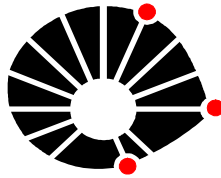


Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



SUZANA PERES PIMENTEL
CIRURGIÃ-DENTISTA

AVALIAÇÃO TÉCNICA DA PROTEÍNA DERIVADA DA MATRIZ DO ESMALTE E DA
REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA EM DEFEITOS ÓSSEOS DO TIPO DEISCÊNCIA
NA PRESENÇA DA NICOTINA.

HISTOMETRIA EM CÃES.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Doutor em Clínica Odontológica na Área de Periodontia.

PIRACICABA

2004

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

SUZANA PERES PIMENTEL
CIRURGIÃ-DENTISTA

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DA PROTEÍNA DERIVADA DA MATRIZ DO ESMALTE E DA
REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA EM DEFEITOS ÓSSEOS DO TIPO DEISCÊNCIA
NA PRESENÇA DA NICOTINA.

HISTOMETRIA EM CÃES.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Doutor em Clínica Odontológica na Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

Banca examinadora :

Prof. Dr. Benedito Egbert Corrêa de Toledo

Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

Prof. Dr. Sérgio de Toledo

PIRACICABA

2004

Ficha Catalográfica

P649a Pimentel, Suzana Peres.
Avaliação da técnica proteína derivada da matriz do esmalte na regeneração tecidual guiada em defeitos ósseos do tipo deíl na presença da nicotina. Histometria em cães. / Suzana Pimentel.
-- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum,
Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Regeneração (Biologia). 2. Nicotina. 3. Ossos – Defeitos. 4. Periodontia. I. Sallum, Enilson Antonio. II. Nociti Jr., Francisco Humberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Palavras-chave em inglês (Keywords): Regeneration (Biology); Nicotine; Bones – Defects; Periodontics

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum; Prof. Dr. Benedito Egbert Corrêa de Toledo; Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli; Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati; Prof. Dr. Sérgio de Toledo.

Data da defesa: 13/12/2004

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Beatriz e Pimentel***, por serem meus maiores e melhores
referenciais de perseverança, dedicação e honestidade.
E por terem, com esforços e amor, iluminado os caminhos da minha vida.

Aos meus amados irmãos ***Adriana, Marcelo, Luciana e Bia***, e cunhados ***Binho
e Pablo*** por terem, cada um a sua maneira, incentivado e ajudado a
alcançar meus sonhos.

Aos meus sobrinhos ***Tomás, Manuela e Isabela*** serem
importante fonte da minha alegria.

Ao **Sérgio**, pelo seu companheirismo, incentivo e amor durante
esta caminhada.

Agradecimentos

A **Deus**, a ciência perfeita.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (**Unicamp**), nas pessoas do Magnífico Reitor Prof. Dr. **Carlos Henrique de Brito Cruz**, e Vice Reitor Prof. Dr. **José Tadeu Jorge**.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Digníssimo Diretor Prof. Dr. **Thales Rocha de Mattos Filho** e Vice Diretor **Mário Fernando Góes**.

Ao Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalém**, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP e à Prof. Dr. **Roger Willian Fernandes Moreira**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

À Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo apoio financeiro fornecido para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Enilson Antônio Sallum**

Pela orientação e confiança depositadas em mim. E por ser exemplo de conduta e dedicação.

Ao Professor Dr. **Francisco Humberto Nociti Jr.**

Pela valiosa amizade e orientação e ainda, pela disponibilidade em ajudar e ensinar.

Ao Professor **Antonio Wilson Sallum**

Pela atenção, carinho e por tentar colocar na alma de todos nós o seu amor pelo aprender e ensinar.

Ao Professor **Marcio Zaffalon Casati**

Pela amizade, confiança no meu trabalho e fundamental incentivo nesta difícil caminhada.

Ao Professor **Sérgio de Toledo**

Por sua admirável serenidade e competência em ensinar.

Ao Professor **Fernando Martoreli de Lima** (*in memoriam*)

Por sua valiosa contribuição na minha formação acadêmica.

Aos meus colegas **Juliana Saldanha e Laerte Bremm**, pela ajuda nos experimentos fazendo de nós uma eficiente equipe.

Aos meus amigos de pós-graduação, **Ângela, Antonieta, Bruno, Cristina, Fernando, João, Luciana, Patrícia, Poliana, Renato e Robert** por termos caminhado juntos e por tanto tempo, sempre com respeito e sabendo que poderíamos contar uns com os outros.

Aos irmãos que a vida me deu, **Andréia Mendonça, Juliana Sanches, Livia Falcão, Luciane Torres, Renata Oliveira, Renata Spironeli, Roberta Sevá e Rodrigo Senise**, pelo carinho e apoio nas horas difíceis e por acreditar em nas minhas escolhas.

À querida amiga, **Vanessa**, pelo auxílio na realização da parte estatística deste trabalho.

Às amigas **Noeli, Patricia, Liana e Vanessa** minhas inesquecíveis companheiras de morada.

À secretária da área de Periodontia, Sra. **Eliete Aparecida Ferreira Lima** pelos auxílios prestados durante todo o curso, pela amizade e competência.

Ao Srs. **Wanderley e D Zuleica** pelos cuidados dispensados aos animais

À Sra. **Mariana** pela realização do processamento histológico, pela amizade e esforço em fazer o melhor.

Aos colegas de trabalho da UNIP, **Célio Nabuco Filho, Fabiano Cirano, Karina Villalpando, Márcio Casati e Marta Riesco**, pelo incentivo, amizade e ótima convivência.

À banca de qualificação, professores **Guilherme Elias Pessanha Henrique, Márcio Zaffalon Casati, Renato Mazzonetto**, pelas valiosas sugestões neste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
1. INTRODUÇÃO	03
2. REVISÃO DA LITERATURA	06
2.1. Cura Periodontal	06
2.2. Regeneração Periodontal com Regeneração Tecidual Guiada	09
2.3. Regeneração Periodontal com Proteínas Derivadas da matriz do Esmalte	15
2.4. Estudos Comparativos entre PME e RTG	22
2.5. Impacto do consumo de cigarro de tabaco na saúde geral	26
2.5.1 Características da fumaça do cigarro	27
2.5.2. Nicotina: Estudos <i>in vitro</i>	30
2.5.3. Nicotina: Estudos <i>in vivo</i>	32
2.5.4. Técnicas Regenerativas na presença do fumo	34
3. PROPOSIÇÃO	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Seleção dos Animais	37
4.2. Anestesia	37
4.3. Criação dos Defeitos	38
4.4. Tratamento dos Defeitos	39
4.5. Dosagem de Nicotina e Cotinina	42
4.6. Sacrifício dos Animais	43
4.7. Processamento do Material	43
4.8. Histometria	44
4.9. Análise Estatística	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Observações Clínicas	47
5.2. Observações Histológicas	47
5.3. Observações Histométricas	49
5.4. Observações Plasmáticas	51
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

RESUMO

Objetivo – O propósito deste trabalho foi avaliar, histometricamente, o processo de cura de defeitos periodontais do tipo deiscência, criados cirurgicamente em cães e tratados pela técnica de regeneração tecidual guiada (RTG) com o uso de membranas reabsorvíveis (copolímero de ácido polilático e poliglicólico) e proteínas derivadas da matriz do esmalte (PME) em animais que receberam nicotina de forma subcutânea.

Material e Métodos - Defeitos do tipo deiscência (4 X 6 mm) foram criados sobre as raízes mesiais dos 3^{os} e 4^{os} pré-molares mandibulares, bilateralmente. Durante três meses os defeitos foram cronificados com tiras metálicas permaneceram adaptadas aos defeitos promovendo acúmulo de placa. Após este período, os defeitos foram aleatoriamente designados a receber um dos tratamentos cirúrgicos: 1) raspagem e alisamento radicular (CO); 2) regeneração tecidual guiada com membranas reabsorvíveis (RTG) e 3) proteínas derivadas da matriz do esmalte (PME). Durante quatro meses após os tratamentos os animais receberam nicotina subcutânea (2mg/kg duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas entre as aplicações). Após este período, os cães foram sacrificados e os espécimes processados histologicamente para a análise histométrica, que incluiu os seguintes parâmetros: extensão do defeito, extensão do epitélio, extensão da adaptação conjuntiva, extensão do novo cemento, extensão de novo osso e recessão gengival.

Resultados – Observou-se uma maior extensão linear de novo cemento, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), nos sítios tratados com PME (5,32 mm) quando comparados ao grupo CO (3,60mm), entre os grupos PME e RTG (4,05mm) não houve diferença estatística. Todos os outros parâmetros não tiveram diferenças estatísticas. A extensão de epitélio foi de $1,71 \pm 0,61$ mm para no grupo CO; $1,23 \pm 0,99$ mm para o grupo RTG e $0,63 \pm 0,35$ mm para o grupo PME. Quanto à adaptação conjuntiva o grupo CO apresentou uma extensão de $0,15 \pm 0,22$ mm; o grupo RTG $0,15 \pm 0,21$ mm e o grupo PME $0,36 \pm 0,27$ mm. A formação de novo osso foi de $1,55 \pm 0,93$ mm no grupo controle; $1,56 \pm 0,96$ mm no grupo RTG e de $2,52 \pm 1,34$ mm no grupo PME. A recessão gengival foi de $0,36 \pm 0,48$ mm no grupo CO; $0,25 \pm 0,35$ mm no grupo RTG e de $0,02 \pm 0,07$ mm no grupo PME.

