



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA

LENIN ISRAEL PROANO MINACA

**INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DE MATRIZ COLÁGENA NA ADESÃO,
MORFOLOGIA, VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR**

FLORIANÓPOLIS

2020

LENIN ISRAEL PROANO MINACA

**INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DE MATRIZ COLÁGENA NA ADESÃO,
MORFOLOGIA, VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina, na área de concentração de Implantodontia, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

Coorientadora: Prof^ª. Dr^a. Izabella Thaís da Silva

FLORIANÓPOLIS

2020

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

Proano, Lenin
INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DE MATRIZ COLÁGENA NA ADESÃO,
MORFOLOGIA, VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR / Lenin
Proano ; orientador, Profa. Dra. Ariadne Cristiane Cabral
da Cruz, coorientador, Profa. Dra. Izabella Thais da
Silva, 2020.
47 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Regeneração tecidual. 3. Matrizes de
Colágeno. 4. Viabilidade celular . 5. Proliferação celular.
I. Cabral da Cruz, Profa. Dra. Ariadne Cristiane . II. da
Silva, Profa. Dra. Izabella Thais . III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. IV. Título.

LENIN ISRAEL PROANO MINACA

**INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DE MATRIZ COLÁGENA NA ADESÃO,
MORFOLOGIA, VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

Presidente

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Felipe Perozzo Daltoé

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Profª. Dra. Elena Riet Correa Riveiro

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profª. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

Orientadora

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado aos meus pais e irmão que sempre fizeram tudo para me apoiar e brindar o melhor deles para que eu pudesse fazer o que gosto e me apaixona. Todo meu trabalho e esforço é para eles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar a saúde necessária para meu desenvolvimento diário, por cuidar de mim e dos meus seres amados enquanto não estou perto deles. Por ser a luz que sempre guia meu caminho e me acompanha. Por ser a luz que preciso quando mais necessito.

Aos meus pais e irmão, Lenin, Shirley e Alex, que mesmo longe estão comigo me fazendo sentir todo o seu carinho e apoio. Que me ensinaram valores fundamentais no meu desenvolvimento, e, sem dúvida, fizeram a diferença nas minhas decisões na vida. Sempre são meu exemplo a seguir. Admiro vocês por sua dedicação e carinho, demonstrados sempre de diferentes formas. Ao meu irmão com quem compartilhei tudo na vida, quem sempre esteve comigo em todos os momentos, desde quando jogávamos bola até nos momentos ruins e problemáticos. Sinto saudades de vocês todos os dias, mas são vocês que me motivam para continuar. Quero fazer vocês se sentirem orgulhosos de mim sempre. São tudo o que eu tenho e os amo com todo meu coração.

Aos meus professores, grandes amigos em Bauru, Valmir, Thiago, Lucas e Vinicius, que me motivaram e inspiraram para seguir os seus passos no caminho do ensino. Adicionalmente, quero fazer um agradecimento especial ao Professor Eric Tincoco, que além de fazer parte do grupo de professores mencionado, tem me mostrado o lado humano da nossa área de trabalho. Obrigado por ser uma excelente pessoa e professor. Obrigado por me abrir as portas da sua casa e da sua família e por me tratar como se eu fosse membro dela. Por me passar os conhecimentos que me levaram a acreditar mais em mim e que me fizeram gostar tanto da Implantodontia. Que bom poder trabalhar com a sua equipe, no mesmo lugar onde comecei. Gratidão pela parceria de todos vocês sempre.

Aos meus professores na UFSC, começando pelo Professor Ricardo Magini, que sem me conhecer e antes mesmo de eu me tornar aluno do mestrado, me aconselhou e mostrou seu apoio para eu correr atrás do que eu queria, e que no final aconteceu. Dentro do CEPID, agradeço aos professores Cesar Benfatti e Marco Bianchini que sempre estiveram abertos a escutar, opinar e encaminhar as minhas ideias, e que conseguem nos guiar de maneira incrível. Mas, sem dúvida quem tem me marcado nesta etapa é minha orientadora, a Professora Ariadne Cruz, que como ela fala, me roubou para eu ser seu orientado num momento que eu não tinha começado trabalhar com pesquisa ainda e no qual estava preocupado sobre como iria avançar no meu mestrado. Ela sendo uma excelente professora e cientista, me deu seu apoio e soube me

ensinar e guiar com a delicadeza e o carinho de uma mãe, o que a caracteriza sempre. É uma pessoa íntegra e admirável em todas as suas faces. Que se preocupa com as pessoas com as quais trabalha, vendo-as como pessoas mesmo e não só como alunos ou colegas de trabalho. Isso demonstra uma qualidade humana sem igual. Me deu uma luz, e mais do que isso, me motivou e inspirou para trabalhar numa área que não tinha conhecimento nenhum. E ainda assim me deu sua confiança e me fez sentir segurança. Hoje eu gosto da pesquisa tanto quanto da clínica, e isso é graças a você. Obrigado pelos conselhos e palavras de apoio quando as precisei também. Gratidão sempre Profe.

Aos meus amigos que compartilharam tantas experiências de vida comigo desde criança, Meli, Andres, Fausto e Julio, que sempre estão presentes, mesmo de longe. São tantos anos de amizade que já não somos mais amigos, somos irmãos. Obrigado por estarem comigo sempre.

Aos meus amigos e colegas que compartilharam comigo o início deste caminho de ensino fora do meu país, Diego e Ana. Que souberam ser parceiros e verdadeiros amigos em todo momento, enquanto moramos juntos e ainda agora. Sempre se preocupando e me dando palavras de ânimo durante toda minha caminhada. Saudades de vocês. Logo estaremos juntos trabalhando como sempre.

Aos meus amigos e colegas da UFSC. Meus irmãos, Mario, Paulo, Lincoln e Giovani que fizeram esta caminhada muito mais agradável, que desde o início me receberam com os braços abertos e me fizeram sentir em casa. São a família que escolhemos, ainda mais importante quando estamos longe de casa. Obrigado pelo trabalho juntos, pela parceria de sempre e pelos momentos de lazer que ajudam a descontrair e a continuar na caminhada. Às minhas queridas amigas e colegas de trabalho, Mari e Raissa. À vocês duas, junto com a nossa orientadora, devo meu mestrado. Sua parceria, cuidado com os detalhes e paixão pelo trabalho fazem as coisas fluir. Obrigado por estarem comigo nesse aprendizado, por estarem nos momentos bons, quando nossos experimentos ficavam perfeitos, e também quando nada dava certo, chegando até o ponto de chorar no laboratório. Por me acompanharem nos dias que chegávamos cedo no laboratório para fazer nossos experimentos e só saíamos tarde da noite. Nesses momentos percebi que vocês são amigas de verdade. Gratidão por tudo o que me ensinaram. Por todos esses motivos, admiro muito vocês.

A todos meus colegas do CEPID, que são uma família e me integraram nela desde o momento que cheguei. O nosso ambiente de trabalho é incrível, sem egoísmo, todos se ajudando

e dando uma mão em tudo o que precisamos. Gosto muito de fazer parte desse lugar e, sem dúvida, o aprendizado é muito melhor com todos vocês.

Também aos meus colegas do LVA, que sempre foram parceiros a toda hora. Sempre se disponibilizaram para ajudar e também para trabalhar em todo momento. Não posso deixar de mencionar as professoras Izabella e Gislaine, que me acolheram e brindaram com todo o seu conhecimento. São excelentes pessoas e me ajudaram sempre que precisei. É um verdadeiro prazer aprender com vocês.

Por último, mas não menos importante, às minhas coorientadas de TCC, Grazi e Fer, que além de queridas e boas amigas, são excelentes alunas, muito interessadas e responsáveis. Sou muito grato pela ajuda incondicional que me brindaram durante todo meu mestrado. Tem sido um prazer trabalhar com vocês e vamos deixar seus trabalhos perfeitos para quando chegar a hora de vocês defenderem. Sem dúvida, podem contar comigo no que vocês precisarem.

Finalmente, agradeço à todas a pessoas que estiveram envolvidas nessa caminhada. Gosto de lembrar sempre das pessoas, mas do que dos títulos o dos profissionais. Com certeza, cada pessoa que tem passado pela minha vida tem aportado um grão de areia, permitindo que eu tivesse chegado neste ponto, seja com uma palavra, um conselho ou um simples cumprimento.

Gratidão com a vida por me permitir viver todas estas experiências.

“Porque te confundes y agitas ante los problemas de la vida? Déjame el cuidado de tus cosas y toda ira mejor. Cuando te entregues a mi todo se resolverá con tranquilidad según mis designios. No te desesperes, no me dirijas una oración agitada como si quisieras exigirme el cumplimiento de tus deseos. Cierra los ojos del alma y di con calma:

DIOS YO CONFIO EN TI ...”

