

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 21/11/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MANUELA MARIA VIANA MIGUEL

**NOVO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE DROGAS – FILME DE
FIBROÍNA DE SEDA CARREGADO OU NÃO COM
INSULINA PARA REPARO DE FERIDAS EM MUCOSA
PALATINA: estudo *in vitro* e clínico randomizado**

2023

MANUELA MARIA VIANA MIGUEL

**NOVO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE DROGAS – FILME DE
FIBROÍNA DE SEDA CARREGADO OU NÃO COM INSULINA PARA
REPARO DE FERIDAS EM MUCOSA PALATINA: estudo *in vitro* e
clínico randomizado**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria

Coorientadora: Profa. Dra. Ingrid Fernandes Mathias-Santamaria

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Miguel , Manuela Maria Viana

Novo sistema de liberação de drogas - filme de fibroína de seda carregado ou não com insulina para reparo de feridas em mucosa palatina: estudo in vitro e clínico randomizado. / Manuela Maria Viana Miguel . - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
177 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientador: Mauro Pedrine Santamaria

Coorientador: Ingrid Fernandes Mathias-santamaria

1. Cicatrização. 2. Fibroína. 3. Insulina. 4. Quitosana. 5. Sistemas de liberação. I. Santamaria, Mauro Pedrine, orient. II. Mathias-santamaria, Ingrid Fernandes, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Luciana Macchion Shaddox

University of Kentucky (UK)

College of Dentistry

Campus de Lexington

Prof. Assoc. Renato Corrêa Viana Casarin

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Campus de Piracicaba

Profa. Dra. Suzana Peres Pimentel

Universidade Paulista (Unip)

Faculdade de Odontologia

Campus de São Paulo

Profa. Assoc. Andrea Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 21 de novembro de 2023

DEDICATÓRIA

*Dedico essa tese de doutorado ao meu pai, **Prof. Dr. Antonio Carlos Viana Miguel**. Um homem que faz de sua vida uma doação integral a mim e aos meus irmãos. Exemplo de honestidade, perseverança e resiliência mesmo em meio as tribulações e provações. Obrigada por ser incansável lutando todos os dias incessantemente pelos objetivos dos seus filhos. A nossa relação pai-filha é o maior presente da minha vida. Que felicidade a minha que temos um ao outro!*

Amo o senhor imensamente.

AGRADECIMENTOS

*A **Deus**, pela sua misericórdia e compaixão para comigo frente às minhas misérias. Obrigada por me sustentar e proteger em todos os caminhos que eu decido percorrer me abençoando muito mais do que eu mereço.*

*À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp**, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, **Prof. Dr. Cesar Rogério Pucci** e da vice-diretora **Profa. Dra. Symone Cristina Teixeira**.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora **Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira**.*

*Ao meu orientador **Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria**. Minha imensa gratidão pela paciência, confiança depositada em mim e por todas as oportunidades que o senhor me concedeu nesses 6 anos de pós-graduação. Devo ao senhor toda a minha formação profissional e o meu amadurecimento pessoal durante esse período como sua orientada. Desejo que ainda possamos fazer muitos projetos juntos na vida acadêmica. Obrigada por acreditar em mim.*

*À minha coorientadora, **Profa Dra. Ingrid Fernandes Mathias-Santamaria**, por todo suporte na idealização e desenvolvimento do biomaterial me acompanhando diversas vezes até Ribeirão Preto para que a etapa laboratorial fosse cumprida. Você foi fundamental neste processo. Obrigada pela nossa amizade.*

Aos docentes do **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, de modo especial as professoras da disciplina de periodontia: **Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim** e **Profa. Dra. Andrea Carvalho de Marco**. Muito obrigada por todo conhecimento compartilhado desde a minha graduação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)**, pela concessão da Bolsa de Doutorado através do processo 88887.529118/2020-00 no período de 01/03/2020 a 31/03/2022 e Bolsa Doutorado Sanduíche (Capes PrInt) através do processo 88887.685373/2022-00 no período de 01/08/2022 a 31/07/2023

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (Fapesp)** pela concessão da Bolsa de Doutorado, através do Processo nº 2021/05963-8, no período de 01/04/2022 a 30/11/2023.

Ao **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen)** em especial à **Elizabeth S. Ribeiro Somessari, Heitor Gameiro Duarte e Paulo Santos**, por todo auxílio no processo de esterilização do presente biomaterial e cordialidade para comigo em todas os nossos encontros no Ipen. Agradeço imensamente pela paciência e proatividade durante todos os meus testes de esterilização.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP)** no nome da **Profa. Titular Renata Fonseca Vianna Lopez, Dra. Camila Nunes Lemos, Dra. Luciana Facco Dalmolin, Dra. Janette Betzabeth Villarruel Muñoz e Dra. Bianca Aparecida Martin**, pela colaboração no desenvolvimento do biomaterial e ensinamentos na área da Farmácia-Farmacologia. Não tenho palavras suficientes para expressar meu agradecimento à Camila Nunes Lemos que se dedicou integralmente para que, mesmo em um período de pandemia, o biomaterial fosse desenvolvido e

caracterizado. Agradeço a nossa amizade e por sempre me acolher muito bem cada semana que fiquei em Ribeirão Preto.

*À **Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira e Dr. Lucas de Paula Ramos**, pelo auxílio na condução dos experimentos in vitro e por sempre me abrirem as portas para a pesquisa desde a minha iniciação científica.*

*Ao **Prof. Assoc. Renato Corrêa Viana Casarin** por toda a colaboração durante a minha pós-graduação. Poder conviver e aprender mais com o senhor durante o meu estágio no exterior somente reafirmou toda a minha admiração pelo seu trabalho e pela pessoa incrível que o senhor é.*

*À **Profa. Dra. Luciana Macchion Shaddox**. Sou extremamente grata pela oportunidade incrível que a senhora me concedeu. Estar no seu laboratório durante um ano foi extremamente enriquecedor e me abriu portas para áreas as quais hoje quero me aprofundar cada vez mais. Admiro muito a sua empatia pelo próximo e alegria que contagia a todos que trabalham com a senhora.*
Obrigada por tudo! Espero nos vermos em breve.

*À equipe do **Center of Oral Health Research (COHR) - University of Kentucky (UK)**, em especial à **Courtney Brown, Dana Satterly, Lori Snow e Sreenatha Kirakodu**, por todo acolhimento e empatia durante o meu período na UK. Vocês fizeram eu me sentir em casa!*

*À **Vanessa Tubero Euzebio Alves Handel e Lance Handel**. Não tenho palavras para agradecer por todo suporte e carinho durante o meu período em Lexington-KY. Sou imensamente grata por me acolherem como parte da família de vocês não medindo esforços para me ajudar em qualquer situação. Vanessa, aprender diversas técnicas com você no laboratório foi enriquecedor, porém a*

nossa amizade foi o melhor presente que eu recebi neste período no exterior.

Obrigada por tudo!