Conclusão - Dentro dos limites deste estudo, conclui-se que mesmo na presença da nicotina houve reparo em todos os grupos e a utilização da proteína derivada da matriz do esmalte foi o procedimento regenerativo mais efetivo para se obter maior formação cementária quando comparado com o controle.

ABSTRACT

Objectives: The goal of this investigation was to evaluate, histologically and histometrically, the healing process of dehiscence-type defects treated by enamel matrix derivative (EMD) or guided tissue regeneration (GTR) in dogs that received nicotine.

Methods: Eight mongrel dogs were used. Buccal osseous dehiscences were surgically created on the mesial roots of the mandibular third and fourth premolars. The defects were exposed to plaque accumulation for 3 months. After this period, the defects were randomly assigned to one of the treatments: open flap debridement (OFD), enamel matrix derivative (EMD) and guided tissue regeneration with resorbable membrane (GTR). During 4 months after the treatments the dogs received subcutaneous administration of nicotine (2mg/kg twice a day with a twelve-hour interval between the applications). After this period, the animals were sacrificed and the blocks were processed. The histometric parameters evaluated included: gingival recession, epithelial length, connective tissue adaptation, new cementum and new bone.

Results: A superior length of new cementum statistically significant was observed in the sites treated by EMD (5.32mm) in comparison with OFD (3.60mm) ($P \leq 0.05$). There was no statistically difference in the EMD group compared with GTR (4.05mm). All others parameters was not statistically significant. The extension of the epithelium was 1.71 ± 0.61 mm for the CO group, 1.23 ± 0.99 mm for the GTR group and 0.63 ± 0.35 mm for the EMD. Regarding the connective tissue adaptation was 0.15 ± 0.22 mm in the CO group, 0.15 ± 0.21 mm for GTR and 0.36 ± 0.27 mm for EMD. The new bone formation was 1.55 ± 0.93 mm for CO, 1.56 ± 0.96 mm for GTR and 2.52 ± 1.34 mm for EMD group. Gingival recession was 0.36 ± 0.48 mm for CO group, 0.25 ± 0.35 mm in GTR and 0.02 ± 0.07 mm in the PME.

Conclusions: Within the limits of this study, it can be concluded that healing was uneventful in all the treatments and EMD alone seems to be the most effective way to promote new cementum formation in the presence of nicotine compared to control.

1. INTRODUÇÃO

A terapia periodontal regenerativa tem sido associada ao conceito de Regeneração Tecidual Guiada (RTG). A hipótese feita originalmente por Melcher em 1976, e concretizada por Nyman *et al.* (1982) e Gottlow *et al.* (1984) sugere que somente algumas células do periodonto podem produzir novo cemento, ligamento e osso, se a estas células for dada a oportunidade de ocupar a área do defeito. Para que isso aconteça outras populações celulares, como por exemplo, as células epiteliais ou fibroblastos gengivais, que provavelmente são os primeiros a ocupar a área do defeito, teriam que ser excluídas desta região durante a cicatrização. A possibilidade de excluir algumas células durante a cicatrização de um defeito ósseo periodontal, e finalmente alcançarmos a regeneração periodontal, gera o interesse pelas chamadas barreiras ou membranas utilizadas para a Regeneração Tecidual Guiada.

As primeiras barreiras usadas em cirurgia periodontal que permitiram regeneração de cemento, ligamento e osso foram os filtros de papel (Nyman *et al.*, 1982). No entanto, este tipo de barreira não possuía algumas características fundamentais para promover a RTG, e a partir dela, várias outras foram desenvolvidas na tentativa de se obter a barreira mecânica ideal para Regeneração Tecidual Guiada, principalmente membranas fossem reabsorvíveis, dispensando um segundo ato cirúrgico (Greenstein & Caton 1993).

Mais recentemente, além das barreiras, têm sido indicada a utilização de proteínas derivadas da matriz de esmalte (PME) visando a regeneração periodontal (Hammarström, 1997; Heijl *et al.*, 1997); um material absorvível, composto por proteínas derivadas do esmalte do órgão dental formando uma matriz protéica, que tem como proteína predominante a amelogenina.

A sua utilização está vinculada ao conhecimento do papel destas proteínas durante o desenvolvimento embriogênico da raiz dental. Estudos que descreveram a cementogênese demonstraram uma íntima relação entre a bainha epitelial de Hertwig e a formação de cemento acelular (Slavkin & Boyde, 1975). Desta forma, sugere-se que a aplicação deste material em uma raiz dental previamente contaminada possa agir mimetizando a ação das

proteínas liberadas no processo de desenvolvimento embrionário dos tecidos periodontais e da raiz, na formação de novo cemento acelular (Hammastron *et al.*, 1997), promovendo assim, a formação de nova inserção conjuntiva.

Vários estudos clínicos controlados usando RTG (Yukna *et al.* 1996, Cortellini *et al.* 1993, Cury *et al.* 2003) ou PME (Mellonig, 1999; Sculean *et al.*, 1999; Sculean *et al.*, 2000; Yukna *et al.*, 2000) mostraram bons resultados. Uma meta-análise de 12 estudos controlados comparando o efeito das técnicas regenerativas mostrou um ganho de inserção clínico de 32.7% para os defeitos angulares tratados com a proteína e de 38,7% para os defeitos tratados com membranas (Kalpidis *et al.*, 2002). Porém, mesmo havendo uma grande eficácia destas técnicas regenerativas, também foi observado uma significativa variância clínica de resultados. Informações acumuladas ao longo de 20 anos de uso da RTG indicam que a variabilidade dos resultados é influenciada por alguns fatores modificadores durante a cicatrização da ferida (Garrett, 1996), e que a identificação destes fatores permite obter melhoras nos resultados das terapias regenerativas.

Um dos fatores modificadores que vem sendo discutido é o consumo de cigarros. O tabaco está relacionado ao desenvolvimento e progressão das doenças periodontais (Johnson *et al.*, 1999; Albandar *et al.*, 2000), à reabsorção da crista óssea alveolar (Bergström *et al.*, 1991), agrava a perda de altura e densidade do osso alveolar em mulheres após a menopausa com doença periodontal (Payne *et al.*, 2000). O consumo de cigarros ou de outros derivados de tabaco, como charuto e cachimbo, também está associado a um maior risco de perdas dentárias precoces, especialmente quando associada à má higiene bucal (Holm, 1994; Albandar *et al.*, 2000). Indivíduos fumantes com saúde periodontal têm 18 vezes mais chance de ter sulco gengival colonizado por patógenos periodontais que os não fumantes, risco este que também varia de acordo com a quantidade e duração do consumo de cigarros (Shiloah *et al.*, 2000).

Dentre as 2000 substâncias potencialmente tóxicas da fumaça do cigarro, a nicotina é uma das mais importantes (Reynolds, 1996; James *et al.*, 1999). Após o consumo de cigarros de tabaco, os níveis plasmáticos de nicotina variam de 15ng a 1,8µg/ml e os níveis salivares de 96ng a 1,6mg/ml (McGuire *et al.*, 1989; Tripton & Dabbous, 1995). Na

cavidade bucal, as concentrações são bastante altas em função do contato direto com a fumaça do cigarro e da produção contínua de saliva e fluído crevicular. Este último atua como reservatório da substância em níveis cinco a seis vezes mais altos que o plasma ou a saliva (McGuire *et al.*, 1989; Peacock *et al.*, 1993; Payne *et al.*, 1996).

Diversas funções celulares e de defesa são alteradas pela ação da nicotina durante o consumo de cigarros, como a adesão e proliferação de fibroblastos (James *et al.*, 1999) e a atividade de neutrófilos/monócitos (Pabst *et al.*, 1985). A nicotina provoca aumento da secreção de prostaglandina E₂ (PGE₂) modulada por lipopolissacarídeos bacterianos e pelos monócitos periféricos do sangue (Payne *et al.*, 1996), bem como diversos efeitos diretos sobre as células do ligamento periodontal (Giannopoulos *et al.*, 1999).

Há na literatura poucas referências quanto à influência do fumo no sucesso das técnicas regenerativas, Tonnetti *et al.* (1995) observaram clinicamente a influência do cigarro no reparo de defeitos infra ósseos tratados com membranas não reabsorvíveis, e puderam observar que no momento da retirada da membrana não houve diferença entre pacientes fumantes e não fumantes quanto à formação óssea; porém, a avaliação após um ano mostrou que o fumo está associado a uma pior resposta após regeneração. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Trombelli *et al.* (1997) realizaram um estudo clínico com a utilização de membranas em retrações gengivais e concluiu que os resultados desta terapia regenerativa foram prejudicados em pacientes fumantes. Em relação às proteínas derivadas da matriz do esmalte, Tonetti *et al.* (2002) incluíram pacientes fumantes (consumo de menos de 20 cigarros/dia) em um estudo multicêntrico, e observaram que a possibilidade de haver ganho de inserção clínico com aplicação de EMD aumentava dependendo de vários fatores - e um deles era do paciente não ser fumante.