RESUMO

Considerando que o uso de enxertos autógenos em cirurgias plásticas periodontais e peri-implantares estão relacionados à alta morbidade pós-operatória, sangramento e disponibilidade limitada de tecidos no local doador, matrizes xenogênicas têm sido utilizadas com crescente frequência em cirurgias mucogengivais. Este estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar a influência da espessura de matriz xenogênica de colágeno na adesão, morfologia, viabilidade e proliferação celular, bem como na degradação das matrizes. As matrizes Lumina Coat® e Mucograft® foram avaliadas, seguindo os grupos estabelecidos: SLC - Lumina Coat® de espessura única, disponível comercialmente com 2 mm de espessura; DLC - Lumina Coat® de espessura dupla, com o dobro da espessura da SLC; e MG - Mucograft®, com 4mm de espessura (controle positivo). Foram avaliadas a degradação das matrizes, a topografia da superfície, a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (HGF) e de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), bem como a sua morfologia, adesão e proliferação. Os resultados de todos os grupos foram comparados através da análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey, comparando todos os tratamentos em cada tempo experimental individualmente. As diferenças entre os conjuntos de dados com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Todos os grupos foram biocompatíveis para HGF e SHED, uma vez que as viabilidades foram superiores a 70% nos dias 1, 3 e 7. Além disso, o grupo DLC promoveu as maiores viabilidades de HGF e SHED no dia 1. Adicionalmente, DLC demonstrou maior proliferação de HGF e SHED comparado ao controle positivo (MG; $p < 0,05$) no dia 7. Por outro lado, o MG demonstrou taxas mais altas de proliferação de HGF e SHED comparado com DLC no dia 3. Em relação à degradação das matrizes, as matrizes SLC foram completamente degradadas no dia 14, enquanto as matrizes DLC e MG apresentaram 48,41% e 20,52% de sua massa inicial, respectivamente, no dia 35. Concluindo-se, o aumento da espessura da matriz xenogênica de colágeno melhorou a viabilidade e proliferação dos fibroblastos gengivais humanos e células-tronco mesenquimais humanas, bem como impediu a degradação precoce da matriz.

Palavras-chave: Matriz Colágena. Regeneração tecidual. Viabilidade celular. Proliferação celular.

ABSTRACT

Considering that the use of autogenous grafts in periodontal and peri-implant plastic surgeries are related to high postoperative morbidity, bleeding, and limited tissue availability at the donor site, xenogeneic matrices have been used with increasing frequency in mucogingival surgeries. This *in vitro* study aimed to evaluate the influence of xenogeneic collagen matrix thickness on cell adhesion, morphology, viability, and proliferation, as well as matrices degradation. Lumina Coat® and Mucograft® matrices were evaluated, following the established groups: SLC – Single thickness Lumina Coat®, commercially available with 2 mm thickness; DLC - Double thickness Lumina Coat®, with double thickness of SLC; and MG - Mucograft® with 4mm thickness (positive control). Matrices degradation, surface topography, cell viability, morphology, adhesion, and proliferation were evaluated. Results from all groups were compared through one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, comparing all treatments at each experimental time individually. Differences among datasets with $p < 0.05$ were considered statistically significant. All groups were biocompatible for human gingival fibroblasts (HGF) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), since the viabilities were higher than 70% at days 1, 3, and 7. In addition, DLC promoted the highest HGF and SHED viabilities at day 1. Also, DLC demonstrated HGF and SHED proliferations higher than positive control (MG; $p < 0.05$) at day 7. Conversely, MG demonstrated higher HGF and SHED proliferation rates than DLC at day 3. Regarding matrices degradation, SLC were completely degraded at day 14, while DLC and MG presented 48.41% and 20.52% of its initial mass, respectively, at day 35. In summary, increasing the xenogeneic collagen matrix thickness improved human gingival fibroblasts and human mesenchymal stem cells viability and proliferation, as well as prevented early matrix degradation.

Key words: Collagen Matrix. Tissue regeneration. Cell viability. Cell proliferation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ETC	Enxerto de tecido conjuntivo
MC	Matriz Colágena
PCL	Poli (ϵ -caprolactone)
PLA	Ácido polilático
PEG	Poli (etilenoglicol)
PLGA	Poli (lático-co-glicólico)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
HGF	Fibroblastos gengivais humanos
SHED	Células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos
MTS	[3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfoophenyl)- 2H-tetrazolium, inner salt]
FGG	Free gingival graft
CTG	Connective tissue graft
SEM	Scanning Electronic Microscopy
EDS	Energy-Dispersive x-ray Spectroscopy
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	Fetal bovine serum
HMDS	Hexamethyldisilazane

LISTA DE FIGURAS

Figure 1: Scanning electronic microscopy (SEM) images of matrices	29
Figure 2: Cytotoxicity assay by MTS colorimetric test at days 1, 3, and 7..	30
Figure 3: Proliferation assay by PicoGreen® reagent at days 3 and 7.....	31
Figure 4: Scanning electronic microscopy (SEM) images	32
Figure 5: Degradation assay.	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS.....	19
	<i>2.1 Objetivo Geral</i>	<i>19</i>
	<i>2.2 Objetivos Específicos</i>	<i>19</i>
3	ARTIGO.....	20
	INTRODUCTION.....	24
	MATERIALS AND METHODS	25
	RESULTS	28
	DISCUSSION.....	33
	CONCLUSIONS.....	36
	REFERENCES.....	37
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
	REFERÊNCIAS	41
	PRODUÇÕES DURANTE O MESTRADO.....	47

1 INTRODUÇÃO

A cirurgia plástica periodontal e peri-implantar vem sendo realizada com maior frequência atualmente, em função dos seus resultados clínicos promissores, bem como do aumento das demandas estéticas por parte dos pacientes (ZUHR; BÄUMER; HÜRZELER, 2014). Adicionalmente, essas cirurgias são consideradas terapia essencial para correção de defeitos mucogengivais em dentes e implantes (ZUHR; BÄUMER; HÜRZELER, 2014). Assim, como objetivos das cirurgias mucogengivais periodontais e peri-implantares, pode-se incluir o aumento da espessura do tecido queratinizado, recobrimentos radiculares, aumento de tecidos moles no contorno de implantes em áreas edêntulas unitárias ou múltiplas, reconstruções papilares, dentre outros (CAIRO, 2017;CAIRO et al., 2017; ZUCHELLI et al., 2020).

Os procedimentos cirúrgicos mucogengivais convencionais, na maioria dos casos, exigem a remoção de enxerto de tecido conjuntivo ou enxerto de tecido gengival livre de áreas doadoras, como o palato ou a área retromolar (JEPSEN et al., 2013; ZUCHELLI et al., 2020). Entretanto, esta cirurgia adicional para remoção do tecido da área doadora frequentemente está associada com elevada morbidade, sangramento pós-cirúrgico e dificuldade do paciente se alimentar (CAIRO et al., 2017; TONETTI; JEPSEN, 2014). Além disso, os casos clínicos em que há necessidade de tratamento de vários dentes / implantes simultaneamente representam um enorme desafio ao cirurgião-dentista, tendo em vista a limitada quantidade de tecido autógeno disponível na área doadora, bem como o aumento considerável do tempo cirúrgico em função da remoção de tecidos doadores extensos (ZUHR; BÄUMER; HÜRZELER, 2014).

Convém destacar que os biomateriais, quanto à origem, são classificados em: Autógeno – obtido do próprio indivíduo; Alógeno ou homogêneo – obtido de indivíduos da mesma espécie, contudo geneticamente diferentes; Xenógeno ou heterógeno – advém de doares de diferente espécie do receptor, como bovinos e suínos; e Aloplásticos – material sintético (ABBAS; LICHTMAN, 2017).

Assim, biomateriais xenogênicos e alogênicos têm sido propostos como uma alternativa aos enxertos de tecido autógeno. Estes biomateriais permitem o tratamento de múltiplos sítios em uma única intervenção cirúrgica, evitam a cirurgia adicional na área doadora e, conseqüentemente, diminuem o tempo cirúrgico (TAVELLI et al., 2020; THOMA et al., 2010). O colágeno tem sido o material de escolha para a confecção de matrizes empregadas em

cirurgias mucogengivais, em decorrência de sua biocompatibilidade, biodegradação, baixo nível de imunogenicidade e habilidade de formar uma rede de poros interconectados que facilita a adesão e proliferação celular (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010), além de ser facilmente preparado e estar disponível em grande quantidade na natureza (GROVER; CAMERON; BEST, 2012). É importante destacar que o colágeno faz parte da constituição dos tecidos do corpo humano (GROVER; CAMERON; BEST, 2012; KEANE; BADYLAK, 2014), sendo a principal proteína estrutural encontrada nos tecidos conjuntivos, formando parte de tecidos como pele, tendão, cartilagem e ossos (DASKALOVA et al., 2014). Assim, vários estudos relatam que a confecção e uso do colágeno em biomateriais é uma forma eficaz de suporte para o crescimento e maturação celular (MATTHEWS et al., 2002; SELL et al., 2008; SHIELDS et al., 2004). Tem sido demonstrado que, tanto o colágeno tipo I, II e III podem reproduzir fibras similares ou mesmo mimetizar completamente as propriedades estruturais e biológicas da matriz extracelular em condições ideais (CHEVALLAY; HERBAGE, 2000).

O colágeno pode ser usado na sua forma original ou reconstituída. No caso da utilização na forma reconstituída, pode haver alteração nas propriedades mecânicas e na biocompatibilidade. Processos químicos, físico-químicos ou enzimáticos, também podem promover modificações para potencializar os processos regenerativos decorrentes do uso da matriz (MEYER, 2019). Adicionalmente, a topografia, morfologia e estabilidade da superfície aparecem como características importantes no desenvolvimento de matrizes, e têm sido relatadas como ponto chave no processo de adesão e proliferação celular. Efetivamente, o desenho das matrizes deveria imitar a microestrutura tecidual e o microambiente celular para um melhor desempenho, mimetizando a matriz extracelular do tecido a ser regenerado. Assim, estas características representam uma ferramenta importante no controle da atividade celular (FUJIOKA-KOBAYASHI et al., 2020).

