (2002) realizou estudo associando o PRP com produtos de origem xenógena e obteve resultados satisfatórios em 21 pacientes que apresentavam defeitos periodontais.

Conforme mencionado por Marx (2004), o PRP auxilia na cicatrização da mucosa e tecidos moles e devido a isso é muito utilizado em associação a membranas como material de enxertia. Devido ao fato de ser um material autógeno, o PRP pode ser utilizado com segurança e tem grande aceitação pelos pacientes (MARX, 2004). O PRP é obtido a partir de sangue autógeno por meio de um processo que utiliza o princípio da separação celular por centrifugação diferencial, no qual se retira sangue do doador e separam-se as substâncias desejadas (RAVEL, 1997).

Dentre as técnicas existentes para obtenção do PRP, a venipuntura e a cardiopunção são comentadas frequentemente na literatura e para a presente pesquisa optou-se pela realização da punção intra-cardíaca baseando-se no protocolo fornecido pelo Biotério USP - Manual de Normas Técnicas (TABORDA *et al.*, 2004). Normalmente a técnica da cardiopunção é escolhida quando há a necessidade de obtenção de volume sanguíneo considerável e é considerada uma “coleta final” visto que após o procedimento o animal normalmente é sacrificado. Realiza-se a anestesia geral, coloca-se o animal em uma superfície plana para que seja realizada a punção e a agulha deve então ser inserida em um ângulo de 10 a 30° acima do abdômen (TABORDA *et al.*, 2004).

A sequência do processo é basicamente a seguinte: punção venosa, retirada do sangue e separação celular. A punção venosa e a retirada de sangue podem ser realizadas através de 3 técnicas descritas na literatura. A primeira, que será abordado neste trabalho, é a obtenção de uma bolsa de sangue total, que corresponde a retirada em média de 440 a 460 ml (MARX, 1999; WHITMAN *et al.*, 1997); a segunda remove o tecido sanguíneo armazenando-o em túbulos de 10 ml (ANITUA, 1999); e a terceira corresponde à técnica de aférese onde um separador celular de gradiente de densidade é utilizado obtendo-se somente as células escolhidas sem coletar o sangue (LYNCH, 1999). A separação dos elementos do sangue retirado é feita por meio da centrifugação, partindo do mais denso para o menos denso, sendo

estabelecidos diferentes protocolos devido as diferenças do volume coletado. Todas as técnicas buscam como produto final o PRP (ANITUA, 1999; MARX, 1999; WHITMAN et al., 1997).

FATORES DE CRESCIMENTO

Os fatores de crescimento são classificados como polipeptídeos com capacidade de ação local ou sistêmica possibilitando a proliferação de células por meio da regulação, proliferação, migração e diferenciação celular. Desta forma, a regeneração de tecidos moles por meio de materiais de origem artificial necessita da presença de fatores de crescimento que possibilitem a proliferação e diferenciação celular em tecido epitelial e conjuntivo (BARTOLD et al., 2000).

Diversos fatores de crescimento vêm sendo estudados como é o caso das BMPs (Proteínas morfogenéticas ósseas), FGF (Fator de crescimento de fibroblastos) e o PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas) um dos primeiros a ser identificado. Os fatores de crescimento, além de serem capazes de promover a angiogênese, o que facilita ainda mais o processo cicatricial, têm ação indireta na síntese de colágeno, que permite a maior resistência das feridas em processo de cicatrização (KNIGHTON et al., 1990). Vários estudos *in vivo* realizados por Okada & Muramaki (1998), Bikfalvi et al. (1997) e Werner & Groose (2003) demonstraram a importância e necessidade da presença de fatores de crescimento durante estes processos regenerativos.

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e de regeneração. Estes polipeptídeos são a chave para regular os diversos eventos celulares tais como: síntese de DNA, quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz (ANITUA, 1999; LYNCH, 1999; GIANNOBILE, 1999). Pode-se encontrar fatores de crescimento, no osso, no cimento e em vários tecidos de cicatrização. Como exemplo, pode-se citar: PDGF, TGF- β s, IGF-I e II, e BMPs (RIPAMONTI e REDDI, 1994). Estas moléculas naturais são iniciadores universais de quase todos os processos cicatriciais (MARX et al., 1998). Estudos específicos do PRP identificaram uma lista completa de fatores de crescimento, destes, pelo menos três importantes fatores de crescimento são derivados dos grânulos α -plaquetários, a saber: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β s,) e o fator de crescimento similar a insulina (IGFs), (LYNCH e BUSER, 1991; MARX et al., 1998).

ARCABOUÇOS

Tendo em vista a relação íntima entre as CTs e seu microambiente tridimensional, arcabouços (*scaffolds*) feitos de materiais poliméricos ou compósitos biodegradáveis e bioabsorvíveis vêm sendo desenvolvidos. Estes estão sendo utilizados tanto para estudos do comportamento e mecanismos celulares *in vitro*, quanto para engenharia de tecidos e aplicações clínicas (WEI, 2000). Fundamentalmente, biomateriais para cultivo celular e engenharia de tecidos devem fornecer: um ambiente que favoreça a interação, proliferação e diferenciação celular; uma matriz permeável que permita difusão de nutrientes, gases e metabólitos; e ainda, suporte mecânico, para a reposição e regeneração do tecido (SERPOOSHAN *et al.*, 2010).

Um arcabouço celular é um material com capacidade de carrear células e fatores de crescimento (NETO, 2010). Classificado como um biomaterial, este deve interagir com sistemas biológicos que objetivam o tratamento, aumento ou substituição de qualquer tecido ou órgão do corpo e para sua correta escolha, requisitos como a biocompatibilidade com tecidos, biodegradabilidade e velocidade de degradação devem ser considerados (TABATA, 2009).

Dentre os biomateriais disponíveis existem os materiais alógenos e xenógenos. Aloenxertos são aqueles obtidos de materiais de outro indivíduo da mesma espécie, enquanto os xenoenxertos são compostos provenientes de espécies diferentes. A literatura apresenta uma vasta quantidade de arcabouços como hidroxiapatita (HAp), fosfato de cálcio, ácido polilático (PLA), ácido poli-glicólico (PGA), fosfato tricálcico, colágeno tipo I, entre outros. Contudo atualmente não há um consenso sobre qual biomaterial é considerado o melhor arcabouço para a engenharia tecidual (NETO, 2010).

Recentemente, a busca de novas classes de biomateriais com propriedades específicas para uso em engenharia de tecidos tem atraído grande interesse. Para esta finalidade, uma variedade de materiais vem sendo avaliados, estes incluem polímeros naturais como o colágeno, polímeros sintéticos como o poliácido lático, e ainda materiais inorgânicos como a hidroxiapatita (HAp). Hidrogéis ou polímeros com elevado teor de água (>99%) formam outra classe importante de biomateriais que tem sido extensivamente estudado devido à sua natureza tridimensional, biocompatibilidade e versatilidade no processamento (ZHANG; KOHN, 2012).

As matrizes derivadas do colágeno 2D e 3D são opções bastante estudadas na literatura e vêm sendo vistas como alternativas para

utilização como materiais xenógenos, devido à sua biocompatibilidade, envolvimento em processos fisiológicos, propriedades semelhantes ao tecido humano e importância fundamental na constituição da matriz do tecido conjuntivo (HARKNESS, 1961). Bell et al. (1981) demonstraram em seu estudo com fibroblastos cultivados em matriz colágena de arranjo tridimensional, que houve formação de estrutura semelhante ao tecido dérmico.

Já Hillman et al. (2002) verificaram que sobre matrizes colágenas sintéticas bioabsorvíveis, a migração de células foi reduzida, enquanto matrizes frouxamente organizadas houve migração total. Apesar de a literatura atual estudar matrizes de colágeno com frequência, não há consenso sobre o melhor material e dentre a disponibilidade dos mesmos, a matriz dérmica acelular (MDA) é uma opção de substituto de origem alógena que vem sendo amplamente utilizada como arcabouço celular para a engenharia de tecidos. Sua biocompatibilidade e capacidade de promoção de adesão, migração e proliferação fibroblástica, conforme demonstrado em estudo realizado por Rodrigues (2008), faz com que a mesma seja visada em procedimentos de enxertia, principalmente no recobrimento de raízes expostas em quadros de deiscência (HENDRSON 2000; PINI PRATO et al., 2012). A MDA (SureDerm®) consiste em um material já disponível no mercado, obtido através do tecido natural humano que sofre um processo de congelamento após a remoção das células da derme e epiderme, mantendo a estrutura tridimensional da derme; além disso a membrana permite a realização de revascularização e breve crescimento e influxo de fibroblastos.

Outra opção de arcabouço é a matriz de celulose bacteriana (MCB), assim denominada devido à presença de fibras nanométricas. Como características predominantes, possui ótima capacidade de absorção e retenção de água e boa elasticidade (MACEDO, 2008). A MCB consiste em um polímero que possui diversas características favoráveis como “flexibilidade, alta força de elasticidade e capacidade de reter água, uma permeabilidade considerável para gases e líquidos e uma ótima compatibilidade com tecidos vivos” (CZAJA et al., 2006).

Algumas matrizes já foram testadas e comprovadas cientificamente da sua possibilidade de utilização como substituto de tecido mole, como foi demonstrado por Harris (1998) que realizou estudo comparativo entre o uso de enxertos autógenos e matrizes dérmicas acelulares e pode concluir, satisfatoriamente, que não existe diferença estatística entre os dois materiais, trazendo assim, ambas as técnicas como possíveis de serem utilizadas na clínica odontológica.

Henderson (2001) também obtiveram resultados positivos, assegurando novamente o uso de enxertos alógenos.

Outro estudo ainda mais recente avaliou a matriz de PLGA (poli ácido láctico-co-glicólico) associada a partículas de hidroxiapatita e, novamente, os resultados foram satisfatórios, caracterizando tal membrana como “mais consistente para servir de arcabouço na engenharia de tecidos” (NETO, 2010).

MATRIZ DÉRMICA ACELULAR (MDA)

A preparação deste enxerto dérmico é realizada pela remoção do componente celular e preservação da integridade ultra-estrutural, onde se danificada induziria uma resposta inflamatória. A matriz dérmica acelular é processada a partir da pele do doador humano obtido a partir de bancos de tecidos aprovados, onde o tecido é preparado pela remoção dos componentes celulares e epiderme da pele, o restante então é crioprotégido e rapidamente liofilizadas em um processo patenteado para preservar a integridade bioquímica estrutural (WAINWRIGHT, 1995; 1996).

A matriz dérmica acelular foi originalmente utilizada para o uso em cirurgia plástica para o tratamento de queimaduras (WAINWRIGHT, 1995). Na medicina seu uso vem se expandindo para incluir reconstrução de membrana timpânica, reconstrução nasal (BENECKE, 2001; KRIDEL; FODA; LUNDE, 1998), tratamento de atrofia dérmica (FISCHER; FRODEL, 1999), reparação de fístulas (GIRARD; SIDEMAN; SPAIN, 2002) e aplicações em cirurgia estética facial (CASTOR; TO; PAPAY, 1999).

Nos últimos anos vários estudos têm avaliado o efeito da matriz dérmica acelular para a cirurgia periodontal com resultados promissores. A maioria dos estudos incluiu um pequeno tamanho da amostra onde não tinha valor estatístico o suficiente para tirar conclusões sobre a sua eficácia (HARRIS, 2000; 2001; 2002; 2004; TAL, 1999; 2002; WEI, 2000; 2002).

Shulman (1996) foi o primeiro autor a documentar o uso da matriz dérmica acelular em odontologia. A partir de então, a matriz dérmica acelular vindo sendo utilizada em várias aplicações, como aumento de tecido mole, aumento de gengiva queratinizada, como membrana de barreira, como material de enxertia para cobrir tatuagem de amalgama e procedimentos de cobertura de raiz exposta (FOWLER; BREAUULT, 2001; WEI et al, 2000; NOVAES JUNIOR et al, 2002). Aloenxertos como matriz dérmica acelular têm sido utilizados ao redor

de dentes e implantes para substituir os enxertos autógenos de tecido conjuntivo, principalmente para locais de recepção maiores ou quando a obtenção de tecido autógeno não é viável e levaria a um desconforto pós-operatório exacerbado (FU; SU; WANG, 2012).

Apesar de aloenxertos e autotransplante possuírem previsibilidade semelhante para técnicas de recobrimento radicular, autotransplante de tecido conjuntivo resulta uma cobertura superior ao defeito, com maior ganho de tecido queratinizado e profundidades de sondagens residuais inferiores (HARRIS, 2002; 2004).

Os aloenxertos também se apresentam como uma alternativa para substituir um enxerto gengival livre. Wei e colaboradores (2000; 2002) realizaram um estudo comparando a matriz dérmica acelular e enxerto gengival livre comparando-as em relação ao aumento da faixa de gengiva inserida. Os resultados sugeriram que o tecido do local formado com matriz dérmica acelular era semelhante a um tecido cicatricial.

A matriz dérmica acelular (MDA) vem cada vez mais sendo utilizada quando há necessidade de realização de enxertia com substituto de origem alógena, isto porque descarta a necessidade de uma segunda cirurgia para obtenção de tecido autógeno (REINO DM, 2011). Inicialmente esta matriz era aplicada como enxerto não-vital para pacientes em quadros de queimaduras severas, preservando o tecido do paciente e reduzindo a sua morbidade (WAINWRIGHT DJ, 1995).

A MDA é uma matriz acelular de tecido conjuntivo humano e biocompatível conforme vários estudos já demonstraram, tornando-a assim, um dos materiais alógenos mais estudados em periodontia atualmente (REINO et al., 2011). Ela é formulada a partir de uma preparação de pele humana e desta é realizada a remoção das células e outros componentes celulares sem prejudicar a organização da matriz extracelular e a membrana basal, podendo assim manter as fibras elásticas e colágenas (WAINWRIGHT DJ, 1995).

Conforme citado por Rodrigues (2008), a MDA favorece a formação de uma estrutura biocompatível onde os fibroblastos terão maior facilidade de adesão, proliferação e migração. Para o bom funcionamento da mesma, é necessária a realização de um retalho favorável ao material, que por ser de origem alógena, requer um aporte sanguíneo considerável para que o processo de revascularização se dê com sucesso. Langer (1985) confirmou o sucesso da utilização de retalhos estendidos na maioria dos casos quando comparados à aplicação técnica clássica.

Esta matriz é indicada como recobrimento tecidual nas mais diversas áreas da medicina e odontologia. Dentre as indicações clínicas orais, Lino e Rosa (2006) citaram o aumento de gengiva queratinizada, coberturas radiculares e aumento e correção de defeitos de tecido mole em rebordo alveolar como possibilidades do uso da MDA.

Pesquisas revelam ótimos resultados quando do uso da MDA, principalmente no que diz respeito ao recobrimento de raízes expostas, apresentando resultados estéticos altamente satisfatórios (HENDRSON, 2000; PINI PRATO et al., 2012). Vantagens são claramente visíveis quando da utilização da MDA, como já confirmado em diversos estudos, a mesma leva à ocorrência da diminuição da morbidade pós-operatória, redução do tempo cirúrgico e fácil obtenção do material, o que permite seu uso em ampla escala (REINO DM, 2011).

Henderson (2001) apresentou resultados bastante satisfatórios quanto ao uso da MDA, frisando a possibilidade da utilização do material em áreas estéticas, visto que a cor e textura se mantém semelhantes ao tecido. Comparando a utilização da MDA com enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, não houve diferença significativa entre os mesmos (Harris 2000; Novaes et al., 2001).

Quando da escolha da utilização da MDA, há de se decidir qual dos produtos disponíveis no mercado será utilizado, uma vez que existem diversos fabricantes. Uma das opções é a SureDerm®, um material que pode ser transportado em temperatura ambiente (25°C) com auxílio de refrigeração e imersa em antibióticos.

A SureDerm® foi primeiramente implementada para o uso em cirurgias plásticas em quadros de queimaduras graves, bem como a maioria das matrizes dérmicas acelulares; posteriormente foi introduzida à periodontia como alternativa em cirurgias periodontais demonstrando sucesso (CHO, 2012).

MATRIZ DE CELULOSE BACTERIANA (MCB)

A celulose forma a base estrutural da parede celular de plantas, e também é produzida por outros organismos como algas, fungos e bactérias. Uma forma de obtenção da celulose é a partir de algumas cepas bacterianas não patogênicas, tais como as bactérias aeróbicas Gram-negativas do gênero *Gluconacetobacter*. Quando cultivadas em cultura estática, em meio líquido, essas bactérias sintetizam uma rede cristalina tridimensional de pura celulose que forma um hidrogel de celulose bacteriana (HCB) na interface entre o ar e o meio líquido (OLIVEIRA, 2012).

A matriz de celulose bacteriana (MCB) é um polissacarídeo composto por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de glicose, unidas por ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas. As moléculas longas e rígidas de celulose se combinam para formar nanofibras, cada uma consistindo de várias cadeias de celulose. Estruturalmente, a MCB consiste em uma rede destas nanofibras, interligadas por pontes de hidrogênio (RAMBO *et al.*, 2008).

A MCB apresenta propriedades únicas que a tornam potencialmente adequado para utilização como um biomaterial. Estas propriedades incluem alta capacidade de retenção de água, que compreende cerca de 99% do volume total do hidrogel, a formação de uma rede de nanofibras, que permite o crescimento e proliferação celular, além de elevada resistência à tração, possibilidade de ser moldada e baixo custo de produção (RAMBO *et al.*, 2008).

A biocompatibilidade, característica importante quando se fala em engenharia de tecidos, foi comprovada por Helenius e colaboradores (2006) em um estudo *in vivo*. Neste estudo, foi demonstrado que a MCB possui a capacidade de se integrar ao tecido hospedeiro sem provocar reação inflamatória. Entretanto, a MCB possui lenta degradação no organismo humano, devido à ausência de celulases, enzimas necessárias para hidrólise das ligações entre as moléculas glicose. Sugere-se que uma hidrólise não enzimática espontânea ocorra e justifique a lenta degradação da MCB no corpo humano (PETERSEN; GATENHOLM, 2011).

Devido a estas características a MCB tem sido utilizada em numerosas aplicações biomédicas, incluindo produção de micro vasos artificiais, engenharia tecidual de cartilagem (SVENSSON *et al.*, 2005) e em processos de cicatrização de feridas e queimaduras (CZAJA *et al.*, 2006).

Outra característica da MCB que a torna um promissor biomaterial é a possibilidade de modificação da sua estrutura e composição. Tratamentos químicos, irradiação e incorporação de moléculas biologicamente ativas ou metais estão sendo investigados e oferecem utilidades promissoras em aplicações biomédicas (PETERSEN; GATENHOLM, 2011). Um exemplo é a incorporação de HAp à MCB, para aplicação em regeneração óssea.

Este polímero extracelular é produzido por bactérias de diferentes gêneros, incluindo *Acetobacter* (renomeado como *Gluconacetobacter*), *Acanthamoeba*, *Achromobacter*, *Zoogloea*, sendo a espécie mais amplamente estudada a *Gluconacetobacter hansenii*, que

consiste em uma bactéria Gram negativa, estritamente aeróbica (PETERSEN; GATENHOLM, 2011).

As bactérias *Gluconacetobacter hansenii* possuem capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono para a biossíntese de celulose. Quando cultivadas em meio de cultura adequado, de forma estática, essas bactérias produzem uma membrana de celulose bacteriana (MCB), também denominada de matriz, na superfície do meio de cultivo que está em contato com o oxigênio. O formato e o tamanho das membranas são originados de acordo com o recipiente no qual as mesmas estão sendo produzidas, já sua espessura varia com a quantidade de meio de cultura e o tempo de produção. Após tempo determinado as MCBs são submetidas a processos de lavagem e esterilização, e processadas para as aplicações desejadas (RECOUVREUX, 2008).

A celulose bacteriana é um tipo de polissacarídeo extracelular presente no biofilme produzido por várias bactérias. Este polímero é altamente cristalino e o grau de cristalinidade varia de acordo com a origem e modo de tratamento químico. Celulose bacteriana é composta por moléculas de glicose e seu processo de biossíntese envolve várias etapas reguladas e caracterizadas por enzimas e proteínas complexas (BROWN; WILLISON; RICHARDSON, 1976; ROSS; MAYER; BANZIMAN, 1991).

A celulose bacteriana é utilizada em uma vasta gama de aplicações e em muitos estudos realizados na Universidade Federal de Santa Catarina. É potencialmente adequada como carreadores em engenharia de tecidos, devido as suas propriedades únicas, como retenção de água elevada, rede fibrosa fina, permite crescimento e proliferação celular e resistente à tração e baixo custo de produção. Em medicina, são utilizadas como revestimentos de stents, por substituição de dura-máter, em casos de tumores ou traumas ou como proteção para pele em casos de queimaduras (SVENSSON et al, 2005; WATANABE; TABUCHI, 1998; FONTANA et al, 1990).

Em odontologia, a celulose bacteriana vem sendo utilizada para recuperação de tecido periodontal. Gengiflex® é uma membrana de celulose na qual foi desenvolvida para recuperar tecidos periodontais pela separação de células epiteliais e tecido conjuntivo gengival em tratamentos de superfícies radiculares expostas (NOVAES, 1990, 1992, 1993).