Tendo em vista a necessidade de se estudar até que ponto vai a influência dos fatores modificadores no tratamento da doença periodontal, e que estudos histológicos retratam o que acontece nos processos regenerativos, este trabalho teve como objetivo avaliar histometricamente o processo de reparo de defeitos ósseos do tipo deiscência, tratados com regeneração tecidual guiada e proteínas derivadas da matriz do esmalte, na presença da nicotina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O objetivo do tratamento periodontal consiste principalmente na resolução do processo inflamatório por meio da eliminação dos depósitos e toxinas bacterianas da superfície dental, e também se fundamenta na manutenção e na longevidade funcional e estética de dentes saudáveis (Cortellini *et al.*, 1990).

Em casos avançados da doença periodontal, alguns dentes são perdidos mesmo após o tratamento, devido principalmente às dificuldades de manutenção causada pelos defeitos ósseos remanescentes (McFall Jr., 1982). Nesses casos, a terapia periodontal deve compreender também o tratamento dos defeitos ósseos produzidos pela doença (Caffesse *et al.*, 1988; Cortellini *et al.*, 1993a). Sendo assim a terapia periodontal regenerativa visa restabelecer completamente o aparato de suporte que foi perdido como consequência da doença periodontal inflamatória (Caton *et al.*, 1993).

Vários procedimentos têm sido propostos para o tratamento de defeitos ósseos, com previsibilidades distintas. O sucesso da terapia depende, além da técnica empregada, de fatores associados, como a anatomia do defeito e o controle de placa. As opções de tratamento com diferentes processos de cura dos tecidos periodontais resultantes dessas modalidades terapêuticas têm motivado discussões ao longo dos anos (Melcher, 1976; Listgarten & Rosenberg, 1979; Caton *et al.*, 1980).

2.1. Cura Periodontal

Procedimentos convencionais como raspagem e alisamento radicular, curetagem gengival, gengivectomia, retalhos e cirurgia óssea afetam favoravelmente defeitos anatômicos produzidos pela periodontite, por meio da redução da profundidade de sondagem, tanto pela retração dos tecidos quanto pelo ganho de inserção clínica. Durante

vários anos, estas mudanças favoráveis foram interpretadas como verdadeira regeneração periodontal (Rosling *et al.*, 1976; Caton *et al.*, 1982), entretanto estudos posteriores demonstraram que a terapia periodontal convencional resultava primariamente em reparo (Caton *et al.*, 1980; Listgarten *et al.*, 1979). Caton *et al.* (1980), utilizando o modelo experimental em primatas, demonstraram que os procedimentos convencionais resultavam na formação de um epitélio juncional longo, sem a formação de nova inserção conjuntiva, mostrando a capacidade do epitélio em ocupar rapidamente a área da ferida, impedindo a regeneração periodontal.

Apesar do limitado poder regenerativo, estudos longitudinais em humanos demonstraram que a terapia periodontal convencional, seguida por manutenção adequada, foi efetiva em estabilizar e manter a saúde periodontal (Becker *et al.*, 1984; Ramfjord *et al.*, 1987).

Os tratamentos cirúrgicos que associam enxertos ósseos ou substitutos ósseos parecem não produzir resultados consistentemente superiores aos procedimentos cirúrgicos convencionais (Renvert *et al.*, 1985b; Masters *et al.*, 1996), no entanto, tem sido relatado um ganho médio no nível de inserção clínico de 2,1 mm, similar ao preenchimento ósseo (Laurell *et al.*, 1998).

Independente da modalidade terapêutica, a importância de um regime de controle de placa sistemático é de fundamental importância para a obtenção e manutenção de bons resultados clínicos, em qualquer dos procedimentos empregados (Rosling *et al.*, 1976).

Com o surgimento dos procedimentos regenerativos, que abrem um leque de opções para o tratamento de defeitos periodontais, o termo “*regeneração*” vem sendo discutido, e, segundo a Academia Americana de Periodontia (1986), pode ser definido como: processo de cura que reproduz ou reconstitui a arquitetura e função do tecido ferido ou perdido por ocorrência de doença. Seguindo esta definição, a Regeneração Periodontal é a reconstituição do periodonto de inserção através da formação de novo ligamento, novo

cimento e novo osso ao redor dos dentes que perderam estas estruturas após a instalação e progressão da doença periodontal (Lynch, 1992). Desta forma, a cura da ferida com formação de epitélio juncional longo, anquilose ou reabsorção radicular é um processo definido como *reparo*, já que não restaura completamente a arquitetura e função das estruturas perdidas (Caton & Greenstein, 1993).

Considerando os conceitos de *regeneração* e *reparo* e avaliando os estudos histológicos em modelos animais e humanos, é possível demonstrar que o tipo de cura resultante da terapia cirúrgica e não cirúrgica de defeitos intra-ósseos pode ter um potencial para representar *regeneração* unicamente na região mais apical do defeito (Gottlow *et al.*, 1990), enquanto que na sua maior extensão, existe formação de epitélio juncional longo (*reparo*), independente do preenchimento ósseo observado (Caton & Zander, 1976; Moskow *et al.*, 1979; Caton *et al.*, 1980).

Segundo Lindhe *et al.* (1982b), a cicatrização através da formação de epitélio juncional longo, não compromete a estabilidade dos resultados obtidos com a terapia cirúrgica. Em longo prazo, entretanto, a presença de uma barreira epitelial tem sido vista como uma seqüela indesejável resultante dos eventos de cura periodontal, na medida em que parece impedir a formação de um novo aparato de inserção sobre a superfície radicular, além de não representar regeneração periodontal verdadeira (Cortellini, 1993a).

Os estudos clínicos têm mostrado que, embora seja possível modificar os eventos de cura de várias maneiras, a regeneração periodontal completa e previsível, ainda é um objetivo difícil de ser alcançado (Hammarstrom *et al.*, 1997; Heijl *et al.*, 1997); porém, o emprego da regeneração tecidual guiada e das proteínas da matriz do esmalte são as técnicas que mais se aproximam deste objetivo.

2.2. Regeneração Periodontal com Regeneração Tecidual Guiada

Dentre as técnicas regenerativas, a regeneração tecidual guiada (RTG) foi a mais estudada e tem perspectivas bastante interessantes, principalmente em relação à sua eficácia clínica e previsibilidade em lesões de bifurcação grau II na superfície vestibular de molares inferiores e defeitos intra-ósseos profundos de três paredes.

A partir dos postulados de Melcher (1976), em que as células do ligamento periodontal são as que possuem a capacidade de neoformação do periodonto de sustentação, vários estudos surgiram com o propósito de dar sustentação a essa “teoria”, elucidando a participação dos diferentes tecidos periodontais no processo de cura.

O papel das células epiteliais foi constatado por Caton *et al.* (1980), num estudo em macacos. Foram induzidos defeitos periodontais por meio da colocação de elásticos ortodônticos ao redor dos dentes, os quais foram tratados em um desenho de boca dividida da seguinte forma: retalho de Widman modificado; retalho de Widman modificado + osso cortical e medular autógeno congelado previamente; retalho de Widman modificado + tricálcio fosfato e raspagem dental + curetagem gengival. Os resultados histométricos demonstraram que todos os tratamentos resultaram na formação de um epitélio juncional longo sobre a superfície radicular, sem formação de nova inserção.

Com o objetivo de avaliar o papel das células do tecido conjuntivo gengival no processo de cura, Nyman *et al.* (1980) induziram periodontite nos pré-molares mandibulares de cães, através da colocação de ligaduras de fio de algodão ao redor dos dentes, até que a destruição dos tecidos periodontais atingisse a metade do comprimento radicular. Posteriormente, as ligaduras foram removidas e os dentes limpos. Retalhos de espessura total vestibular e lingual foram elevados e a raiz exposta foi instrumentada e polida. As coroas dentais foram removidas, o nível da crista óssea foi demarcado através de um sulco na superfície radicular e as raízes foram cuidadosamente extraídas e transplantadas para um defeito criado cirurgicamente nas partes edêntulas da mandíbula, de modo que o dente, em posição horizontal, permanecesse com uma metade da circunferência

radicular voltada para o osso e outra metade voltada para o tecido conjuntivo gengival do retalho que a recobria. Os resultados histológicos, após três meses, demonstraram que havia reabsorção radicular em ambas as circunferências radiculares, apesar de Aukhil *et al.* (1986) afirmarem que o grau de reabsorção provocado pelo tecido conjuntivo derivado do osso era maior em comparação ao do retalho.

Karring *et al.* (1980) avaliaram o potencial do tecido ósseo em promover a regeneração periodontal, utilizando de metodologia semelhante à descrita por Nyman *et al.* (1980), diferenciando-se apenas no aspecto de que as raízes permaneceram em posição vertical, completamente circundada por tecido ósseo, sendo a porção mais coronária da raiz coberta pelo tecido conjuntivo gengival, evitando a migração epitelial e contaminação pela placa bacteriana. Os resultados histológicos de três meses demonstraram reinserção conjuntiva na parte mais apical da raiz, onde havia ligamento periodontal viável, ao passo que na porção mais coronária, onde a superfície radicular foi exposta à doença e desprovida do ligamento periodontal ou gengiva, os fenômenos de anquilose e reabsorção radicular foram preponderantes.