Por sua vez, o colágeno quando usado em matrizes com pouca espessura, além de menor resistência mecânica, apresenta um comprometimento da estabilidade estrutural, particularmente quando usado em ambientes úmidos, como a cavidade bucal (SADEGHI et al., 2018). Assim, para superar essas limitações, as matrizes a base de colágeno têm sido modificadas, tanto em estrutura como em composição, com intuito de aprimorar as propriedades mecânicas (DONG; LV, 2016). Estratégias como *cross-linking* têm sido usadas para o aumento da estabilidade e resistência estrutural em biomateriais. O princípio para esse processo compreende a formação de ligações covalentes entre as moléculas de colágeno usando agentes

químicos sintéticos ou naturais. Os agentes mais comumente usados para gerar reações de *cross-link* são os grupos aldeídos, mas o emprego de agentes naturais como carboidratos e extratos naturais também tem sido estudado (DELGADO et al., 2015). Apesar do emprego de agentes de *cross-link*, de uma forma geral, ter fornecido melhora nas propriedades mecânicas do colágeno, eles têm sido relacionados à efeitos citotóxicos *in vivo* (BARNES et al., 2007; DONG; LV, 2016).

Outra estratégia que vem sendo estudada, é a associação de colágeno com outros polímeros naturais e sintéticos. A associação com quitosana tem se mostrado biocompatível e sem efeito antigênico, além de fornecer um adequado coeficiente de degradação (NILSEN-NYGAARD et al., 2015; YAN et al., 2015). Polímeros sintéticos, tais como poli (ϵ -caprolactone) (PCL), ácido polilático (PLA), poli (etilenoglicol) (PEG), poli (lático-co-glicólico) (PLGA) são também usados para regeneração tecidual. Quando empregados na estrutura de matrizes colágenas (HAAPARANTA et al., 2014; ZHANG et al., 2015) podem promover um padrão de poros que favorece a migração e proliferação celular (JIA et al., 2013).

É importante destacar que, pequenas modificações na concentração, alinhamento e quantidade das fibras colágenas podem gerar mudanças relevantes na resposta biológica destes biomateriais (GROVER; CAMERON; BEST, 2012). Ao se observar as características dos tecidos humanos, nota-se uma estrutura complexa, caracterizada pela heterogeneidade na disposição das fibras colágenas, com espaços entre as fibras que guiam o movimento celular e permitem uma adesão e proliferação celular de maneira tridimensional pelas vias de menor resistência. Assim, uma matriz colágena deveria mimetizar esta estrutura tridimensional observada *in vivo*, propiciando, além do padrão de migração celular favorável destacado acima, a formação de vasos sanguíneos e conseqüentemente a nutrição do tecido (WOLF et al., 2009).

Ao se observar as matrizes de colágeno disponíveis comercialmente, nota-se que a maioria consegue reproduzir de forma bastante fiel as características dos tecidos humanos. Modelos de estudos *in vitro* têm sido propostos e executados para avaliar os padrões de migração celular, observando que em estruturas tridimensionais, o padrão de migração é similar aos tecidos humanos. Por outro lado, nos modelos bidimensionais que não apresentam uma rede de fibras e poros mais espessa, a migração celular é comprometida (DOYLE et al., 2009). A matriz Mucograft® foi escolhida como controle positivo por ser uma matriz colágena usada para regeneração tecidual periodontal e peri-implantar, sendo considerada uma matriz de referência.

Escolheu-se como modelo de células, os fibroblastos gengivais humanos (HGF) e células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), uma vez que essas células estão diretamente relacionadas à regeneração dos tecidos moles periodontais e peri-implantares. Além desse fato, por serem células humanas, se assemelham mais às condições humanas *in vivo* comparado com linhagens não humanas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a influência da espessura de matriz colágena xenogênica na adesão celular, morfologia, viabilidade e proliferação, bem como na degradação da matriz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da espessura de uma matriz de colágeno xenogênica na adesão, morfologia, viabilidade e proliferação celular, bem como na degradação da matriz.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar as características de superfície das matrizes de colágeno Lumina Coat® com a espessura de 2mm disponível comercialmente (SLC); Lumina Coat® com o dobro da espessura disponível comercialmente (DLC); e Mucograft®, com a espessura disponível comercialmente (MG), por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

- Determinar os elementos químicos presentes na superfície das matrizes SLC, DLC e MG, empregando-se espectroscopia com energia dispersiva de raios-X.

- Avaliar a adesão e morfologia de fibroblastos gengivais humanos (HGF) e células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) semeadas sobre as matrizes SLC, DLC e MG, por meio de MEV, após 7 dias de cultivo celular.

- Determinar a biocompatibilidade das matrizes SLC, DLC e MG em HGF e SHED, empregando-se o teste colorimétrico MTS, em 1, 3 e 7 dias.

- Analisar a proliferação de HGF e SHED promovida pelas matrizes SLC, DLC e MG, por meio do teste PicoGreen®, em 3 e 7 dias.

- Avaliar a degradação das matrizes SLC, DLC e MG, por meio da determinação da massa das matrizes em 1, 3, 7, 14, 21, 28, e 35 dias.

3 ARTIGO**Increasing the thickness of the collagen xenogeneic matrix prevents early matrix degradation and improves the proliferation, adhesion, and viability of human gingival fibroblasts and mesenchymal stem cells**

L. Proaño^{1,2} (<https://orcid.org/0000-0002-0939-5040>, leninp9007@gmail.com), R. B. Curtarelli^{1,2} (<https://orcid.org/0000-0001-7147-9010>, raissa.curtarelli@hotmail.com), M. B. Sordi^{1,2}, (<http://orcid.org/0000-0001-7873-0765>, marianesordi@hotmail.com), I. T. Silva^{2,3} (<https://orcid.org/0000-0002-1893-4317>, izabella.thais@ufsc.br), G. Fongaro^{2,4} (<https://orcid.org/0000-0001-5596-3320>, gislaine.fongaro@ufsc.br), Márcio Côrrea⁶ (<http://orcid.org/0000-0002-9063-7974>, profmarcioufsc@gmail.com), M. A. Bianchini^{1,6} (<https://orcid.org/0000-0001-6135-701X>, bian07@yahoo.com.br), A. C. C. Cruz^{1,2,6} (<http://orcid.org/0000-0001-7306-4708>, ariadne.cruz@ufsc.br)

¹Center for Research on Dental Implants, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

²Laboratory of Applied Virology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

³Department of Pharmaceutics Science, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

⁴Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

⁶Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

Corresponding author:

Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina

Campus Universitário – Trindade, CEP: 88.040-970, Florianópolis, SC – Brasil

Telefone: +55 48 3721-3407

E-mail: ariadne.cruz@ufsc.br

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank Curityba Biotech® for providing stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). Authors appreciate the support from the Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) and Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) at the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) for providing their equipments and infrastructures to perform some experimental analyses.

ETHICAL APPROVAL

Human gingival fibroblasts (HGF) were obtained from the primary culture of three healthy patients who needed a distal wedge periodontal procedure. The experimental protocol (number 21/09) was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), under authorization number 062.

CONFLICT OF INTEREST

Marco Aurélio Bianchini is a speaker from Criteria Biomateriais.

The present project was not supported by any grant.

ABSTRACT

Background and objective: Considering that the use of autogenous grafts in periodontal and peri-implant plastic surgeries are related to postoperative morbidity, bleeding, and limited tissue availability at the donor site, xenogeneic matrices have been used with increasing frequency in mucogingival surgeries. This *in vitro* study aimed to evaluate the influence of xenogeneic collagen matrix thickness on cell adhesion, morphology, viability, and proliferation, as well as matrix degradation.

Materials and methods: Lumina Coat® and Mucograft® matrices were evaluated, following the established groups: SLC – Single thickness Lumina Coat®, commercially available with 2 mm thickness; DLC - Double thickness Lumina Coat®, with double SLC thickness; and MG - Mucograft®. Matrix degradation, surface topography, cell viability, morphology, adhesion, and proliferation were evaluated. Results from all groups were compared through one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, comparing all groups at each experimental time individually. Differences among datasets with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results: All groups were biocompatible for human gingival fibroblasts (HGF) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), since the viabilities were higher than 70% at days 1, 3, and 7. DCL promoted HGF viabilities similar to MG ($p = 0.2828$) and the highest SHED viability ($p < 0.0001$) at day 1. Also, DLC demonstrated HGF and SHED proliferations higher than the positive control (MG; $p < 0.05$) at day 7. Regarding matrix degradation, SLC was completely degraded at day 14, while DLC and MG presented 48.41% and 20.52% of their initial mass, respectively, at day 35.

Conclusion: Increasing the xenogeneic collagen matrix thickness improved human gingival fibroblasts and human mesenchymal stem cells viability and proliferation, as well as prevented early matrix degradation.