Galgut (1990) realizou um estudo clínico onde avaliou a cicatrização do tecido periodontal em áreas de defeito, utilizando celulose oxidada biodegradável com a técnica de regeneração guiada dos tecidos. O autor observou boa cicatrização em todos os indivíduos,

com ausência de defeitos deletérios onde foi colocada a malha. Não observou diferenças significativas, acreditando que as diferenças eram atribuídas às diferentes formas de cicatrização entre os indivíduos. Neste estudo não ocorreu investigação histológica, necessitando de novos estudos onde possivelmente irá determinar a resposta tecidual.

A MCB vem sendo amplamente utilizada para o tratamento de lesões em tecido mole e queimaduras (SULAEVA et al., 2015) e historicamente é caracterizada como um material de sucesso por ser rápido e eficiente (CZAJA et al., 2006). Proveniente de bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Sarcina*, possui “flexibilidade, alto módulo de força de elasticidade e capacidade de reter água, uma permeabilidade considerável para gases e líquidos e uma ótima compatibilidade com tecidos vivos” (CZAJA et al., 2006). Além dessas características vantajosas para a recuperação tecidual, Shah et al. (2013) citado por Sulaeva et al. (2015) também afirmam os benefícios de possuir uma alta porosidade que permite que outros medicamentos e materiais biológicos diferenciados possam ser introduzidos na membrana. A estabilidade mecânica, transparência, biocompatibilidade e a não toxicidade do material protegem de certa forma, o estabelecimento de um processo infeccioso.

A biocompatibilidade com os tecidos biológicos, citada previamente, é característica fundamental para os materiais xenógenos. A MCB, conforme publicado em estudos *in vivo*, apresentou ótima biocompatibilidade principalmente devido à alta taxa de adesão aos tecidos, proliferação de células do tecido conjuntivo, ausência de reação de corpo estranho e baixa taxa de reação inflamatória (SULAEVA et al., 2015).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a MCB é capaz de realizar com sucesso a disseminação e proliferação de variadas células. Conforme citado por Morgado et al. (2015) “interações aprimoradas com células vivas podem permitir uma maior migração de células epiteliais e fibroblastos e então, conseguir uma maior rapidez na substituição tecidual”.

Dentre tantos materiais existentes no mercado, a MCB possui propriedades importantíssimas que fazem da mesma uma ótima escolha de material, como foi demonstrado em estudo *in vitro* por Sulaeva et al. (2015), podendo confirmar o benefício de sua utilização pela presença de características como estabilidade estrutural e boa resistência à ruptura. Além das propriedades biológicas como alta capacidade de proliferação de células humanas, como os fibroblastos, e ser

biocompatível com os tecidos humanos, há também uma grande vantagem de ser considerada mais econômica devido a sua alta durabilidade (SULAEVA et al., 2015).

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o processo de reparo tecidual a enxertia de fibroblastos obtidos por cultura primária suplementada com plasma rico em plaquetas (PRP) em mucosa oral de ratos.

Objetivos específicos:

- Desenvolver uma técnica cirúrgica de enxertia gengival com um mínimo de morbidade e com previsibilidade;
- Estabelecer um protocolo para pesquisas de cirurgias de enxertia de tecido mole em ratos;
- Testar dois materiais (Matriz dérmica acelular e Membrana de celulose bacteriana) que podem ser arcabouços para células do tecido gengival;
- Avaliar se a presença de fibroblastos influencia no processo de reparo;

METODOLOGIA

SELEÇÃO DA AMOSTRA

Inicialmente o projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa estão de acordo com o regimento deste comitê.

Foram selecionados 70 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos jovens (20-24 semanas), machos, pesando em média 180g. Esses ratos tiveram de apresentar um estado de saúde geral considerado bom e foram submetidos aos tratamentos profiláticos necessários como vacinação e dieta conforme as recomendações veterinárias determinadas pelo Biotério da UFSC e pelo veterinário

responsável pelos tratamentos pré, trans e pós-cirúrgicos. Os animais foram armazenados e cuidados no Laboratório de Neurologia da Dor e Inflamação (LANDI).

PROFILAXIA ANTIBIÓTICA E PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS

Antes dos procedimentos cirúrgicos foi administrado intramuscularmente uma dose de antibiótico de 40000 U por quilo de peso do animal (Pentabiótico® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de 90 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec, Cotia – São Paulo) e 10 mg/kg cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec, Cotia – São Paulo). A região escolhida para o estudo foi mucosa oral jugal dos animais.

PROCEDIMENTOS PRELIMINARES

Inicialmente foram selecionados 20 ratos para os procedimentos de coleta de sangue, para o preparo do PRP utilizado no meio de cultura, e a biópsia do tecido gengival. A coleta de sangue total foi efetuada empregando-se a técnica de venipuntura com o mínimo de traumatismo para não desencadear os fatores plaquetários; facilitando adesividade, aglutinação e aglomeração plaquetária. Após a coleta, o sangue foi centrifugado seguindo o protocolo estabelecido na literatura.

OBTENÇÃO DO PRP

Dos ratos selecionados para os procedimentos preliminares, todo o sangue coletado foi utilizado para preparação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP). No meio de cultura dos fibroblastos não foi utilizado o Soro Fetal Bofino (SFB). Em contrapartida, foi utilizado Plasma Rico em Plaquetas (PRP) que apresentou bons resultados no crescimento e manutenção estável da linhagem de células testadas na dissertação “Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular – Estudo in vitro” (COURA, 2004).

Para metodizar a obtenção do PRP, foi utilizado o protocolo estabelecido pelo Núcleo de Hemoterapia da Faculdade de Farmácia Bioquímica - UNESP – Campus de Araraquara. A coleta de sangue total foi efetuada empregando-se a técnica de venipuntura com o mínimo de traumatismo para não desencadear os fatores plaquetários; facilitando

adesividade, aglutinação e a aglomeração plaquetária. Uma unidade de sangue foi acondicionada a uma tripla bolsa coletora padronizada e devidamente identificada contendo anticoagulante CPDA-1, obtendo-se um volume total de 200 ml, devendo ser processada em um período de até 6 horas após a coleta.

A tripla bolsa de sangue foi posicionada na centrífuga, para promover a separação dos componentes sanguíneos por ordem de densidade, a uma velocidade de 2.200 RPM por 5 minutos a 22°C. As bolsas retornaram para a centrífuga, onde foram submetidas a nova centrifugação, na velocidade de 4.100 rpm, por 10 minutos a 22°C. Retira-se a bolsa do interior da máquina e extraiu-se o sobrenadante diretamente para a última bolsa coletora. Separou-se a bolsa e obteve-se o PRP e o plasma pobre em plaquetas.

A bolsa contendo PRP foi pesada para certificar se a relação peso volume está proporcional entre 60 gr para 70 ml. Esta bolsa foi colocada em um agitador para homogeneização das plaquetas, ficando por 1 hora em temperatura de 20 a 22°C para ocorrer à desagregação espontânea das plaquetas, para finalização do PRP.

Foram coletados 8 ml do PRP em seringa de 20ml, sendo colocado 1 ml em tubo de microcentrífuga devidamente identificado, recebendo a sigla I, onde doravante será denominada de PRP puro. Seguindo o trâmite clínico normal, na seringa o qual restavam os 7 ml de PRP, foi incorporado 1 ml de ClCa a 10% passando a ter uma proporção de 7 para 1. Após o tempo de 1 minuto, para que ocorresse a reação de quebra plaquetária, foi coletado outro 1 ml desta mistura e colocado em tubo de microcentrífuga devidamente identificado, recebendo a sigla II, onde doravante será denominada de PRP ativado.

BIÓPSIA DO TECIDO GENGIVAL

Para a coleta do tecido autógeno o animal foi posicionado sobre a mesa cirúrgica em decúbito ventral e com a cabeça imobilizada em dois pontos fixos com o auxílio de uma mesa para estereotaxia. Após a realização da desinfecção com clorexidina 0,12%, sob anestesia geral foi realizada a biópsia (explante) de aproximadamente 5 mm² (2,5 x 2,0 mm) de mucosa queratinizada (epitélio e tecido conjuntivo) da região palatal, através de cabo de bisturi nº 3 e lâmina cirúrgica no 15C.

Figura 2: A) Animal posicionado sobre a mesa cirúrgica. B) Aspecto do animal após a biópsia do material do palato.



O material obtido foi enviado para o laboratório para realização do isolamento dos fibroblastos pela técnica do explante e estabelecimento da cultura primária dos fibroblastos. Todos os procedimentos de cultura primária de fibroblastos realizados nesta pesquisa são baseados na dissertação “Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos da gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA” (COURA, 2004).

CULTURA PRIMÁRIA

Todos os procedimentos para a obtenção do cultivo primário de fibroblastos gengivais humanos foram realizados sob capela de fluxo laminar (VECO, Campinas, Brasil), em temperatura ambiente, entre 25 e 28°C, em um laboratório de segurança do tipo P2, preparado para a manipulação de microorganismos pertencentes ao grupo de risco 2 (risco individual moderado e risco coletivo limitado; microorganismos que podem provocar doenças no homem, com pouca probabilidade de alto risco para os profissionais do laboratório), assegurando maior proteção aos pesquisadores. Todas as substâncias líquidas foram quantificadas com o auxílio de micropipetas automáticas.

As amostras de tecido da mucosa oral dos ratos foram lavadas por 2 vezes com solução salina de fosfato tamponada (PBS) e, posteriormente, o tecido epitelial foi removido com o auxílio de cabo de bisturi n° 3 e lâmina cirúrgica n° 15, em placas de Petri de 60 mm de diâmetro, que contêm 5 ml do meio de cultura.

A escolha do cultivo de fibroblastos gengivais eliminando os ceratinócitos reside no fato demonstrado por Lõe et al. (1971 e 1974) de que a ceratinização do epitélio bucal é controlada por estímulos

morfogenéticos do tecido conjuntivo subepitelial. Após a desepitelização, a amostra foi fragmentada em 5 partes (explantes) de aproximadamente 1mm^2 .

Em cada uma das 5 (cinco) garrafas de cultura de 25 cm^2 , previamente pré-incubadas a 37°C , 5% de CO_2 com 2 ml do meio de cultura devidamente suplementado, por 20 minutos, para equilíbrio da fase gasosa, 1 (hum) explante foi adicionado concomitante à colocação de mais 2 ml de meio de cultura. As garrafas de cultura permaneceram invertidas por 2h na estufa a 37°C , 5% de CO_2 (NUAIRE US AUTOFLOW CO_2 Water Jacketed Incubator, EUA) para aderência dos explantes ao substrato. Após, as garrafas de cultura foram colocadas na sua posição original e o crescimento celular foi checado, diariamente, através de um microscópio de fase invertida (40x a 200x, Olympus, Japão).

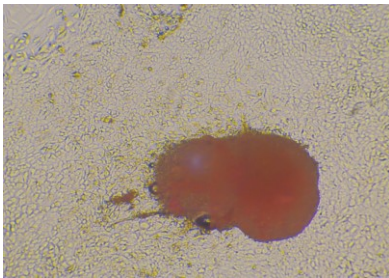


Figura 3 - Imagem de microscópio de fase invertida da explante de fibroblastos proliferando sobre a placa

O meio de cultura escolhido para o cultivo dos fibroblastos gengivais foi o meio DMEM suplementado por PRP. O meio de soro fetal bovino (SFB) - como preconizado por Coura (2004) e mais atualmente por Meenakshi et al. (2013) - foi optado por não ser utilizado nesta pesquisa para que houvesse maior fidedignidade aos resultados esperados em humanos, sendo assim substituído pelo Plasma Rico em Plaquetas.

Quando verificada confluência de aproximadamente 70%, as células foram então tripsinizadas a fim de obter a individualização das mesmas e essa cultura primária originou uma nova subcultura na proporção de 1:1. Nesta primeira “passagem” – que caracteriza o número de vezes que uma cultura foi subcultivada – os explantes foram removidos. A transferência de uma passagem ou subcultura de uma garrafa para outra geralmente causa uma subdivisão de uma população

celular proliferativa capaz de perpetuação através do estabelecimento de uma linhagem celular.

A cada 4 (quatro) dias o meio era trocado, realizando a substituição de apenas metade do conteúdo das placas de cultura. A alteração de coloração do meio de cultura, que indica a atividade metabólica celular e alteração do pH, foi controlada diariamente.

O meio de cultura foi removido para dar continuidade à linhagem celular e as células foram lavadas duas vezes com PBS (0,2 mL/cm²) e retiradas de seu substrato pela ação da tripsina (500 µl) durante o período de 5 min a 37°C – processo nomeado tripsinização. A inativação da tripsina foi realizada adicionando meio de cultura DMEM suplementado. Após todo o procedimento, as placas foram recolocadas na estufa de CO₂ onde permaneceram incubadas e monitoradas diariamente até que a nova subconfluência fosse atingida. Na 6ª passagem as amostras celulares foram removidas das 5 (cinco) placas de cultura.

SEMEADURA DOS FIBROBLASTOS

Após o estabelecimento da cultura primária dos fibroblastos, as células foram semeadas sobre membranas em placas de cultura de 96 poços, para realização dos testes de viabilidade celular (MTS). Foi utilizado como arcabouço para os fibroblastos cultivados tanto a membrana de Celulose Bacterina (MCB) como a matriz dérmica acelular (MDA - Surederm®), ambas testadas seguindo o protocolo utilizado na dissertação “Análise do comportamento de fibroblastos gengivais cultivados sobre diferentes tipos de membranas reabsorvíveis” (NETO, 2010).

Para a produção da MCB que foi realizada no IntelLAB – UFSC, preparou-se um pré-inóculo em um tubo cônico com 10% do volume total de inóculo de meio manitol (25 g·L⁻¹ de manitol, 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura e 3 g·L⁻¹ de peptona bacteriológica) e 5 colônias da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* por mL de pré-inóculo. O pré-inóculo foi agitado em vórtex durante 1 minuto e, após isso, leu-se a absorbância do meio em placa de 96 poços com alíquota de 200 µL no comprimento de onda de 660nm até que a absorbância se estabelecesse em aproximadamente 0,150. As membranas foram produzidas em placas de 96 poços onde foi colocado 200 µL de inóculo por poço. O crescimento bacteriano aconteceu em condição estática a 26°C. Após 7 dias de cultivo, as membranas foram retiradas e purificadas em solução

0,1 mol·L⁻¹ de NaOH a 50°C durante 24 horas. Após esse período, as membranas foram lavadas com água destilada até que o pH da água de enxágue equivallesse ao da água usado na lavagem. Por fim, esterilizou-se o material em autoclave (121°C e 1,1 atm).



Figura 4 - Membrana de Celulose Bacteriana MCB (InteLAB - UFSC)

Já a matriz dérmica acelular (MDA), comercialmente vendida pela empresa Hans Biomed com o nome de Surederm® foi adquirida no mercado estrangeiro.

VIABILIDADE CELULAR

Foi escolhido o teste com corante MTS para avaliar a cultura celular. Este procedimento consiste na utilização do corante MTS em associação com o agente acoplador de elétrons Metassulfato de Fenazina (PMS) que juntos facilitam a leitura, visualização e contabilização das células de fibroblastos, podendo assim os caracterizar como viáveis ou não.

MTS

A viabilidade das células sobre as membranas de MCB e MDA (Surederm®) foram avaliadas pelo método colorimétrico com MTS. Foram semeadas 1×10^5 células (contadas na câmara de Neubauer) por poço sobre as membranas. Após o tempo de cultura de 48 horas, as membranas e o controle placa, contendo as células foram lavadas com Tampão Fosfato Salino (PBS) três vezes e as membranas transferidas para uma nova placa de 96 poços. Sobre cada membrana foram adicionados 100 µL de meio DMEM e 20 µL do reagente MTS. As

membranas foram incubadas por 2 horas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C.

Após a incubação, a solução foi homogeneizada e 100 µL de solução foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. A absorbância foi determinada a 490 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA). O grupo do controle positivo foi constituído de células cultivadas sobre a placa de cultura de tecidos (TPP, Switzerland). Através da câmara de Neubauer foi realizada a contagem de células que foram introduzidas entre a lâmina e a câmara e se preencheram por capilaridade.

O estabelecimento da cultura primária de fibroblastos se deu de forma eficaz e satisfatória onde as células conseguiram sobreviver ao processo de desagregação e aderiram à placa, formando então uma monocamada primária de fibroblastos.

Mediante análise do teste com o corante MTS foi possível qualificar a atividade metabólica dos fibroblastos após 48 horas de cultivo, verificando-se que as membranas apresentam viabilidade semelhante. Foi possível notar através da análise por meio de microscopia, a presença de proliferação de fibroblastos que se encontraram espalhados na placa. Desta forma as membranas MDA e MBC foram classificadas como biocompatíveis para utilização como potenciais arcabouços celulares.

Foi realizada análise estatística de variância não paramétrica (ANOVA), porém não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

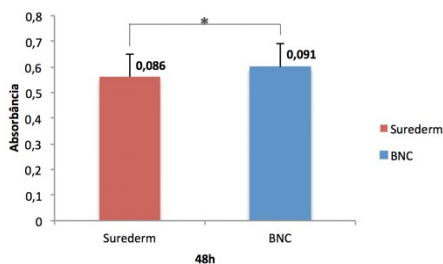


Gráfico 1 - Atividade metabólica dos fibroblastos de gengiva de rato
(*). Não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) entre si, utilizando-se variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey.

PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DE ENXERTO

Antes de todo procedimento cirúrgico os animais foram submetidos aos cuidados de desinfecção e assepsia. Então, foi confeccionado um defeito circular na mucosa jugal bilateral dos animais (Figura 5).



Figura 5 - Defeito criado em mucosa jugal direita

Todos os defeitos criados seguiram um padrão de tamanho específico, padronizado por meio de um bisturi circular de diâmetro igual a 08 mm.

No grupo controle negativo, os defeitos foram apenas criados, sem nenhum recobrimento. No controle positivo, foi realizado enxerto gengival livre proveniente do palato. Nos demais grupos as membranas foram suturadas à mucosa, cobrindo a ferida cirúrgica.



Figura 6 - Ilustração do enxerto gengival livre proveniente do palato.

Os ratos foram divididos em 06 grupos, organizados aleatoriamente, conforme tabela a seguir.

Tabela 1 - Descrição dos grupos com o número de sítios operados

	Grupos	Enxerto	N
G1	CN	Controle Negativo - Sem recobrimento	12
G2	CP	Controle Positivo - Enxerto Gengival Livre (Palato)	14
G3	MCB	Matriz de Celulose Bacteriana	16
G4	MCB + F	MCB + Fibroblastos	10
G5	MDA	Matriz Dérmica Acelular	8
G6	MDA + F	MDA + Fibroblastos	6

CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Logo após toda e qualquer cirurgia os animais foram acompanhados até cessar o efeito do anestésico, também foi realizado o agasalhamento dos animais, no intuito de manter a temperatura corpórea. Os animais foram acompanhados durante os 15 dias após as cirurgias quanto à integridade das suturas, o aspecto clínico da área operada e os aspectos de saúde geral dos animais.

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Após 15 dias da cirurgia de enxertia, os animais foram sedados para avaliação clínica da área operada, juntamente com a fotografia da região. A avaliação clínica da área operada considerou a regularidade do epitélio e a presença ou ausência de úlcera, edema e rubor. Todas as informações foram tabuladas e as características predominantes em cada grupo foram analisadas.

OBTENÇÃO DAS PEÇAS E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a avaliação clínica foi realizada uma biópsia da região enxertada para processamento histológico. A biópsia foi realizada com uma grande margem de segurança, permanecendo a área operada no centro da amostra, próxima à comissura labial.

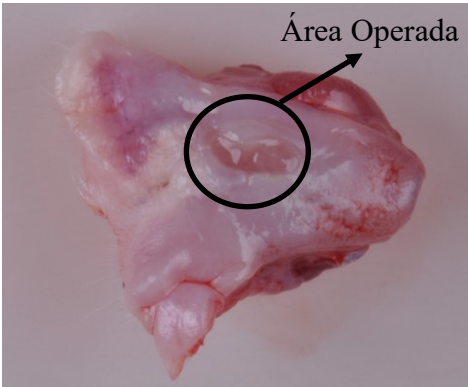
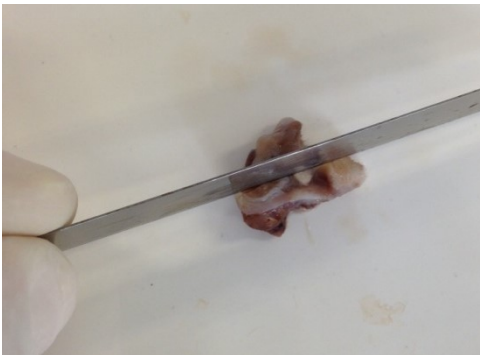


Figura 7 - Amostra após a biópsia

Os fragmentos teciduais contendo os corpos de prova foram fixados em formol a 10% tamponado por um período de 24 a 48 horas. Após a fixação foi feita a análise visual macroscópica das peças. Nesse momento as peças foram aparadas em seus excessos, os corpos de prova removidos e foi realizado um corte no sentido longitudinal da peça para estabelecimento do perfil de inclusão do material.