Nestes dois estudos citados anteriormente, os achados histológicos demonstraram áreas de reabsorção radicular e anquilose também na porção apical das raízes, possivelmente devido ao traumatismo do ligamento periodontal, causado pelos movimentos de extração e transplante dentais. Provavelmente, isso levou à migração dos tecidos de granulação, derivados do osso e do tecido conjuntivo gengival, para a região de contato com a superfície radicular, causando reabsorção e anquilose e evitando a migração coronária das células do ligamento periodontal (Karring *et al.*, 1985). Em vista disso, Karring *et al.* (1985) modificaram a metodologia anterior, sendo que as raízes permaneceram no local e foram cobertas pelo retalho após a instrumentação radicular. A análise histológica revelou uma quantidade razoável de formação de nova inserção na porção coronária das raízes, onde o periodonto de inserção foi perdido após a indução de periodontite, demonstrando que as células do ligamento periodontal são capazes de formar nova inserção.

Com base nestes estudos pôde-se concluir que as células do tecido epitelial migram rapidamente em direção apical, interpondo-se entre a superfície radicular e o tecido conjuntivo gengival, evitando a formação de nova inserção. Por outro lado, este fenômeno evita a reabsorção radicular e anquilose provocadas pelos tecidos conjuntivo gengival e ósseo (Karring *et al.*, 1984, 1985). Surgiu, então, o princípio biológico da RTG, fundamentada na utilização das barreiras físicas, excluindo os tecidos incapazes de induzir a formação de nova inserção (epitelial e conjuntivo gengival) do contato com a superfície radicular durante o processo de cura, promovendo a proliferação e migração das células do ligamento periodontal e do tecido ósseo em direção coronária, no intuito de alcançar a “Regeneração Periodontal” (Nyman *et al.*, 1982).

O primeiro relato de um dente humano tratado de acordo com o princípio da RTG foi feito por Nyman *et al.* (1982), em um incisivo lateral inferior com periodontite avançada, indicado para extração. No ato do procedimento cirúrgico, a sondagem clínica da face vestibular média era de 11mm da junção cimento esmalte ao fundo do defeito. Após a instrumentação radicular cuidadosa, um filtro milipore foi colocado sobre o defeito, 2mm aquém da junção cimento esmalte e 1mm apical à crista óssea, e fixado com resina. Após três meses do procedimento cirúrgico, o dente foi removido em bloco, juntamente com a parede vestibular. Observou-se histologicamente a formação de nova inserção, que se estendia 7mm do fundo do defeito em direção coronária.

Nyman *et al.* (1982), em um outro estudo, utilizando três macacos, removeram a tábua óssea vestibular e proximal da porção mediana da raiz de incisivos e caninos até 2mm apical à crista óssea marginal. Antes do reposicionamento e sutura do retalho as raízes foram instrumentadas, sulcos de referência foram realizados determinando a posição coronária e apical do osso remanescente e um filtro milipore foi posicionado, como uma barreira, entre o retalho e a superfície radicular. A análise histológica da porção mediana da raiz, realizada seis meses após o procedimento cirúrgico, mostrou que houve a formação de novo cimento com fibras colágenas inseridas em todos os espécimes, sendo mais espesso o

cimento na região apical. Também foram observadas fibras colágenas, paralelas à superfície radicular, sem inserção ao cimento, nas áreas mais coronárias.

Gottlow *et al.* (1984) utilizaram defeitos ósseos do tipo deiscência em três macacos. A porção gengival que recobria o defeito foi removida permitindo a exposição da superfície radicular à placa por um período de seis meses. Decorrido este período, novo retalho foi elevado, as raízes foram instrumentadas, as coroas removidas, os canais radiculares preenchidos e os retalhos suturados visando completo recobrimento das raízes. No grupo experimental, antes da sutura, as raízes foram cobertas por um filtro milipore. A avaliação histológica, executada após três meses de cicatrização, revelou que nova inserção conjuntiva (novo cimento com fibras colágenas inseridas) se formou em todas as raízes do grupo experimental em uma extensão que variou de 0,9 a 6,8mm, enquanto que no grupo controle esta extensão foi de 0 a 2,5mm. Áreas onde não houve formação de cimento apresentaram fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície radicular e reabsorção radicular sendo esta mais freqüente no grupo controle. A formação óssea ocorreu no grupo experimental em 7 dos 9 espécimes, em uma extensão de 20 a 100% da superfície do defeito, enquanto que no grupo controle ocorreu em 2 dos 6 espécimes, em uma proporção de 40 a 60%. Concluiu-se que o uso da membrana entre o retalho e a superfície radicular favoreceu a repopularização da área de cura pelas células do ligamento periodontal, não encontrando correlação entre formação do cimento e regeneração óssea. Neste modelo, tanto células do ligamento periodontal quanto células do tecido ósseo poderiam invadir o sítio de cura entretanto, anquilose não foi observada nos sítios teste nem nos controle, indicando que a capacidade das células do ligamento migrarem é maior ou igual a das células do tecido ósseo.

Cortellini *et al.* (1993 a e b), aplicando os princípios da RTG no tratamento de defeitos intra-ósseos profundos em humanos, obtiveram após um ano de tratamento com rigoroso controle de placa uma média de 4,1mm de ganho no nível de inserção clínica, acompanhados de um ganho ósseo médio de 4,3mm. Esse grupo de autores concluiu que a técnica é altamente eficaz e previsível para esse tipo de defeito.

Com o surgimento da RTG, as primeiras barreiras disponíveis foram as não reabsorvíveis, como as milipore e Goretex[®] (Greesnstein & Caton, 1993). No entanto, como estas necessitavam de um segundo ato cirúrgico após 4 a 6 semanas, com a finalidade de removê-las, pesquisadores iniciaram investigações para estudar a eficácia de membranas reabsorvíveis na RTG. Estas, por não necessitarem de um posterior procedimento de reentrada cirúrgica, representam um benefício para o paciente, além de eliminar um possível trauma sob os tecidos localizados na área de cura, o que pode ocorrer no ato da remoção da barreira e que poderia prejudicar o processo de cura. Os materiais mais comumente utilizados na fabricação das membranas reabsorvíveis são colágeno, ácido polilático, ácido poliglicólico e seus copolímeros (Reynolds & Bowers, 1996).

Muitos estudos foram feitos com o objetivo de demonstrar que, da mesma maneira que as membranas não reabsorvíveis, as membranas reabsorvíveis também cumpriam seu papel em barrar a migração epitelial. Pitaru *et al.* (1987) avaliaram a eficácia de membranas de colágeno em prevenir a migração apical do epitélio juncional em defeitos do tipo deiscência em cães. Superfícies radiculares desnudadas de caninos superiores receberam a barreira enquanto dentes contralaterais serviram como controle. Os animais foram sacrificados 10 dias após a cirurgia, procedendo-se o exame histológico e histométrico. Observou-se migração apical do tecido epitelial em 34% da extensão vertical da superfície radicular do defeito no grupo experimental e em 82% no grupo controle. Concluiu-se que as membranas de colágeno preveniram (parcialmente) a migração apical do epitélio e foram colonizadas por células do tecido conjuntivo, sendo por ele incorporadas.

Caffesse *et al.* (1994) usaram nove cães nos quais foram criados cirurgicamente defeitos de furca Classe II, onde foram avaliadas membranas, uma produzidas a partir do copolímero de ácido glicólico e ácido láctico (RESOLUT[®]) e membranas não reabsorvíveis de PTFE-e (GORE-TEX[®]) foram utilizadas como controle. Após seis meses de cicatrização, observou-se que as três barreiras foram efetivas na prevenção da migração apical do epitélio juncional e na formação de tecido ósseo e nova inserção. O processo de

reabsorção das membranas iniciou-se em 4 semanas, sendo que após 24 semanas ainda foram detectados pequenos fragmentos das mesmas. Concluiu-se que a utilização deste tipo de membrana reabsorvível proporcionou resultados semelhantes aos obtidos no grupo controle.

Sallum *et al.* (1998) avaliaram histometricamente a resposta dos tecidos periodontais em defeitos do tipo deiscência criados cirurgicamente em cães. Os defeitos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: utilização da técnica de regeneração tecidual guiada com membrana reabsorvível GUIDOR[®] (grupo teste) ou terapia cirúrgica convencional (grupo controle). Os resultados encontrados demonstraram que a formação de nova inserção conjuntiva foi significativamente maior nos sítios teste do que no controle (2.79 ± 0.74 mm e 1.47 ± 0.20 mm respectivamente) ($p < 0.05$). A migração apical do epitélio também foi reduzida nos sítios teste ($p < 0.05$). Não foram encontradas diferenças na resposta do tecido ósseo. Os autores concluíram que a membrana reabsorvível GUIDOR[®] foi efetiva em bloquear a migração apical do epitélio e a proliferação do tecido conjuntivo, promovendo nova inserção.