Keywords: collagen matrix, cell viability, cell proliferation, cell adhesion, tissue regeneration

INTRODUCTION

Mucogingival surgeries are performed frequently due to the promising clinical outcomes of periodontal and peri-implant plastic surgeries and the increasing patient's aesthetic demands.¹ Conventional mucogingival procedures require a second surgical site to remove a free gingival graft (FGG) or a connective tissue graft (CTG).² This additional surgery site is associated with high morbidity, postsurgical bleeding, and feeding difficulties.³ Additionally, multiple simultaneous treatment sites represent a clinical challenge to the surgeon, prolonged surgical time, and commonly there is a limited tissue availability of donor site for mucogingival surgeries.^{4,5}

Therefore, xenogeneic and allogeneic graft materials have been proposed as an alternative to autogenous graft tissues. These biomaterials allow the treatment of multiple sites in one surgical intervention, prevent the additional donor site surgery, and reduce surgical time.^{6,7} Collagen has been the eligible component to develop matrices for mucogingival regeneration surgeries due to its biocompatibility, suitable biodegradation, low levels of immunogenicity, and the possibility to form a porous interconnected network structure that facilitates the cell migration and adhesion.⁸⁻¹⁰

Concerning xenogeneic matrices, the promising clinical findings are related to the matrix adaptation to the surgical site, blood clot stabilization, and tissue integration, which will promote the cellular ingrowth. Also, the matrix physico-chemical characteristics, such as collagen type composition, surface characteristics, and matrix degradation are directly associated with the clinical outcomes,^{8,11,12} including long-lasting tissue stability and keratinized tissue formation.^{11,13,14} In this sense, the present *in vitro* study aimed to evaluate the

influence of xenogeneic collagen matrices thickness on cell adhesion, morphology, viability, and proliferation, as well as matrices degradation.

MATERIALS AND METHODS

Collagen matrices

Lumina Coat® (Criteria Biomateriais, Sao Paulo, Brazil) and Mucograft® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) were evaluated, following the established groups: SLC - Single thickness Lumina Coat®, commercially available with 2 mm thickness; DLC - Double thickness Lumina Coat®, with a double thickness of SLC; and MG - Mucograft®, as commercially available. In a laminar flow cabinet, matrices of all groups were divided on fragments of 5 mm x 5 mm each for SLC and MG, and 5 x 10 mm for DLC. DLC matrices were folded and sutured at the borders (4.0 Nylon, Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brazil) to double their thickness.

Scanning electronic microscopy and energy-dispersive x-ray spectroscopy

Surface topography analyses of SLC, DLC, and MG were performed using a high resolution scanning electron microscope (JEOL JMS-6390LV, Massachusetts, USA) at 10 kV. Previously, samples were spin-coated with 300 Å gold. Each sample was photographed in three distinct fields at magnifications of 500X, 1000X, and 2500X. Analyses were performed in triplicate. The surface chemical composition of SLC, DLC, and MG were assessed by Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS, JEOL JMS-6390LV, Massachusetts, USA), using 500X magnification SEM images. Analyses were performed in triplicate.

Cell lineages and culture conditions

To evaluate the cell viability, proliferation, adhesion, and morphology, all cell lineages described below were incubated at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂. Cells were seeded in triplicate at a density of 2.0×10⁴ cells per well or per sample.

Human gingival fibroblasts

Human gingival fibroblasts (HGF) were obtained from the primary culture of three healthy patients who needed distal wedge periodontal procedures, according to Littuma et al. (2019).¹⁵ The experimental protocol was approved by the Human Research Ethics Committee and each volunteer signed written consent. Experiments were conducted in full accordance with ethical principles, including the Helsinki Declaration. After the establishment of the fibroblast lineage, HGF were cultivated with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Massachusetts, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Massachusetts, USA) and were applied in the following experiments using cell passages from 4 up to 6.

SHED

Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHED, Curityba Biotech™ Cell Processing Center, Curitiba, Brazil) were cultured in DMEM with 10% FBS, according to Littuma et al. (2019).¹⁵ SHED passages from 4 up to 6 were used.

Cytotoxicity assay

Matrices cytotoxicity were evaluated by MTS [3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium, inner salt] (CellTiter 96®, Promega, São Paulo, Brasil) colorimetric assay¹⁵ evaluating HGF and SHED at days 1, 3, and 7. Cells were seeded over SLC, DLC, and MG matrices, in triplicate, placed in 96-well plates. Samples were maintained immobile for 4 h to allow cell adhesion, then the culture medium was

added up to 200 μ L. Also, cell control groups were performed using HGF and SHED (2.0×10^4 cells/well, in 96-wells plates) seeded directly into the wells.

At each experimental time, 40 μ L of MTS solution were added per well and the plates were incubated for 150 min. Absorbances were measured by spectrophotometry (Infinite M200, Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland) at 490 nm. Cell viability percentages were calculated relative to cell control group absorbances.

Cell proliferation

HGF and SHED were seeded over SLC, DLC, and MG matrices as described at item 2.4 *Cytotoxicity assay*. Cell proliferations were assessed by PicoGreen® assay (Invitrogen™, Massachusetts, USA). The analyses were performed following the manufacturer's recommendations at days 3 and 7, according to Costa et al. (2014),¹⁶ with minor modifications. Fluorescent spectrophotometry (Infinite M200, Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland) was used at 360/440 nm (Ex / Em). Analyses were performed in triplicate.

Cell morphology and adhesion

To visualize cell morphology and cell ability to adhere on matrix surfaces, SEM (JEOL JMS-6390LV, Massachusetts, USA) was carried out after item 2.5 *Cell Proliferation* at day 7. Therefore, matrices were carefully washed with phosphate-buffered saline (PBS, Gibco, Massachusetts, USA), fixed using 4% glutaraldehyde for 30 min at room temperature, dehydrated with progressive alcohol concentrations, 50% to 100%, and finalized with hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich). The dried matrices were spin-coated with 300 Å gold. SEM was performed in triplicate at 10 kV and samples were photographed at two distinct fields at 500X and 1000X magnifications.

Matrices degradation assay

Matrices degradation were evaluated according to the mass loss. Therefore, the determination of SLC, DLC, and MG matrices initial mass (n=3) was performed. Then, samples were submerged in 3 mL PBS into 24-well plates and maintained at 37 °C, according to Cruz et al. (2016),¹⁷ with modifications. At days 1, 3, 7, 14, 21, 28, and 35, samples were individually dried, weighed at sterile conditions, and placed back into the wells.

Statistical Analysis

Three independent experiments were performed to confirm the reproducibility of the results. Graph Pad Software Inc. (7.0 version, San Diego, CA, USA) was employed for statistical analyses. Results of matrices cytotoxicity and cell proliferation from all groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, comparing all treatments at each experimental time individually. Differences among datasets with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Scanning electronic microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy

According to Figure 1, SLC, DLC, and MG matrices demonstrated irregular fibers and porous surfaces. SLC and DLC provided similar SEM images showing the same fiber arrangement and porosity pattern (Figure 1A and 1B). Meanwhile, MG fibers were thicker and more continuous, resulting in a different porosity pattern (Figure 1C). EDS analyses demonstrated that SLC, DLC, and MG were essentially composed of carbon, oxygen, and sodium chemical elements (Figure 1D, 1E, and 1F).

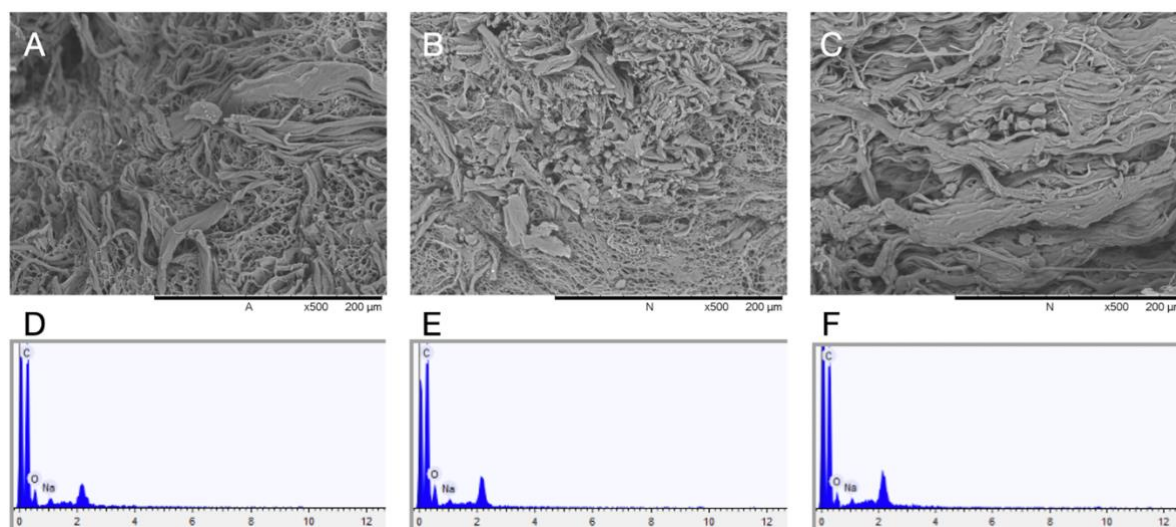


Figure 1: Scanning electronic microscopy (SEM) images of matrices. **A)** Single Lumina Coat® (SLC); **B)** Double Lumina Coat® (DLC); and **C)** Mucograft® (MG) at 500x magnification. Images are representative (n=3). Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) graphs presenting the chemical composition surface of **D)** Single Lumina Coat® (SLC); **E)** Double Lumina Coat® (DLC), and **F)** Mucograft® (MG).