*Figura 8 - Macroscopia:
Corte da peça histológica*

A seguir, as peças foram submetidas ao processamento histológico para inclusão em parafina, seguindo todos os procedimentos recomendados pelo protocolo de fixação, desidratação e inclusão. Para a avaliação da morfologia tecidual, cortes histológicos de 3 micrômetros foram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina.

IMUNOHISTOQUÍMICA

Depois de finalizado o processo histológico, as amostras foram submetidas à técnica de imunoistoquímica pelo método da streptavidina-biotina-peroxidase. Para cada um dos anticorpos seguiram-se as orientações do fabricante e padronização, assim como incluídos controles positivos e negativos para cada reação. O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário. Das amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina foram obtidos cortes de 3 μm de espessura, estendidos em lâminas de vidro preparadas com solução de ATPS (3-aminopropiltriethoxisileno). Os cortes foram inicialmente fixados na lâmina mantendo as lâminas em estufa a 65°C, durante 3 horas. Então realizou-se a desparafinização e reidratação dos cortes, seguida de duas imersões de 20 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 6% em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena.

A reativação antigênica foi realizada mantendo as lâminas em solução de tampão citrato 0,01M, pH 6,0, em banho-maria à temperatura constante de 96°C, durante 40 minutos. A incubação com os anticorpos primários foi realizada em câmara úmida mantida sob refrigeração (4 a 8°C), durante 18 horas. Os anticorpos utilizados foram o *Alfa Smooth Muscle Actin* (Dako), marcador de miofibroblastos, auxiliando a identificação e avaliação destas células e de vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo, e o *PAN-Cytokeratin AE1/AE3* (Santa Cruz), marcador de células epiteliais, auxiliando a avaliação do epitélio da área em reparo, evidenciando a queratina.

Para amplificação da reação foi utilizado o kit EasyLink One (EasyPath), que consta de soro secundário policlonal e do soro terciário streptavidina-biotina com peroxidase conjugada. A revelação da reação foi realizada através de solução cromógena, contendo diaminobenzidina (DAB) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com hematoxilina de Harris, seguido de desidratação em cadeias de concentração crescentes de etanol (etanol 85% a etanol absoluto), diafanização em xilol e

montagem com Entellan (Merck, Alemanha). Após montadas, as lâminas foram mantidas em estufa (40°C) por no mínimo 24 horas antes de serem examinadas ao microscópio.

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Finalizado o processamento histológico e a reação imunohistoquímica, as lâminas foram escaneadas com um digitalizador de lâminas AXIO SCAN 2.1 (Zeiss, Alemanha). Tendo todas as lâminas padronizadas e com o mesmo tamanho, com o auxílio de um programa para análise de imagem AxionVision (Zeiss, Alemanha), as lâminas foram analisadas por um observador previamente calibrado.

Primeiramente se identificou a área operada e avaliou se ocorreu a reepitelização completa ou se havia área de úlcera. Em seguida, o epitélio foi classificado em fino (1 a 3 camadas de células) ou regular (4 ou mais camadas de células epiteliais). Também se avaliou a presença ou ausência de cristas epiteliais e queratina (*PAN-Cytokeratin*).

Também se realizou a contagem de vasos sanguíneos, células inflamatórias e miofibroblastos (α -SMA). O número de células foi obtido dentro de uma mesma área (aumento de 20x) e classificado em leve (menos de 20 células), regular (20 a 60 células) e intenso (60 ou mais células).

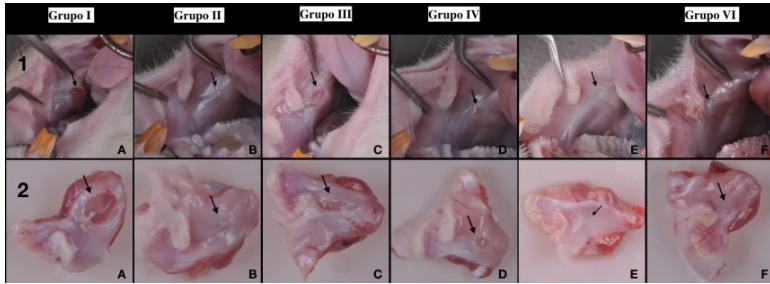
Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste exato de Fisher. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Um teste Kappa foi realizado, para calibração do examinador.

RESULTADOS

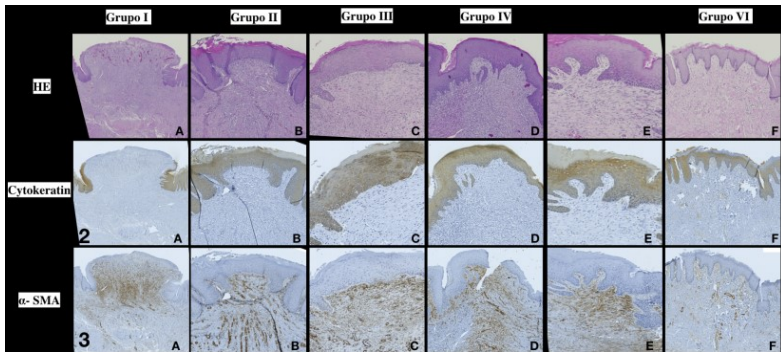
Os resultados foram obtidos através das análises das imagens da área operada (Figura 9), da análise das lâminas histológicas e imunohistoquímicas (Figura 10). O resultado do teste Kappa foi 0,845. Os resultados estatísticos foram obtidos intragrupo, quando presentes afirmam a característica predominante de cada grupo. Para todas as variáveis testadas, apenas a quantidade de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório não apresentaram valores significativos nos grupos ($p < 0,05$).

Analisando os parâmetros clínicos (Tabela 2), em relação à regularidade da área operada, apenas o grupo I apresentou epitélio irregular, os grupos II, IV e VI apresentaram epitélio regular. Apesar de haver uma

tendência, não se pode afirmar estatisticamente que os grupos III e V apresentaram epitélio regular. A presença de úlcera só foi constatada no grupo I. Os grupos II, IV, V e VI não apresentaram úlcera. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que o grupo III não apresentou úlcera. O rubor não foi encontrado nos grupos II, V e VI. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que os grupos I, III e IV não apresentaram rubor. O edema foi presente no grupo I. O grupo VI não apresentou edema. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que os grupos III e IV apresentaram edema e que os grupos II e V não apresentaram edema.



*Figura 9 - Fotos da área operada após 15 dias da cirurgia.
 Linha 1: Imagem direta da mucosa. Linha 2: Imagem da biópsia.
 (A) Grupo Negativo; (B) Grupo Positivo; (C) Grupo MCB; (D) Grupo
 MCB+Células; (E) Grupo MDA; (F) Grupo MDA+Células*



*Figura 10 - Lâminas histológicas e imunohistoquímica.
 Linha 1: Histologia com HE. Linha 2: Imunohistoquímica com Cytokeratin. Linha
 3: Imuno com α-SMA.
 (A) Grupo Negativo; (B) Grupo Positivo; (C) Grupo MCB; (D) Grupo
 MCB+Células; (E) Grupo MDA; (F) Grupo MDA+Células*

Tabela 2 - Resultados da avaliação clínica dos grupos.

		Característica da Área Operada				Rubor		Edema	
		Irregular	Regular	Com úlcera	Sem úlcera	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Grupos	I-Negativo	11 _a	1 _b	10 _a	2 _b	7 _a	5 _a	3 _a	9 _b
		91,7%	8,3%	83,3%	16,7%	58,3%	41,7%	25,0%	75,0%
	II-Positivo	3 _a	11 _b	2 _a	12 _b	13 _a	1 _b	10 _a	4 _a
		21,4%	78,6%	14,3%	85,7%	92,9%	7,1%	71,4%	28,6%
	III-MCB	7 _a	9 _a	3 _a	13 _a	9 _a	7 _a	7 _a	9 _a
		43,8%	56,3%	18,8%	81,3%	56,3%	43,8%	43,8%	56,3%
	IV-MCB+ Fibroblastos	3 _a	7 _b	2 _a	8 _b	5 _a	5 _a	4 _a	6 _a
		30,0%	70,0%	20,0%	80,0%	50,0%	50,0%	40,0%	60,0%
V-MDA	3 _a	5 _a	0 _a	8 _b	8 _a	0 _b	5 _a	3 _a	
	37,5%	62,5%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	62,5%	37,5%	
VI-MDA + Fibroblastos	0 _a	6 _b	0 _a	6 _b	6 _a	0 _b	6 _a	0 _b	
	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	
Fisher's Test	P Value	0,001		0,000		0,010		0,025	

Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$)

Analisando as lâminas histológicas (Tabela 3), os grupos II, V e VI apresentaram epitélio regular. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que o grupo I não apresentou epitélio e que os grupos III e IV apresentaram epitélio regular. As cristas epiteliais não foram encontradas no grupo I. Os grupos V e VI apresentaram cristas epiteliais. O grupo II apresentou resultados divididos (50% com cristas epiteliais). Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que os grupos III e IV não apresentaram cristas epiteliais. O infiltrado inflamatório esteve presente em todos os grupos, mas a quantidade de infiltrado inflamatório não obteve valores significativos ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Resultados da avaliação histológica dos grupos.

		Epitélio		Cristas Epiteliais		Infiltrado Inflamatório		
		Ausente	Presente	Ausente	Presente	Leve	Regular	Intenso
Grupos	I-Negativo	8 _a 66,7%	4 _a 33,3%	10 _a 83,3%	2 _b 16,7%	2 16,7%	3 25,0%	7 58,3%
	II-Positivo	4 _a 28,6%	10 _b 71,4%	7 _a 50%	7 _a 50%	3 21,4%	5 35,7%	5 35,7%
	III-MCB	6 _a 37,5%	10 _a 62,5%	9 _a 56,3%	7 _a 43,8%	0 0,0%	7 43,8%	9 56,3%
	IV-MCB+ Fibroblastos	4 _a 40,0%	6 _b 60,0%	8 _a 80,0%	2 _a 20,0%	1 10,0%	4 40,0%	5 50,0%
	V-MDA	0 _a 0,0%	8 _b 25,0%	1 _a 12,5%	7 _b 87,5%	0 0,0%	6 75,0%	2 25,0%
	VI-MDA + Fibroblastos	0 _a 0,0%	6 _b 0,0%	0 _a 0,0%	6 _b 100%	1 16,7%	4 66,7%	1 16,7%
Fisher's Test	P Value	0,000		0,000		0,061		

*Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$).
Contagem Vasos e Infiltrado: Leve (menos de 20 células), Regular (20 a 60 células), Severo (mais de 60 células).*

Analisando as lâminas imunohistoquímicas (Tabela 4), a queratina não foi encontrada no grupo I. Os grupos IV, V e VI apresentaram queratina. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que o grupo II e III apresentaram queratina. Os miofibroblastos estiveram presentes em todos os grupos. A quantidade de miofibroblastos foi considerada leve a regular no grupo VI e severa no grupo I, III e IV. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que o grupo II apresentou uma quantidade severa de miofibroblastos. Os vasos sanguíneos estiveram presentes em todos os grupos, mas a quantidade de vasos sanguíneos não obteve valores significativos ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Resultados da avaliação imunohistoquímica dos grupos.

		Queratina		Miofibroblastos			Vasos Sanguíneos		
		Ausente	Presente	Leve	Regular	Intenso	Leve	Regular	Intenso
Grupos	I-Negativo	11 _a 91,7%	1 _b 8,3%	0 _a 0,0%	1 _a 8,3%	11 _b 91,7%	2 16,7%	3 25,0%	7 58,3%
	II-Positivo	4 _a 28,6%	10 _a 71,4%	2 _a 14,3%	4 _a 28,6%	8 _a 57,1%	2 14,3%	5 35,7%	7 50,0%
	III-MCB	6 _a 37,5%	10 _a 62,5%	0 _a 0,0%	0 _a 0,0%	16 _b 100%	0 0,0%	7 43,8%	9 56,3%
	IV-MCB+ Fibroblastos	4 _a 40,0%	6 _b 60,0%	0 _a 0,0%	2 _{a,b} 20%	8 _b 80,0%	3 30,0%	3 30,0%	4 40,0%
	V-MDA	1 _a 12,5%	7 _b 87,5%	1 _a 12,5%	4 _a 50%	3 _a 37,5%	0 0,0%	4 50,0%	4 50,0%
	VI-MDA + Fibroblastos	0 _a 0,0%	6 _b 100%	2 _a 33,3%	4 _a 66,7%	0 _b 0,0%	0 0%	4 66,7%	2 33,3%
Test	<i>P Value</i>	0,000		0,000			0,298		

*Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$).
Contagem Miofibroblastos: Leve (menos de 20 células), Regular (20 a 60 células), Severo (mais de 60 células).*

O grupo I apresentou clinicamente epitélio irregular, úlcera e edema. Histologicamente não apresentou cristas epiteliais nem queratina e apresentou grande quantidade de miofibroblastos. O grupo II apresentou clinicamente epitélio regular e ausência de úlcera e rubor. Histologicamente apresentou epitélio regular e com tendência de apresentar queratina.

O grupo III apresentou clinicamente tendência a epitélio regular, ausência de úlcera e de rubor e presença de edema. Histologicamente apresentou miofibroblastos em grande quantidade. O grupo IV apresentou clinicamente epitélio regular e ausência de úlcera. Histologicamente apresentou epitélio regular com queratina e presença regular a severa de miofibroblastos.

O grupo V apresentou clinicamente ausência de úlcera e de rubor. Histologicamente apresentou epitélio regular, com cristas epiteliais e queratina. O grupo VI apresentou clinicamente epitélio regular, ausência de úlcera, de rubor e de edema. Histologicamente apresentou epitélio regular, com cristas epiteliais e queratina, miofibroblastos com quantidade leve a regular.

DISCUSSÃO

Podemos observar que o grupo positivo apresentou melhor aspecto clínico que o grupo negativo, pois apresentou tecido com superfície regular e com ausência de úlcera, rubor e edema. Também apresentou melhores aspectos histológicos, com um epitélio regular, presença de queratina, vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório e miofibroblastos. A presença de tecido queratinizado em região cicatrizada é uma característica de grande relevância, corroborando com resultados de estudos onde se realizou instalação de implantes dentários, na presença e ausência de mucosa queratinizada (DEVEREAUX et al., 2018), onde se afirma que em locais de ausência de mucosa queratinizada, ocorre maior reabsorção de crista alveolar e recessão marginal da mucosa, em comparação a regiões de mucosa mastigatória, com presença de tecido queratinizado. Este tecido nos oferece particularidades como proteção, ganhos em sustentação, manutenção de higiene, redução de risco de doenças peri-implantares, estética, entre outros fatores (BENGAZI et al., 2015 e BUYUKOZDEMIR ASKIN et al., 2015).

Observamos que apenas o grupo negativo apresentou úlcera, enquanto os outros grupos apresentaram continuidade do epitélio. Algumas amostras dos demais grupos apresentaram úlcera, entretanto, esta foi uma característica predominante do grupo negativo. Mas essa característica já era esperada, pois no grupo negativo não houve nenhum recobrimento, sendo normal a maior demora para cicatrização da região. Sendo assim, o ideal é sempre recobrir as lesões orais. Durante anos os auto-enxertos vêm sendo utilizados com grande sucesso, no entanto, certas limitações forçam pesquisadores a procurarem enxertos alternativos onde supririam necessidades de conforto, compatibilidade e aceitabilidade pelo paciente. Na técnica de enxerto gengival livre, é necessário um segundo local cirúrgico para o tecido do doador, onde este sítio será cicatrizado por segunda intenção, podendo resultar em dor pós-operatória e morbidade. Os enxertos gengivais livres resultam em aparência estética desfavorável, em relação ao comportamento dos tecidos inseridos circunvizinhos à área operada, culminando em um resultado inestético. Além disso os enxertos autógenos não podem ser utilizados para aumentar a largura de gengiva inserida em vários elementos dentais por causa da oferta limitada do doador (RAMBO et al., 2008).

O grupo III apresentou presença de ulceração ou perda de continuidade epitelial, por conta, talvez, da presença do remanescente do arcabouço utilizado. Em muitas amostras os observadores levantaram suspeita de que o material localizado no meio da lesão possa ser o arcabouço instalado. Analisou-se que a lesão se apresentava com superfície regular, com sinais leves de inflamação, como rubor e edema em volta da lesão. A MCB tem várias utilidades e mostra-se uma relevante ferramenta para diversos fins, como para terapias de queimaduras, úlceras e manipulação tecidual em casos envolvendo implantes dentários. Comparando nossos resultados ao que se tem na literatura, podemos observar que a cicatrização foi previsível (CALLAN & SILVERSTEIN, 1998).

O comportamento do grupo V mostrou resultado semelhante ao grupo controle positivo. Foi analisado que este grupo não apresentou úlcera nem rubor. Apresentou um epitélio regular, com cristas epiteliais e queratina. Estudos mostram que a MDA proporciona uma espessura uniforme, é facilmente cortado, material bem-adaptável, e requer um curto período de tempo para reidratar antes de poder ser utilizado (SHULMAN J, 1996). Em contrapartida, a colheita do tecido conjuntivo do palato é um procedimento demorado e o tamanho do enxerto pode ser limitado, além de gerar novo sítio cirúrgico, onde com a MDA este

desconforto não é presenciado. Estudos que comparam MDA e enxerto gengival livre demonstram que a MDA não é tão eficaz no aumento da largura da gengiva inserida, porém, é mais previsível em sua estética, misturando-se com o tecido adjacente. A quantidade de gengiva inserida adquirida com MDA é clinicamente suficiente para prevenir inflamação persistente (HARRIS, 1998). A MDA atua como uma estrutura de suporte para permitir o repovoamento de fibroblastos e vasos sanguíneos no epitélio de tecidos circundantes e é, eventualmente, substituída por tecidos do hospedeiro (WEI et al., 2000).

O grupo IV apresentou, em boa parte das amostras, um tecido regular, sem úlcera. Na histologia apresentou um epitélio fino, ausência de cristas epiteliais e queratina, presença de células inflamatórias, neovasos e miofibroblastos. Comparando ao grupo III, pode-se afirmar que a presença de fibroblastos favoreceu o processo de cicatrização. Em comparação à literatura, não foram observados relatos anteriores utilizando este material com esta cultura específica associada, determinando-se assim uma lacuna sobre este assunto na literatura científica.

O grupo VI apresentou resultados promissores. Além das ótimas qualidades clínicas, superfície regular, ausência de úlcera, de edema e de rubor, este grupo apresentou características histológicas de cicatrização avançadas, como um epitélio regular, com uma boa quantidade de tecido queratinizado, com cristas epiteliais constantes e bem delimitadas, miofibroblastos e neo vasos. Comparando diretamente aos demais grupos, é visto que o grupo se apresentou de forma superior até ao grupo controle positivo, expondo cicatrização superior e sendo o melhor resultado da pesquisa. Pode-se afirmar que isso ocorreu devido à presença dos fibroblastos, que favorecem o processo de cicatrização. Não existem resultados na literatura compatíveis com este resultado. Mas demonstra um grande potencial, devendo ser estudado e aprimorado.

Analisando os comportamentos histológicos, podemos concluir que em 15 dias de cicatrização, os grupos foram muito similares entre si, com uma pequena diferença ao grupo VI, onde exibiu características superiores de cicatrização. Esta situação nos dá diversidade nas opções de tratamento aos desafios clínicos contemporâneos, contudo são necessários estudos futuros com diferentes períodos de cicatrização, em outros sítios anatômicos, em outros tipos de organismos, para conclusões mais concretas sobre o comportamento clínico e histológico destes materiais associados ou não às culturas celulares.

Destaca-se a grande utilidade da imunohistoquímica através dos marcadores Cytokeratin, marca o tecido epitelial, e o α -SMA que, além de marcar miofibroblastos, também marcou os vasos sanguíneos. A importância de marcar o tecido epitelial foi para confirmação da área operada, além de confirmar a presença de queratina, de suma importância em cirurgias de enxerto. Já as células marcadas pelo α -SMA ajudam a identificar a etapa que se encontra a cicatrização. A avaliação destas células em HE é dificultada pela presença de grande quantidade de células inflamatórias. Uma das limitações em estudar melhor o comportamento dos miofibroblastos foi que nenhum grupo apresentou significância estatística. Também se destaca o tempo de cicatrização das lesões induzidas de 15 dias como uma das possíveis limitações deste estudo, onde outros períodos poderiam ressaltar resultados mais promissores entre os grupos. Também podemos destacar a utilização de animais de pequeno porte. Novos estudos devem ser desenvolvidos em animais de portes maiores, para continuar a linha de estudo, possibilitando a utilização futura desta técnica em humanos.

CONCLUSÕES

Conclui-se que esta técnica de enxertia gengival com fibroblastos de cultura primária suplementada com PRP obteve resultados clínicos e histológicos semelhantes à técnica de enxerto gengival livre.

Através deste estudo foi possível estabelecer um protocolo para pesquisas de cirurgias de enxertia de tecido mole em ratos.