Usando uma metodologia semelhante, Pereira *et al.* (2000) utilizaram seis cães com o objetivo de comparar histológica e histometricamente o processo de cicatrização de defeitos de deiscência tratados com RTG, utilizando membranas não reabsorvíveis de politetrafluoretileno e reabsorvíveis de ácido polilático, comparados ao controle (retalho para raspagem). Os resultados mostraram uma maior quantidade de novo cemento nos sítios tratados com RTG, independente do tipo de membrana que foi utilizado, quando comparado com o controle. Nenhuma diferença estatística foi encontrada quando se compararam as duas membranas, exceto na área óssea onde houve um resultado ligeiramente maior para o grupo tratado com a membrana de politetrafluoretileno. Os autores concluíram que ambas as barreiras foram igualmente eficazes para a formação de novo cemento, e que as membranas não reabsorvíveis podem resultar um pouco mais de área óssea, quando comparadas com as não reabsorvíveis.

Quando se comparam as membranas reabsorvíveis e as não reabsorvíveis, um dos tópicos que se discute é quanto à vascularização dos tecidos. Vergara *et al.* (1997) delinearam um trabalho histológico com o objetivo de esclarecer esta questão. Foram criados cirurgicamente defeitos de furca Classe II em 8 cães, os quais foram aleatoriamente tratados com membranas reabsorvíveis, membranas não reabsorvíveis ou sem membrana, que serviram como controle. O período de sacrifício dos animais foi entre 3 e 49 dias. Os autores puderam concluir que na fase inicial as membranas de politetrafluoretileno interferiram de forma negativa na cicatrização, quando estava em posição, o que não ocorreu com as membranas reabsorvíveis, que permitiram anastomoses precoces do retalho revascularizado e regeneração dos tecidos. Isto poderia ser um bom argumento para a utilização das membranas reabsorvíveis, embora, em longo prazo, as respostas tenham se tornado similares para ambas as membranas.

2.3 REGENERAÇÃO PERIODONTAL COM PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DO ESMALTE

A utilização de proteínas da matriz do esmalte para obter regeneração periodontal tem sido descrita recentemente e fundamenta-se no conhecimento do papel destas proteínas durante o desenvolvimento da raiz dental, com os estudos clássicos que descreveram a cementogênese, onde se demonstrou íntima relação entre a bainha radicular epitelial de Hertwig e a cementogênese inicial. A proteína da matriz do esmalte, atualmente disponível comercialmente como EMDOGAIN® tem como componente principal a amelogenina um constituinte hidrofóbico do agregado de proteínas da matriz do esmalte que causa uma agregação protéica em áreas úmidas (Zetterstrom *et al.*, 1997)

A bainha radicular epitelial de Hertwig consiste em uma extensão apical do órgão dental e sua camada mais interna representa uma extensão da camada de ameloblastos da coroa (Heijl *et al.*, 1997). Existem grandes evidências de que a bainha radicular secreta proteínas da matriz do esmalte durante a formação radicular e este tipo de proteína está possivelmente envolvida na formação do cimento acelular durante o processo

de desenvolvimento dental. Vários estudos realizados nos últimos 20 anos já suportavam cientificamente esta hipótese (Slavkin & Boyde, 1975; Slavkin, 1976; Lindskog, 1982a, b; Lindskog & Hammarstrom, 1982; Slavkin *et al.*, 1989a,b; Hammarstrom, 1997a, b).

Em 1982, numa série de três trabalhos Lindskog (1982a,b); Lindskog & Hammarstrom (1982), demonstraram, através de estudos *in vitro* (*in vitro*) e com microscopia eletrônica de varredura, que a camada mais interna da bainha radicular epitelial de Hertwig tem um estágio secretor e um material semelhante à matriz do esmalte é formado sobre a superfície radicular previamente à formação do cimento.

Mais recentemente, Bosshardt & Schroeder, em 1996, demonstraram através de estudos ultraestrutural e imunohistoquímico que de fato, proteínas da matriz do esmalte são depositadas sobre a superfície dentinária da parte apical de dentes humanos em desenvolvimento e também em dentes de porcos. Antes disso, Slavkin *et al.* (1989b), mostraram que o cimento acelular contém proteínas que são imunologicamente relacionadas com as proteínas presentes na matriz do esmalte.

Parece então que a deposição temporária de proteínas da matriz do esmalte sobre a superfície radicular é um passo essencial e prévio à formação do cimento acelular e que a formação do ligamento periodontal e osso alveolar é dependente da formação do cimento acelular (Hammarstrom, 1997a,b; Hammarstrom *et al.*, 1997; Heijl, 1997). Este fato também está de acordo com o estudo de Ten Cate, em 1975, no qual demonstrou que o cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar não constituem apenas uma unidade funcional que ancora os dentes nos maxilares, mas que o desenvolvimento destes três tecidos também ocorre simultaneamente.

Com base nessas informações obtidas através de muitas investigações que esclarecem, ainda que parcialmente, os eventos biológicos que caracterizam o desenvolvimento dental, um grupo de pesquisadores suecos, a partir de 1997, demonstraram em uma série de publicações a indução de regeneração periodontal através da reprodução desses eventos em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Num primeiro estudo, composto por três experimentos, Hammarstrom, em 1997b, identificou, inicialmente *in vitro*, a presença e distribuição de amelogenina no ápice em formação de pré-molares humanos e de molares de ratos em desenvolvimento.

No segundo experimento (Hammarstrom, 1997b), depois de propiciar uma exposição experimental da matriz do esmalte às células do folículo dental, observou a formação de uma matriz de tecido duro acelular sugerindo que a matriz do esmalte teve um efeito indutivo sobre algumas células do folículo dental.

No último experimento deste estudo (Hammarstrom, 1997b), investigou-se histologicamente o tipo de tecido neoformado após a aplicação de matriz do esmalte exógena, em cavidades experimentais produzidas na superfície radicular de incisivos de macacos removidos de seus respectivos alvéolos. As cavidades foram preparadas na superfície mesial de incisivos laterais, sendo que nas cavidades teste, foi aplicada a matriz do esmalte, e nas cavidades controle nada foi aplicado. Os dentes foram, então, reimplantados e após oito semanas, se observou nas cavidades teste a formação de um tecido histologicamente idêntico ao cimento acelular de fibras extrínsecas. Este tecido era firmemente aderido à dentina subjacente e fibras colágenas se estendiam a partir do cimento. Já nas cavidades controle, houve formação irregular de uma camada espessa de tecido duro, celular, fracamente aderido à dentina e parecido com osso imaturo.

Com o objetivo de avaliar se a aplicação da matriz do esmalte sobre uma superfície radicular desnudada pode promover regeneração de todos os tecidos periodontais, Hammarstrom *et al.* (1997) realizaram um estudo em deiscências ósseas vestibulares experimentais em macacos. Retalhos mucoperiosteais foram elevados do canino até o primeiro molar em cada um dos lados da maxila, e defeitos padronizados foram criados nos pré-molares e na raiz mesial do primeiro molar. Após o condicionamento das raízes com ácido orto-fosfórico a 37%, foi aplicada a solução contendo as proteínas da matriz do esmalte e os retalhos foram reposicionados e suturados. Os dentes do quadrante contra-lateral foram usados como controle, sendo que após o condicionamento ácido foi aplicada apenas uma solução veículo, sem o conteúdo protéico. A avaliação em

microscopia óptica e comparação morfométrica revelaram que houve regeneração periodontal quase completa do cimento acelular firmemente aderido à dentina, do ligamento periodontal e do osso alveolar.

Quanto à capacidade da dentina em adsorver estas proteínas, Gestrelus *et al.* em 1997, por meio de análise espectroscópica eletrônica, verificaram, *in vitro*, que as superfícies mais externas das raízes, após o condicionamento ácido, apresentavam um caráter mais proteico do que mineral. A partir dessa informação foi testada a capacidade de adsorção das proteínas da matriz do esmalte a superfícies minerais e protéicas. Segundo os autores, o derivado da matriz do esmalte forma multicamadas tanto sobre superfície mineral como protéica.

Em uma segunda parte desse estudo (Gestrelus *et al.*, 1997a), os autores descreveram o efeito das proteínas da matriz do esmalte em uma solução veículo de alginato de propilenoglicol sobre células do ligamento periodontal ao longo do tempo *in vivo*. Incisivos de macacos foram extraídos e 2/3 do cimento foi removido longitudinalmente na superfície mesial. Após o condicionamento ácido, foi aplicada a matriz do esmalte em alginato de propilenoglicol nas superfícies dos dentes testes, e no controle nada foi aplicado. Os dentes eram, então, imediatamente reimplantados. Para avaliação em microscopia eletrônica de varredura, os dentes foram progressivamente extraídos nos 3º, 7º, 14º dias. De acordo com os resultados obtidos, as superfícies testes ficaram inicialmente cobertas por uma rede de fibras protéicas e foram continuamente colonizadas por células semelhantes a fibroblastos até atingirem uma média de cobertura celular correspondente a 3/4 da superfície. Já as superfícies controle tornaram-se continuamente cobertas por placa bacteriana e atingiram uma cobertura celular equivalente a 1/8 da superfície.

Com o propósito de obter maiores esclarecimentos sobre mecanismos e fatores necessários para que ocorra a regeneração periodontal, Gestrelus *et al.*, 1997b desenvolveram modelos de estudo *in vitro* para avaliar a capacidade da matriz do esmalte em influenciar propriedades específicas de células do ligamento periodontal. Dentro dos

limites dos sistemas de avaliação, constataram: aumento na proliferação de células do ligamento periodontal, sem, contudo, haver proliferação de células epiteliais, usando o mesmo protocolo; aumento na produção total de proteínas pelas células do ligamento periodontal e uma maior formação de nódulos minerais também pelas células do ligamento periodontal. Entretanto, não teve efeito significativo sobre a migração e adesão celular.