*Ao **Prof. Dr. Robert Danaher**, pela paciência e disponibilidade em dividir comigo técnicas e ensinamentos no campo da biologia molecular e estudo em animais. Obrigada por me acolher como parte do time sempre com muita alegria e disposição.*

*Ao **Prof. Dr. Octavio A. Gonzalez Duque**, por permitir a minha participação nas pesquisas em condução no seu laboratório e me acolher como sua aluna durante meu estágio no exterior. Obrigada por me oferecer essa oportunidade ímpar e pelo tanto que aprendi com o senhor em cada reunião de laboratório.*

*Ao meu pai, **Prof. Dr. Antonio Carlos Viana Miguel**, por tornar tudo possível por meio do seu trabalho árduo e dedicação a mim sempre em busca da minha realização pessoal e profissional.*

*Aos meus irmãos, **Marco Antônio Viana Miguel, Mariana Maria Viana Miguel e Matheus Lucca Viana Miguel**. Que benção ter os meus irmãos como meus melhores amigos. Vocês são o tesouro mais precioso da minha vida!*

*À **Camila Carvalho Dias Viana Miguel**, pela dedicação à nossa família e por nos conceder o maior milagre de Deus, a nossa pequena **Maria Luísa Carvalho Viana Miguel**.*

*À minha avó paterna, **Maria da Glória Rapozo Miguel (in memoriam)**, por ter me ensinado a ser fiel a vida.*

*A **João Victor Dini Colatto**, pela paciência, respeito e amor mútuo durante esses doze anos juntos. Obrigada por caminhar sempre ao meu lado, independente da direção, colocando os meus objetivos em primeiro lugar. Que*

sorte a minha em ter um amor tranquilo que tudo crê, tudo espera e tudo suporta.

*À **Priscila Campos Dini Colatto e Marcelo Donatini Colatto**, pelo acolhimento e imenso carinho por mim durante todos esses anos. Que felicidade a minha em ter vocês como minha família.*

*Às minhas grandes amigas da pós-graduação, **Amanda Rossato, Ana Carolina Ferreira Bonafé, Laís Fernanda Ferreira Ferraz, Victória Clara da Silva Lima**. Agradeço de todo coração pela oportunidade de conviver e aprender tanto com vocês nesses anos! Obrigada por tornarem a minha jornada na pós-graduação mais leve e feliz!*

*À minha irmã de pós-graduação, **Cássia Fernandes Araújo**, pelo companheirismo e apoio incondicional em toda a minha pós-graduação. Estaremos sempre juntas.*

*À **Camila Schmidt Stolf e Tayane da Rocha Costa Coelho**. Que alegria a minha ter compartilhado com vocês o meu estágio no exterior. Obrigada por todos os desafios enfrentados juntos e as boas risadas! Levo vocês no coração.*

*À **Maria Margarida Gomes de Carvalho**, por me acolher com todo amor e carinho na sua casa em São José dos Campos após o meu retorno do estágio no exterior. Que Deus a abençoe infinitamente sempre!*

*Às técnicas **Márcia Cristina Lopes Garcia e Valéria Santos da Silva**, bem como a secretária do departamento de Diagnóstico e Cirurgia, **Jacqueline Amaral Gomes**, por sempre estarem de prontidão para ajudar em todo atendimento clínico. Sentirei falta de vocês!*

*A todos os funcionários da **Seção Técnica de Pós-Graduação, Seção Técnica de Triagem, Documentação e Esterilização e Seção Técnica de Serviços** do
ICT-Unesp.*

*A todos os meus pacientes do **ICT-Unesp**. Obrigada pela confiança em mim e por acreditarem na pesquisa clínica. Vocês foram peça fundamental para o meu desenvolvimento técnico e profissional. Muito obrigada!*

“É justo que muito custe o que muito vale.”

Santa Teresa D'Ávila

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 PROPOSIÇÃO.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
PARTE I - DESENVOLVIMENTO DO BIOMATERIAL E CARACTERIZAÇÃO.....	31
1.1 Preparação dos filmes	31
1.2 Espessura dos filmes.....	35
1.3 Permeabilidade ao vapor de água	35
1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
1.5 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	37
1.6 Análise termogravimétrica (TGA)	38
1.7 Avaliação das propriedades de tensão e deformação do filme	39
1.8 Ensaio de intumescimento (swelling)	40
1.9 Ensaio de degradação enzimática.....	42
1.10 Análise estatística.....	43
PARTE II - ANÁLISES IN VITRO	44
2.1 Liberação in vitro da insulina.....	44
2.1.1 Método para quantificação da insulina por HPLC – UV.....	44
2.1.2 Preparo de amostra	45
2.1.2.1 Método para a avaliação de liberação da insulina.....	45
2.1.2.2 Tampão fosfato de sódio (0,01M – pH = 7).....	46
2.1.2.3 Saliva humana.....	47

2.2 Citotoxicidade in vitro	48
2.2.1 Viabilidade celular.....	48
2.3 Genotoxicidade in vitro (teste de micronúcleos)	49
2.4 Análise estatística.....	50
PARTE III - ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO	51
3.1 População de estudo	51
3.1.1 Tamanho da amostra.....	52
3.1.2 Critérios de inclusão	52
3.1.3 Critérios de não-inclusão	53
3.1.4 Aspectos éticos da pesquisa.....	54
3.2 Delineamento do estudo	55
3.3 Plano de pesquisa.....	55
3.3.1 Terapia inicial	55
3.3.2 Randomização, ocultamento da alocação e cegamento	55
3.3.3 Tratamento.....	56
3.3.4 Procedimento cirúrgico	56
3.4 Avaliações clínicas	61
3.5 Parâmetros centrados no paciente	65
3.6 Análise de microbioma	68
3.7 Análise imunológica.....	68
3.8 Análise histológica	69
3.9 Análise estatística.....	70
3.9.1 Análises clínicas	70
3.9.2 Análise microbiológica	71
3.9.3 Análise imunológica.....	72
4 RESULTADOS	73
4.1 PARTE I - DESENVOLVIMENTO DO BIOMATERIAL E	
CARACTERIZAÇÃO.....	73

4.1.1 Espessura dos filmes	73
4.1.2 Permeabilidade ao vapor de água	74
4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	75
4.1.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	76
4.1.5 Análise termogravimétrica (TGA)	78
4.1.6 Avaliação das propriedades de tensão e deformação do filme	80
4.1.7 Ensaio de intumescimento (swelling)	81
4.1.8 Ensaio de degradação enzimática.....	82
4.2 PARTE II - ANÁLISE IN VITRO	84
4.2.1 Método para quantificação da insulina por HPLC – UV.....	84
4.2.1.1 Liberação em meio receptor PBS e saliva humana	84
4.2.2 Citotoxicidade in vitro	88
4.2.2.1 Viabilidade celular.....	88
4.2.3 Genotoxicidade in vitro (teste de micronúcleos)	90
4.3 PARTE III - ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO	92
4.3.1 Análises clínicas	92
4.3.1.1 Área remanescente da ferida (ARF)	93
4.3.1.2 Epitelização (E)	93
4.3.1.3 Espessura do tecido (ET).....	94
4.3.1.4 Índice de cicatrização precoce da ferida (ICPF).....	98
4.3.1.5 Edema tecidual.....	99
4.3.2 Parâmetros centrados no paciente	100
4.3.2.1 Qualidade de vida associada à saúde oral.....	100
4.3.2.2 Número de analgésicos (NA) e Desconforto pós-operatório (DPO).....	101
4.3.2.3 Teste somatosensorial	103
4.3.3 Análise de microbioma	104
4.3.4 Análise imunológica.....	126
4.3.5 Análise histológica.....	131