As duas matrizes testadas podem ser usadas como arcabouço para células do tecido gengival, sendo a MDA a matriz mais indicada em enxertos gengivais livres em mucosa jugal de ratos.

A utilização de fibroblastos obtidos por cultura primária influenciou positivamente o processo de reparo. A suplementação do meio com PRP além de favorecer o processo de cicatrização, viabiliza a técnica para utilização em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIBRAD M, SHAHABUEI M, SAHABI M. Significance of the width of keratinized mucosa on the health status of the supporting tissue around implants supporting overdentures. **J Oral Implantol** 2009; 35: 232 - 7.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência.** 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências – Opção Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; ANTONIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 843-848, 2003.

ANITUA E. - Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.14, n.4, p.529-535, 1999.

ARMELIN H.A. – Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.70, p.2702-2706, 1973.

ARMELIN H.A. – Hormones and regulation of cell division: mammalian cell cultures as an experimental approach. In: *Biochemical Actions of Hormones*, Ed. G. Litwack, vol. III: p.1-21 Academic Press Inc. New York.

ARNOCZKY SP, DELOS D, RODEO SA. **What is platelet-rich plasma?** *Oper Tech Sports Med.* 2011; 19:142–8.

ASSAEL, L.A. The promise of tissue engineering. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 61:155-156, 2003.

BAUME L.J.; HOLZ J.; FIORE DONNO, G. Produits intermédiaires d'obturation soumis au test biologique normalisé [Biological testing of intermediate lining substances]. **J. Can. Dent. Assoc.**, Edinburg, v.38, p.18–27, 1972.

BARTOLD MP, MCCULLOCH CAG, NARAYANAN AS, PITARU S. Tissue Engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology* 2000 2000,24; 253-269.

BENECKE JE JR. Tympanic membrane grafting with alloderm. *Laryngoscope* 2001; 111:1525-1527.

BENFATTI, C. A. M.; BEZ, L. V.; MAGINI, R. S. . Viability Analysis of Subepithelial Connective Tissue Grafts Subjected to a Mechanical Expansion Process: A Histological Study in Dogs. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 31, p. 37-44, 2011.

BENGAZI F, LANG NP, CAROPRESE M, et al. Dimensional changes in soft tissues around dental implants following free gingival grafting: an experimental study in dogs. **Clinical Oral Implants Research**. 2015, 176-182.

BLOCK MS, KENT JN. Factors associated with soft- and hard-tissue compromise of endosseous implants. **J Oral Maxillofac Surg**

BODNER, L.; GROSSMAN, N. Autologous cultured mucosal graft to cover large intraoral mucosal defects: A clinical study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.61, p. 169-173, 2003.

BODNER, L.; GROSSMAN, N. The use of cultured mucosal graft for preprosthetic surgery. **J. Isr. Dent. Assoc.**, v. 18, p. 32-34, 2001.

BOURI JR A, BISSADA N, AL-ZAHRANI MS, FADDOUL F, NOUNEH I. Width of keratinized gingiva and the health status of the supporting tissues around dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2008; 23:323e6

BOYCE, S. T.; HANSBROUGH, J. F. Biologic attachment, growth, and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6 sulfate substrate. **Surgery**, v. 103, p.421-431, 1988.

BRÅNEMARK PI, ADELL R, BREINE U, HANSSON BO, LINDSTRÖM J, OHLSSON A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969; 3:81-100.

BROWN RM JR., WILLISON JH, RICHARDSON CL, **Proc. Natl. Acad. Sci., Cell Biology**, vol. 73, 1976, p. 4565.

BURT, A.M.; PALLET, C.D.; SLOANE, J.P.; O'HARE, M.J.; SCHAFNER, K.F.; YARDENI, P.; ELDAD, A.; CLARKE, J.A.; GUSTERSON, B.A. Survival of culture allografts in patients with burns assessed with probe specific for Y chromosome. **Br. Med. J.**, London, v. 298, p.915-917, 1989.

BUYUKOZDEMIR ASKIN S, BERKER E, AKINCIBAY H, UYSAL S, ERMAN B, TEZCAN I, et al. Necessity of keratinized tissues for dental implants: a clinical, immunological, and radiographic study. **Clin Implant Dent Relat Res** 2015; 17:1-12.

CAMARGO PM, MELNICK PR, KENNEY B. The use of free gingival grafts for aesthetic purposes. **Periodontology** 2000. Vol. 27, 2001 72-96
CAIRO F, PAGLIARO U, NIERI M. Treatment of gingival recession with coronally advanced flap procedures: a systematic review. **J Clin Periodontol** 2008;35: 136-62.

CANEVA M, BOTTICELLI D, VIGANÒ P, MORELLI F, REA M, LANG NP. Connective tissue grafts in conjunction with implants installed immediately into extraction sockets. An experimental study in dogs. **Clin Oral Implants Res** 2013;24: 50-6.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside the organism. **J. Exp. Med.**, Hampshire, v. 15, p.516-528, 1912.

CASTOR SA, TO WC, PAPAY FA. Lip augmentation with AlloDerm acellular allogenic dermal graft and fat autograft: A comparison with autologous fat injection alone. **Aesthetic plast surg** 1999; 23:218-223.

CHUNG DM, OH TJ, LEE J, MISCH CE, WANG HL. Factors affecting late implant bone loss: a retrospective analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2007; 22:117-26.

COURA, G.S. Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA, 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COURA, G. S. et al. Human periodontal ligament: A niche of neural crest stem cells. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 5, p. 531–536, 2008.

COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein acceleration incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. *J. Biol. Chem.*, v.237, p.1555-1562, 1962.

CZAJA, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., Brown Jr., R.M. **Microbial cellulose – the natural power to heal wounds**. Biomaterials, 2006.

CHO MY, LEE SH, HAN KA, LEE JY, JEON HR, KANG NR, KIM MR. Experimental Study on the SureDerm (Acellular Dermal Matrix) Graft for Root Coverage in Dog. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol 6. Seoul, Korea, 2012

DORFMAN HS, KENNEDY JE, BIRD WC. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. **J Clin Periodontol**. 1980;7(4):316- 24.

DORFMAN HS, KENNEDY JE, BIRD WC. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. A four year report. **J Periodontol** 1982;53(6):349–52.

EAGLE H. – Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*. v.122, p.43-46, 1965.

EARLE, W.R. Production of malignancy in vitro: IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 4, p.165-212, 1943.

FENG Y., WANG J., LING S., LI Z., LI M., LI Q., et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuronal cells on fetal bovine acellular dermal matrix as a tissue engineered nerve scaffold. **NRR** 2014; 9:1968 e 78.

FERREIRA, Cimara Fortes. **Avaliação incipiente da influência do plasma rico em plaquetas na proliferação de osteoblastos humanos: estudo “in vitro”**. 2003, 70f. Dissertação (Mestre em Odontologia, opção Implantodontia) – Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FERREIRA, Vanessa Borges Costa. **Protocolo para obtenção do plasma rico em plaquetas de cães**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Opção Ciência Animal) - Programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Araçatuba, 2012).

FERREIRA, Cimara Fortes. Avaliação incipiente da influência do plasma rico em plaquetas na proliferação de osteoblastos humanos: estudo in vitro. Florianópolis, 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

FISHER E, FRODEL JL. Facial suspension with acellular human dermal allograft. **Arch Facial Plast Surg** 1999; 1:195-199.

FILHO, J.S. Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular – estudo “in vitro”, 2002. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FOLKMAN, J.; HAUDENSCHILD, C. Angiogenesis *in vitro*. **Nature**, v. 288, p.551-556, 1980.

FONTANA, J. D.; DESOUSA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DESOUSA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. X. Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute. **Appl Biochem Biotech**, v. 24, n. 5, p. 253-264, 1990.

FOWLER EB, BREAUULT LG. Ridge augmentation with a folded acellular dermal matrix allograft: A case report. **J Contemp Dent Pract** 2001; 2: 31-40.

FRESHNEY, R.I. Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique. 4 ed. New York: Wiley-Liss, 2000. 577p.

FRESHNEY, R.I. *Biology of the cultured cell: a manual of basic technique*. 2.ed. NewYork: Wiley-Liss, 1990. p.347.

FU JH, SU CY, WANG HL. Esthetic soft tissue management for teeth and implants. **J Evid Based Dent Pract** 2012;12(3 Suppl):129–42.

GALGUT, Peter apud RAMBO CR, RECOUVREUX DOS, CARMINATTI CA, PITLOVANCIV AK, ANTÔNIO RV, PORTO LM. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membrane for tissue engineering. **Materials Science & Engineering**. 549-554, 2008.

GIANNOBILE W. - Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. *Tissue Engeneering*. Illinois: Quintessence Books, 1999, p.231-243.

GIRARD S, SIDEMAN M, SPAIN DA. A novel approach to the problem of intestinal fistulization arising in patients managed with open peritoneal cavities. **Am J Surg** 2002; 184:166-167.

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.**, v. 12, p.364-365, 1952.

GREEN, H.; KEHINDE, O.; THOMAS, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p.5665-5668, 1979.

GREENE L.A., SHOOTER E.M. – The nerve growth factor: biochemistry, síntesis and mechanism of action. *Ann. Rev. Neurosci.* v.3, p.353-402, 1980.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–21, 15 maio 2008.

HARKNESS RD. **Biological functions of collagen**. Biol Rev Camb Philos Soc. p. 399-463, 1961.

HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 4, p.140-143, 1907.

HARRIS RJ. Clinical evaluation of 3 techniques to augment keratinized tissue without root coverage. *J Periodontol*, 2001; 72(7): 932-938.

HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 76, n. 2, p. 431–8, fev. 2006a.

HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 76, n. 2, p. 431–8, fev. 2006b.

HENDERSON, R. D. Root coverage using Alloderm® acellular dermal graft material. *Contemp. Dent. Pract.*, Cincinnati, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2000.

HENDERSON Robin, JONES Margaret, STARE Janez. Accuracy of point predictions in survival analysis. *Statistics in Medicine*, vol 20, 2001.

HILLMAN G, STEINKAMP-ZUCHT A, GEURSTEN W, GROSS G, HOFFMAN A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials*, 2002.

HORNSBY P, STUREK M, HARRIS S, SIMONIAN M. Serum and growth factor requirements for proliferation of human adrenocortical cells in culture: comparison with bovine adrenocortical cells. *In Vitro*. 1983; 19:863-9.

HOLLEY R.W., KIERNAN J.A. – Contact inhibition of cell division in 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.60, p.300-304, 1968.

HUANG, T.H.; TSAI, C.Y.; CHEN, S.L.; KAO, C.T. An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer cell-line. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.63, n.6, p.814-821, 2002.

IWATA T., YAMATO M., ISHIKAWA I., ANDO T., OKANO T. **Tissue Engineering in Periodontal Tissue**. *The Anatomical Record*, 2013.

JAHNKE PV, SANDIFER JB, GHER ME, et al. Thick free gingival and connective tissue autografts for root coverage. **J Periodontol** 1993;64(4):315-22.

KARRING, T., OSTERGAARD, E.; LÖE, H. Conservation of tissue specificity after heterotopic transplantation of gingival and alveolar mucosa. *J. Periodont. Res.*, Chicago, v.6, p.282-293, 1971.

KAWAHARA H, SHIOTA M, YAMAKAWA Y. Studies on the effects of dental metals upon the mesenchymal cells in tissue culture. **J. Osaka Odontol. Soc.**, Osaka, v.18, p.348, 1955.

KENNEDY JE, BIRD WC, PALCANIS KG, et al. A longitudinal evaluation of varying widths of attached gingiva. **J Clin Periodontol** 1985;12(8): 667-75.

KENT, L.W.; DYKEN, R.A.; RAHEMTULLA, F.; ALLISON, A.C.; MICHALEK, S.M. Effect of *in vitro* passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression. **Archs. Oral Biol.**, v. 41, n. 3, p. 262-270, 1996.

KIM BS, KIM YK, YUN PY, YI YJ, LEE HJ, KIM SG, et al. Evaluation of peri-implant tissue response according to the presence of keratinized mucosa. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2009; 107:24-8.

KNIGHTON D, PHILIPS G, FIEDEL V. Wound healing angiogenesis: indirect stimulation by basic fibroblast growth factor. *J Trauma* 1990; 30: s1134-s1144

KRIDEL RW, FODA H, LUNDE KC. Septal perforation repair with acellular human dermal allograft. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1998; 124:73-78.

LANGDON, J.; WILLIAMS, D.M.; NAVSARIA, H.; LEIGH, I.M. Autologous keratinocyte grafting: A new technique for intra-oral reconstruction. **Br. Dent. J.**, London, v. 171, n.3-4, p. 87-90, 1991.

LANGELAND L. K., GUTTUSO J, JEROME D.R., LANGELAND K. Histologic and clinical comparison of addent with silicate cements and

cold-curing materials. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.72, p.373–385, 1966.

LANGER B, LANGER L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol* 1985; 56:715-20.

LANGER R., VACANTI JP. **Tissue engineering**. Science 1993; 260p

LAUER, G.; SCHIMMING, R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: A clinical and immunohistologic study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 59, p. 169-177, 2001.

LARSON, B. J.; LONGAKER, M. T.; LORENZ, H. P. Scarless fetal wound healing: a basic science review. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 126, n. 4, p. 1172–80, out. 2010.

LEE, K. Y., ROWLEY, J. A, EISELT, P., MOY, E., BOUHAIR, K., MOONEY, D. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by crosslinker type and cross-linking density. **Macromolecules**, v. 33, p. 4291-4294, 2000.

LEON, P.E. Biotechnology for developing countries. The case of the Central American isthmus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.21, p.194-203, 1993.

LEKOVIC, V. et al. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J. Periodontol.* v. 2, n. 73. p. 198-205, 2002.

LIN NH, GRONTHOS S, BARTOLD PM. 2008. Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dental J* 53:108–121.

LINO, M. D. M.; ROSA, F. P. Matriz dermal acelular em cirurgia periodontal: aplicações clínicas. *Rev. Periodontia*, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 89-94, mar. 2006.

LIU B.A.Y.; ANDERS KALÉN M.D.; RISTO OLOF, MD.; WHALSTROM OLA, MD. Fibroblast proliferation due to exposure to a

platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair and Regeneration* vol. 10, no. 5, 2002.

LO, D. D. et al. Scarless fetal skin wound healing update. **Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews**, v. 96, n. 3, p. 237–47, set. 2012.

LYNCH S.E., BUSER D., HERNANDEZ R.A., WEBER H.P., STICH H., FOX C.H., WILLIAMS R.C. - Effects of the platelet-derived growth factor / Insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental Implants. Results of a Pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol.*, v.62, n. 11, p.710-716, 1991.

MACEDO, Adriana P. **Plasma Rico em Plaquetas: Uma Análise Quantitativa e Qualitativa de Dois Protocolos de Obtenção**. Florianópolis, 2004. 61p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu – Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

MACEDO, L. R. Emprego de membrana de celulose microfibrilar na ceratoplastia lamelar em coelhos (*O. cuniculus*, LINNAEUS, 1758): aspectos clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MALEKZADEH, R.; HOLLINGER, J.O.; BUCK, D.; ADAMS, D.F. ; McALLISTER, B. S. Isolation of human osteoblasts-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. **J. Periodontol.**, Boston, v. 69, p.1256-1262, 1998.

MARX R.E. - Platelet-rich plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. *Tissue Engeneering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Illinois: **Quintessence Books**, 1999, p.71-82.

MARX R.E., CARLSON E.R., EICHSTAEDT R.M., SCHIMMELE S.R., STRAUSS J.E., GEORGE F.K. - Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MARX R.E., GARG A.K. - Bone Graft physiology with use of platelet – rich plasma and hiperbaric oxygen. *The Sinus Bone Graft*. Colorado: **Quintessence Books**, 1999, p.183-189.

MARX R.E., GARG A.K. - A estrutura óssea, o metabolismo e a fisiologia: Seu impacto na implantodontia dentária. **Implant Dent.**, v.7, n.5, p.267-276, 1998.

MASTERS, J.R.W. **Animal Cell Culture**. 3. ed. Oxford: New York, 2000.

MAZLYZAM A.L., AMINUDDIN B.S., SAIM L., RUSZYMAH B.H.I. Human Serum Is an Advantageous Supplement for Human Dermal Fibroblast Expansion: Clinical Implications for Tissue Engineering of Skin. **Archives of Medical Research**, 2008, p. 743-752.

MEENAKSHI A. **Cell Culture Media: A Review**. Labome, Mater Methods, 3:175, University of Pittsburgh Medical Center, 2013.

MOMBELLI A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. **Periodontol** 2000, 2002; 28:177-89.

MUSCHLER, George F.; NAKAMOTO, Chizu; GRIFFITH, Linda G. Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, vol. 86-A, 200.

NETO, A.R.P. Análise do comportamento de fibroblastos gengivais cultivados sobre diferentes tipos de membranas reabsorvíveis, 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

NOVAES JUNIOR AB, PAPALEXIOU V, LUCZYSZYN SM, et al. Immediate implant in extraction socket with acellular dermal matrix graft and bioactive glass: A case report. **Implant Dent** 2002; 11:343-348.

NOVAES, Arthur Belem Júnior apud JONAS R, FARAH LF. Production and application of microbial cellulose. **Polym. Degrad. Stab.** 59 (1998) 101.

OLIVEIRA, C. R. Bacterial Cellulose Membranes Constitute Biocompatible Biomaterials for Mesenchymal and Induced Pluripotent Stem Cell Culture and Tissue Engineering. **Journal of Tissue Science & Engineering**, v. S11, 2012.

OPALENIK, S. R; DAVIDSON, J. M. **During wound repair**. v. 19, n. 2, p. 1–19, 2005.

OKADA H, MURAMAKI S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Crit. Rev. Oral. Biol.** 9(3): 248-266, 1998.

ORLY J., SATO G. – Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium. *Cell*. v.17, p.295-305, 1979

PEAT, N.; GENDLER, S.J.; LALANI, N.; DUHIG, T.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. Tissue-specific expression of human polymorphic epithelial mucin (MUC1) in transgenic mouse. **Cancer Res.**, v. 52, p.1954-1960, 1992.

PIEPER, J. S., OOSTERHOF, A., DIJKSTRA, P. J., VEERKAMP, J.H., KUPPEVELT, T. H. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. **Biomater.**, v. 20, p. 847-848, 1999.

PINI PRATO, G.P.; ROTUNDO, R.; MAGNANI, C.; SORANZO, C. Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: A case report. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.20, p.553-559, 2000.

PINI PRATO, G.P.; 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.**, Chicago, v.74, n.2, p.262-267, 2003.

PEGO, A P., POOT, A, GRIJMA, D., FEIJEN, J. Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. **J. Control. Rel.**, v. 87, p. 69-79, 2003.

RAGHOEBAR, G.M.; TOMSON, A.M.; SCHOLMA, J; BLAAUW, E.H.; WITJES, M.J.; VISSINK, A. Use of cultured mucosal graft to cover defects caused by vestibuloplasty: An vivo study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 53, n. 8, p. 872-878, 1995.

RAI B, HO KH, LEI Y, SI-HOE KM, TEO CMJ, BIN YACOB K, CHEN FL, NG FC, TEOH, SH. Polycaprolactone-20% tricalcium phosphate scaffolds in combination with platelet-rich plasma for the treatment of critical-sized defects of the mandible: a pilot study. **J Oral Maxillofac Surg** 65:2195–2205, 2007.

RAVEL R. - Laboratório Clínico: **Aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p.109-129.

RAMBO CR, RECOUVREUX DOS, CARMINATTI CA, et al. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membrane for tissue engineering. **Materials Science & Engineering**. 549-554, 2008.

REINO, Daniel Maeda; AYUB, Lauro Garrastazu; RAMOS, Umberto Demoner; NOVAES JR, Arthur Belém. Uso de substitutos de enxertos de tecido mole na odontologia. **Braz J Periodontol**. Vol 21, 2011.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European surgical research**. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes, v. 49, n. 1, p. 35–43, jan. 2012.

RODRIGUES, Annelissa Zorzeto. **Avaliação in vitro do cultivo de fibroblastos gengivais humanos em matriz dérmica acelular**. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Periodontia) – Programa de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

RIPAMONTI U., REDDI A.H. - – Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. **J. Periodontal Res.**, v.29, p.225-235, 1994.

ROSS R., GLOMSET J., KARIYA B., RAINES E. – Role of platelet factors in the growth of cells in culture. **Natl. Cancer Inst. Nonogr**. v.48, p.103-108, 1978.

ROSSA JÚNIOR, C.; MARTINEZ, K.G.; SILVÉRIO, A.E.T. Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos – estudo *in vitro*. **Pesqui. Odontol. Brás.**, São Paulo, v. 16, n. 3, p:234-238, 2002.

SALVI GE, LANG NP. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:116e27.

SANT'ANNA, A.C.P.; MARQUES, M.M.; BARROSO, E.C.; PASSANEZI, E. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. *Rev. Fac. Odontol.*, Bauru, v. 10, n. 3, p. 134-140, 2002.