Cytotoxicity assay

On the topic of Figure 2A, SLC, DLC, and MG matrices were biocompatible with both HGF and SHED at days 1, 3, and 7, since all groups demonstrated cell viabilities over 70% [ISO 10993-5:2009(E)].¹⁸ All groups presented HGF viability over 100% at day 1, and DLC promoted higher HGF viability than SLC ($p=0.049$) and cell control ($p=0.0066$). At day 3, SLC and DLC demonstrated similar HGF viabilities ($p=0.1222$), MG was similar to DLC ($p=0.2634$), and cell control was similar to SLC ($p=0.7071$). All groups promoted similar HGF viabilities at day 7 ($p=0.5922$).

At day 1, SHED (Figure 2B) demonstrated viabilities higher than 70% for all groups. Additionally, DLC promoted the highest SHED viability, followed by MG ($p=0.0001$), while SLC and cell control promoted similar results ($p=0.9965$) at day 1. At day 3, no substantial difference was found among groups ($p=0.0441$). No significant difference was found among groups at day 7 ($p=0.0748$).

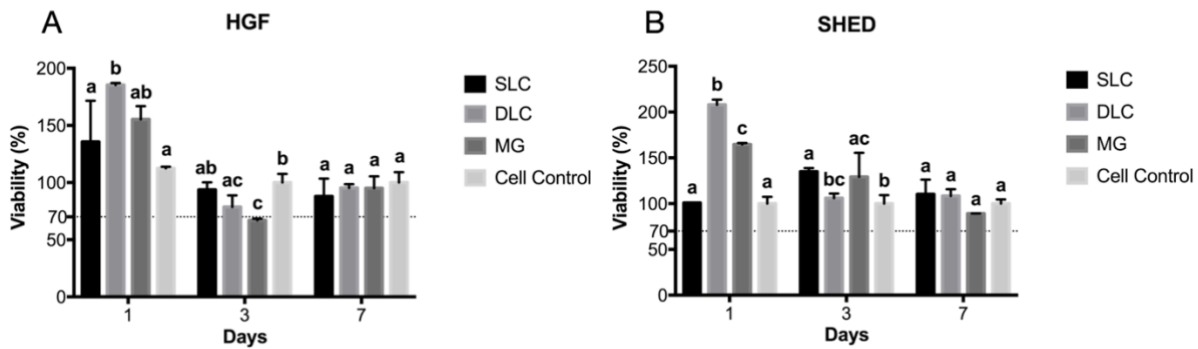


Figure 2: Cytotoxicity assay by MTS colorimetric test at days 1, 3, and 7. Different lower case letters refer to significant differences (ANOVA/Tukey test, $p < 0.05$) among groups. Percentages of viable cells were calculated concerning cell control group. **A)** Human gingival fibroblasts (HGF) and **B)** mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). Single Lumina Coat® (SLC); **B)** Double Lumina Coat® (DLC); and **C)** Mucograft® (MG).

Cell proliferation

As observed in Figure 3A, SLC and DLC promoted lower HGF proliferation than MG and cell control at day 3 ($p=0.0005$). Conversely, at day 7, DLC demonstrated the highest HGF proliferation ($p=0.0033$).

Regarding SHED (Figure 3B), DLC, MG, and cell control promoted similar cell proliferation, while SLC demonstrated the lowest SHED proliferation at day 3 ($p=0.0001$). At day 7, MG and cell control demonstrated lower SHED proliferation rates than SLC and DLC ($p=0.0218$).

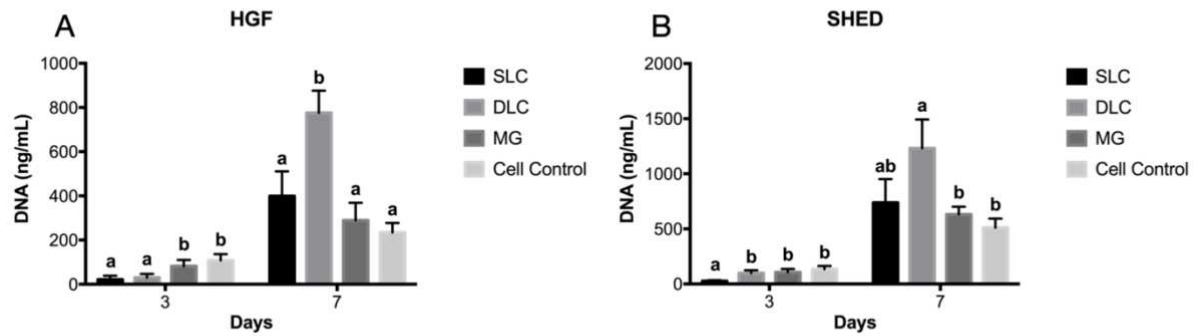


Figure 3: Proliferation assay by PicoGreen® reagent at days 3 and 7. Different lower-case letters refer to significant differences (ANOVA/Tukey test, $p < 0.05$) among groups. **A)** Human gingival fibroblasts (HGF), and **B)** mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). Single Lumina Coat® (SLC); **B)** Double Lumina Coat® (DLC); and **C)** Mucograft® (MG).

Cell morphology and adhesion

According to SEM images (Figure 4), all matrices allowed HGF and SHED to adhere and spread on their surfaces. Additionally, HGF demonstrated an elongated shape with cell extensions and cell-to-cell connections. SHED also demonstrated cells extensions and cell-to-cell connections, but polygonal morphology.

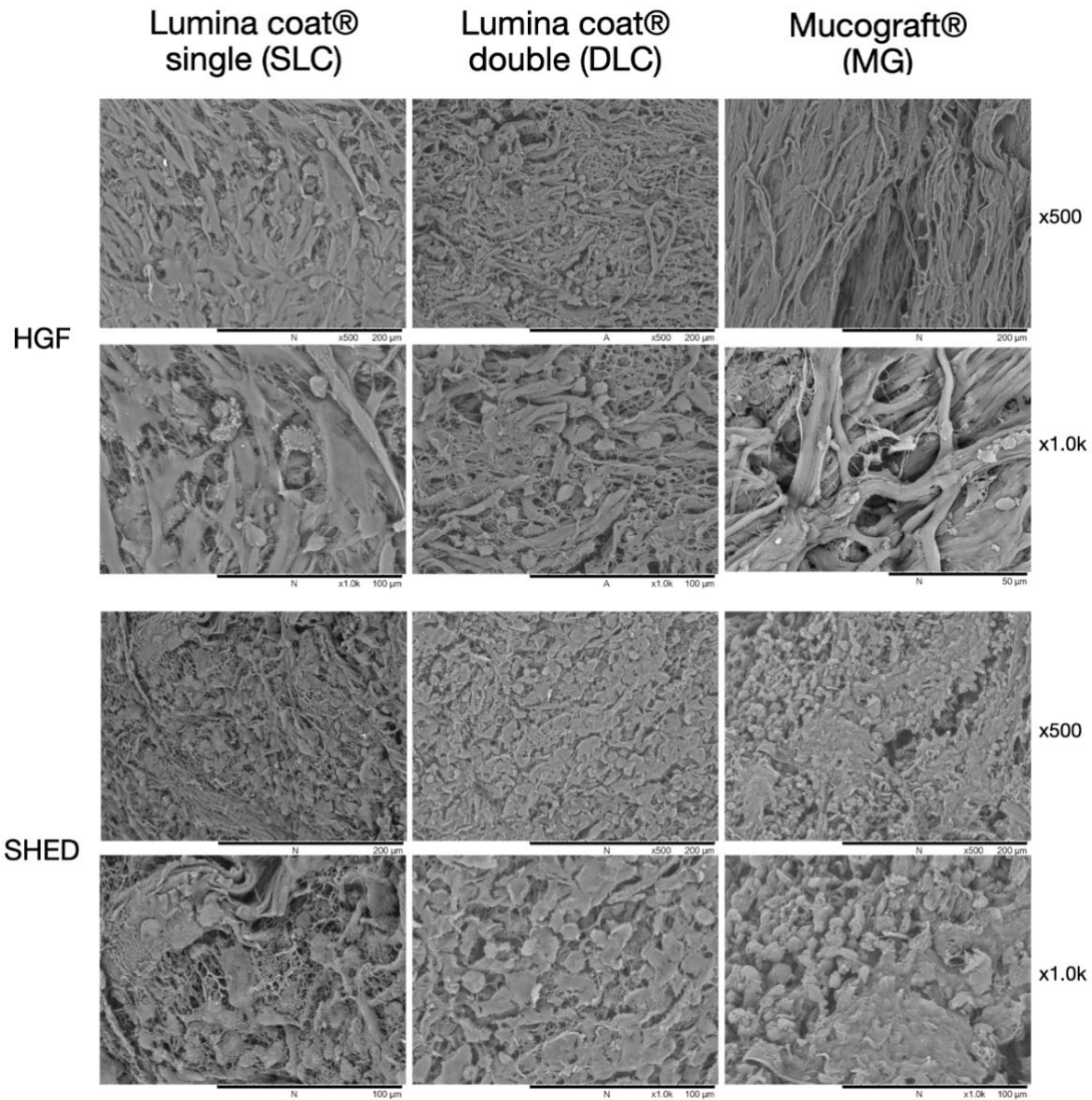


Figure 4: Scanning electronic microscopy (SEM) images at 500x and 1000x magnification. Human gingival fibroblasts (HGF) and mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) adhered and spread on surfaces of Single Lumina Coat® (SLC), Double Lumina Coat® (DLC), and Mucograft® (MG) matrices after 7 days of cells seeded. Images are representative (n=3).