5 DISCUSSÃO	133
5.1 PARTE I - DESENVOLVIMENTO DO BIOMATERIAL E CARACTERIZAÇÃO.....	133
5.2 PARTE II - ANÁLISES IN VITRO.....	137
5.3 PARTE III - ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO	139
5.3.1 Análises clínicas	139
5.3.2 Parâmetros centrados no paciente	141
5.3.3 Análise de microbioma	143
5.3.4 Análise imunológica.....	149
5.3.5 Análise histológica.....	152
5.3.6 Limitações do presente estudo	153
6 CONCLUSÃO.....	154
REFERÊNCIAS*.....	156
ANEXOS.....	174

6 CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos nas três etapas do presente estudo, pode-se concluir que:

a) Parte I - desenvolvimento do biomaterial e caracterização:

- o presente biomaterial desenvolvido possui propriedades favoráveis para emprego em mucosa oral como boa permeabilidade ao vapor de água, hidrofiliabilidade, elasticidade e superfície propícia à adesão celular,
- a incorporação da INS ao filme de FS/QT não acarretou alterações mecânicas ou fisioquímicas relevantes ao dispositivo;

b) Parte II - análise *in vitro*:

- o biomaterial IF foi capaz de manter a sua propriedade de liberação controlada em saliva humana por período relevante para aplicação clínica (72 h),
- ausência de cito e genotoxicidade foi observada em diferentes tipos celulares caracterizando segurança do biomaterial F e IF em questão com maior viabilidade celular em células epiteliais afirmando a ação de *scaffold* deste dispositivo;

c) Parte III - estudo clínico randomizado:

- o emprego de ambos os dispositivos, biomaterial F e IF, apresentou benefício na cicatrização de feridas abertas em palato com fechamento acelerado da área injuriada e maiores índices de epitelização nos períodos iniciais de reparo tecidual quando comparado à cicatrização espontânea,

- o biomaterial F apresentou maior influência sob conforto pós-operatório e redução de NA consumidos em relação à cicatrização espontânea,
- fases iniciais do processo de cicatrização tecidual apresentaram uma tendência a menor diversidade bacteriana no grupo C e IF,
- a composição microbiana na cicatrização espontânea (grupo C) apresenta maior número de microrganismo relacionados a alterações patogênicas na cavidade oral e redução de espécies relacionadas à saúde oral com manutenção deste perfil aos 14 e 30 dias pós-operatórios,
- os grupos F e IF apresentam características de eubiose ao longo do processo de reparo enquanto o grupo C um perfil mais propenso à disbiose,
- o emprego de F e IF na ferida palatina propiciou redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α bem como menor degradação tecidual com modulação de MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 nos tempos iniciais do reparo,
- associação de bactérias com perfil patogênico na cavidade oral com TNF- α e MMP-2 revela interações positivas entre microbioma e resposta do hospedeiro após o uso do biomaterial F na ferida palatina,
- o dispositivo desenvolvido apresenta capacidade de degradação após incorporado no tecido da mucosa palatina com ausência de reação de corpo estranho ou processo inflamatório crônico.

REFERÊNCIAS*

Abianeh SH, Bajestani SM, Rahmati J, et al. The effect of local insulin injection on the healing process of split thickness skin graft donor site: a randomized, double-blind, placebo control clinical trial. *Eur J Plast Surg.* 2020; 43,633–638. doi.org/10.1007/s00238-020-01683-3.

Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013;7(5):1016-1025. doi:10.1038/ismej.2012.174.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975;25(4):229-235.

Akcalı A, Trullenque-Eriksson A, Sun C, Petrie A, Nibali L, Donos N. What is the effect of soft tissue thickness on crestal bone loss around dental implants? A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(9):1046-1053. doi:10.1111/clr.12916.

Aliasghari A, Rabbani Khorasgani M, Vaezifar S, Rahimi F, Younesi H, Khoroushi M. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic streptococci: an in vitro study. *Iran J Microbiol.* 2016;8(2):93-100.

Allen JE. IL-4 and IL-13: regulators and effectors of wound repair. *Annu Rev Immunol.* 2023;41:229-254. doi:10.1146/annurev-immunol-101921-041206.

Alqahtani F, Aleanizy F, El Tahir E, et al. Antibacterial activity of chitosan nanoparticles against pathogenic n. gonorrhoea. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:7877-7887. doi:10.2147/IJN.S272736.

Al-Shibani N. Low-intensity laser for harvesting palatal graft for the treatment of gingival recession: A systematic review. *J Invest Clin Dent.* 2019;10:e12368. doi:10.1111/jicd.12368.

Amani H, Arzaghi H, Bayandori M, et al. Controlling cell behavior through the design of biomaterial surfaces: a focus on surface modification techniques. *Adv. Mater. Interfaces* 2019, 6, 1900572. doi.org/10.1002/admi.201900572.

Anita E, Pino A. The management of postsurgical wound complication with plasma rich in growth factors: a preliminary series. *Adv Skin Wound Care.* 2020;33:202–208. doi:10.1097/01.ASW.0000604168.62330.c7.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Antezack A, Boxberger M, Rolland C, Monnet-Corti V, La Scola B. Isolation and characterization of *kingella bonacorsii* sp. Nov., a novel *kingella* species detected in a stable periodontitis subject. *Pathogens*. 2021;10(2):240. doi:10.3390/pathogens10020240.
- Asal HA, Shoueir KR, El-Hagrasy MA, Toson EA. Controlled synthesis of in-situ gold nanoparticles onto chitosan functionalized PLGA nanoparticles for oral insulin delivery. *Int J Biol Macromol*. 2022;209(Pt B):2188-2196. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.04.200.
- Asthana S, Goyal P, Dhar R, et al. Evaluation extracellular matrix-chitosan composite films for wound healing application. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(8):220. doi:10.1007/s10856-015-5551-y.
- Aykac A, Karanlik B, Sehirli AO. Protective effect of silk fibroin in burn injury in rat model. *Gene*. 2018;641:287-291.
- Azar EL, Rojas MA, Mandalunis P, Gualtieri A, Carranza N. Preliminary study in humans Histological evaluation of subepithelial connective tissue grafts harvested by two different techniques. *Acta Odontol Latinoam*. 2019;32(1):10- 16.
- Baad-Hansen L, Pigg M, Ivanovic SE, et al. Chairside intraoral qualitative somatosensory testing: reliability and comparison between patients with atypical odontalgia and healthy controls. *J Orofac Pain*. 2013;27(2):165-170. doi:10.11607/jop.1062.
- Bano I, Arshad M, Yasin T, Ghauri MA, Younus M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int J Biol Macromol*. 2017;102:380-383. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047.
- Barbero AM, Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol In Vitro*. 2009;23(1):1-13. doi:10.1016/j.tiv.2008.10.008.
- Barootchi S, Tavelli L, Zucchelli G, Giannobile WV, Wang HL. Gingival phenotype modification therapies on natural teeth: A network meta-analysis. *J Periodontol*. 2020;91(11):1386-1399. doi:10.1002/JPER.19-0715.
- Beer HD, Longaker MT, Werner S. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *J Invest Dermatol*. 1997;109(2):132-138. doi:10.1111/1523-1747.ep12319188.