SANTOS, Thiago de Santana. Efeitos da terapia celular com a associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos no reparo do tecido ósseo. 2014. Tese (Doutorado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

SATO, J.D.; HAYASHI, I.; HAYASHI, J.; HOSHI, H. KAWAMOTO, T.; McKEEHAN, W.L.; MATSUDA, R.; MATSUZAKI, K.; MILLS, K.H.G.; OKAMOTO, T.; SERRERO, G. SUSSMAN, D.J.; KAN, M. Specific cell types and their requirements. In: DAVIS, J.M. (Ed.). **Basic Cell Culture: a practical approach**. Oxford University Press: New York. 1994. p.181-222. Cap. 6.

SCHROEDER A, VAN DER ZYPEN E, STICH H, SUTTER F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium- sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg* 1981; 9:15-25.

SCHULTZ, G. S. et al. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, v. 19, n. 2, p. 134–48, 2011.

SHIEH, S.; CHENG, T. Regeneration and repair of human digits and limbs: fact and fiction. *Regeneration*, v. 2, n. 4, p. 149–168, 2015.

SHULMAN J. Clinical evaluation of an acellular dermal allograft for increasing the zone of attached gingiva. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1996; 8:201-208.

SEIFERT, A. W. et al. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature*, v. 489, n. 7417, p. 561–5, 2012.

STAMMEN, J. A., WILLIAMS, S., KU, D., GULBERG, R. E. Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. **Biomat.**, v. 22, 799-806, 2001.

SULAEVA, L., et al., Bacterial cellulose as a material for wound treatment: **Properties and modifications**. A review, *Biotechnol Adv*, 2015.

SULLIVAN HC, ATKINS JH. Free autogenous gingival grafts. I. Principles of successful grafting. **Periodontics**. 1968;6(3):121-9.

SULLIVAN H, ATKINS J. Free autogenous gingival grafts. III. Utilization of grafts in the treatment of gingival recession. **Periodontics** 1968; 6:152.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **J. R. Soc. Interface**, v.6, p. S311- 324, 2009.

TABORDA, Carlos; MEHNERT Dolores U.; DA SILVA Carlos Augusto. **Manual de Normas Técnicas**. Biotério de Experimentação Animal - Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas USP, 25p, 2004.

TANG, A.T.H.; LIU, Y.; BJÖRKMAN, L.; EKSTRAND, J. In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblasts. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v.116, n.2, p.132-138, 1999.

TEN CATE AR. The fibroblast and its products. In: *Oral Histology. Development structure and function*. Toronto: C. V. Mosby, p.90-105, cap. 6, 1989.

TRAVASSOLI-HOJJATI, S.; SATTARI M., GHASEMI T., AHMADI R., MASHAYEKHI A. Effect of platelet-rich plasma concentrations on the proliferation of periodontal cells: An *in vitro* study. **European Journal of Dentistry**. 2016.

UEDA, M.; HATA, K-I.; SUMI, Y; MIZUNO, H.; NIIMI, A. Peri-implant soft tissue management through use of mucosal epithelium.

Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., St. Louis, v. 86, n. 4, p. 393-400, 1998.

UEDA, M.; SUMI, Y.; MIZUNO, H.; HONDA, M. ODA, T.; WADA, K.; BOO, J.S.; KENICHIRO, H. Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. **Mater. Sci. Eng.**, v.13, p.7-14, 2000.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; ROMERO F. T. Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. **Rev. Bras. Cir. Plást** 2009; 24: 212-8.

WAINWRIGHT DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. **Burns** 1995; 21:243-248.

WAINWRIGHT D, MADDEN M, LUTERMAN A, et al. Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. **J Burn Care Rehabil** 1996;17: 124-136.

WARRER K, BUSER D, LANG NP, KARRING T. Plaque-induced peri-implantitis in the presence or absence of keratinized mucosa. An experimental study in monkeys. **Clin Oral Implants Res** 1995; 6: 131e8.

WATANABE K, TABUCHI M. Structural Features and Properties of Bacterial Cellulose Produced in Agitated Culture. **Cellulose**, Vol. 5 (1998) 187-200

WEI PC, LAURELL L, GEIVELIS M, et al. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. **J Periodontol** 2000;71: 1297-1305.

WEI PC, LAURELL L, LINGEN MW, et al. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 2. A histological comparative study. **J Peri-odontol** 2002; 73: 257-265.

WENNSTROM JL, LINDHE J. Role of attached gingiva for maintenance of periodontal health. Healing following excisional and grafting procedures in dogs. **J Clin Periodontol** 1983;10(2):206-21.

WHEITZ-MAYFIELD L.J. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. **J Clin Periodontol** 2008; 35:292e304.

WHITMAN D.H., BERRY R.L., GREEN D.M. – Platelet Gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.55, p.1294-1299, 1997

WOOLLONS, A.; CLINGEN, P.H.; PRICE, M.L.; ARLETT, C.F.; GREEN, M.H.L. Induction of mutagenic DNA damage in human fibroblast after exposure to artificial tanning lamps. **Br. J. Dermatol.**, London, v. 137, p. 687-692, 1997.

YATES, C. C.; HEBDA, P.; WELLS, A. Skin wound healing and scarring: fetal wounds and regenerative restitution. **Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews**, v. 96, n. 4, p. 325–33, dez. 2012.

ZACCHI, V.; SORANZO, C.; CORTIVO, R.; RADICE, M.; BRUN, P.; ABATANGELO, G. In vitro engineering of human skin-like tissue. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 40, p.187-194, 1998.

ZHANG, N.; KOHN, D. H. Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 96, n. 1, p. 63–81, 2012.

ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética em Animais

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
PP00908
Título
Cultura Primária de Fibroblastos: Avaliação In Vivo
Data de Entrada
20/02/2014

Resultado:
Aprovado
Data/Prazo
29/05/2014

Considerações
Ofício nº 145/CEUA/PROPESQ/2014
Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA
Ao(à): Prof(a) Dr(a) Cesar Augusto Benfatti - Departamento de Odontologia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao projeto de pesquisa sob sua responsabilidade o presidente da CEUA deliberou ad referendum, considerando o parecer de dois relatores, pela:

- APROVAÇÃO para a utilização de 50 ratos (*Rattus norvegicus*) pelo período de 2 anos a partir da data de credenciamento.
- vide parecer em anexo.

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 29/08/2016

Data 29/05/2014

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ARTIGOS

PRADO, A.M.; PEREIRA, J.; SILVA, F.S.; HENRIQUES, B.; NASCIMENTO, R. M.; BENFATTI, C.A.M.; LÓPEZ-LÓPEZ, J.; SOUZA, J.C.M. Wear of Morse taper and external hexagon implant joints after abutment removal. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine (dordrecht. Online)**, v.28, p.65 - 78, 2017.

PRADO, A.M.; PEREIRA, J.; HENRIQUE, B.; MAGINI, R.S.; BENFATTI, C.A.M.; LOPEZ, J.L.; SOUZA, J. Biofilm Affecting the Mechanical Integrity of Implant-Abutment Joints. **The International Journal of Prosthodontics**, v.29, p.381 - 383, 2016.

FERREIRA, C.F.; PRADO, A.M.; PEREIRA, M.A.; CARDOSO, A.C. The Value of Occlusion in Dentistry: A Clinical Report Showing the Correction of an Anterior Reverse Articulation with Selective Occlusal Adjustment. **Journal of Prosthodontics-Implant Esthetic and Reconstructive Dentistry**, v.24, p.n/a - n/a, 2015.

PRADO, A.M.; PIM, L.V.; SOUZA JUNIOR, J.M.; SOUZA, J.G.O.; MAGINI, R. S. Técnica do conjuntivo rotacionado palatino para fechamento de alvéolos pós extração. **DENTAL PRESS IMPLANTOLOGY**, v.8, p.31 - 38, 2014.

PRADO, A.M.; TEIXEIRA, K.N.; SCHULDT FILHO, G.; Volpato, C.A.M.; VASCONCELLOS, D. K. Avaliação da experiência e do grau de satisfação de pacientes tratados com próteses totais sobre implantes. **DENTAL PRESS IMPLANTOLOGY**, v.8, p.60 - 67, 2014.

ALBERTO SIERRA-ROSALES; JAIR RODRIGUEZ-IVICH; ABRAÃO MORATELLI PRADO; CIMARA FORTES FERREIRA. An esthetic option for single-unit implant-supported restorations in the aesthetic zone: a 6-year follow-up. **Journal of Tennessee Dental Association**, v.98, p.23 - 27, 2018.

IVICHI, E.J.; DUMES, J.F.; GEREMIAS, T.C.; PRADO, A.M.; BENFATTI, C.A.M.; CARDOSO, A.C. Prótese unitária metalocerâmica

para implantes colocados em nível ósseo usando o pilar Gold. Relato de caso. **Implant News Perio**, v.2, p.681 - 686, 2017.

IVICHI, E.J.; PRADO, A.M.; FERREIRA, C.F.; CARDOSO, A.C. Lithium Disilicate Versatility for Veneers, Crowns and Implant Restoration: A Clinical Report. **Journal of the Tennessee Dental Association**, 2017.

RODRIGUEZ-IVICH, J.; PRADO, A.M.; HENRIQUES, B.; MAGNE, P. Copy, Restore, Redefine: Degrees of Creativity with Bonded Lithium Disilicate Restorations. **Quintessence of Dental Technology 2019**.

RESUMOS

PEREIRA, OFG.; PRADO, A. M.; SOUZA JUNIOR, J. M.; OURIQUES, FD; BIANCHINI, M.A.; BENFATTI, C. A. M. Fatores que alteram a satisfação dos pacientes em reabilitações implantossuportadas: Estudo transversal In: 34th SBPqO Annual Meeting, 2017, Campinas, SP. **Brazilian Oral Research**, 2017. v.31. p.209 – 209.

LEBARBECHON, M.; PRADO, A.M.; PEZZINI FILHO, R.; MAGINI, R.S.; PORTO, L.; COLLA, G.; BENFATTI, C.A.M. Avaliação das membranas de Nanocelulose bacteriana e SureDerm como arcabouço para cultura celular In: Proceedings of the 33nd SBPqO Annual Meeting, 2016, Campinas, SP. **Brazilian Oral Research**, 2016. v.30. p.138 - 138.

PEZZINI FILHO, R.; PRADO, A. M.; MAGINI, R. S.; LEBARBECHON, M.; PORTO, L.; COLLA, G.; BENFATTI, C. A. M. Avaliação de membranas utilizadas em enxertos gengivais para recobrimento de lesões criadas em mucosa de ratos In: Proceedings of the 33nd SBPqO Annual Meeting, Campinas, SP. **Brazilian Oral Research**, 2016. v.30. p.213 - 213.

PRADO A.M.; HEIDENREICH, R.; IVICHI, E. J.; COLLA, G.; MAGINI, R.; BENFATTI, C. A. M. Comparison between gingival grafts with bacterial cellulose matrix and acellular dermal matrix: study in rats. In: Abstracts of the EAO Congress, Paris, France, 29 September - 1

October 2016, 2016. **Clinical Oral Implants Research**, 2016. v.27. p.62 - 62.

BEDOYA, K. A.; PRADO A.M.; MAGINI, R; BENFATTI, C.A.M.; SOUZA, J. Wear of dental implant joints after removal torque. In: Abstracts of the EAO Congress, Paris, France, 29 September - 1 October 2016. **Clinical Oral Implants Research**, 2016. v.27. p.19 - 19.

PRADO, A. M.; SOUZA, J.; BENFATTI, C. A. M.; MAGINI, R. S. Detorque and Wear of Dental Implant Joints After Immersion in a Biofilm Medium. In: IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition - Boston, Massachusetts. **Journal of Dental Research**, 2015.

Capítulo II

ARTIGO CIENTÍFICO

Elaborado de acordo com as normas do periódico The International Journal of Implant Dentistry.

Comparação entre enxerto gengival livre e enxerto de fibroblastos de cultura primária suplementada com plasma rico em plaquetas: estudo em ratos

Abraão Moratelli Prado¹, Luismar Marques Porto², Elena Riet Correa Rivero³, Ricardo de Souza Magini⁴, Cesar Augusto Magalhães Benfatti⁴.

1 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

2 Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

3 Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

4 Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Correspondência:

Abraão Moratelli Prado

Avenida Santos Saraiva, 1746. Apt 107. Bairro Estreito –
Florianópolis/SC – Brasil.

CEP: 88010-030.

abraaomoratelli@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta cicatricial de ratos a enxerto de fibroblastos gengivais provenientes de cultura primária suplementada com PRP semeados em matriz de celulose bacteriana (MCB) e matriz dérmica acelular humana (MDA - SureDerm®). Inicialmente foi realizada uma cirurgia de remoção de um pequeno explante de tecido conjuntivo/epitelial da mucosa oral de rato. Logo em seguida, foi realizada a técnica de obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Então, se realizou a cultura primária de fibroblastos em meio suplementado com PRP, substituindo o Soro Fetal Bovino. Após estabelecida a cultura celular, as células foram semeadas nas matrizes e somente então iniciaram-se os procedimentos cirúrgicos. Foram realizados defeitos cirúrgicos na mucosa jugal oral dos ratos com um bisturi circular. Os ratos foram divididos em 06 grupos: I-controle negativo (apenas criação do defeito); II-controle positivo (enxerto gengival livre obtido do palato); III-MCB; IV-fibroblastos em MCB; V-MDA; VI-fibroblastos em MDA. Quinze dias após as cirurgias de enxertia, foram realizadas avaliações clínicas, verificando a regularidade do epitélio e a presença de úlcera, rubor e edema. Foi realizada a biópsia da área operada. Foram obtidos cortes histológicos para coloração em Hematoxilina e Eosina e para realização da técnica imunohistoquímica com os anticorpos anti- α -SMA (marcador de miofibroblastos), e PAN-Cytokeratin (marcador de células epiteliais). A avaliação histológica considerou se ocorreu a reepitelização completa da área operada e classificou o novo epitélio em fino ou regular, com cristas epiteliais e/ou queratina. Também se realizou a contagem de vasos sanguíneos, células inflamatórias e miofibroblastos. O número de células foi obtido dentro de uma mesma área e classificado em leve, regular ou intenso, e uma análise estatística pelo teste exato de Fisher foi realizada. Os resultados clínicos demonstraram que os grupos testados não apresentaram úlcera e apresentaram epitélio regular, sem rubor e sem edema. Os resultados histológicos demonstraram que estes grupos apresentaram um epitélio regular com cristas epiteliais e queratina, e miofibroblastos presentes no tecido conjuntivo. A técnica de engenharia tecidual realizada obteve resultados clínicos e histológicos semelhantes a técnica de enxerto gengival livre. A cultura primária de fibroblastos suplementada com PRP além de favorecer o processo de cicatrização, viabiliza a técnica para utilização em humanos. As duas matrizes testadas podem ser usadas como arcabouço celular, sendo a MDA a matriz mais indicada em enxertos gengivais livres.

Palavras-chave: Cultura de fibroblastos; enxerto gengival livre; matriz celulose bacteriana; matriz dérmica celular.

INTRODUÇÃO

Uma situação corriqueira na clínica odontológica é a presença de recessões e de depressões vestibulares, e a ausência de mucosa queratinizada, que trazem problemas estéticos funcionais e dificultam a manutenção da higiene por parte do paciente. Nessas situações, enxertos de tecido mole autógeno são consideradas o padrão-ouro de tratamento¹.

A utilização de tecido autógeno pode trazer desconforto adicional ao paciente, já que há duas áreas cirúrgicas, riscos de acidentes hemorrágicos nas áreas doadoras, dificuldade de padronização da espessura do tecido, diferença de cor/espessura que pode resultar em alterações estéticas nas áreas receptoras e, nos casos em que várias áreas necessitam de intervenção cirúrgica, há a necessidade de grande disponibilidade de tecido doador aumentando os riscos relatados²⁻⁸. Sendo assim, procura-se por uma técnica reconstrutiva menos invasiva. Para tal, a engenharia tecidual visa a criação de um arcabouço de material absorvível ou não, capaz de armazenar células e fatores de crescimento que possam auxiliar no desenvolvimento de melhores técnicas dentro da odontologia, mais especificamente na área da periodontia e implantodontia⁹⁻¹⁴.

Quanto à utilização de enxertos, a engenharia de tecidos institui uma tríade que diz respeito aos fatores necessários para o estabelecimento e viabilidade de um arcabouço, para possível utilização como enxerto de origem artificial; esta tríade assim se compõe: células cultivadas, matrizes “*scaffolds*” e mediadores solúveis, a exemplo dos fatores de crescimento¹⁵.

Para a utilização destes materiais de origem alógena e objetivando o restabelecimento de tecido mole periodontal (gengiva e ligamento periodontal), faz-se necessária a aquisição de células adequadas para tal. Os fibroblastos gengivais são fundamentais na produção e manutenção do periodonto¹⁶, portanto, são as células mais adequadas para estudos e testes *in vitro* visando um arcabouço ideal para a reconstrução dos tecidos moles periodontais. No estudo realizado por Pini Prato, fibroblastos cultivados sobre uma matriz de ácido hialurônico foram transportados ao sítio receptor do paciente. Pôde-se observar clinicamente o restabelecimento de mucosa ceratinizada e posteriormente houve confirmação histológica do sucesso dos testes¹⁷.

Os fibroblastos são as células responsáveis pela formação e manutenção da matriz extracelular e produção de fibras colágenas do periodonto. Na busca pela regeneração de tecido mole periodontal ou peri-implantar, a manipulação e cultivo destas células permite o

estabelecimento de uma cultura adequada e viável para a formação de um arcabouço celular. No cultivo das células é usual utilizar Soro Fetal Bovino (SFB). Entretanto, objetivando a utilização desta técnica em humanos, passou-se a substituir o SFB por Plasma Rico em Plaquetas (PRP) para suplementação do meio.

A matriz de Celulose Bacteriana (MBC) e a matriz dérmica acelular (MDA - SureDerm). têm sido desenvolvidas e utilizadas para diversas aplicações médicas, especialmente como curativo de ferimentos e substituto temporário de pele no tratamento de lesões, queimaduras, úlceras e enxertos, e como auxiliar em abrasões dérmicas^{18 - 21}. Ao aplicar a matriz em diferentes cicatrizações de feridas, elas costumam atuar como suporte para infiltração celular e entram em processo de remodelação progressiva, formando tecido funcional sem resposta imunológica do organismo²².

O processo de fechamento de uma lesão pode se dar por duas vias: a regeneração ou o reparo. A regeneração consiste em uma resposta na qual o tecido neoformado recapitula totalmente a arquitetura tecidual após a ocorrência de uma lesão. O processo de reparo consiste em fechar as lesões por meio da formação de cicatrizes. Cicatrizes consistem em um aglomerado de matriz extracelular (MEC) desorganizada e, apesar de fecharem a lesão, não reconstituem características originais dos tecidos. O processo de reparo é dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelamento. Na fase de inflamação há presença dos componentes da coagulação. Na fase de proliferação ocorre a reepitelização da ferida, a formação do tecido de granulação e a angiogênese. Também ocorre a diferenciação dos fibroblastos presentes nas bordas da lesão em miofibroblastos (células contráteis que tendem a fechar a ferida). Na fase de remodelamento há organização do tecido, assim como, formação de queratina²³.

Baseado no exposto e visto que ainda existem poucos estudos nessa área, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento cicatricial de ratos submetidos a enxerto de fibroblastos gengivais provenientes de cultura primária suplementada com PRP, cultivados sobre a MCB e a MDA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 70 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos jovens (20-24 semanas), machos, pesando em média 180g, apresentando bom estado de saúde geral. A pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética em Animais (PP00908). Foram selecionados 20 ratos

para os procedimentos de coleta de sangue (para o preparo do PRP) e a biópsia do tecido gengival. Nos outros 50 ratos foram realizadas as cirurgias de enxertia.

Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

A coleta de sangue total foi efetuada empregando-se a técnica de venipuntura com o mínimo de traumatismo para não desencadear os fatores plaquetários; facilitando adesividade, aglutinação e a aglomeração plaquetária. Após a coleta, o sangue foi centrifugado seguindo o protocolo estabelecido na literatura²⁴.

Cultura Primária

Para a coleta do tecido autógeno (biópsia) o animal foi posicionado sobre a mesa cirúrgica em decúbito ventral e com a cabeça imobilizada em dois pontos fixos com o auxílio de uma mesa para estereotaxia. Após a realização da desinfecção com clorexidina 0,12%, foi realizado sob sedação quetamina a biópsia (explante) de aproximadamente 5mm² (2,5 x 2,0mm) de mucosa queratinizada (epitélio e tecido conjuntivo) da região palatal. O material obtido foi enviado para o laboratório para realização da cultura primária dos fibroblastos.

Os procedimentos para a obtenção do cultivo primário de fibroblastos gengivais humanos foram realizados sob capela de fluxo laminar (VECO, Campinas, Brasil), em temperatura ambiente, entre 25 e 28°C, em um laboratório de segurança do tipo P2. A amostra de tecido da mucosa oral do rato (aproximadamente 5mm²) foi lavada por 2 vezes com solução salina de fosfato tamponada (PBS) e, posteriormente, o tecido epitelial foi removido e fragmentada em 5 partes (explantes) de aproximadamente 1mm².