Degradation assay

According to Figure 5, at day 1, all groups demonstrated similar mass loss. At day 3, SLC, DLC, and MG lost 1.35%, 3.13%, and 43.84%, respectively. SLC and MG demonstrated similar loss of mass at day 7 (72.69% and 65.07%, respectively), while DLC demonstrated 20.53% mass loss. At day 14, SLC matrices were completely degraded, while DLC and MG

mass losses were 24.25% and 68.68%, respectively. At the end of the experimental evaluation (day 35), DLC and MG presented a remaining mass of 48.41% and 20.52%, respectively.

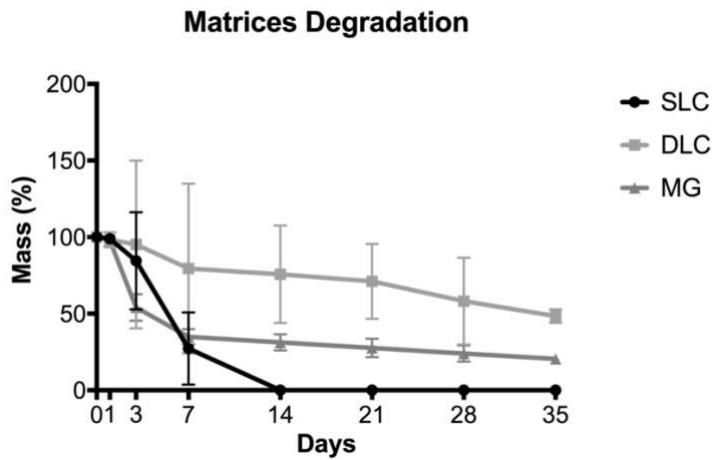


Figure 5: Degradation assay. The percentage \pm standard deviation of matrices degradation was calculated regarding the initial mass (n=3). Single Lumina Coat® (SLC), Double Lumina Coat® (DLC), and Mucograft® (MG).

DISCUSSION

Considering that the use of autogenous grafts in periodontal and peri-implant plastic surgeries are related to high postoperative morbidity, bleeding, and limited tissue availability at the donor site,^{6,7,19} collagen matrices have been applied with increased frequency. Due to the influence of physico-chemical characteristics of biomaterials on biological responses, this *in vitro* study evaluated the effect of xenogeneic collagen matrix thickness on cell adhesion, morphology, viability, and proliferation, as well as matrix degradation. In summary, the evaluated collagen matrix with double thickness (DLC group, 4 mm) promoted the highest cell viabilities at day 1 for both HGF and SHED. Additionally, DLC demonstrated the highest HGF and SHED proliferation rates at day 7, even higher than Mucograft® (positive control). Conversely, at day 3, Mucograft® demonstrated higher HGF proliferation than DLC, while SHED proliferation rates were similar for both groups. Regarding degradation, collagen

matrices with single thickness were completely degraded at day 14, while double thickness and Mucograft® matrices presented 48.41% and 20.52% of their initial mass, respectively, at day 35. These findings are relevant for clinical practice, since the regeneration of periodontal and peri-implant soft tissues is closely related to the ability of xenogeneic matrices used in mucogingival surgeries to promote cell adhesion, migration, and proliferation. In addition, the matrices must be biocompatible and demonstrate an adequate degradation rate to enable architecture maintenance while exerting the support for cell adhesion, proliferation, and differentiation, as well as to allow an adequate formation of blood supply to transport nutrients and remove metabolic waste.

It is relevant to mention that this study used human gingival fibroblasts and human mesenchymal stem cells from the dental origin. Human lineages are more representative of the patient's condition than established commercially available cell lineages from non-human species. Also, the evaluated cell lineages are directly related to the matrices clinical application for soft tissue regeneration. Herein, all matrices demonstrated irregular surfaces with ideal porosity pattern for cell spreading, adhesion, and proliferation. This information was corroborated by cell viability findings, which demonstrated that all evaluated matrices were biocompatible for HGF and SHED.

Therefore, we observed a positive influence regarding the increase of matrix thickness on HGF and SHED behavior, probably due to the delayed matrix degradation observed in the double thickness group. Despite their interesting biological properties, deficient structural stability and mechanical strength were observed in experimental and clinical situations evaluating thin collagen matrices.²⁰ To deal with this limitation, collagen matrices have been modified using mechanical and chemical procedures, such as ultraviolet and gamma radiation, and dehydrothermal treatment, to reduce their solubility and reabsorption, and improve the

mechanical properties.²¹⁻²³ Additionally, cross-linking strategies applied to collagen matrices to improve their mechanical and structural properties are available, but such strategies could lead to negative effects on cell responses. Therefore, providing an improved structure and environment for cell migration, adhesion, and proliferation has an important role in many biological processes, such as cell motility, growth, metabolism, development, and differentiation, which are directly related to tissue regeneration.⁸ Thus, volumetric and thickness modifications of collagen matrices, as performed herein, are interesting alternatives in soft tissue regenerative therapies.

Moreover, biomaterials for tissue regeneration should mimic extracellular matrix, reproducing the natural connective tissue and acting as a scaffold, maintaining an architecture for cell migration, vessels formation, and, finally, tissue regeneration.^{1,17} Collagen types I and III are the principal extracellular matrix components and the main fibrous structural protein in the living organisms. Therefore, collagen matrices have been pointed out as promisor biomaterial for soft tissue regeneration as several studies have proven that they are suitable for mature cell growth and proliferation.^{20,24,25} Mucograft® was chosen as a positive control since it is a resorbable two-layer xenogeneic collagen matrix used for periodontal and peri-implant tissue regeneration. The literature has indicated Mucograft® as a benchmark biomaterial.^{13,26} This matrix is composed of collagen types I and III with no cross-linking or chemical treatments. Additionally, Mucograft® has two phases: 1) a compact structure of denser collagen and smooth texture to improve wound healing and increase cell adhesion, and 2) a porous surface that allows blood clot formation, tissue integration, and angiogenesis.¹³

Regarding the limitations of this study, it is an *in vitro* study. Nevertheless, human gingival fibroblasts and mesenchymal stem cells were applied since they resemble more closely the *in vivo* human conditions than cells from animal origin. However, further *in vivo* and clinical

studies are suggested to confirm the influence of double collagen matrix thickness on biomaterial degradation and cell behavior. Finally, future studies could evaluate other types of collagen matrices commercially available.

CONCLUSIONS

In summary, increasing the xenogeneic collagen matrix thickness improved human gingival fibroblasts and dental-derived mesenchymal stem cells viability and proliferation, and prevented early matrix degradation.

REFERENCES

1. Cairo F. Periodontal plastic surgery of gingival recessions at single and multiple teeth. *Periodontol.* 2000. 2017;75:296–316.
2. Zucchelli G, Tavelli L, McGuire MK, et al. Autogenous soft tissue grafting for periodontal and peri-implant plastic surgical reconstruction. *J. Periodontol.* 2020;91:9–16.
3. Stavropoulou C, Atout RN, Brownlee M, Schroth RJ, Kelekis-Cholakis A. A randomized clinical trial of cyanoacrylate tissue adhesives in donor site of connective tissue grafts. *J. Periodontol.* 2019;90:608–615.
4. Griffin TJ, Cheung WS, Zavras AI, Damoulis PD. Postoperative Complications Following Gingival Augmentation Procedures. *J. Periodontol.* 2006;77:2070–2079.
5. Wessel JR, Tatakis DN. Patient Outcomes Following Subepithelial Connective Tissue Graft and Free Gingival Graft Procedures. *J. Periodontol.* 2008;79:425–430.
6. McGuire MK, Scheyer ET, Schupbach P. Growth Factor–Mediated Treatment of Recession Defects: A Randomized Controlled Trial and Histologic and Microcomputed Tomography Examination. *J. Periodontol.* 2009;80:550–564.
7. Wilson TG, McGuire MK, Nunn ME. Evaluation of the Safety and Efficacy of Periodontal Applications of a Living Tissue-Engineered Human Fibroblast- Derived Dermal Substitute. II. Comparison to the Subepithelial Connective Tissue Graft: A Randomized Controlled Feasibility Study. *J. Periodontol.* 2005;76:881–889.
8. Chevally B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: Applications for tissue engineering and gene therapy. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2000;38:211–218.