Behera SS, Das U, Kumar A, Bissoyi A, Singh AK. Chitosan/TiO₂ composite membrane improves proliferation and survival of L929 fibroblast cells: Application in wound dressing and skin regeneration. *Int J Biol Macromol*. 2017;98:329-340. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.02.017.

Biazar E, Heidari M, Asefnejad A, Montazeri N. The relationship between cellular adhesion and surface roughness in polystyrene modified by microwave plasma radiation. *Int J Nanomedicine* 2011;6:631-639. doi:10.2147/IJN.S17218.

Bondar B, Fuchs S, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. Functionality of endothelial cells on silk fibroin nets: comparative study of micro- and nanometric fibre size. *Biomaterials*. 2008;29(5):561-572. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.002.

Bor B, Bedree JK, Shi W, McLean JS, He X. Saccharibacteria (TM7) in the human oral microbiome. *J Dent Res*. 2019;98(5):500-509. doi:10.1177/0022034519831671.

Buff LR, Bürklin T, Eickholz P, Möniting JS, Ratka-Krüger P. Does harvesting connective tissue grafts from the palate cause persistent sensory dysfunction? A pilot study. *Quintessence Int*. 2009;40(6):479-489.

Cai F, Hornauer H, Peng K, Schofield CA, Scheerens H, Morimoto AM. Bioanalytical challenges and improved detection of circulating levels of IL-13. *Bioanalysis*. 2016;8(4):323-332. doi:10.4155/bio.15.254.

Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, et al. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Front Microbiol*. 2015;6:119. doi:10.3389/fmicb.2015.00119.

Canchy L, Kerob D, Demessant A, Amici JM. Wound healing and microbiome, an unexpected relationship. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2023;37 Suppl 3:7-15. doi:10.1111/jdv.18854.

Ceylan S. Propolis loaded and genipin-crosslinked PVA/chitosan membranes; characterization properties and cytocompatibility/genotoxicity response for wound dressing applications. *Int J Biol Macromol*. 2021;181:1196-1206. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.069.

Chan AW, Tetzlaff JM, Altman DG, et al. SPIRIT 2013 statement: defining standard protocol items for clinical trials. *Ann Intern Med*. 2013;158(3):200-207. doi:10.7326/0003-4819-158-3-201302050-00583.

- Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J*. 2008;17 Suppl 4(Suppl 4):467-479. doi:10.1007/s00586-008-0745-3.
- Chattopadhyay S, Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014;101(8):821-833. doi:10.1002/bip.22486.
- Chen X, Liu Y, Zhang X. Topical insulin application improves healing by regulating the wound inflammatory response. *Wound Repair Regen*. 2012;20(3):425-434. doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00792.x.
- Chen Z, Zhang X, Liang J et al. Preparation of silk fibroin/carboxymethyl chitosan hydrogel under low voltage as a wound dressing. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7610. doi: 10.3390/ijms22147610. PMID: 34299229; PMCID: PMC8307387.
- Chipashvili O, Utter DR, Bedree JK, et al. Episymbiotic *Saccharibacteria* suppresses gingival inflammation and bone loss in mice through host bacterial modulation. *Cell Host Microbe*. 2021;29(11):1649-1662.e7. doi:10.1016/j.chom.2021.09.009.
- Chou KC, Chen CT, Cherng JH et al. Cutaneous regeneration mechanism of β -sheet silk fibroin in a rat burn wound healing model. *Polymers*. 2021; 13(20):3537. <https://doi.org/10.3390/polym13203537>.
- Coelho F, Cavicchioli M, Specian SS, et al. Silk fibroin/hydroxyapatite composite membranes: Production, characterization and toxicity evaluation. *Toxicol In Vitro*. 2020;62:104670. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104670.
- Colombo APV, Tanner ACR. The role of bacterial biofilms in dental caries and periodontal and peri-implant diseases: a historical perspective. *J Dent Res*. 2019;98(4):373-385. doi:10.1177/0022034519830686.
- Cruz-Cazarim ELC, Cazarim MS, Ogunjimi AT, Petrilli R, Rocha EM, Lopez RFV. Prospective insulin-based ophthalmic delivery systems for the treatment of dry eye syndrome and corneal injuries. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019;140:1-10. doi:10.1016/j.ejpb.2019.04.014.
- Cubayachi C, Lemos CN, Pereira F, et al. Silk fibroin films stabilizes and releases bioactive insulin for the treatment of corneal wounds. *European Polymer Journal* 2019;118: 502-513.
- da Silva Neves FL, Silveira CA, Dias SB, et al. Comparison of two power densities on the healing of palatal wounds after connective tissue graft removal: randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2016;31(7):1371-1378. doi:10.1007/s10103-016-1988-6.

de Magalhães SF, Manzo LP, de Faria FM, et al. Inflammatory pain in peripheral tissue depends on the activation of the TNF- α type 1 receptor in the primary afferent neuron. *Eur J Neurosci*. 2021;53(2):376-389. doi:10.1111/ejn.14985.

De Ryck T, Grootaert C, Jaspaert L, et al. Development of an oral mucosa model to study host-microbiome interactions during wound healing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(15):6831-46. doi: 10.1007/s00253-014-5841-1

Del Pizzo M, Modica F, Bethaz N, Priotto P, Romagnoli R. The connective tissue graft: a comparative clinical evaluation of wound healing at the palatal donor site. A preliminary study. *J Clin Periodontol*. 2002;29(9):848-854. doi:10.1034/j.1600-051x.2002.290910.x.

Delima SL, Kumar PS, Tatakis DN. Bacterial community shifts during healing of palatal wounds: comparison of two graft harvesting approaches. *J Clin Periodontol*. 2016;43(3):271-278. doi:10.1111/jcpe.12494.

Deng ZL, Szafranski SP, Jarek M, Bhuju S, Wagner-Döbler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep*. 2017;7(1):3703. doi:10.1038/s41598-017-03804-8.

Dhanikula AB, Panchagnula R. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of Paclitaxel. *AAPS J*. 2004;6(3):e27. doi:10.1208/aapsj060327.

Dias SB, Fonseca MV, Dos Santos NC, et al. Effect of GaAIAs low-level laser therapy on the healing of human palate mucosa after connective tissue graft harvesting: randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2015;30(6):1695-1702. doi:10.1007/s10103-014-1685-2.

Djelić N. Analysis of sister-chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes treated with insulin. *Folia Biol (Praha)*. 2001;47(1):28-31.

Do Couto RO, Cubayachi C, Calefi PL, et al. Combining amino amide salts in mucoadhesive films enhances needle-free buccal anesthesia in adults. *J Control Release*. 2017;266:205-215. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.039.

Doshi A, McAuley JW, Tatakis DN. Topical phenytoin effects on palatal wound healing. *J Periodontol*. 2021;92(3):409-418. doi:10.1002/JPER.20-0340.

Fickl S, Fischer KR, Jockel-Schneider Y, Stappert CF, Schlagenhauf U, Kebschull M. Early wound healing and patient morbidity after single-incision vs. trap-door graft harvesting from the palate--a clinical study. *Clin Oral Investig*. 2014;18(9):2213-2219. doi:10.1007/s00784-014-1204-7.