Os fragmentos foram colocados em 5 (cinco) garrafas de cultura de 25cm², previamente pré-incubadas a 37°C, 5% de CO₂ com 2ml do meio de cultura DEM devidamente suplementado por PRP. O crescimento celular foi checado, diariamente, através de um microscópio de fase invertida (40x a 200x, Olympus, Japão).

Quando verificada confluência de aproximadamente 70%, as células foram então tripsinizadas a fim de obter a individualização das mesmas e essa cultura primária originou uma nova subcultura na proporção de 1:1. Nesta primeira “passagem” os explantes foram

removidos. A inativação da tripsina foi realizada adicionando meio de cultura DMEM suplementado.

Após todo o procedimento, as placas foram recolocadas na estufa de CO₂ onde permaneceram incubadas e monitoradas diariamente até que a nova subconfluência fosse atingida.

Viabilidade Celular

Mediante análise do teste com o corante MTS foi possível qualificar a atividade metabólica dos fibroblastos após 48 horas de cultivo, verificando que as membranas apresentam viabilidade semelhante. Foi possível notar através da análise por meio de microscópico de fase invertida, a presença de proliferação de fibroblastos que se encontraram espalhados na placa.

A absorvância foi determinada a 490nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA). O grupo do controle positivo foi constituído de células cultivadas sobre a placa de cultura de tecidos (TPP, Switzerland). Através da câmara de Neubauer foi realizada a contagem de células.

Procedimentos de Enxertia

Os ratos foram divididos aleatoriamente em 06 grupos: I- controle negativo (n=12); II-controle positivo (n=14); III-MCB (n=16); IV-fibroblastos em MCB (n=10); V-MDA (n=8); VI-fibroblastos em MDA (n=6). Devido à morte de alguns ratos, os grupos possuem *n* diferentes.

Foi confeccionado um defeito circular na mucosa jugal bilateral dos animais. Todos os defeitos criados seguiram um padrão de tamanho específico, padronizado por meio de um bisturi circular de diâmetro igual a 08 mm.

No grupo I os defeitos foram apenas criados, sem nenhum recobrimento. No grupo II foi realizado enxerto gengival livre proveniente do palato. Nos grupos III e V os arcabouços foram suturados sobre a ferida cirúrgica. Nos grupos IV e VI os fibroblastos foram semeados nos arcabouços e estes foram suturados. Devido a limitação na abertura da boca do animal, todos os enxertos foram estabilizados com 3 suturas, uma mesial, uma inferior e outra distal.

Avaliação Clínica

Após 15 dias da cirurgia de enxertia, os animais foram sedados para avaliação clínica da área operada, juntamente com a fotografia da região. A avaliação clínica da área operada considerou a regularidade do epitélio e a presença ou ausência de úlcera, edema e rubor. Todas as informações foram tabuladas e analisadas as características predominantes em cada grupo.

Processamento Histológico

Foi realizada uma biópsia da região enxertada para processamento histológico. A biópsia foi realizada com uma grande margem de segurança, permanecendo a área operada no centro da amostra, próxima a comissura labial.

Os fragmentos teciduais contendo os corpos de prova foram fixados em formol a 10% tamponada por um período de 48 horas. Após a fixação foi feita a macroscopia das peças. Nesse momento as peças foram aparadas em seus excessos, os corpos de prova removidos e realizado um corte no sentido longitudinal da peça para estabelecimento do perfil de inclusão do material.

A seguir, as peças foram submetidas ao processamento histológico para inclusão em parafina, seguindo todos os procedimentos recomendados pelo protocolo de fixação, desidratação e inclusão. Para a avaliação da morfologia tecidual, cortes histológicos de 3 micrômetros foram submetidos a coloração por hematoxilina e eosina.

Imunohistoquímica

Para cada um dos anticorpos seguiu-se às orientações do fabricante e padronização, assim como incluídos controles positivos e negativos para cada reação. O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário. Das amostras fixadas em formol e emblocadas em parafina foram obtidos cortes de 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene). Os cortes foram inicialmente fixados na lâmina mantendo as lâminas em estufa a 65°C, durante 3 horas. Então realizou-se a desparafinização e reidratação dos cortes, seguida de duas imersões de 20 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 6% em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena.

A reativação antigênica foi realizada mantendo as lâminas em solução de tampão citrato 0,01M, pH 6,0, em banho-maria a temperatura constante de 96°C, durante 40 minutos. A incubação com os anticorpos

primários foi realizada em câmara úmida mantida sob refrigeração (4 a 8°C), durante 18 horas. Os anticorpos utilizados foram o *Alfa Smooth Muscle Actin* (Dako), marcador de miofibroblastos, auxiliando a identificação e avaliação destas células e de vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo, e o *PAN-Cytokeratin AE1/AE3* (Santa Cruz), marcador de células epiteliais, auxiliando a avaliação do epitélio da área em reparo, evidenciando a queratina.

Para amplificação da reação foi utilizado o kit EasyLink One (EasyPath), que consta de soro secundário policlonal e do soro terciário streptavidina-biotina com peroxidase conjugada. A revelação da reação foi realizada através de solução cromógena, contendo diaminobenzidina (DAB) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com hematoxilina de Harris, seguido de desidratação em cadeias de concentração crescentes de etanol (etanol 85% a etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem com Entellan (Merck, Alemanha). Após montadas, as lâminas foram mantidas em estufa (40°C) por no mínimo 24 horas antes de serem examinadas ao microscópio de luz.

Avaliação Histológica/Imunohistoquímica

Finalizado o processamento histológico e a reação imunohistoquímica, as lâminas foram escaneadas com um digitalizador de lâminas AXIO SCAN 2.1 (Zeiss, Alemanha). Tendo todas as lâminas padronizadas e com o mesmo tamanho, com o auxílio de um programa para análise de imagem AxionVision (Zeiss, Alemanha), as lâminas foram analisadas por um observador previamente calibrado.

Primeiramente se identificou a área operada e avaliou se ocorreu a reepitelização completa ou se havia área de úlcera. Em seguida, o epitélio foi classificado em fino (1 a 3 camadas de células) ou regular (4 ou mais camadas de células epiteliais). Também se avaliou a presença ou ausência de cristas epiteliais e queratina (*PAN-Cytokeratin*).

Também se realizou a contagem de vasos sanguíneos, células inflamatórias e miofibroblastos (α -SMA). O número de células foi obtido dentro de uma mesma área (aumento de 20x) e classificado em leve (menos de 20 células), regular (20 a 60 células) e intenso (60 ou mais células).

Os resultados foram analisados dentro de cada grupo estatisticamente pelo teste exato de Fisher. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Um teste Kappa foi realizado, para calibração do examinador.

RESULTADOS

Os resultados foram obtidos através das análises das imagens da área operada (Figura 1), da análise das lâminas histológicas e imunohistoquímicas (Figura 2). O resultado do teste Kappa foi 0,845. Os resultados estatísticos foram obtidos intragrupo, quando presentes afirmam a característica predominante de cada grupo.

Analisando os parâmetros clínicos (Tabela 1), em relação à regularidade da área operada, apenas o grupo I apresentou epitélio irregular, os grupos II, IV e VI apresentaram epitélio regular. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que os grupos III e V apresentaram epitélio regular. A presença de úlcera só foi constatada no grupo I. Os grupos II, IV, V e VI não apresentaram úlcera. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que o grupo III não apresentou úlcera. O rubor não foi encontrado nos grupos II, V e VI. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que os grupos I, III e IV não apresentaram rubor. O edema foi presente no grupo I. O grupo VI não apresentou edema. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que os grupos III e IV apresentaram edema e que os grupos II e V não apresentaram edema.

Analisando as lâminas histológicas (Tabela 2), os grupos II, V e VI apresentaram epitélio regular. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que o grupo I não apresentou epitélio e que os grupos III e IV apresentaram epitélio regular. As cristas epiteliais não foram encontradas no grupo I. Os grupos V e VI apresentaram cristas epiteliais. O grupo II apresentou resultados divididos (50% com cristas epiteliais). Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que os grupos III e IV não apresentaram cristas epiteliais. O infiltrado inflamatório esteve presente em todos os grupos, mas a quantidade de infiltrado inflamatório não obteve valores significativos ($p < 0,05$).

Analisando as lâminas imunohistoquímicas (Tabela 3), a queratina não foi encontrada no grupo I. Os grupos IV, V e VI apresentaram queratina. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar estatisticamente que o grupo II e III apresentaram queratina. Os miofibroblastos estiveram presentes em todos os grupos. A quantidade de miofibroblastos foi considerada leve a regular no grupo VI e severa no grupo I, III e IV. Apesar de haver uma tendência, não se pode afirmar

estatisticamente que o grupo II apresentou uma quantidade severa de miofibroblastos. Os vasos sanguíneos estiveram presentes em todos os grupos. Os vasos sanguíneos estiveram presentes em todos os grupos, mas a quantidade de vasos sanguíneos não obteve valores significativos ($p < 0,05$).

O grupo I apresentou clinicamente epitélio irregular, úlcera e edema. Histologicamente não apresentou cristas epiteliais nem queratina e apresentou grande quantidade de miofibroblastos. O grupo II apresentou clinicamente epitélio regular e ausência de úlcera e rubor. Histologicamente apresentou epitélio regular e com tendência a apresentar queratina.

O grupo III apresentou clinicamente tendência a epitélio regular, ausência de úlcera e de rubor e presença de edema. Histologicamente apresentou infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos com quantidade regular a severa e miofibroblastos com quantidade severa. O grupo IV apresentou clinicamente epitélio regular e ausência de úlcera. Histologicamente apresentou epitélio regular com queratina e presença regular a severa de infiltrado inflamatório e de miofibroblastos.

O grupo V apresentou clinicamente ausência de úlcera e de rubor. Histologicamente apresentou epitélio regular, com cristas epiteliais e queratina, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório com quantidade regular a severa. O grupo VI apresentou clinicamente epitélio regular, ausência de úlcera, de rubor e de edema. Histologicamente apresentou epitélio regular, com cristas epiteliais e queratina, vasos sanguíneos com quantidade regular a severa e miofibroblastos com quantidade leve a regular.

DISCUSSÃO

Podemos observar que o grupo controle positivo apresentou melhor aspecto clínico que o grupo controle negativo, pois apresentou tecido com superfície regular e com ausência de úlcera, rubor e edema. Também apresentou melhores aspectos histológicos, com um epitélio regular, presença de queratina, vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório e miofibroblastos. A presença de tecido queratinizado em região cicatrizada é uma característica de grande relevância, corroborando com resultados de estudos onde se realizou instalação de implantes dentários, na presença e ausência de mucosa queratinizada²⁴, onde se afirma que em locais de ausência de mucosa queratinizada, ocorre maior reabsorção de crista alveolar e recessão marginal da mucosa, em comparação a

regiões de mucosa mastigatória, com presença de tecido queratinizado. Este tecido nos oferece particularidades como proteção, ganhos em sustentação, manutenção de higiene, redução de risco de doenças peri-implantares, estética, entre outros fatores ^{25 e 26}.

Observamos que apenas o grupo controle negativo apresentou úlcera, enquanto os outros grupos apresentaram continuidade do epitélio. Algumas amostras dos demais grupos apresentaram úlcera, entretanto, esta foi uma característica predominante do grupo negativo. Mas essa característica já era esperada, pois no grupo negativo não houve nenhum recobrimento, sendo normal a maior demora para cicatrização da região. Sendo assim, o ideal é sempre recobrir as lesões orais. Durante anos os auto-enxertos vem sendo utilizados com grande sucesso, no entanto, certas limitações forçam pesquisadores a procurarem enxertos alternativos onde supririam necessidades de conforto, compatibilidade e aceitabilidade pelo paciente. Na técnica de enxerto gengival livre, é necessário um segundo local cirúrgico para o tecido do doador, onde este sítio será cicatrizado por segunda intenção, podendo resultar em dor pós-operatória e morbidade. Os enxertos gengivais livres resultam em aparência estética desfavorável, em relação ao comportamento dos tecidos inseridos circunvizinhos à área operada, culminando em um resultado inestético. Além disso os enxertos autógenos não podem ser utilizados para aumentar a largura de gengiva inserida em vários elementos dentais por causa da oferta limitada do doador ²⁷.

O grupo III apresentou presença de ulceração ou perda de continuidade epitelial, por conta, talvez, da presença do remanescente do arcabouço utilizado. Em muitas amostras os observadores levantaram suspeita de que o material localizado no meio da lesão possa ser o arcabouço instalado. Analisou-se que a lesão se apresentava com superfície regular, com sinais leves de inflamação, como rubor e edema em volta da lesão. A MCB tem várias utilidades e mostra-se uma relevante ferramenta para diversos fins, como para terapias de queimaduras, úlceras e manipulação tecidual em casos envolvendo implantes dentários. Comparando nossos resultados ao que se tem na literatura, podemos observar que a cicatrização foi previsível ²⁸.

O comportamento do grupo V mostrou resultado semelhante ao grupo controle positivo. Foi analisado que este grupo não apresentou úlcera nem rubor. Apresentou um epitélio regular, com cristas epiteliais e queratina. Estudos mostram que a MDA proporciona uma espessura uniforme, é facilmente cortado, material bem-adaptável, e requer um curto período de tempo para rehidratar antes de poder ser utilizado ²⁹.

Em contrapartida, a colheita do tecido conjuntivo do palato é um procedimento demorado e o tamanho do enxerto pode ser limitado, além de gerar novo sítio cirúrgico, onde com a MDA este desconforto não é presenciado. Estudos que comparam MDA e enxerto gengival livre demonstram que a MDA não é tão eficaz no aumento da largura da gengiva inserida, porém, é mais previsível em sua estética, misturando-se com o tecido adjacente. A quantidade de gengiva inserida adquirida com MDA é clinicamente suficiente para prevenir inflamação persistente³⁰. A MDA atua como uma estrutura de suporte para permitir o repovoamento de fibroblastos e vasos sanguíneos no epitélio de tecidos circundantes e é, eventualmente, substituída por tecidos do hospedeiro³¹.

O grupo IV apresentou, em boa parte das amostras, um tecido regular, sem úlcera. Na histologia apresentou um epitélio fino, ausência de cristas epiteliais e queratina, presença de células inflamatórias, neovasos e miofibroblastos. Comparando ao grupo III, pode-se afirmar que a presença de fibroblastos favoreceu o processo de cicatrização. Em comparação à literatura, não foram observados relatos anteriores utilizando este material com esta cultura específica associada, determinando-se assim uma lacuna sobre este assunto na literatura científica.

O grupo VI apresentou resultados promissores. Além das ótimas qualidades clínicas, superfície regular, ausência de úlcera, de edema e de rubor, este grupo apresentou características histológicas de cicatrização avançadas, como um epitélio regular, com uma boa quantidade de tecido queratinizado, com cristas epiteliais constantes e bem delimitadas, miofibroblastos e neo vasos. Comparando diretamente aos demais grupos, é visto que o grupo se apresentou de forma superior até ao grupo controle positivo, expondo cicatrização superior e sendo o melhor resultado da pesquisa. Pode-se afirmar que isso ocorreu devido à presença dos fibroblastos, que favorecem o processo de cicatrização. Não existem resultados na literatura compatíveis com este resultado. Mas demonstra um grande potencial, devendo ser estudado e aprimorado.

Analisando os comportamentos histológicos, podemos concluir que em 15 dias de cicatrização, os grupos foram muito similares entre si, com uma pequena diferença ao grupo VI, onde exibiu características superiores de cicatrização. Esta situação nos dá diversidade nas opções de tratamento aos desafios clínicos contemporâneos, contudo são necessários estudos futuros com diferentes períodos de cicatrização, em outros sítios anatômicos, em outros tipos de organismos, para

conclusões mais concretas sobre o comportamento clínico e histológico destes materiais associados ou não às culturas celulares.

Destaca-se a grande utilidade da imunohistoquímica através dos marcadores Cytokeratin, marca o tecido epitelial, e o α -SMA que, além de marcar miofibroblastos, também marcou os vasos sanguíneos. A importância de marcar o tecido epitelial foi para confirmação da área operada, além de confirmar a presença de queratina, de suma importância em cirurgias de enxerto. Já as células marcadas pelo α -SMA ajudam a identificar a etapa que se encontra a cicatrização. A avaliação destas células em HE é dificultada pela presença de grande quantidade de células inflamatórias. Uma das limitações em estudar melhor o comportamento dos miofibroblastos foi que nenhum grupo apresentou significância estatística. Também se destaca o tempo de cicatrização das lesões induzidas de 15 dias como uma das possíveis limitações deste estudo, onde outros períodos poderiam ressaltar resultados mais promissores entre os grupos. Também podemos destacar a utilização de animais de pequeno porte. Novos estudos devem ser desenvolvidos em animais de portes maiores, para continuar a linha de estudo, possibilitando a utilização futura desta técnica em humanos.

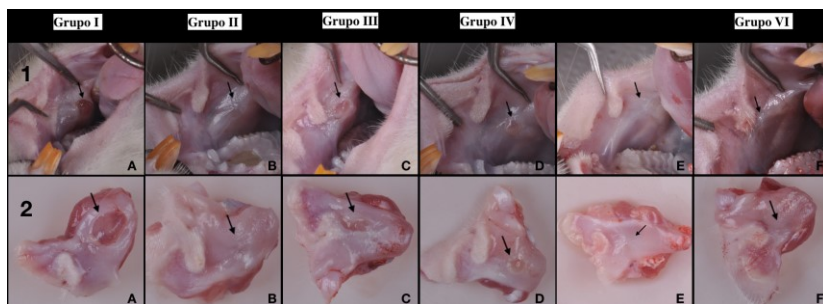
CONCLUSÕES

Conclui-se que esta técnica de enxertia gengival com fibroblastos de cultura primária suplementada com PRP obteve resultados clínicos e histológicos semelhantes à técnica de enxerto gengival livre.

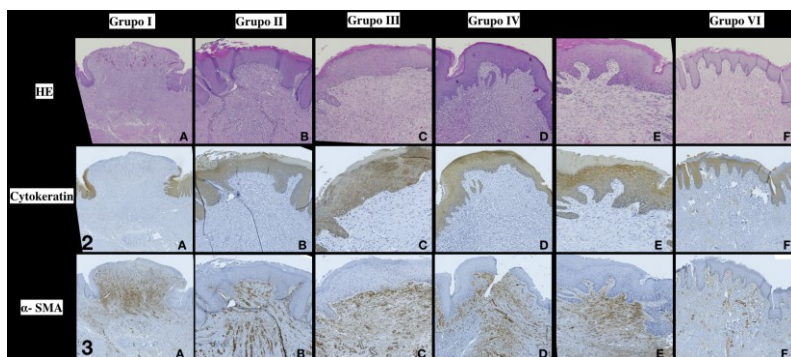
Através deste estudo foi possível estabelecer um protocolo para pesquisas de cirurgias de enxertia de tecido mole em ratos.

As duas matrizes testadas podem ser usadas como arcabouço para células do tecido gengival, sendo a MDA a matriz mais indicada em enxertos gengivais livres em mucosa jugal de ratos.

A utilização de fibroblastos obtidos por cultura primária influenciou positivamente o processo de reparo. A suplementação do meio com PRP, além de favorecer o processo de cicatrização, viabiliza a técnica para utilização em humanos.



*Figura 1 - Fotos da área operada após 15 dias da cirurgia.
Linha 1: Imagem direta da mucosa. Linha 2: Imagem da biópsia.
(A) Grupo I; (B) Grupo II; (C) Grupo III; (D) Grupo IV; (E) Grupo V; (F) Grupo VI*



*Figura 2 - Lâminas histológicas e imunohistoquímica.
Linha 1: Histologia com HE. Linha 2: Imunohistoquímica com Cytokeratin.
Linha 3: Imunohistoquímica com α -SMA.
(A) Grupo I; (B) Grupo II; (C) Grupo III; (D) Grupo IV; (E) Grupo V; (F) Grupo VI*

Tabela 1 - Resultados da avaliação clínica dos grupos.

		Característica da Área Operada				Rubor		Edema	
		Irregular	Regular	Com úlcera	Sem úlcera	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Grupos	I-Negativo	11 _a	1 _b	10 _a	2 _b	7 _a	5 _a	3 _a	9 _b
		91,7%	8,3%	83,3%	16,7%	58,3%	41,7%	25,0%	75,0%
	II-Positivo	3 _a	11 _b	2 _a	12 _b	13 _a	1 _b	10 _a	4 _a
		21,4%	78,6%	14,3%	85,7%	92,9%	7,1%	71,4%	28,6%
	III-MCB	7 _a	9 _a	3 _a	13 _a	9 _a	7 _a	7 _a	9 _a
		43,8%	56,3%	18,8%	81,3%	56,3%	43,8%	43,8%	56,3%
	IV-MCB+ Fibroblastos	3 _a	7 _b	2 _a	8 _b	5 _a	5 _a	4 _a	6 _a
		30,0%	70,0%	20,0%	80,0%	50,0%	50,0%	40,0%	60,0%
V-MDA	3 _a	5 _a	0 _a	8 _b	8 _a	0 _b	5 _a	3 _a	
	37,5%	62,5%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	62,5%	37,5%	
VI-MDA + Fibroblastos	0 _a	6 _b	0 _a	6 _b	6 _a	0 _b	6 _a	0 _b	
	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	
Fisher's Test	<i>P Value</i>	0,001		0,000		0,010		0,025	

Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$)

Tabela 2 – Resultados da avaliação histológica dos grupos.