Considerando a dificuldade de estudos experimentais em modelo animal em interpretar previsibilidade em humanos, Heijl, em 1997, realizou um estudo para avaliar histologicamente o efeito das proteínas da matriz do esmalte na regeneração periodontal de um defeito de deiscência vestibular, criado experimentalmente em humano. A avaliação em microscopia óptica polarizada e transmitida revelou um processo de cura caracterizado pela formação de cemento acelular associado com ligamento periodontal e osso alveolar.

Mellonig, em 1999, mostrou um outro caso de histologia humana após terapia regenerativa com proteínas da matriz do esmalte. Neste estudo, o derivado da matriz do esmalte foi aplicado em um defeito periodontal intra-ósseo de três paredes na mesial de um canino inferior esquerdo, apresentando um componente intra-ósseo de 5,0mm. Clinicamente, foi observada uma redução de 5,0 mm na profundidade de sondagem, um ganho de inserção clínica de 4,0mm e um preenchimento ósseo radiográfico limitado, 6 meses após o procedimento cirúrgico. A avaliação histológica, no mesmo período de avaliação, demonstrou uma fina camada de cemento acelular sobre o cemento original, áreas de osso maduro e lamelar com poucas áreas de formação óssea imatura e fibras do ligamento periodontal paralelas à superfície radicular.

Heijl *et al.*, em 1997, compararam o efeito, em longo prazo, do tratamento cirúrgico de defeitos intra-ósseos associado ao gel de proteínas da matriz do esmalte, EMDOGAIN[®], e um gel placebo. O estudo multicêntrico, caracterizado por um modelo *split-mouth*, envolveu 33 pacientes que apresentavam 34 pares de sítios teste e controle. As avaliações clínica e radiográfica foram feitas aos 8, 16 e 36 meses. O ganho médio de inserção clínica do grupo teste em relação ao controle aos 8 meses foi de 2,1mm e 1,5mm; aos 16 meses foi de 2,3mm e 1,7mm e aos 36 meses foi de 2,2mm e 1,7mm,

respectivamente, e as diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes a cada período. Para o nível ósseo radiográfico, o grupo teste apresentou em média um ganho de 0,9mm, enquanto que o grupo controle apresentou em média uma perda de 0,1mm aos 8 meses. Aos 16 meses de avaliação, o grupo teste apresentou um ganho médio inserção de 2,2mm e o controle uma perda média de 0,2mm, e aos 36 meses o grupo teste continuou apresentando um ganho ósseo médio de 2,6mm comparado aos níveis ósseos inalterados no grupo controle.

As alterações nos parâmetros clínicos e radiográficos de defeitos ósseos angulares tratados com o derivado da matriz do esmalte (EMDOGAIN®) também foram investigadas por Heden *et al.* (1999), em uma série de casos clínicos. O estudo compreendeu 108 pacientes e um total de 145 defeitos intra-ósseos profundos tratados pela aplicação das proteínas da matriz do esmalte adjunto à cirurgia periodontal, no entanto, nenhum procedimento controle foi incluído neste estudo. Os resultados obtidos um ano após a terapia regenerativa revelaram um ganho médio de inserção de 4,6mm e um ganho ósseo radiográfico de 2,9mm em média, ou o equivalente a uma média de 69% de preenchimento ósseo do defeito original. Os autores também consideraram que a média obtida no ganho de inserção foi superior a de estudos publicados anteriormente, principalmente devido à instituição do mesmo controle rígido de placa e da realização de tratamento periodontal com raspagem subgengival previamente à terapia regenerativa.

Ainda avaliando as modificações nos parâmetros clínicos de sondagem após tratamento regenerativo de defeitos periodontais intra-ósseos com proteínas da matriz do esmalte, Sculean *et al.* (1999c) publicaram um estudo documentando 32 casos clínicos. Os defeitos angulares apresentavam 2 e 3 paredes ósseas e um componente intra-ósseo de pelo menos 6mm no início do estudo. Decorridos 8 meses de pós-operatório, constatou-se uma média de redução da profundidade de sondagem de 4,4mm, uma média de recessão gengival de 1,5mm e um ganho médio no nível de inserção de 3,0mm. A avaliação radiográfica foi apenas qualitativa, revelando uma formação de tecido ósseo em 26 dos 32 defeitos.

Atualmente, a proteína da matriz do esmalte (PME), disponível comercialmente como EMDOGAIN,[®] foi designado para aplicação tópica em superfícies radiculares comprometidas periodontalmente durante cirurgia periodontal com retalho de espessura total, apresentando-se como um gel viscoso, e que deve ser aplicado por meio de uma seringa no defeito intra-ósseo, de acordo com as instruções do fabricante.

A viscosidade da formulação é dependente do pH e da temperatura. Esta formulação é solúvel numa temperatura baixa e num pH ácido ou alcalino, no entanto, quando as condições fisiológicas são estabelecidas (pH 7.4, 36° C), a viscosidade diminui gradualmente e a solução se precipita formando uma matriz de proteínas insolúveis e aderentes sobre a superfície radicular (Gestrelius *et al.*, 1997a).

O aspecto de segurança do tratamento com proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMDOGAIN[®]) foi avaliado tanto clínica quanto imunologicamente por Zetterstrom *et al.* (1997), em 107 pacientes teste e 33 pacientes controle. Não foi demonstrado nenhum efeito adverso que não fosse o normalmente esperado após as cirurgias periodontais com sua aplicação. As análises das amostras de sangue não indicaram alterações nos níveis de anticorpos específicos, estabelecidos antes do tratamento repetido com o derivado da matriz do esmalte, nem mesmo em pacientes propensos a reações alérgicas.

Zetterstrom *et al.* (1997) também consideraram que a exposição do organismo às proteínas da matriz do esmalte que ocorre durante os primeiros estágios do desenvolvimento dental em crianças parece induzir normalmente uma tolerância a essas proteínas que são reconhecidas pelo sistema imune como “proteínas próprias”. Alterações na estrutura e conformação da proteína ou a ocorrência de proteínas não relacionadas poderiam ser possíveis fatores para uma resposta imune negativa ao produto, contudo, as proteínas do esmalte ficam virtualmente inalteradas durante a evolução (Slavkin & Diekwisch, 1996). Outro aspecto é que parece haver ainda uma homogeneidade entre a proteína humana e a suína, encontrada no EMDOGAIN[®], o que pode explicar a ausência de reações adversas.

Embora as PME não contenham fatores de crescimento, estas aumentam os níveis de fator de crescimento de transformação (TGF β), tanto pelos fibroblastos oriundos do ligamento periodontal como dos fibroblastos oriundos do tecido conjuntivo gengival, além de estimular a atividade de fosfatase alcalina destes dois tipos de fibroblastos e a inserção e migração destas células (Van Der Pauw *et al.*, 2000).

2.4. Estudos comparativos entre PME e RTG

A regeneração tecidual guiada (RTG) é, possivelmente, um dos tratamentos mais pesquisados nos últimos anos e chega a ser classificado como “gold standard” quando se fala em regeneração periodontal (Caffesse *et al.*, 1994). As proteínas derivadas do esmalte surgiram como uma possível alternativa à utilização das barreiras, que segue não o caminho de exclusão de células, e sim o de estimulação das mesmas. Vários autores realizaram trabalhos que comparam estas duas técnicas regenerativas a fim de demonstrar a real equivalência ou superioridade na obtenção de novo cemento, ligamento e osso alveolar.

Araújo & Lindhe (1998), avaliaram o efeito das PME nos tecidos periodontais após tratamento de bifurcações classe III. Foram utilizados cinco cães, os quais receberam dois tipos de tratamento, associação de PME e membranas reabsorvíveis (grupo teste), e apenas membranas reabsorvíveis. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos em relação ao preenchimento ósseo da bifurcação. Entretanto, foram observadas diferenças significativas entre os tipos de cemento obtido. No grupo teste havia presença de cemento acelular no terço apical das raízes enquanto no grupo controle havia presença de cemento celular em toda extensão da raiz.

Donos *et al.* (1998), em um estudo em macacos, também utilizaram em defeitos de furca III a RTG e PME. Foram feitos três grupos de tratamento, um em que se utilizava a PME, outro com membranas e um terceiro que associava as duas técnicas. As análises histológicas mostraram que nos grupos onde houve a associação das terapias e no grupo

com somente RTG, ocorreu quase um recobrimento total das superfícies previamente exposta. No grupo onde foram utilizadas somente as PME não houve um completo fechamento dos defeitos em nenhum dos casos.

Pontoriero *et al.* (1999) em um estudo clínico controlado e prospectivo, com 40 pacientes, avaliaram comparativamente várias técnicas regenerativas com o efeito do tratamento cirúrgico para acesso à raspagem radicular. Foram testados três tipos diferentes de membrana e a aplicação tópica do gel de proteínas da matriz do esmalte em defeitos ósseos angulares. As quatro modalidades apresentaram resultados igualmente efetivos em relação à redução da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, sendo, contudo, as técnicas regenerativas superiores ao procedimento controle (acesso à raspagem), após o período de um ano de avaliação.