9. Kim SG, Lee DS, Lee S, Jang JH. Osteocalcin/fibronectin-functionalized collagen matrices for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 2015;103:2133–2140.
10. Tavelli L, McGuire MK, Zucchelli G, et al. Extracellular matrix-based scaffolding technologies for periodontal and peri-implant soft tissue regeneration. *J. Periodontol.* 2020;91:17–25.
11. Zuhr O, Bäumer D, Hürzeler M. The addition of soft tissue replacement grafts in plastic periodontal and implant surgery: Critical elements in design and execution. *J. Clin. Periodontol.* 2014;41:S123–S142.
12. Rusu D, Boariu M, Stratul Ștefan I, et al. Interaction between a 3d collagen matrix used for periodontal soft tissue regeneration and t-lymphocytes: An in vitro pilot study. *Exp. Ther. Med.* 2019;17:990–996.
13. Sanz M, Lorenzo R, Aranda JJ, Martin C, Orsini M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft® prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: A randomized prospective clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* 2009;36:868–876.
14. Thoma DS, Benić GI, Zwahlen M, Hämmerle CHF, Jung RE. A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques. *Clin. Oral Implants Res.* 2009;20:146–165.
15. Littuma GJS, Sordi MB, Borges Curtarelli R, et al. Titanium coated with poly(lactic-co-glycolic) acid incorporating simvastatin: Biofunctionalization of dental prosthetic abutments. *J. Periodontal Res.* 2020;55:116–124.
16. Costa PF, Vaquette C, Zhang Q, et al. Advanced tissue engineering scaffold design for regeneration of the complex hierarchical periodontal structure. *J. Clin. Periodontol.*

- 2014;41:283–294.
17. Cruz ACC, Caon T, Menin Á, et al. Adipose-Derived Stem Cells Decrease Bone Morphogenetic Protein Type 2-Induced Inflammation In Vivo. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2016;74:505–514.
 18. Organization IS. Biological evaluation of medical devices–Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. *Int. Organ.* 2009;2007:1–11.
 19. Stavropoulou C. Comparison of Cyanoacrylate Tissue Adhesives to Polytetrafluoroethylene Sutures in the Donor Site of Connective Tissue Grafts – A Randomized Clinical Trial. 2018;
 20. Sadeghi R, Mahdavi P, Lee WS, et al. A novel, cell-permeable, collagen-based membrane promotes fibroblast migration. *J. Periodontal Res.* 2018;53:727–735.
 21. Wang W, Zhang Y, Ye R, Ni Y. Physical crosslinkings of edible collagen casing. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015;81:920–925.
 22. Takitoh T, Bessho M, Hirose M, et al. Gamma-cross-linked nonfibrillar collagen gel as a scaffold for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* 2015;119:217–225.
 23. Maslennikova A, Kochueva M, Ignatieva N, et al. Effects of gamma irradiation on collagen damage and remodeling. *Int. J. Radiat. Biol.* 2015;91:240–247.
 24. Sell SA, Francis MP, Garg K, et al. Cross-linking methods of electrospun fibrinogen scaffolds for tissue engineering applications. *Biomed. Mater.* 2008;3:.
 25. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules.* 2002;3:232–238.
 26. Schmitt CM, Tudor C, Kiener K, et al. Vestibuloplasty: Porcine Collagen Matrix Versus Free Gingival Graft: A Clinical and Histologic Study. *J. Periodontol.* 2013;84:914–923.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os resultados deste trabalho *in vitro*, pode-se concluir que o aumento da espessura da matriz xenogênica de colágeno melhorou a viabilidade e a proliferação de fibroblastos gengivais humanos e células-tronco mesenquimais de origem dentária, bem como preveniu a degradação precoce da matriz. Estes achados são importantes para a prática clínica, uma vez que a regeneração dos tecidos moles periodontais e peri-implantares está intimamente relacionada à capacidade das matrizes xenogênicas utilizadas nas técnicas cirúrgicas mucogengivais em propiciar a adesão, migração e proliferação celular. Além de que as matrizes devem ser biocompatíveis e apresentarem uma taxa de degradação adequada para permitir que as matrizes exerçam a função de suporte para a adesão, proliferação e diferenciação celular, bem como permitir uma formação adequada de suprimento sanguíneo para transportar nutrientes e remover resíduos metabólicos. Apesar deste estudo ter empregado fibroblastos gengivais humanos e células-tronco mesenquimais humanas, que se assemelham às condições humanas *in vivo*, estudos *in vivo* e clínicos devem ser realizados para confirmar os achados desta pesquisa. Adicionalmente, sugere-se estudos futuros para avaliar outros tipos de matrizes de colágeno disponíveis comercialmente.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI S. **Cellular and molecular immunology**. 9 ed. Philadelphia, United States: Elsevier, 2017

BARNES, C. P. et al. **Cross-linking electrospun type II collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in ethanol**. *Tissue Engineering*, [s.l.], v. 13, no 7, p. 1593–1605, 2007. ISSN: 10763279, DOI: 10.1089/ten.2006.0292.

CAIRO, F. **Periodontal plastic surgery of gingival recessions at single and multiple teeth**. *Periodontology 2000*, [s.l.], v. 75, no 1, p. 296–316, 2017. ISSN: 09066713, DOI: 10.1111/prd.12186.

CAIRO, F. et al. **Xenogeneic collagen matrix versus connective tissue graft for buccal soft tissue augmentation at implant site. A randomized, controlled clinical trial**. *Journal of Clinical Periodontology*, [s.l.], v. 44, no 7, p. 769–776, 2017. ISSN: 03036979, DOI: 10.1111/jcpe.12750.

CHEVALLAY, B.; HERBAGE, D. **Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: Applications for tissue engineering and gene therapy**. *Medical and Biological Engineering and Computing*, [s.l.], v. 38, no 2, p. 211–218, 2000. ISSN: 01400118, DOI: 10.1007/BF02344779.

COSTA, P. F. et al. **Advanced tissue engineering scaffold design for regeneration of the complex hierarchical periodontal structure**. *Journal of Clinical Periodontology*, [s.l.], v. 41, p. 283–294, 2014. DOI: 10.1111/jcpe.12214.

CRUZ, A. C. C. et al. **Adipose-Derived Stem Cells Decrease Bone Morphogenetic Protein Type 2-Induced Inflammation In Vivo**. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, [s.l.], v. 74, no 3, p. 505–514, 2016. ISSN: 02782391, DOI: 10.1016/j.joms.2015.09.006.

DASKALOVA, A. et al. **Controlling the porosity of collagen, gelatin and elastin biomaterials by ultrashort laser pulses**. *Applied Surface Science*, [s.l.], v. 292, p. 367–377, 2014. ISSN: 01694332, DOI: 10.1016/j.apsusc.2013.11.145.

DELGADO, L. M. et al. **To Cross-Link or Not to Cross-Link? Cross-Linking Associated Foreign Body Response of Collagen-Based Devices**. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, [s.l.], v. 21, no 3, p. 298–313, 2015. ISSN: 19373376, DOI: 10.1089/ten.teb.2014.0290.

DONG, C.; LV, Y. **Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives.** *Polymers*, [s.l.], v. 8, no 2, p. 1–20, 2016. ISSN: 20734360, DOI: 10.3390/polym8020042.

DOYLE, A. D. et al. **One-dimensional topography underlies three-dimensional fibroblast cell migration.** *Journal of Cell Biology*, [s.l.], v. 184, no 4, p. 481–490, 2009. ISSN: 00219525, DOI: 10.1083/jcb.200810041.

FUJIOKA-KOBAYASHI, M. et al. **In vitro Observation of Macrophage Polarization and Gingival Fibroblast Behavior on Three-dimensional Xenogeneic Collagen Matrixes.** *Journal of biomedical materials research. Part A*, [s.l.], no February, p. 1–11, 2020. ISSN: 1552-4965, DOI: 10.1002/jbm.a.36911.

GRIFFIN, T. J. et al. **Postoperative Complications Following Gingival Augmentation Procedures.** *Journal of Periodontology*, [s.l.], v. 77, no 12, p. 2070–2079, 2006. ISSN: 0022-3492, DOI: 10.1902/jop.2006.050296.

GROVER, C. N.; CAMERON, R. E.; BEST, S. M. **Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering.** *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, [s.l.], v. 10, p. 62–74, 2012. ISSN: 17516161, DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.02.028.

HAAPARANTA, A. M. et al. **Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, [s.l.], v. 25, no 4, p. 1129–1136, 2014. ISSN: 15734838, DOI: 10.1007/s10856-013-5129-5.

JEPSEN, K. et al. **Treatment of gingival recession defects with a coronally advanced flap and a xenogeneic collagen matrix: A multicenter randomized clinical trial.** *Journal of Clinical Periodontology*, [s.l.], v. 40, no 1, p. 82–89, 2013. ISSN: 03036979, DOI: 10.1111/jcpe.12019.

JIA, L. et al. **Stem cell differentiation on electrospun nanofibrous substrates for vascular tissue engineering.** *Materials Science and Engineering C*, [s.l.], v. 33, no 8, p. 4640–4650, 2013. ISSN: 09284931, DOI: 10.1016/j.msec.2013.07.021.

KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. **Biomaterials for tissue engineering applications.** *Seminars in Pediatric Surgery*, [s.l.], v. 23, no 3, p. 112–118, 2014. ISSN: 15329453, DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2014.06.010.

KIM, S. G. et al. **Osteocalcin/fibronectin-functionalized collagen matrices for bone**

tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, [s.l.], v. 103, no 6, p. 2133–2140, 2015. ISSN: 15524965, DOI: 10.1002/jbm.a.35351.

LITTUMA, G. J. S. et al. **Titanium coated with poly(lactic-co-glycolic) acid incorporating simvastatin: Biofunctionalization of dental prosthetic abutments.** *Journal of Periodontal Research*, [s.l.], v. 55, no 1, p. 116–124, 2020. ISSN: 0022-3484, DOI: 10.1111/jre.12695.

MASLENNIKOVA, A. et al. **Effects of gamma irradiation on collagen damage and remodeling.** *International Journal of Radiation Biology*, [s.l.], v. 91, no 3, p. 240–247, 2015. ISSN: 13623095, DOI: 10.3109/09553002.2014.969848.