		Epitélio		Cristas Epiteliais		Infiltrado Inflamatório		
		Ausente	Presente	Ausente	Presente	Leve	Regular	Intenso
Grupos	I-Negativo	8 _a 66,7%	4 _a 33,3%	10 _a 83,3%	2 _b 16,7%	2 16,7%	3 25,0%	7 58,3%
	II-Positivo	4 _a 28,6%	10 _b 71,4%	7 _a 50%	7 _a 50%	3 21,4%	5 35,7%	5 35,7%
	III-MCB	6 _a 37,5%	10 _a 62,5%	9 _a 56,3%	7 _a 43,8%	0 0,0%	7 43,8%	9 56,3%
	IV-MCB+ Fibroblastos	4 _a 40,0%	6 _b 60,0%	8 _a 80,0%	2 _a 20,0%	1 10,0%	4 40,0%	5 50,0%
	V-MDA	0 _a 0,0%	8 _b 25,0%	1 _a 12,5%	7 _b 87,5%	0 0,0%	6 75,0%	2 25,0%
	VI-MDA + Fibroblastos	0 _a 0,0%	6 _b 0,0%	0 _a 0,0%	6 _b 100%	1 16,7%	4 66,7%	1 16,7%
Fisher's Test	P Value		0,000		0,000		0,061	

Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$).
 Contagem Vasos e Infiltrado: Leve (menos de 20 células), Regular (20 a 60 células),
 Severo (mais de 60 células).

Tabela 3 - Resultados da avaliação imunohistoquímica dos grupos.

		Queratina		Miofibroblastos			Vasos Sanguíneos		
		Ausente	Presente	Leve	Regular	Intenso	Leve	Regular	Intenso
Grupos	I-Negativo	11 _a 91,7%	1 _b 8,3%	0 _a 0,0%	1 _a 8,3%	11 _b 91,7%	2 16,7%	3 25,0%	7 58,3%
	II-Positivo	4 _a 28,6%	10 _a 71,4%	2 _a 14,3%	4 _a 28,6%	8 _a 57,1%	2 14,3%	5 35,7%	7 50,0%
	III-MCB	6 _a 37,5%	10 _a 62,5%	0 _a 0,0%	0 _a 0,0%	16 _b 100%	0 0,0%	7 43,8%	9 56,3%
	IV-MCB+ Fibroblastos	4 _a 40,0%	6 _b 60,0%	0 _a 0,0%	2 _{a,b} 20%	8 _b 80,0%	3 30,0%	3 30,0%	4 40,0%
	V-MDA	1 _a 12,5%	7 _b 87,5%	1 _a 12,5%	4 _a 50%	3 _a 37,5%	0 0,0%	4 50,0%	4 50,0%
	VI-MDA + Fibroblastos	0 _a 0,0%	6 _b 100%	2 _a 33,3%	4 _a 66,7%	0 _b 0,0%	0 0%	4 66,7%	2 33,3%
Fisher's Test	<i>P Value</i>	0,000		0,000			0,298		

Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$).
 Contagem Miofibroblastos: Leve (menos de 20 células), Regular (20 a 60 células),
 Severo (mais de 60 células).

REFERÊNCIAS

- 1 - CLAVERO J, LUNDGREN S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2003; 5 (3):154-160.
- 2 - BROOME WC, TAGGART EJ. Free autogenous connective tissue grafting – report of two cases. *J Periodontol*. 1976; 47:580.
- 3 - CAFFESSE RG, GUINARD EA. Treatment of localized gingival recessions. Part II. Coronally repositioned flap with a free gingival graft. *J Periodontol*. 1978; 49(7):357-61.
- 4 - CALLAN DP, SILVERSTEIN LH. Use of acellular dermal matrix for increasing keratinized tissue around teeth and implants. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1998; 10(6):731-4.
- 5 - DORFMAN HS, KENNEDY JE, BIRD WC. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. *J Clin Periodontol*. 1980; 7(4):316- 24.
- 6 - EDEL A. The use of a free connective tissue graft to increase the width of attached gingival. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1975; 39(3):341-6.
- 7 - HAERI A, SERIO FG. Mucogingival surgical procedures: a review of the literature. *Quintessence Int*. 1999; 30(7): 475-83.
- 8 - MARX R.E., GARG A.K. - A estrutura óssea, o metabolismo e a fisiologia: Seu impacto na implantodontia dentária. *Implant Dent.*, v.7, n.5, p.267-276, 1998.
- 9 - BREAUKT LG, FOWLER EB, BILLMAN MA. Retained free gingival graft rugae: a 9-year case report. *J Periodontol*. 1999; 70(4):438-40
- 10 - HALL WB. Present status of soft tissue grafting. *J Periodontol*. 1977; 48(9):587-97.

- 11 - SIVERSTEIN LH. Fundamentally changing soft tissue grafting. *Dent Today*. 1997; 16(3):56-9.
- 12 - SULLIVAN HC, ATKINS JH. Free autogenous gingival grafts. I. Principles of successful grafting. *Periodontics*. 1968; 6(3):121-9.
- 13 - KRIEGEBAUM U, MILDENBERGER M, MUELLER-RICHTER UDA, KLAMMERT U, KUEBLER AC, REUTHER T. Tissue engineering of human oral mucosa on different scaffolds: In vitro experiments as a basis for clinical applications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012; 114(5):190–8.
- 14 - OPHOF R, MALTHA JC, KUIJPERS-JAGTMAN AM, VON DEN HOFF JW. Implantation of tissue-engineered mucosal substitutes in the dog palate. *Eur J Orthod*. 2008; 30(1):1–9.
- 15 - UEDA, M.; SUMI, Y.; MIZUNO, H.; HONDA, M. ODA, T.; WADA, K.; BOO, J.S.; KEN- ICHIRO, H. Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. *Mater. Sci. Eng.*, v.13, p.7-14, 2000.
- 16 - TEN CATE AR. The fibroblast and its products. In: *Oral Histology. Development structure and function*. Toronto: C. V. Mosby, p.90-105, cap. 6, 1989.
- 17 - PINI PRATO, G.P.; 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.*, Chicago, v.74, n.2, p.262-267, 2003.
- 18 - FONTANA, J. D.; DESOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DESOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. X. *Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute*. *Appl Biochem Biotech*, v. 24, n. 5, p. 253-264, 1990.
- 19 - SANCHAVANAKIT, N.; SANGRUNGRAUNGROJ, W.; KAOMONGKOLGIT, R.; BANAPRASERT, T.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. *Biotechnol Progr*, v.22, n. 4, p.1194- 1199, 2006.

- 20 - ZHANG X.J., DENG Z.H., WANG H.L., YANG Z.H., GUO W.H., LI Y., et al. Expansion and delivery of human fibroblasts on micronized acellular dermal matrix for skin regeneration. *Biomaterials* 2009; 30(14):2666e74.
- 21 - FENG Y., WANG J., LING S., LI Z., LI M., LI Q., et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuronal cells on fetal bovine acellular dermal matrix as a tissue engineered nerve scaffold. *NRR* 2014; 9:1968 a 78.
- 22 - RENNERT R.C., SORKIN M., GARG R.K., JANUSZYK M., GURTNER G.C. Cellular response to a novel fetal acellular collagen matrix: implications for tissue regeneration. *Int J Polym Mater* 2013; 2013:527957.
- 23 - WYNN TA, VANNELLA KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis Thomas. *Immunity*. 2017; 44(3):450–62.
- 24 - DEVEREAUX J, NURGALI K, KIATOS D, SAKKAL S, APOSTOLOPOULOS V. Effects of platelet-rich plasma and platelet-poor plasma on human dermal fibroblasts. *Maturitas*. Elsevier; 2018; 117(July):34–44.
- 25 - BENZAIZI F, LANG NP, CAROPRESE M, et al. Dimensional changes in soft tissues around dental implants following free gingival grafting: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*. 2015, 176-182.
- 26 - BUYUKOZDEMIR ASKIN S, BERKER E, AKINCIBAY H, UYSAL S, ERMAN B, TEZCAN I, et al. Necessity of keratinized tissues for dental implants: a clinical, immunological, and radiographic study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015;17: 1e12.
- 27 - RAMBO CR, RECOUVREUX DOS, CARMINATTI CA, et al. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membrane for tissue engineering. *Materials Science & Engineering*. 549-554, 2008.
- 28 - CALLAN DP, SILVERSTEIN LH. Use of acellular dermal matrix for increasing keratinized tissue around teeth and implants. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1998;10(6):731-4.

29 - SHULMAN J. Clinical evaluation of an acellular dermal allograft for increasing the zone of attached gingiva. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1996; 8:201-208.

30 - HARRIS, RJ. Root coverage with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft and acellular dermal matrix graft: a clinical and histological evaluation of a case report. *Journal of Periodontology*, p. 1305-1311, 1998.

31 - WEI PC, LAURELL L, GEIVELIS M, et al. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *J Periodontol* 2000;71: 1297-1305.

MANUSCRIPT

Prepared according to the standards of the International Journal of Implant Dentistry.

Comparison between free gingival graft and primary culture fibroblasts supplemented with Platelet Rich Plasma: study in rats

Abraão Moratelli Prado¹, Luismar Marques Porto², Elena Riet Correa Rivero³, Ricardo de Souza Magini⁴, Cesar Augusto Magalhães Benfatti⁴.

1 Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

2 Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

3 Patology Department, Federal University of Santa Catarina , Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

4 Dentistry Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Correspondence:

Abraão Moratelli Prado
Av. Santos Saraiva, 1746. Apt 107. Bairro Estreito – Florianópolis/SC –
Brasil.
CEP: 88010-030.
abraaomoratelli@gmail.com

SUMMARY

The objective of this work was to evaluate *in vivo* the healing response of rats grafted with gingival fibroblasts from primary culture, seeded in bacterial cellulose matrix (MCB) and human acellular dermal matrix (MDA - SureDerm®). Initially, surgery was performed to remove a small connective / epithelial tissue explant from the oral mucosa of the rat. Soon after, the technique of obtaining the Rich Plasma in Platelets (PRP) was carried out. Then, the primary culture of fibroblasts was performed in medium supplemented with PRP, replacing Fetal Bovine Serum. After the cell culture was established, the cells were seeded in the matrices and only then the surgical procedures began. Surgical defects were performed in the oral mucosa of the rats with a circular scalpel. The rats were divided into 6 groups: I-negative control (defect creation only); II-positive control (free gingival graft obtained from the palate); III-MCB; IV-fibroblasts in MCB; V-MDA; VI-fibroblasts in MDA. Fifteen days after the grafting surgeries, clinical evaluations were performed, evaluating the regularity of the epithelium and the presence of ulcer, flushing and edema. The biopsy of the surgical area was performed. Histological sections were obtained and stained with Hematoxylin and Eosin; and immunohistochemically with anti- α -SMA antibody (myofibroblast marker), and PAN-Cytokeratin (epithelial cell marker). The histological evaluation considered whether a complete reepithelialization of the operated area occurred and then classified the new epithelium as thin or regular, with epithelial ridges and/or keratin. Counting of blood vessels, inflammatory cells and myofibroblasts was also performed. The number of cells was obtained within the same histological area and classified as mild, regular or intense, and a statistical analysis applying Fisher exact test was performed. Clinical results showed that the tested groups had no ulcer and had regular epithelium, no flushing and no edema. Histological results demonstrated that these groups had a regular epithelium with epithelial ridges and keratin and with inflammatory infiltrate, blood vessels and myofibroblasts present in the connective tissue. The performed tissue engineering technique obtained clinical and histological results similar to the free gingival graft technique. The primary culture of fibroblasts supplemented with PRP besides favoring the cicatrization process, allows the technique for use in humans. The two matrices tested can be used as a cellular scaffold, MDA being the most indicated matrix in free gingival grafts.

Keywords: Culture of fibroblasts; free gingival graft; bacterial cellulose matrix; cellular dermal matrix.

INTRODUCTION

A common situation in dental practice is the presence of gingival recessions and buccal depressions, and the absence of keratinized mucosa, which bring functional aesthetic problems and difficulties maintenance of dental hygiene. In these situations, autogenous soft tissue grafts are considered the gold standard of treatment¹.

The use of autogenous tissue can bring additional discomfort to the patient, since there are two surgical areas, risks of hemorrhagic accidents in the donor areas, difficulty in standardizing the thickness of the tissue, color / thickness difference that may result in aesthetic changes in the recipient areas, and in cases in which several areas require surgical intervention, there is a need for a great availability of donor tissue, increasing the risks reported²⁻⁸.

Thus, a less invasive reconstructive technique is needed. To this end, tissue engineering aims to create a framework of absorbable or non-absorbable material capable of storing cells and growth factors that may help in the development of better techniques within dentistry, more specifically in the area of periodontics and implantology⁹⁻¹⁴.

Regarding the use of grafts, tissue engineering establishes a triad that refers to the factors necessary for the establishment and viability of a scaffold, for possible use as an artificial origin graft; this triad is composed of: cultured cells, scaffolds, and soluble mediators, for example growth factors¹⁵.

For the use of these materials of allogeneic origin and aiming at the restoration of periodontal soft tissue (gingiva and periodontal ligament), it is necessary to acquire cells suitable for this. Gingival fibroblasts are fundamental in the production and maintenance of the periodontium¹⁶, therefore, they are the most suitable cells for in vitro studies and tests aiming at an ideal framework for the reconstruction of periodontal soft tissues. In the study performed by Pini Prato, fibroblasts cultured on a matrix of hyaluronic acid were transported to the patient's receptor site. It was possible to observe clinically the reestablishment of keratinized mucosa and later there was histological confirmation of the success of the tests¹⁷.

Fibroblasts are the cells responsible for the formation and maintenance of extracellular matrix and production of collagen fibers of the periodontium. In the search for regeneration of periodontal or peri-implant soft tissue, the manipulation and cultivation of these cells allows the establishment of a suitable and viable culture for the formation of a cellular framework. In Cell culture, it is usual to use Bovine Fetal Serum

(FBS). However, with the aim of using this technique in humans, SFB was replaced by Platelet Rich Plasma (PRP) for medium supplementation.

The Bacterial Cellulose matrix (MBC) and the acellular dermal matrix (MDA - SureDerm) have been developed and used for various medical applications, especially as wound dressing and temporary skin substitute in the treatment of lesions, burns, ulcers and grafts, and as an aid in dermal abrasions¹⁸⁻²¹. When applying the matrix to different wound healing, they usually act as support for cellular infiltration and enter into a process of progressive remodeling, forming functional tissue with no immune response from the organism²².

The process of closing an injury can occur in two ways: regeneration or repair. Regeneration consists of a response in which the newly formed tissue fully recapitulates the tissue architecture after the occurrence of an injury. The repair process consists in closing the lesions through the formation of scars. Scars consist of a disorganized extracellular matrix cluster (EMC) and despite closing the lesion, do not reconstitute original tissue characteristics. The repair process is divided into three phases: inflammation, proliferation and remodeling. In the inflammation phase, the coagulation components are present. In the proliferation phase, wound reepithelialization, granulation tissue formation and angiogenesis occur. There is also differentiation of the fibroblasts present at the edges of the lesion in myofibroblasts (contractile cells that tend to close the wound). In the remodeling phase there is tissue organization, as well as keratin formation²³.

Based on the above and since there are still few studies in this area, the objective of this work was to evaluate the cicatricial behavior of rats submitted to gingival fibroblasts grafts cultured supplemented with Platelet rich plasma (PRP) on MCB and MDA. In this way, contributing to the cell culture becomes a usual practice of dentists.

MATERIALS AND METHODS

Seventy male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), young adults (20-24 weeks), males weighing on average 180g, were in good general health. The research was approved by the Animal Ethics Committee (PP00908). Twenty rats were selected for blood collection procedures (for the preparation of PRP) and biopsy of the gingival tissue. In the other 50 rats grafting surgeries were performed.

Platelet Rich Plasma (PRP)

The collection of whole blood was done using the technique of venipuncture with the minimum of traumatism not to trigger the platelet factors; facilitating adhesiveness, agglutination and platelet agglomeration. After collection, the blood was centrifuged following the protocol established in the literature²⁴.

Primary Culture

In order to collect the autogenous tissue (biopsy), the animal was placed on the surgical table in ventral decubitus position and the head immobilized at two fixed points with the aid of a stereotaxic table. After disinfection with chlorhexidine 0.12%, the biopsy (explant) of approximately 5 mm² (2.5 x 2.0 mm) of keratinized mucosa (epithelium and connective tissue) of the palatal region was performed under sedation. The obtained material was sent to the laboratory to perform the primary culture of the fibroblasts.

The procedures to obtain the primary culture of human gingival fibroblasts were performed under laminar flow hood (VECO, Campinas, Brazil), at room temperature, between 25 and 28 °C, in a P2 type safety laboratory. The rat oral mucosal tissue sample (approximately 5mm²) was washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and subsequently the epithelial tissue was removed and fragmented into 5 parts (explants) of approximately 1mm².

The fragments were placed in 5 (25) culture bottles of 25 cm², pre-incubated at 37°C, 5% CO₂ with 2 ml of the DEM medium supplemented by PRP. Cell growth was checked daily through an inverted-phase microscope (40x to 200x, Olympus, Japan).

The specimens containing the specimens were fixed in 10% buffered formalin for a period of 48 hours. After the fixation, macroscopy of the pieces was done.

At that moment the pieces were trimmed in their excesses, the specimens removed and a cut in the longitudinal direction of the piece to establish the inclusion profile of the material.

Next, the pieces were subjected to histological processing for inclusion in paraffin, following all the procedures recommended by the fixation, dehydration and inclusion protocol. For the evaluation of tissue morphology, histological sections of 3 micrometers were stained with hematoxylin and eosin.

Immunohistochemistry

For each of the antibodies followed the manufacturer's guidelines and standardization, as well as positive and negative controls were included for each reaction. Negative control of all reactions was accomplished by omission of the primary antibody. From the formalin-fixed and paraffin-embedded samples, 3 μm thick slices were obtained, extended on glass slides prepared with APTS solution (3-aminopropyltriethoxysilene).

The cuts were initially fixed to the slide maintaining the oven blades at 65 ° C for 3 hours. Then the dewaxing and rehydration of the cuts were carried out, followed by two immersions of 20 minutes in 6% hydrogen peroxide solution in methanol to block the endogenous peroxidase.

Antigen reactivation was performed by keeping the slides in 0.01M citrate buffer solution, pH 6.0, in a water bath at a constant temperature of 96 ° C for 40 minutes. Incubation with the primary antibodies was performed in a wet chamber maintained under refrigeration (4 to 8 ° C) for 18 hours.

The antibodies used were the Alfa Smooth Muscle Actin (Dako), a marker of myofibroblasts, helping to identify and evaluate these cells and blood vessels present in connective tissue, and PAN-Cytokeratin AE1 / AE3 (Santa Cruz), a marker of epithelial cells, helping to evaluate the epithelium of the area under repair, evidencing keratin.

For amplification of the reaction, the EasyLink One kit (EasyPath) was used, consisting of polyclonal secondary serum and streptavidin-biotin tertiary serum with conjugated peroxidase. Reaction development was performed by chromogen solution containing diaminobenzidine (DAB) in 0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.4.

After the development, the blades were counterstained with Harris haematoxylin, followed by dehydration in increasing concentration chains of ethanol (85% ethanol to absolute ethanol), diaphanization in xylol and assembly with Entellan (Merck, Germany). After being assembled, the slides were kept in an oven (40 ° C) for at least 24 hours before being examined under a light microscope.

Histological Evaluation

After histological processing and immunohistochemical reaction, the slides were scanned with an AXIO SCAN 2.1 slide scanner (Zeiss, Germany). Having all the blades standardized and of the same size, with the aid of an AxionVision image analysis program (Zeiss, Germany), the slides were analyzed by a previously calibrated observer. First, the area under investigation was identified and evaluated whether complete reepithelialization occurred or whether there was an ulcer area.

Then, the epithelium was classified as thin (1 to 3 layers of cells) or regular (4 or more layers of epithelial cells). The presence or absence of epithelial ridges and keratin (PAN-Cytokeratin) was also evaluated.

Counting of blood vessels, inflammatory cells and myofibroblasts (α -SMA) was also performed. The number of cells was obtained within the same area (20x zoom) and classified as light (less than 20 cells), regular (20 to 60 cells) and intense (60 or more cells).

The results were statistically analyzed by Fisher's exact test. The level of significance was set at $p < 0.05$. A Kappa test was performed for calibration of the examiner.

RESULTS

The results were obtained through analysis of the images of the operated area (Figure 1), analysis of the histological and immunohistochemical slides (Figure 2). The Kappa test result was 0.845. The statistical results were obtained intragroup, when present affirm the predominant characteristic of each group.