Fons-Badal C, Alonso Pérez-Barquero J, Martínez-Martínez N, Faus-López J, Fons-Font A, Agustín-Panadero R. A novel, fully digital approach to quantifying volume gain after soft tissue graft surgery. A pilot study. *J Clin Periodontol*. 2020;47(5):614-620. doi:10.1111/jcpe.13235.

Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med*. 2005;353(18):1899-1911. doi:10.1056/NEJMoa043802.

Galimanas V, Hall MW, Singh N, et al. Bacterial community composition of chronic periodontitis and novel oral sampling sites for detecting disease indicators. *Microbiome*. 2014;2:32. doi:10.1186/2049-2618-2-32.

Gantner S, Andersson AF, Alonso-Sáez L, Bertilsson S. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J Microbiol Methods*. 2011;84(1):12-18. doi:10.1016/j.mimet.2010.10.001.

Ge Z, Yang Q, Xiang X, Liu KZ. Assessment of silk fibroin for the repair of buccal mucosa in a rat model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(5):673-680. doi:10.1016/j.ijom.2011.11.016.

Ghanim H, Mohanty P, Deopurkar R, et al. Acute modulation of toll-like receptors by insulin. *Diabetes Care*. 2008;31(9):1827-1831. doi:10.2337/dc08-0561.

Gholipourmalekabadi M, Sapru S, Samadikuchaksaraei A, et al. Silk fibroin for skin injury repair: where do things stand? *Adv Drug Deliv Rev*. 2020 Jan 1;153:28-53. doi: 10.1016/j.addr.2019.09.003.

Giacomini JJ, Torres-Morales J, Dewhirst FE, Borisy GG, Mark Welch JL. Site specialization of human oral veillonella species. *Microbiol Spectr*. 2023;11(1):e0404222. doi:10.1128/spectrum.04042-22.

Gobin AS, Froude VE, Mathur AB. Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74(3):465-473. doi:10.1002/jbm.a.30382.

Gomathysankar S, Halim AS, Yaacob NS. Proliferation of keratinocytes induced by adipose-derived stem cells on a chitosan scaffold and its role in wound healing, a review. *Arch Plast Surg*. 2014;41(5):452-457. doi:10.5999/aps.2014.41.5.452.

Gonçalves WA, Rezende BM, de Oliveira MPE, et al. Sensory ganglia-specific tnfr expression is associated with persistent nociception after resolution of inflammation. *Front Immunol*. 2020;10:3120. doi:10.3389/fimmu.2019.03120.

- Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004;28(3):321-326. doi:10.1007/s00268-003-7397-6.
- Grice EA, Segre JA. Interaction of the microbiome with the innate immune response in chronic wounds. *Adv Exp Med Biol.* 2012;946:55-68. doi:10.1007/978-1-4614-0106-3_4.
- Groeger S, Zhou Y, Ruf S, Meyle J. Pathogenic Mechanisms of *Fusobacterium nucleatum* on Oral Epithelial Cells. *Front Oral Health.* 2022;3:831607. Published 2022 Apr 5. doi:10.3389/froh.2022.831607.
- Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-229. doi:10.1177/0022034509359125.
- Guo S, Zhu X, Li M, et al. Parallel control over surface charge and wettability using polyelectrolyte architecture: effect on protein adsorption and cell adhesion. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(44):30552-30563. doi:10.1021/acsami.6b09481.
- Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett.* 2003;540(1-3):3-6. doi:10.1016/s0014-5793(03)00235-7.
- Hämmerle CH, Giannobile WV; Working Group 1 of the European Workshop on Periodontology. Biology of soft tissue wound healing and regeneration-- consensus report of Group 1 of the 10th European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2014;41 Suppl 15:S1-S5. doi:10.1111/jcpe.12221.
- Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA. Detection and characterization of beta-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;242(2):319-324. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.023.
- Hasatsri S, Angspatt A, Aramwit P. Randomized clinical trial of the innovative bilayered wound dressing made of silk and gelatin: safety and efficacy tests using a split-thickness skin graft model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:206871. doi:10.1155/2015/206871.
- Hawkes CG, Hinson AN, Vashishta A, et al. *Selenomonas sputigena* interactions with gingival epithelial cells that promote inflammation. *Infect Immun.* 2023;91(2):e0031922. doi:10.1128/iai.00319-22.
- Henning A, Neumann D, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Influence of human skin specimens consisting of different skin layers on the result of in vitro permeation experiments. *Skin Pharmacol Physiol.* 2008;21(2):81-88. doi:10.1159/000112958.

- Hess A, Axmann R, Rech J, et al. Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(9):3731-3736. doi:10.1073/pnas.1011774108.
- Hogerheyde TA, Suzuki S, Stephenson SA, et al. Assessment of freestanding membranes prepared from *Antheraea pernyi* silk fibroin as a potential vehicle for corneal epithelial cell transplantation. *Biomed Mater*. 2014;9(2):025016. doi:10.1088/1748-6041/9/2/025016.
- Hrynyk M, Martins-Green M, Barron AE, Neufeld RJ. Alginate-PEG sponge architecture and role in the design of insulin release dressings. *Biomacromolecules*. 2012;13(5):1478-1485. doi:10.1021/bm300186k.
- Hrynyk M, Martins-Green M, Barron AE, Neufeld RJ. Sustained prolonged topical delivery of bioactive human insulin for potential treatment of cutaneous wounds. *Int J Pharm*. 2010;398(1-2):146-154. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.07.052.
- Hrynyk M, Neufeld RJ. Insulin and wound healing. *Burns*. 2014;40(8):1433-1446. doi:10.1016/j.burns.2014.03.020.
- Hu J, Lin Y, Cui C, et al. Clinical efficacy of wet dressing combined with chitosan wound dressing in the treatment of deep second-degree burn wounds: A prospective, randomised, single-blind, positive control clinical trial. *Int Wound J*. 2023;20(3):699-705. doi:10.1111/iwj.13911.
- Hu Z, Zhang DY, Lu ST, Li PW, Li SD. Chitosan-based composite materials for prospective hemostatic applications. *Mar Drugs*. 2018;16(8):273 - 308. doi:10.3390/md16080273.
- Huang W, Ling S, Li C, et al. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. *Chem Soc Rev*, 2018, 47: 6486–6504.
- Ijaola AO, Akamo DO, Damiri F, et al. Polymeric biomaterials for wound healing applications: a comprehensive review. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2022;33(15):1998-2050. doi:10.1080/09205063.2022.2088528.
- Juliano RL, Reddig P, Alahari S, Edin M, Howe A, Aplin A. Integrin regulation of cell signalling and motility. *Biochem Soc Trans*. 2004;32(Pt3):443-446. doi:10.1042/BST0320443.
- Jung RE, Sailer I, Hämmerle CH, Attin T, Schmidlin P. In vitro color changes of soft tissues caused by restorative materials. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007;27(3):251-257.