Sculean *et al.* (1999a), em uma seqüência de publicações, compararam o tratamento de defeitos intra-ósseos profundos aplicando proteínas da matriz do esmalte e regeneração tecidual guiada utilizando membranas reabsorvíveis. O estudo clínico controlado abrangeu 16 pacientes apresentando 2 defeitos intra-ósseos bilateralmente na mesma maxila, os quais foram tratados aleatoriamente com as proteínas da matriz do esmalte e com membranas reabsorvíveis, caracterizando um estudo *split-mouth*. Os resultados obtidos aos 8 meses de pós-operatório demonstraram para os sítios tratados com as proteínas da matriz do esmalte uma redução média na profundidade de sondagem de 3,8mm, uma retração gengival média de 0,8mm e um ganho médio no nível clínico de inserção de 3,1mm. Os sítios tratados com regeneração tecidual guiada apresentaram médias na redução da profundidade de sondagem de 4,0mm, na retração gengival de 1,1mm e no ganho de inserção clínica de 3,0mm. Os resultados indicaram que as duas modalidades terapêuticas melhoraram os parâmetros clínicos investigados de forma significativa e equivalente. Estes mesmos pacientes foram avaliados 3 anos mais tarde, em um estudo longitudinal (Sculean *et al.*,2001) e não houve diferenças estatísticas em relação aos resultados obtidos anteriormente, concluindo-se que o nível de inserção clínica alcançado

com o tratamento com PME e membrana pode ser mantido por um período de até quatro anos.

A resposta clínica e histológica em humanos, após tratamentos regenerativos de defeitos intra-ósseos, também foi investigada por Sculean *et al.* (1999b). O estudo compreendeu quatorze defeitos intra-ósseos avançados em dentes com extração indicada, que foram tratados preliminarmente com derivado da matriz do esmalte ou com membranas reabsorvíveis. Com seis meses de pós-operatório, os resultados clínicos demonstraram para o grupo que recebeu tratamento com as proteínas do esmalte, um ganho médio no nível de inserção de 3,2mm, e para o grupo tratado com regeneração tecidual guiada esse ganho médio foi de 3,6mm. As avaliações histométricas revelaram para o grupo tratado com as proteínas do esmalte, uma média de 2,6mm de nova inserção de tecido conjuntivo acompanhado de 0,9mm de novo osso alveolar. No grupo tratado com regeneração tecidual guiada, a média de nova inserção de tecido conjuntivo foi de 2,4mm e a média de novo osso alveolar foi de 2,1mm. A avaliação histológica também mostrou que após ambas as formas de terapia regenerativa, o cemento neoformado tinha um caráter predominantemente celular. De acordo com os resultados, os autores concluíram que ambas as formas de tratamento promovem formação de nova inserção de tecido conjuntivo, contudo, o tratamento com o derivado da matriz do esmalte pode não resultar, de forma previsível, na formação de cemento acelular em defeitos intra-ósseos humanos. Além disso, o tratamento com regeneração tecidual guiada parece promover regeneração óssea num grau maior do que o tratamento com as proteínas do esmalte.

Resultados semelhantes foram obtidos por Windisch *et al.* (2002), que também fizeram avaliações clínicas, radiográficas e histométricas em 14 dentes com defeitos periodontais avançados e indicados para extração. Oito deles foram tratados com membrana reabsorvível e seis com matriz derivada do esmalte e reavaliados seis meses após o tratamento. Os autores puderam concluir que com exceção da formação de osso, que foi melhor histometricamente no grupo de RTG, nenhuma diferença estatisticamente significativa ocorreu entre os grupos testados.

Sculean *et al.* (2000), dando continuidade aos trabalhos que compararam os tratamentos com PME e membranas reabsorvíveis, utilizaram 3 macacos com a finalidade de avaliar histologicamente a cicatrização de defeitos intra ósseos bilaterais confeccionados cirurgicamente, e concluíram que os grupos testados e a associação deles podem promover a regeneração. No grupo controle, a cicatrização foi caracterizada por um epitélio juncional longo e regeneração periodontal ficou limitada somente na porção mais apical do defeito. Os defeitos tratados com RTG apresentaram regeneração periodontal quando as membranas não foram expostas, já os defeitos tratados com PME apresentaram regeneração em várias extensões, e a combinação das terapias não demonstrou melhora nos resultados. As médias observadas de novo osso foram: membranas $2,0 \pm 1,1$ mm; proteínas derivadas do esmalte $1,4 \pm 0,9$ mm; associação $2,1 \pm 1,1$ mm; controle $0,7 \pm 1,1$ mm.

Sculean *et al.* (2001), em um estudo prospectivo utilizaram 56 pacientes com no mínimo um defeito periodontal de pelo menos 6 mm de profundidade de sondagem, e foram aleatoriamente tratados com PME, membranas reabsorvíveis, associação dos tratamentos ou controle. Nestes pacientes foram avaliados o índice de placa, índice gengival, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível de inserção, antes do tratamento e reavaliados após um ano. Os autores puderam concluir que não houve diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros avaliados nos três grupos testados entre si, e estes mesmos grupos mostraram melhores resultados, com diferenças estatisticamente significante, no nível de inserção clínica e profundidade de sondagem quando os compara ao grupo controle. Dentro deste mesmo grupo, 42 pacientes foram acompanhados durante 5 anos por Sculean *et al.* (2004) aonde eles concluíram que os resultados em curto prazo dos tratamentos CO, RTG, PME e RTG+PME puderam ser mantidos por um período de 5 anos.

Sallum *et al.* (2004), em um estudo em 7 cães, compararam o tratamento de defeitos de deiscência aplicando proteínas derivadas da matriz do esmalte e regeneração tecidual guiada utilizando membranas reabsorvíveis. Os autores concluíram que as proteínas derivadas da matriz do esmalte foram estatisticamente melhores no parâmetro de

formação de novo osso quando comparadas ao controle, porém semelhantes à RTG. Todos os outros parâmetros histométricos (osso novo, epitélio, adaptação conjuntiva, retração) não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

2.5. Impacto do consumo de cigarros de tabaco na saúde geral

O impacto do consumo de cigarros na saúde geral tem sido amplamente discutido na literatura médica. Sabe-se que o hábito de fumar está intimamente relacionado com um maior risco de doenças cardíacas e vários tipos de câncer. Observa-se ainda uma forte correlação com as doenças obstrutivas pulmonares crônicas, doenças vasculares periféricas, enfisema pulmonar, osteoporose e diabetes (World Health Organization-WHO, 2002).

A Organização Mundial da Saúde estima que o consumo de cigarros foi responsável por cerca de 3 milhões de mortes em 1990 e que esse número aumentou para cerca de 4,023 milhões de mortes em 1998. Estima-se ainda que o tabagismo será responsabilizado por 8,4 milhões de mortes em 2020, alcançando a marca de 10 milhões de mortes por ano em 2030 (WHO, 2002).

Outra estimativa da Organização Mundial da Saúde afirma que há cerca de 1,1 bilhão de fumantes no mundo. Embora o consumo de tabaco tenha diminuído nos países desenvolvidos, observa-se um grande aumento nos países em desenvolvimento. A população chinesa tem sido muito estudada no que diz respeito ao hábito de fumar, pelo fato de ser uma população jovem em que dois terços dos adultos do sexo masculino são fumantes. Foram realizados dois grandes estudos avaliando o reflexo do tabagismo nessa população. O primeiro deles investigou a causa de morte de 1 milhão de pessoas em meados da década de 80 e o segundo acompanhou fumantes adultos. Os resultados desses estudos mostraram que 12% das mortes ocorridas na China eram atribuídas ao consumo de cigarros, valor muito próximo aos encontrados em países desenvolvidos (14,5%) (WHO, 2002).

Um outro aspecto importante é a influência que a fumaça de cigarro tem sobre as pessoas que convivem com fumantes (fumantes passivos). Nos EUA, o fumo passivo provoca cerca de 3000 mortes por câncer de pulmão por ano, enquanto as outras formas de poluição em ambiente externo causam cerca de 100 mortes de câncer de pulmão por ano.

Observa-se, ainda, que a exposição à fumaça de cigarro pode agravar a asma e outros problemas respiratórios, principalmente em crianças. As substâncias presentes na fumaça de cigarro influenciam também as patologias cardíacas, pois elas afetam o músculo do coração, interferem no potencial dos vasos sanguíneos de regular a pressão arterial, aumentam a formação de bloqueios nos vasos (o que leva a ataques cardíacos) e tornam o sangue mais viscoso (WHO, 2002).

Inúmeros estudos já relataram os efeitos prejudiciais do consumo de cigarros de tabaco e do fumo passivo sobre a saúde geral, porém muitos governos relutam em tomar medidas para o controle do tabagismo pelo fato da indústria produtora de cigarros ser uma importante fonte de empregos para a população e de recursos financeiros para o governo. Entretanto, em 1999, o banco mundial realizou um estudo e constatou que medidas de restrição ao tabagismo, como o aumento dos impostos, não causaria, em longo prazo, diminuição do número de empregos e traria muitos benefícios à saúde geral da população, além de economia com gastos médicos e hospitalares (WHO, 2002).