Analyzing the clinical parameters (Table 1), in relation to the regularity of the operated area, only group I presented irregular epithelium, groups II, IV and VI presented regular epithelium. Although there is a tendency, it can not be stated statistically that groups III and V presented regular epithelium. The presence of ulcer was only found in group I. Groups II, IV, V and VI did not present ulcer. Although there is a tendency, it can not be stated statistically that group III did not present ulcer. Flushing was not found in groups II, V and VI. Although there is a trend, it can not be stated statistically that groups I, III and IV did not present flushing. Edema was present in group I. Group VI did not present edema. Although there is a trend, it can not be stated statistically that groups III and IV presented edema and that groups II and V did not present edema.

Analyzing the histological slides (Table 2), groups II, V and VI presented regular epithelium. Although there is a trend, it can not be stated statistically that group I did not present epithelium and that groups III and IV presented regular epithelium. Epithelial crests were not found in group I. Groups V and VI presented epithelial ridges. Group II presented divided results (50% with epithelial ridges). Although there is a trend, it can not be stated statistically that groups III and IV did not present epithelial ridges. The inflammatory infiltrate was present in all groups, but the amount of inflammatory infiltrate did not reach significant values ($p < 0.05$).

Analyzing the immunohistochemical slides (Table 3), keratin was not found in group I. Groups IV, V and VI presented keratin. Although there is a trend, it can not be stated statistically that groups II and III presented keratin. Myofibroblasts were present in all groups. The amount of myofibroblasts was considered mild to regular in group VI and severe in groups I, III and IV. Although there is a trend, it can not be stated statistically that group II presented a severe amount of myofibroblasts. Blood vessels were present in all groups. Blood vessels were present in all groups, but the number of blood vessels did not reach significant values ($p < 0.05$).

Group I presented clinically irregular epithelium, ulcer and edema. Histologically, it did not show epithelial ridges or keratin and showed a severe amount of myofibroblasts. Group II presented clinically regular epithelium and absence of ulcer and flushing. Histologically it presented regular epithelium with tendency to keratin.

Group III presented clinically tendency to regular epithelium, absence of ulcer and flushing and presence of edema. Histologically it presented inflammatory infiltrate and blood vessels with regular to severe amount and myofibroblasts with severe amount. Group IV presented clinically regular epithelium and absence of ulcer. Histologically it presented regular epithelium with keratin and regular presence of severe inflammatory infiltrate and of myofibroblasts.

Group V presented clinically no ulcer and redness. Histologically it presented regular epithelium, with epithelial crests and keratin, blood vessels and inflammatory infiltrate with regular to severe amount. Group VI presented clinically normal epithelium, absence of ulcer, flushing and edema. Histologically it presented regular epithelium, with epithelial crests and keratin, blood vessels with regular to severe amount and myofibroblasts with light to regular amount.

DISCUSSION

We can observe that the positive group had a better clinical appearance than the negative group, because it presented tissue with a regular surface and absence of ulcer, redness and edema. It also presented better histological aspects, with a regular epithelium, presence of keratin, blood vessels, inflammatory infiltrate and myofibroblasts. The presence of keratinized tissue in a healed region is a feature of great relevance, corroborating with results of studies where dental implants were installed, in the presence and absence of keratinized mucosa²⁴, where it is stated that in places where there is no keratinized mucosa, greater alveolar ridge resorption and marginal recess of the mucosa, compared to regions of masticatory mucosa, with presence of keratinized tissue. This fabric offers us particularities like protection, gains in sustentation, maintenance of hygiene, reduction of risk of peri-implant diseases, aesthetics, among other factors^{25 and 26}.

We observed that only the negative group presented ulcer, while the other groups presented continuity of the epithelium. Some samples from the other groups presented ulcer, however, this was a predominant characteristic of the negative group. But this characteristic was already expected, because in the negative group there was no recoating, being normal the greater delay for cicatrization of the region. Therefore, it is always best to cover oral lesions. For years, autografts have been used with great success, however, certain limitations force researchers to seek alternative grafts where they would meet patient comfort, compatibility, and acceptability needs. In the free gingival grafting technique, a second surgical site is required for the donor tissue, where this site will be healed by second intention and may result in postoperative pain and morbidity. Free gingival grafts result in unfavorable aesthetic appearance, in relation to the behavior of the inserted tissues surrounding the operated area, resulting in an unsightly result. In addition, autogenous grafts can not be used to increase the width of gingiva inserted in various dental elements because of the donor's limited supply²⁷.

Group III presented presence of ulceration or loss of epithelial continuity, perhaps due to the presence of the remainder of the scaffold used. In many samples the observers raised suspicion that the material located in the middle of the lesion could be the scaffold installed. We analyzed that the lesion presented a regular surface, with slight signs of inflammation, such as flushing and edema around the lesion, without results with statistical significance. The MCB has several uses and is a

relevant tool for various purposes, such as burn therapy, ulcers and tissue manipulation in cases involving dental implants. Comparing our results with the literature, we can see that healing was predictable²⁸.

The behavior of group V showed similar results to the positive control group. It was analyzed that this group did not present ulcer nor flushing. It presented a regular epithelium, with epithelial ridges and keratin. Studies show that MDA provides a uniform thickness, is easily cut, a well-adaptable material, and requires a short period of time to rehydrate before it can be used²⁹. On the other hand, collecting the connective tissue of the palate is a time-consuming procedure and the size of the graft may be limited, in addition to generating a new surgical site, where with MDA this discomfort is not seen. Studies comparing MDA and free gingival graft demonstrate that MDA is not as effective in increasing the width of the inserted gingiva, but more predictable in its aesthetics, mixing with adjacent tissue. The amount of inserted gingiva acquired with MDA is clinically sufficient to prevent persistent inflammation³⁰. MDA acts as a support structure to allow repopulation of fibroblasts and blood vessels in the epithelium of surrounding tissues and is eventually completely replaced by host tissues³¹.

Group IV presented, in most of the samples, a regular tissue, without ulcer. In histology it presented a fine epithelium, absence of epithelial ridges and keratin, presence of inflammatory cells, neovasal and myofibroblasts. Comparing with group III, it can be stated that the presence of fibroblasts favored the healing process. In comparison to the literature, previous reports using this material with this specific culture were not observed, thus determining a gap on this subject in the scientific literature.

Group VI presented promising results. In addition to the excellent clinical characteristics, regular surface, absence of ulcer, edema and flushing, this group presented advanced histological healing characteristics, such as a regular epithelium with a good amount of keratinized tissue, with well defined and defined epithelial ridges, myofibroblasts and neo vessels. Comparing directly to the other groups, it is seen that the group presented superior form to the positive control group, exposing superior healing and being the best result of the research. It can be said that this occurred due to the presence of fibroblasts, which favor the healing process. There are no results in the literature compatible with this result. But it shows great potential and should be studied and improved.

Analyzing the histological behaviors, we can conclude that in 15 days of healing, the groups were very similar to each other, with a

small difference to group VI, where they showed superior healing characteristics. This situation gives us diversity in the treatment options for contemporary clinical challenges, however, future studies are needed with different healing periods, in other anatomical sites, in other types of organisms, for more concrete conclusions on the clinical and histological behavior of these materials, associated or not to cell cultures.

The usefulness of immunohistochemistry through Cytokeratin markers, marking the epithelial tissue, and α -SMA, which besides marking myofibroblasts, also marked the blood vessels. The importance of marking the epithelial tissue was to confirm the operated area, besides confirming the presence of keratin, of great importance in graft surgeries. Already the cells marked by the α -SMA help to identify the stage that is the cicatrization. The evaluation of these cells in HE is hampered by the presence of large numbers of inflammatory cells. One of the limitations in studying the behavior of myofibroblasts better was that no group presented statistical significance. The healing time of the 15-day induced lesions is also highlighted as one of the possible limitations of this study, where other periods could highlight more promising results between the groups. We can also highlight the use of small animals, may have influenced different results than desired, which is as similar as possible to humans. Further studies should be carried out on animals of larger sizes to continue the study line, making possible the future use of this technique in humans.

CONCLUSION

Through this study it was possible to establish a protocol for research on soft tissue grafting surgeries in rats.

The use of primary culture fibroblasts positively influenced the repair process. The supplementation of the medium with PRP besides favoring the cicatrization process, allows the technique for use in humans.

The two matrices tested showed good results, and MDA behaved better as a framework for the cultured cells for gingival grafts.

It is concluded that this technique of tissue engineering obtained clinical and histological results similar to the technique of free gingival graft, and can be considered a surgical technique with a minimum of morbidity and predictability.

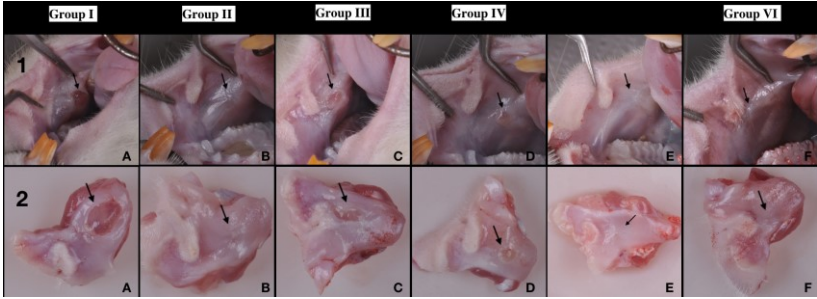


Figure 1 - Photos of the area operated after 15 days of surgery.
 Line 1: Direct image of the mucosa. Line 2: Image of the biopsy.
 (A) Group I; (B) Group II; (C) Group III; (D) Group IV; (E) Group V; (F) Group VI

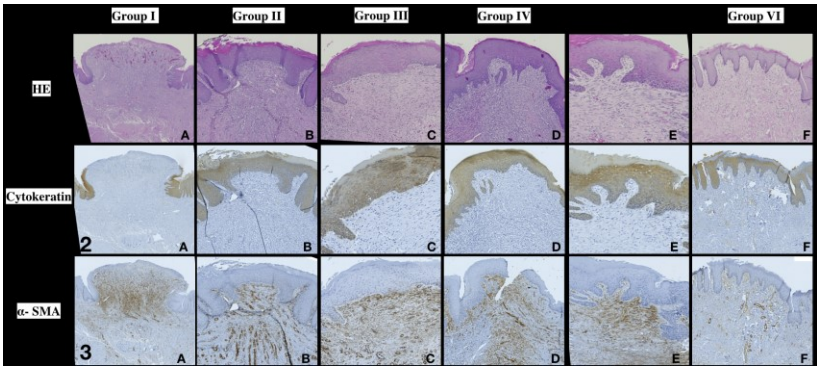


Figure 2 - Histological slides and immunohistochemistry.
 Line 1: Histological with HE. Line 2: Immunohistochemistry with Cytokeratin. Line 3: Immunohistochemistry with α -SMA
 (A) Group I; (B) Group II; (C) Group III; (D) Group IV; (E) Group V; (F) Group VI

Table 1 - Results of the clinical evaluation of the groups.

		Operating Area Characteristics				Rubor		Edema		
		Irregular	Regular	With ulcer	No ulcer	Absent	Present	Absent	Present	
Groups	I-Negative	11 _a	1 _b	10 _a	2 _b	7 _a	5 _a	3 _a	9 _b	
		91,7%	8,3%	83,3%	16,7%	58,3%	41,7%	25,0%	75,0%	
	II-Positive	3 _a	11 _b	2 _a	12 _b	13 _a	1 _b	10 _a	4 _a	
		21,4%	78,6%	14,3%	85,7%	92,9%	7,1%	71,4%	28,6%	
	III-MCB	7 _a	9 _a	3 _a	13 _a	9 _a	7 _a	7 _a	9 _a	
		43,8%	56,3%	18,8%	81,3%	56,3%	43,8%	43,8%	56,3%	
	IV-MCB+ Fibroblasts	3 _a	7 _b	2 _a	8 _b	5 _a	5 _a	4 _a	6 _a	
		30,0%	70,0%	20,0%	80,0%	50,0%	50,0%	40,0%	60,0%	
	V-MDA	3 _a	5 _a	0 _a	8 _b	8 _a	0 _b	5 _a	3 _a	
		37,5%	62,5%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	62,5%	37,5%	
	VI-MDA + Fibroblasts	0 _a	6 _b	0 _a	6 _b	6 _a	0 _b	6 _a	0 _b	
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	
	Fisher's Test	<i>P Value</i>	0,001		0,000		0,010		0,025	

Different letters on the same line indicate a significant difference ($p < 0.05$)

Table 2 - Results of the histological evaluation of the groups.

		Epithelium		Epithelial crests		Inflammatory Infiltrate		
		Absent	Present	Absent	Present	Light	Regular	Severe
Groups	I-Negative	8 _a 66,7%	4 _a 33,3%	10 _a 83,3%	2 _b 16,7%	2 16,7%	3 25,0%	7 58,3%
	II-Positive	4 _a 28,6%	10 _b 71,4%	7 _a 50%	7 _a 50%	3 21,4%	5 35,7%	5 35,7%
	III-MCB	6 _a 37,5%	10 _a 62,5%	9 _a 56,3%	7 _a 43,8%	0 0,0%	7 43,8%	9 56,3%
	IV-MCB+ Fibroblasts	4 _a 40,0%	6 _b 60,0%	8 _a 80,0%	2 _a 20,0%	1 10,0%	4 40,0%	5 50,0%
	V-MDA	0 _a 0,0%	8 _b 25,0%	1 _a 12,5%	7 _b 87,5%	0 0,0%	6 75,0%	2 25,0%
	VI-MDA + Fibroblasts	0 _a 0,0%	6 _b 0,0%	0 _a 0,0%	6 _b 100%	1 16,7%	4 66,7%	1 16,7%
Test	P Value	0,000		0,000		0,061		

*Different letters on the same line indicate a significant difference ($p < 0.05$).
Counting Vessels and Infiltrate: Light (less than 20 cells), Regular (20 to 60 cells),
Severe (more than 60 cells).*

Table 3 - Results of the immunohistochemical evaluation of the groups.

		Keratin		Myofibroblasts			Blood vessels		
		Absent	Present	Light	Regular	Severe	Light	Regular	Severe
Group s	I-Negative	11 _a 91,7%	1 _b 8,3%	0 _a 0,0%	1 _a 8,3%	11 _b 91,7%	2 16,7%	3 25,0%	7 58,3%
	II-Positive	4 _a 28,6%	10 _a 71,4%	2 _a 14,3%	4 _a 28,6%	8 _a 57,1%	2 14,3%	5 35,7%	7 50,0%
	III-MCB	6 _a 37,5%	10 _a 62,5%	0 _a 0,0%	0 _a 0,0%	16 _b 100%	0 0,0%	7 43,8%	9 56,3%
	IV-MCB+ Fibroblasts	4 _a 40,0%	6 _b 60,0%	0 _a 0,0%	2 _{a,b} 20%	8 _b 80,0%	3 30,0%	3 30,0%	4 40,0%
	V-MDA	1 _a 12,5%	7 _b 87,5%	1 _a 12,5%	4 _a 50%	3 _a 37,5%	0 0,0%	4 50,0%	4 50,0%
	VI-MDA + Fibroblasts	0 _a 0,0%	6 _b 100%	2 _a 33,3%	4 _a 66,7%	0 _b 0,0%	0 0%	4 66,7%	2 33,3%
Test	P Value	0,000		0,000			0,298		

*Different letters on the same line indicate a significant difference ($P < 0.05$).
Counting Vessels and Infiltrate: Light (less than 20 cells), Regular (20 to 60 cells),
Severe (more than 60 cells).*

REFERENCE

- 1 - CLAVERO J, LUNDGREN S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2003; 5 (3):154-160.
- 2 - BROOME WC, TAGGART EJ. Free autogenous connective tissue grafting – report of two cases. *J Periodontol*. 1976; 47:580.
- 3 - CAFFESSE RG, GUINARD EA. Treatment of localized gingival recessions. Part II. Coronally repositioned flap with a free gingival graft. *J Periodontol*. 1978; 49(7):357-61.
- 4 - CALLAN DP, SILVERSTEIN LH. Use of acellular dermal matrix for increasing keratinized tissue around teeth and implants. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1998; 10(6):731-4.
- 5 - DORFMAN HS, KENNEDY JE, BIRD WC. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. *J Clin Periodontol*. 1980; 7(4):316-24.
- 6 - EDEL A. The use of a free connective tissue graft to increase the width of attached gingival. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1975; 39(3):341-6.
- 7 - HAERI A, SERIO FG. Mucogingival surgical procedures: a review of the literature. *Quintessence Int*. 1999; 30(7): 475-83.
- 8 - MARX R.E., GARG A.K. - A estrutura óssea, o metabolismo e a fisiologia: Seu impacto na implantodontia dentária. *Implant Dent.*, v.7, n.5, p.267-276, 1998.
- 9 - BREAUKT LG, FOWLER EB, BILLMAN MA. Retained free gingival graft rugae: a 9-year case report. *J Periodontol*. 1999; 70(4):438-40
- 10 - HALL WB. Present status of soft tissue grafting. *J Periodontol*. 1977; 48(9):587-97.

- 11 - SIVERSTEIN LH. Fundamentally changing soft tissue grafting. *Dent Today*. 1997; 16(3):56-9.
- 12 - SULLIVAN HC, ATKINS JH. Free autogenous gingival grafts. I. Principles of successful grafting. *Periodontics*. 1968; 6(3):121-9.
- 13 - KRIEGEBAUM U, MILDENBERGER M, MUELLER-RICHTER UDA, KLAMMERT U, KUEBLER AC, REUTHER T. Tissue engineering of human oral mucosa on different scaffolds: In vitro experiments as a basis for clinical applications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012; 114(5):190-8.
- 14 - OPHOF R, MALTHA JC, KUIJPERS-JAGTMAN AM, VON DEN HOFF JW. Implantation of tissue-engineered mucosal substitutes in the dog palate. *Eur J Orthod*. 2008; 30(1):1-9.
- 15 - UEDA, M.; SUMI, Y.; MIZUNO, H.; HONDA, M. ODA, T.; WADA, K.; BOO, J.S.; KEN- ICHIRO, H. Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. *Mater. Sci. Eng.*, v.13, p.7-14, 2000.
- 16 - TEN CATE AR. The fibroblast and its products. In: *Oral Histology. Development structure and function*. Toronto: C. V. Mosby, p.90-105, cap. 6, 1989.
- 17 - PINI PRATO, G.P.; 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.*, Chicago, v.74, n.2, p.262-267, 2003.
- 18 - FONTANA, J. D.; DESOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DESOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. X. *Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute*. *Appl Biochem Biotech*, v. 24, n. 5, p. 253-264, 1990.
- 19 - SANCHAVANAKIT, N.; SANGRUNGRAUNGRUJ, W.; KAOMONGKOLGIT, R.; BANAPRASERT, T.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. *Biotechnol Progr*, v.22, n. 4, p.1194- 1199, 2006.

- 20 - ZHANG X.J., DENG Z.H., WANG H.L., YANG Z.H., GUO W.H., LI Y., et al. Expansion and delivery of human fibroblasts on micronized acellular dermal matrix for skin regeneration. *Biomaterials* 2009; 30(14):2666e74.
- 21 - FENG Y., WANG J., LING S., LI Z., LI M., LI Q., et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuronal cells on fetal bovine acellular dermal matrix as a tissue engineered nerve scaffold. *NRR* 2014; 9:1968 a 78.
- 22 - RENNERT R.C., SORKIN M., GARG R.K., JANUSZYK M., GURTNER G.C. Cellular response to a novel fetal acellular collagen matrix: implications for tissue regeneration. *Int J Polym Mater* 2013; 2013:527957.
- 23 - WYNN TA, VANNELLA KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis Thomas. *Immunity*. 2017; 44(3):450–62.
- 24 - DEVEREAUX J, NURGALI K, KIATOS D, SAKKAL S, APOSTOLOPOULOS V. Effects of platelet-rich plasma and platelet-poor plasma on human dermal fibroblasts. *Maturitas*. Elsevier; 2018; 117(July):34–44.
- 25 - BENGAZI F, LANG NP, CAROPRESE M, et al. Dimensional changes in soft tissues around dental implants following free gingival grafting: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*. 2015, 176-182.
- 26 - BUYUKOZDEMIR ASKIN S, BERKER E, AKINCIBAY H, UYSAL S, ERMAN B, TEZCAN I, et al. Necessity of keratinized tissues for dental implants: a clinical, immunological, and radiographic study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015;17: 1e12.
- 27 - RAMBO CR, RECOUVREUX DOS, CARMINATTI CA, et al. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membrane for tissue engineering. *Materials Science & Engineering*. 549-554, 2008.
- 28 - CALLAN DP, SILVERSTEIN LH. Use of acellular dermal matrix for increasing keratinized tissue around teeth and implants. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1998;10(6):731-4.

29 - SHULMAN J. Clinical evaluation of an acellular dermal allograft for increasing the zone of attached gingiva. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1996; 8:201-208.

30 - HARRIS, RJ. Root coverage with a connective tissue with partial thickness double pedicle graft and acellular dermal matrix graft: a clinical and histological evaluation of a case report. *Journal of Periodontology*, p. 1305-1311, 1998.

31 - WEI PC, LAURELL L, GEIVELIS M, et al. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *J Periodontol* 2000;71: 1297-1305.