- Kamalathevan P, Ooi PS, Loo YL. Silk-based biomaterials in cutaneous wound healing: a systematic review. *Adv Skin Wound Care*. 2018;31(12):565-573. doi:10.1097/01.ASW.0000546233.35130.a9.
- Kaur P, Choudhury D. Insulin promotes wound healing by inactivating $\text{nfk}\beta\text{p}50/\text{p}65$ and activating protein and lipid biosynthesis and alternating pro/anti-inflammatory cytokines dynamics. *Biomol Concepts*. 2019;10(1):11-24. doi:10.1515/bmc-2019-0002.
- Kim CE, Lee JH, Yeon YK, Park CH, Yang J. Effects of silk fibroin in murine dry eye [published correction appears in *Sci Rep*. 2017 Apr 07;7:46013]. *Sci Rep*. 2017;7:44364. doi:10.1038/srep44364.
- Kim JH, Ruegger PR, Lebig EG, et al. High levels of oxidative stress create a microenvironment that significantly decreases the diversity of the microbiota in diabetic chronic wounds and promotes biofilm formation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:259. doi:10.3389/fcimb.2020.00259.
- Kim MM, Kim SK. Chitooligosaccharides inhibit activation and expression of matrix metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. *FEBS Lett*. 2006;580(11):2661-2666. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.015.
- Kim SY, Nair MG. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol*. 2019;97(3):258-267. doi:10.1111/imcb.12236.
- Kızıltoprak M, Uslu MÖ. Comparison of the effects of injectable platelet-rich fibrin and autologous fibrin glue applications on palatal wound healing: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2020;24(12):4549-4561. doi:10.1007/s00784-020-03320-6.
- Klosowska K., Plotkin B. Human insulin modulation of *Escherichia coli* adherence and chemotaxis. *Am. J. Infect. Dis*. 2006;2:197–200. doi: 10.3844/ajidsp.2006.197.200.
- Knösel M, Attin R, Jung K, Brunner E, Kubein-Meesenburg D, Attin T. Digital image color analysis compared to direct dental CIE colorimeter assessment under different ambient conditions. *Am J Dent*. 2009;22(2):67-72.
- Kolpen M, Bjarnsholt T, Moser C, et al. Nitric oxide production by polymorphonuclear leucocytes in infected cystic fibrosis sputum consumes oxygen. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(1):310-319. doi:10.1111/cei.12318.
- Könönen E, Fteita D, Gursoy UK, Gursoy M. *Prevotella* species as oral residents and infectious agents with potential impact on systemic conditions. *J Oral Microbiol*. 2022;14(1):2079814. doi:10.1080/20002297.2022.2079814.

Kraková L, Šoltys K, Budiš J, et al. Investigation of bacterial and archaeal communities: novel protocols using modern sequencing by Illumina MiSeq and traditional DGGE-cloning. *Extremophiles*. 2016;20(5):795-808. doi:10.1007/s00792-016-0855-5.

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3944-3955. doi:10.1128/JCM.43.8.3944-3955.2005.

Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):457-470. doi:10.1016/j.addr.2012.09.043.

Kweon H, Ha HC, Um IC, Park YH. Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001;80(7):928-934. doi:https://doi.org/10.1002/app.1172.

Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, et al. Microbiome and microbial biofilm profiles of peri-implantitis: a systematic review. *J Periodontol*. 2017;88(10):1066-1089. doi:10.1902/jop.2017.170123.

Lehmann T, Vaughn AE, Seal S, Liechty KW, Zgheib C. Silk fibroin-based therapeutics for impaired wound healing. *Pharmaceutics*. 2022 16;14(3):651. doi: 10.3390/pharmaceutics14030651.

Lemos CN, Cubayachi C, Dias K, et al. Iontophoresis-stimulated silk fibroin films as a peptide delivery system for wound healing. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;128:147-155. doi:10.1016/j.ejpb.2018.04.019.

Li DW, He J, He FL, et al. Silk fibroin/chitosan thin film promotes osteogenic and adipogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomater Appl*. 2018;32(9):1164-1173. doi:10.1177/0885328218757767.

Li JX, Zhao SX, Zhang YQ. Silk protein composite bioinks and their 3d scaffolds and in vitro characterization. *Int J Mol Sci*. 2022a;23(2):910. doi: 10.3390/ijms23020910.

Li L, Mac Aogáin M, Xu T, et al. *Neisseria* species as pathobionts in bronchiectasis. *Cell Host Microbe*. 2022b;30(9):1311-1327.e8. doi:10.1016/j.chom.2022.08.005.

Lin D, Yang L, Wen L, Lu H, Chen Q, Wang Z. Crosstalk between the oral microbiota, mucosal immunity, and the epithelial barrier regulates oral mucosal disease pathogenesis. *Mucosal Immunol*. 2021;14(6):1247-1258. doi:10.1038/s41385-021-00413-7.

Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol.* 2003;73(6):713-721. doi:10.1189/jlb.0802397.

Liu Q, Liu H, Fan Y. Preparation of silk fibroin carriers for controlled release. *Microsc Res Tech.* 2017;80(3):312-320. doi:10.1002/jemt.22606.

Liu Y, Dhall S, Castro A, Chan A, Alamat R, Martins-Green M. Insulin regulates multiple signaling pathways leading to monocyte/macrophage chemotaxis into the wound tissue. *Biol Open.* 2018b;7(1):bio026187. doi:10.1242/bio.026187.

Liu Y, Petreaca M, Yao M, Martins-Green M. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *BMC Cell Biol.* 2009;10:1. doi:10.1186/1471-2121-10-1.

Lopes CM, Lobo JMS, Costa P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Rev Bras Cienc Farm.* 2005;41:143–54. doi.org/10.1590/S1516-93322005000200003.

Lozano-Pérez AA, Rodríguez-Nogales A, Ortiz-Cullera V, et al. Silk fibroin nanoparticles constitute a vector for controlled release of resveratrol in an experimental model of inflammatory bowel disease in rats. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:4507-4520. doi:10.2147/IJN.S68526.

Luangbudnark W, Viyoch J, Laupattarakasem W, Surakunprapha P, Laupattarakasem P. Properties and biocompatibility of chitosan and silk fibroin blend films for application in skin tissue engineering. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:697201. doi:10.1100/2012/697201.

M Ways TM, Lau WM, Khutoryanskiy VV. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymers (Basel).* 2018;10(3):267. doi:10.3390/polym10030267.

Maciel B, Moreira P, Carmo H, Gonçalo M, Lobo JMS, Almeida IF. Implementation of an in vitro methodology for phototoxicity evaluation in a human keratinocyte cell line. *Toxicol In Vitro.* 2019;61:104618. doi:10.1016/j.tiv.2019.104618.

Mark Welch JL, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of the oral microbiome: the site-specialist hypothesis. *Annu Rev Microbiol* 2019;73:335- 358.

Miguel MMV, Mathias-Santamaria IF, Rossato A, et al. Enamel matrix derivative effects on palatal mucosa wound healing: Randomized clinical trial. *J Periodontal Res.* 2021a;56(6):1213-1222. doi: 10.1111/jre.12934.