MATTHEWS, J. A. et al. **Electrospinning of collagen nanofibers.** *Biomacromolecules*, [s.l.], v. 3, no 2, p. 232–238, 2002. ISSN: 15257797, DOI: 10.1021/bm015533u.

MCGUIRE, M. K.; SCHEYER, E. T.; SCHUPBACH, P. **Growth Factor–Mediated Treatment of Recession Defects: A Randomized Controlled Trial and Histologic and Microcomputed Tomography Examination.** *Journal of Periodontology*, [s.l.], v. 80, no 4, p. 550–564, 2009. ISSN: 0022-3492, DOI: 10.1902/jop.2009.080502.

MEYER, M. **Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties.** *BioMedical Engineering Online*, [s.l.], v. 18, no 1, p. 1–74, 2019. ISSN: 1475925X, DOI: 10.1186/s12938-019-0647-0.

NILSEN-NYGAARD, J. et al. **Chitosan: Gels and interfacial properties.** *Polymers*, [s.l.], v. 7, no 3, p. 552–579, 2015. ISSN: 20734360, DOI: 10.3390/polym7030552.

ORGANIZATION IS. **Biological evaluation of medical devices–Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** *International Organization*, [s.l.], v. 2007, p. 1–11, 2009. ISBN: 2831846102, ISSN: 0013-936X, DOI: 10.1021/es0620181.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. **Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications.** *Materials*, [s.l.], v. 3, no 3, p. 1863–1887, 2010. ISBN: 1418682756, ISSN: 19961944, DOI: 10.3390/ma3031863.

RUSU, D. et al. **Interaction between a 3d collagen matrix used for periodontal soft tissue regeneration and t-lymphocytes: An in vitro pilot study.** *Experimental and Therapeutic Medicine*, [s.l.], v. 17, no 2, p. 990–996, 2019. ISSN: 17921015, DOI: 10.3892/etm.2018.6979.

SADEGHI, R. et al. **A novel, cell-permeable, collagen-based membrane promotes**

fibroblast migration. *Journal of Periodontal Research*, [s.l.], v. 53, no 5, p. 727–735, 2018. ISSN: 16000765, DOI: 10.1111/jre.12557.

SANZ, M. et al. **Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft® prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: A randomized prospective clinical trial.** *Journal of Clinical Periodontology*, [s.l.], v. 36, no 10, p. 868–876, 2009. ISSN: 03036979, DOI: 10.1111/j.1600-051X.2009.01460.x.

SCHMITT, C. M. et al. **Vestibuloplasty: Porcine Collagen Matrix Versus Free Gingival Graft: A Clinical and Histologic Study.** *Journal of Periodontology*, [s.l.], v. 84, no 7, p. 914–923, 2013. ISSN: 0022-3492, DOI: 10.1902/jop.2012.120084.

SELL, S. A. et al. **Cross-linking methods of electrospun fibrinogen scaffolds for tissue engineering applications.** *Biomedical Materials*, [s.l.], v. 3, no 4, 2008. ISSN: 1748605X, DOI: 10.1088/1748-6041/3/4/045001.

SHIELDS, K. J. et al. **Mechanical properties and cellular proliferation of electrospun collagen type II.** *Tissue Engineering*, [s.l.], v. 10, no 9–10, p. 1510–1517, 2004. ISSN: 10763279, DOI: 10.1089/ten.2004.10.1510.

STAVROPOULOU, C. **Comparison of Cyanoacrylate Tissue Adhesives to Polytetrafluoroethylene Sutures in the Donor Site of Connective Tissue Grafts – A Randomized Clinical Trial.** [s.l.], 2018.

STAVROPOULOU, Chrysi et al. **A randomized clinical trial of cyanoacrylate tissue adhesives in donor site of connective tissue grafts.** *Journal of Periodontology*, [s.l.], v. 90, no 6, p. 608–615, 2019. ISSN: 00223492, DOI: 10.1002/JPER.18-0475.

TAKITOH, T. et al. **Gamma-cross-linked nonfibrillar collagen gel as a scaffold for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, [s.l.], v. 119, no 2, p. 217–225, 2015. ISSN: 13474421, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.07.008.

TAVELLI, L. et al. **Extracellular matrix-based scaffolding technologies for periodontal and peri-implant soft tissue regeneration.** *Journal of Periodontology*, [s.l.], v. 91, no 1, p. 17–25, 2020. ISSN: 00223492, DOI: 10.1002/JPER.19-0351.

THOMA, D. S. et al. **A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques.** *Clinical Oral Implants Research*, [s.l.], v. 20, no SUPPL. 4, p. 146–165, 2009. ISSN: 09057161, DOI: 10.1111/j.1600-0501.2009.01784.x.

THOMA, D. et al. **Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrices: A volumetric analysis.** *Journal of Clinical Periodontology*, [s.l.], v. 37, no 7, p. 659–666, 2010. ISSN: 03036979, DOI: 10.1111/j.1600-051X.2010.01581.x.

TONETTI, M. S.; JEPSEN, S. **Clinical efficacy of periodontal plastic surgery procedures: Consensus Report of Group 2 of the 10th European Workshop on Periodontology.** *Journal of Clinical Periodontology*, [s.l.], v. 41, no November 2013, p. S36–S43, 2014. ISSN: 1600051X, DOI: 10.1111/jcpe.12219.

WANG, W. et al. **Physical crosslinkings of edible collagen casing.** *International Journal of Biological Macromolecules*, [s.l.], v. 81, p. 920–925, 2015. ISSN: 18790003, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.032.

WESSEL, J. R.; TATAKIS, D. N. **Patient Outcomes Following Subepithelial Connective Tissue Graft and Free Gingival Graft Procedures.** *Journal of Periodontology*, [s.l.], v. 79, no 3, p. 425–430, 2008. ISSN: 0022-3492, DOI: 10.1902/jop.2008.070325.

WILSON, T. G.; MCGUIRE, M. K.; NUNN, M. E. **Evaluation of the Safety and Efficacy of Periodontal Applications of a Living Tissue-Engineered Human Fibroblast-Derived Dermal Substitute. II. Comparison to the Subepithelial Connective Tissue Graft: A Randomized Controlled Feasibility Study.** *Journal of Periodontology*, [s.l.], v. 76, no 6, p. 881–889, 2005. ISSN: 0022-3492, DOI: 10.1902/jop.2005.76.6.881.

WOLF, K. et al. **Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo.** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, [s.l.], v. 20, no 8, p. 931–941, 2009. ISSN: 10849521, DOI: 10.1016/j.semcd.2009.08.005.

YAN, F. et al. **Chitosan-collagen porous scaffold and bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for ischemic stroke.** *Neural Regeneration Research*, [s.l.], v. 10, no 9, p. 1421–1426, 2015. ISSN: 18767958, DOI: 10.4103/1673-5374.163466.

ZHANG, Q. et al. **Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity.** *International Journal of Biological Macromolecules*, [s.l.], v. 76, p. 94–101, 2015. ISSN: 18790003, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.063.

ZUCHELLI, G. et al. **Autogenous soft tissue grafting for periodontal and peri-implant plastic surgical reconstruction.** *Journal of Periodontology*, [s.l.], v. 91, no 1, p. 9–16, 2020. ISSN: 0022-3492, DOI: 10.1002/JPER.19-0350.

ZUHR, O.; BÄUMER, D.; HÜRZELER, M. **The addition of soft tissue replacement**

grafts in plastic periodontal and implant surgery: Critical elements in design and execution. *Journal of Clinical Periodontology*, [s.l.], v. 41, p. S123–S142, 2014. ISSN: 1600051X, DOI: 10.1111/jcpe.12185.

PRODUÇÕES DURANTE O MESTRADO

- Artigo intitulado “A simple technique to repair feldspathic porcelain chipping in screw-retained implant-supported prosthesis: a case report”, submetido no *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, no dia 9 de julho de 2020.
- Artigo intitulado “Increasing the thickness of the collagen xenogeneic matrix prevents early matrix degradation and improves the proliferation, adhesion, and viability of human gingival fibroblasts and mesenchymal stem cells”, submetido no *Journal of Periodontal Research* no dia 21 de julho de 2020.
- Apresentação do trabalho intitulado “Comparação de Bio-adesivo a base de Cyanoacrilato e sutura convencional na cicatrização do palato após remoção de enxerto: estudo piloto” na 36ª reunião anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO) no dia 5 de setembro de 2019.
- Participação no projeto de extensão intitulado “**Hands-on de técnicas de sutura**” promovida pela Liga Acadêmica de Periodontia Prof. Ricardo de Souza Magini da UFSC.
- Participação no Encontro Acadêmico de Atualização em Odontologia com a apresentação dos trabalhos intitulados “**Manipulação de Tecidos moles em dentes e implantes**” e “**Hands-On de técnicas de suturas**”.
- Participação como membro de banca avaliadora de trabalho de conclusão de curso (TCC) dos trabalhos “Biofuncionalização de abutments – Avaliação da agregação e liberação de sinvastatina incorporada em PLGA na superfície de titânio” da aluna Amanda Chaves, apresentado no dia 23 de outubro de 2019, e “Diferentes Técnicas para Correção de Sorriso Gengival: Série de Casos” da aluna Fernanda Lemos, apresentado no dia 22 de julho de 2020.