- Miguel MMV, Mathias-Santamaria IF, Rossato A, et al. Microcurrent electrotherapy improves palatal wound healing: Randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2021b;92(2):244-253. doi: 10.1002/JPER.20-0122.
- Moher D, Hopewell S, Schulz KF, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials [published correction appears in *J Clin Epidemiol*. 2012 Mar;65(3):351]. *J Clin Epidemiol*. 2010;63(8):e1-e37. doi:10.1016/j.jclinepi.2010.03.004.
- Mohyuddin SG, Qamar A, Hu CY, et al. Effect of chitosan on blood profile, inflammatory cytokines by activating TLR4/NF- κ B signaling pathway in intestine of heat stressed mice. *Sci Rep*. 2021;11(1):20608. doi: 10.1038/s41598-021-98931-8.
- Mouritzen MV, Abourayale S, Ejaz R, et al. Neurotensin, substance P, and insulin enhance cell migration. *J Pept Sci*. 2018;24(7):e3093. doi:10.1002/psc.3093.
- Morales JO, McConville JT. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;77(2):187-199. doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.023.
- Moser C, Pedersen HT, Lerche CJ, et al. Biofilms and host response - helpful or harmful. *APMIS*. 2017;125(4):320-338. doi:10.1111/apm.12674.
- Mottaghitalab F, Farokhi M, Shokrgozar MA, Atyabi F, Hosseinkhani H. Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *J Control Release*. 2015;206:161-176. doi:10.1016/j.jconrel.2015.03.020.
- Negut I, Dorcioman G, Grumezescu V. Scaffolds for wound healing applications. *Polymers (Basel)*. 2020;12(9):2010. doi: 10.3390/polym12092010.
- Netea MG, Van der Meer JW, Suttmuller RP, Adema GJ, Kullberg BJ. From the Th1/Th2 paradigm towards a toll-like receptor/T-helper bias. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(10):3991-3996. doi:10.1128/AAC.49.10.3991-3996.2005.
- Nunes KM, Teixeira CC, Kaminski RC, et al. The monoglyceride content affects the self-assembly behavior, rheological properties, syringeability, and mucoadhesion of in situ-gelling liquid crystalline phase. *J Pharm Sci*. 2016;105(8):2355-2364. doi:10.1016/j.xphs.2016.05.005.
- Obara K, Ishihara M, Fujita M, et al. Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2. *Wound Repair Regen*. 2005;13(4):390-7. doi: 10.1111/j.1067-1927.2005.130406.x.

Oryan A, Alemzadeh E. Effects of insulin on wound healing: A review of animal and human evidences. *Life Sci.* 2017;174:59-67. doi:10.1016/j.lf.2017.02.015.

Ozcelik O, Cenk Haytac M, Kunin A, Seydaoglu G. Improved wound healing by low-level laser irradiation after gingivectomy operations: a controlled clinical pilot study. *J Clin Periodontol.* 2008;35(3):250-254. doi:10.1111/j.1600- 051X.2007.01194.x.

Park YR, Sultan MT, Park HJ, et al. NF- κ B signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin [published correction appears in *Acta Biomater.* 2018 Mar 2;:]. *Acta Biomater.* 2018;67:183-195. doi:10.1016/j.actbio.2017.12.006.

Patarapongsanti A, Bandhaya P, Sirinirund B, Khongkhunthian S, Khongkhunthian P. Comparison of platelet-rich fibrin and cellulose in palatal wounds after graft harvesting. *J Investig Clin Dent.* 2019;10(4):e12467. doi:10.1111/jicd.12467.

Patel N, Curtis JC, Plotkin BJ. Insulin regulation of escherichia coli abiotic biofilm formation: effect of nutrients and growth conditions. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(11):1349. doi:10.3390/antibiotics10111349.

Peddada S, Lin H. Multi-group analysis of compositions of microbiomes with covariate adjustments and repeated measures. Preprint. *Res Sq.* 2023;rs.3.rs-2778207. doi:10.21203/rs.3.rs-2778207/v1.

Perinelli DR, Fagioli L, Campana R et al. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *Eur J Pharm Sci.* 2018;117:8-20. doi: 10.1016/j.ejps.2018.01.046.

Petković AB, Matic SM, Stamatović NV, et al. Proinflammatory cytokines (IL- 1beta and TNF-alpha) and chemokines (IL-8 and MIP-1alpha) as markers of peri-implant tissue condition. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39(5):478-485. doi:10.1016/j.ijom.2010.01.014.

Pivatto K, Pedro FLM, Guedes OA, et al. Cytotoxicity of chelating agents used in endodontics and their influence on mmps of cell membranes. *Braz Dent J.* 2020;31(1):32-36. doi:10.1590/0103-6440202002812.

Plotkin BJ, Viselli SM. Effect of insulin on microbial growth. *Curr Microbiol.* 2000;41(1):60-64. doi:10.1007/s002840010092.

Puisys A, Linkevicius T. The influence of mucosal tissue thickening on crestal bone stability around bone-level implants. A prospective controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(2):123-129. doi:10.1111/clr.12301.

Qi Y, Zang SQ, Wei J, et al. High-throughput sequencing provides insights into oral microbiota dysbiosis in association with inflammatory bowel disease. *Genomics*. 2021;113(1 Pt 2):664-676. doi:10.1016/j.ygeno.2020.09.063.

Rebele SF, Zuhr O, Schneider D, Jung RE, Hürzeler MB. Tunnel technique with connective tissue graft versus coronally advanced flap with enamel matrix derivative for root coverage: a RCT using 3D digital measuring methods. Part II. Volumetric studies on healing dynamics and gingival dimensions. *J Clin Periodontol*. 2014;41(6):593-603. doi:10.1111/jcpe.12254.

Ribeiro MC, Correa VLR, Silva FKLD, et al. Wound healing treatment using insulin within polymeric nanoparticles in the diabetes animal model. *Eur J Pharm Sci*. 2020;150:105330. doi:10.1016/j.ejps.2020.105330.

Rossano F, Rizzo A, Sanges MR, Cipollaro de L'Ero G, Tufano MA. Human monocytes and gingival fibroblasts release tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha and interleukin-6 in response to particulate and soluble fractions of *Prevotella melaninogenica* and *Fusobacterium nucleatum*. *Int J Clin Lab Res*. 1993;23(3):165-168. doi:10.1007/BF02592303.

Sahariah P, Másson M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure-activity relationship. *Biomacromolecules*. 2017;18(11):3846-3868. doi: 10.1021/acs.biomac.7b01058.

Sanz-Moliner JD, Nart J, Cohen RE, Ciancio SG. The effect of an 810-nm diode laser on postoperative pain and tissue response after modified Widman flap surgery: a pilot study in humans. *J Periodontol*. 2013;84(2):152-158. doi:10.1902/jop.2012.110660.

Sapudom J, Kongsema M, Methachittipan A, et al. Degradation products of crosslinked silk fibroin scaffolds modulate the immune response but not cell toxicity. *J Mater Chem B*. 2023;11(16):3607-3616. doi:10.1039/d3tb00097d.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(23):7537- 7541. doi:10.1128/AEM.01541-09.

Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm*. 2001;215(1-2):51-56. doi:10.1016/s0378- 5173(00)00665-7.

Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol*. 2014;41 Suppl 15:S6-S22. doi:10.1111/jcpe.12206.

- Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429.
- Silva RAB, Nelson-Filho P, De Oliveira KMH, et al. Adhesion and initial colonization of streptococcus mutans is influenced by time and composition of different composites. *Int. J. Odontostomat.*, 12(4):395-400, 2018.
- Snijders AM, Mannion BJ, Leung SG, Moon SC, Kronenberg A, Wiese C. Micronucleus formation in human keratinocytes is dependent on radiation quality and tissue architecture. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(1):22-31. doi:10.1002/em.21887.
- Stavri GT, Hong Y, Zachary IC, et al. Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1995;358(3):311-315. doi:10.1016/0014-5793(94)01458-d.
- Sultan MT, Lee OJ, Kim SH, Ju HW, Park CH. Silk fibroin in wound healing process. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1077:115-126. doi:10.1007/978-981-13-0947-27.
- Szpadarska AM, DiPietro LA. Inflammation in surgical wound healing: friend or foe?. *Surgery*. 2005;137(5):571-573. doi:10.1016/j.surg.2005.01.006.
- Takeuchi I, Shimamura Y, Kakami Y, et al. Transdermal delivery of 40-nm silk fibroin nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;175:564-568. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.12.012.
- Tanaka CB, Lopes DP, Kikuchi LNT, et al. Development of novel dental restorative composites with dibasic calcium phosphate loaded chitosan fillers. *Dent Mater*. 2020;36(4):551-559. doi:10.1016/j.dental.2020.02.004.
- Tavelli L, Barootchi S, Avila-Ortiz G, Urban IA, Giannobile WV, Wang HL. Peri-implant soft tissue phenotype modification and its impact on peri-implant health: A systematic review and network meta-analysis. *J Periodontol*. 2021;92(1):21-44. doi:10.1002/JPER.19-0716.
- Tavelli L, Barootchi S, Stefanini M, Zucchelli G, Giannobile WV, Wang HL. Wound healing dynamics, morbidity, and complications of palatal soft-tissue harvesting. *Periodontol* 2000. 2023;92(1):90-119. doi:10.1111/prd.12466.

Teuschl AH, Zipperle J, Huber-Gries C, Kaplan DL. Silk fibroin based carrier system for delivery of fibrinogen and thrombin as coagulant supplements. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(3):687-696. doi:10.1002/jbm.a.35940.

Thoma DS, Benić GI, Zwahlen M, Hämmerle CH, Jung RE. A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:146-165. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01784.x.

Thoma DS, Ioannidis A, Cathomen E, Hämmerle CH, Hüsler J, Jung RE. Discoloration of the peri-implant mucosa caused by zirconia and titanium implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2016;36(1):39-45. doi:10.11607/prd.2663.

Thomadaki K, Bosch J, Oppenheim F, Helmerhorst E. The diagnostic potential of salivary protease activities in periodontal health and disease. *Oral Dis*. 2013;19(8):781-788. doi:10.1111/odi.12069.

Tilich M, Arora RR. Modulation of toll-like receptors by insulin. *Am J Ther*. 2011;18(5):e130-7. doi: 10.1097/MJT.0b013e3181e71fa0.

Todo H. Transdermal permeation of drugs in various animal species. *Pharmaceutics*. 2017;9(3):33. doi:10.3390/pharmaceutics9030033.

Tonetti MS, Cortellini P, Pellegrini G, et al. Xenogenic collagen matrix or autologous connective tissue graft as adjunct to coronally advanced flaps for coverage of multiple adjacent gingival recession: Randomized trial assessing non-inferiority in root coverage and superiority in oral health-related quality of life. *J Clin Periodontol*. 2018;45:78–88. PMID: 29087001 PMCID: PMC5765511 DOI: 10.1111/jcpe.12834.

Vartoukian SR, Downes J, Palmer RM, Wade WG. *Fretibacterium fastidiosum* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(Pt 2):458-463. doi:10.1099/ijs.0.041038-0.

Viardot A, Grey ST, Mackay F, Chisholm D. Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype. *Endocrinology*. 2007;148(1):346-353. doi:10.1210/en.2006-0686.

Wang J, Xu J. Effects of topical insulin on wound healing: a review of animal and human evidences. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:719-727. doi:10.2147/DMSO.S237294.

Wani SUD, Veerabhadrapa GH. Silk fibroin based drug delivery applications: promises and challenges. *Curr Drug Targets*. 2018;19(10):1177-1190.

- Wanke I, Steffen H, Christ C, et al. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol*. 2011;131(2):382-390. doi:10.1038/jid.2010.328.
- Wessel JR, Tatakis DN. Patient outcomes following subepithelial connective tissue graft and free gingival graft procedures. *J Periodontol*. 2008;79(3):425-430. doi:10.1902/jop.2008.070325.
- Weyand NJ. Neisseria models of infection and persistence in the upper respiratory tract. *Pathog Dis*. 2017;75(3):10.1093/femspd/ftx031. doi:10.1093/femspd/ftx031.
- Xia Y, Wang D, Liu D, et al. Applications of chitosan and its derivatives in skin and soft tissue diseases. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:894667. doi:10.3389/fbioe.2022.894667.
- Xu B, Wang W, Guo H, et al. Oxidative stress preferentially induces a subtype of micronuclei and mediates the genomic instability caused by p53 dysfunction. *Mutat Res*. 2014;770:1-8. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.08.004.
- Xu Z, Hsia HC. The impact of microbial communities on wound healing: a review. *Ann Plast Surg*. 2018;81(1):113-123.
- Yaghobee S, Rouzmeh N, Aslroosta H, Mahmoodi S, Khorsand A, Kharrazifard MJ. Effect of topical erythropoietin (EPO) on palatal wound healing subsequent to free gingival grafting (FGG). *Braz Oral Res*. 2018;32:e55. doi:10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0055.
- Yıldırım S, Özener HÖ, Doğan B, Kuru B. Effect of topically applied hyaluronic acid on pain and palatal epithelial wound healing: An examiner-masked, randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2018;89(1):36-45. doi:10.1902/jop.2017.170105.
- Yu K, Lu F, et al. Accelerated wound-healing capabilities of a dressing fabricated from silkworm cocoon. *Int J Biol Macromol*. 2017;102:901-913.
- Zeeuwen PL, Boekhorst J, van den Bogaard EH, et al. Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption. *Genome Biol*. 2012;13(11):R101. doi:10.1186/gb-2012-13-11-r101.
- Zhang L, Liu Y, Zheng HJ, Zhang CP. The oral microbiota may have influence on oral cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;9:476. doi:10.3389/fcimb.2019.00476.
- Zhang W, Chen L, Chen J, et al. Silk fibroin biomaterial shows safe and effective wound healing in animal models and a randomized controlled clinical trial. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(10):10.1002/adhm.201700121. doi:10.1002/adhm.201700121.

Zhang X, Chen Z, Bao H et al. Fabrication and characterization of silk fibroin/curcumin sustained-release film. *Materials (Basel)*. 2019;12(20):3340. doi: 10.3390/ma12203340.

Zhou YQ, Liu Z, Liu ZH, et al. Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):141. doi:10.1186/s12974-016-0607-6.

Zinnemann K, Rogers KB, Frazer J, Devaraj SK. A haemolytic V-dependent CO₂-preferring *Haemophilus* species (*Haemophilus paraphrohaemolyticus* nov. spec.). *J Med Microbiol*. 1971;4(1):139-143. doi:10.1099/00222615-4-1-139.