2.5.1. Características da fumaça do cigarro

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa de gases e partículas que possui mais de 4000 substâncias potencialmente tóxicas, incluindo 43 substâncias cancerígenas (Haverstoch & Mandrachia, 1998). A fase gasosa é composta principalmente por monóxido e dióxido de carbono, nitrogênio, oxigênio, cianeto de hidrogênio, acroleína, acetaldeído, formaldeído (Silverstein, 1992). Já a fase particulada tem como constituintes principais nicotina, água, nitratos, nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Hanes *et al.*, 1991).

A composição da fumaça varia de acordo com o tipo de tabaco e também com a preparação, como compactação do fumo, comprimento da coluna, características do filtro

de papel (Ramos & Ramos, 1998). Além disso, outro aspecto importante é a temperatura de queima, que é mais alta nos fumantes que já apresentam dificuldades na respiração (Ramos & Ramos, 1998).

Quando a fumaça é inalada para dentro dos pulmões, muitos dos seus constituintes tóxicos têm partículas cujo tamanho é suficiente para afetar diretamente os cílios ou ultrapassar a barreira ciliar e penetrar na corrente sanguínea, alcançando outras regiões do organismo. Individualmente e em combinação, essas substâncias podem alterar as condições necessárias para a reparação tecidual (Silverstein, 1992). O primeiro relato dos efeitos deletérios do consumo de cigarros sobre a cicatrização foi publicado em 1977 por Mosely & Finseth, que observaram uma pior cicatrização de feridas na mão de um fumante com arteriosclerose. A partir daí, diversos trabalhos têm relacionado o tabagismo com dificuldades na reparação tecidual (Jones & Triplett, 1992; Tonetti *et al.*, 1995; Rosen *et al.*, 1996; Scabbia *et al.*, 2001).

A nicotina, o monóxido de carbono e o cianeto de hidrogênio são os elementos da fumaça de cigarro mais comumente relacionados a um pior processo de reparo (Silverstein, 1992; Haverstoch & Mandrachia, 1998). Outros componentes da fumaça de cigarro, como a acroleína e o acetaldeído, têm mostrado *in vitro* um efeito prejudicial na proliferação e adesão de células importantes para o processo de cicatrização – os fibroblastos. (Cattaneo *et al.*, 2000). Autores como Silverstein (1992), relataram ainda, que outros constituintes da fumaça de cigarro também podem ter efeitos negativos sobre a reparação tecidual.

A nicotina é a razão primária pela qual as pessoas consomem produtos do tabaco, possui alto poder viciante e seu uso crônico pode causar dependência psicológica e física (Robbers *et al.*, 1997). Ao ser utilizada, produz estimulação primária transitória seguida de depressão persistente de todos os gânglios nervosos simpáticos e parassimpáticos. Entre seus efeitos estão: taquicardia, estado de alerta, diminuição dos reflexos profundos e tônus muscular esquelético (Gennaro, 1998), além de promover uma sensação de disposição durante as primeiras horas do dia e de relaxamento, principalmente em situações de estresse (Robbers *et al.*, 1997). Presente nas folhas secas do tabaco

(*Nicotiana tabacum*) na forma de malatos ou citratos (Robbers *et al.*, 1997) é classificada como um alcalóide, inodoro e incolor. Em contato com o ar adquire cor escura e odor característico do cigarro (Ramos & Ramos, 1998). Alguns de seus efeitos podem prejudicar os processos de reparo, como a liberação de catecolaminas que diminuem a perfusão tecidual e a alteração no metabolismo dos fibroblastos (Trypton & Dabbous, 1995), além da diminuição da proliferação de hemácias, macrófagos e fibroblastos (Sherwin & Gastwirth, 1990).

O monóxido de carbono (CO) é um gás incolor, inodoro, insípido e não irritante que resulta da combustão incompleta da matéria orgânica (Klaassen, 1996). É o poluente mais encontrado na atmosfera inferior, e um grande número de mortes acontece anualmente devido a sua inalação (Klaassen, 1996). Corresponde a 4 % da fumaça de cigarro (Haverstoch & Mandrachia, 1998), sua toxicidade deve-se à alta afinidade pela hemoglobina. Esse gás se liga à hemoglobina nos capilares pulmonares e forma um composto altamente estável. Nesta forma, a hemoglobina não transporta oxigênio (O), pois ambos os gases reagem com os mesmos grupamentos da molécula (Klaassen, 1996). Como a afinidade pelo CO é cerca de 220 vezes maior que pelo O, o CO apresenta seus efeitos mesmo em baixas concentrações (Klaassen, 1996). Indivíduos normais têm níveis de CO ligado à hemoglobina que variam de 0,5 a 1,0%, já nos indivíduos fumantes esses níveis podem variar de 1 a 20 %. A redução na capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue é proporcional à quantidade de hemoglobina ligada ao CO. Entretanto, a quantidade de O disponível para os tecidos é ainda menor pela influência inibitória da carboxihemoglobina na dissociação de qualquer molécula de oxihemoglobina ainda disponível (Klaassen, 1996). Esse conjunto de fenômenos pode diminuir a quantidade de O presente nos tecidos em reparação, gerando reflexos negativos nessas áreas (Sherwin & Gastwirth, 1990).

Outro componente da fumaça de cigarro que pode influenciar negativamente a reparação tecidual é o cianeto de hidrogênio, substância altamente tóxica utilizada em produtos como inseticida e até como gás letal em execuções. O cianeto tem uma afinidade muito alta pelo ferro no estado férrico. Quando absorvido, reage prontamente com o ferro trivalente da citocromo oxidase na mitocôndria. A respiração celular é inibida resultando

em acidose láctica e hipóxia citotóxica (Klaassen, 1996). Essas alterações enzimáticas na respiração celular podem prejudicar o processo de reparação dos tecidos (Mosely & Finseth, 1977).

Os aldeídos são formados pela combustão incompleta de hidrocarbonetos e pela oxidação dessas moléculas pela luz solar (Klaassen, 1996). Existem diversos tipos de aldeídos. Os mais freqüentes na atmosfera são o formaldeído e a acroleína, presentes também na fumaça de cigarro. Outro aldeído muito comum na fumaça de cigarro é o acetaldeído. O formaldeído pode causar irritação da mucosa nasal, ocular e vias aéreas superiores. A acroleína é muito mais tóxica que o formaldeído e é uma das substâncias que confere a qualidade irritante da fumaça do cigarro. Tal substância produz diminuição da freqüência respiratória e aumento da resistência das vias aéreas superiores. Um estudo recente (Cattaneo *et al.*, 2000) observou que a acroleína e o acetaldeído alteram a proliferação e adesão dos fibroblastos gengivais *in vitro* e sugere que esses efeitos podem ocorrer *in vivo*.

2.5.2. Nicotina: Estudos *in vitro*

Alguns trabalhos *in vitro* têm demonstrado que a fumaça de cigarro e seus componentes apresentam efeitos negativos em culturas de células ósseas. Ramp *et al.* (1991) estudaram o efeito da nicotina sobre culturas de células tipo osteoblasto. Os resultados mostraram que a nicotina inibiu a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de colágeno num padrão dose-dependente. Não foram observados efeitos da nicotina sobre as proteínas não-colágenas e observou-se uma estimulação da síntese de DNA.

Em 1999, Yuhara *et al.* avaliaram a influência da nicotina sobre o metabolismo ósseo de culturas de células. Para esse estudo foram utilizadas 3 linhagens de células: clonais osteogênicas da calvária de ratos (ROB-C26), clonais pré-osteoblásticas da calvária de camundongos (MC3T3-E1) e células tipo osteoblasto retiradas de uma co-cultura de células da medula óssea de ratos. Os resultados revelaram que a nicotina estimulou a deposição de Ca e a atividade da fosfatase alcalina nas células ROB-C26. Por outro lado ambas as atividades foram diminuídas nas células MC3T3-E1. Observou-se ainda que a

nicotina afetou a diferenciação das células tipo osteoblasto. Desta forma os autores concluíram que a nicotina pode ter um efeito crítico sobre o metabolismo ósseo.

Muitos estudos também têm sido realizados com o objetivo de observar os efeitos da fumaça de cigarro e seus componentes sobre os fibroblastos. Essas células têm uma função crítica no metabolismo do tecido conjuntivo, sendo importantes para os tecidos normais e em reparação. De maneira geral, as culturas de fibroblastos apresentam-se como uma monocamada de células fusiformes, superfície lisa, alinhamento paralelo e mínima sobreposição (Trypton & Dabbous, 1995; James *et al.*, 1999). Já as culturas submetidas à ação da nicotina mostram células com arranjo desorganizado, sobreposições, anatomia alterada, vacuolização do citoplasma, redução do conteúdo protéico e destruição das membranas celulares (Raulin *et al.*, 1988; Trypton & Dabbous, 1995; Tanur *et al.*, 2000).

Peacock *et al.* (1993) também avaliaram a influência da nicotina em culturas de fibroblastos gengivais. Entretanto, seus resultados foram conflitantes com os citados anteriormente. Observou-se nesse estudo que altas concentrações de nicotina não produziram nenhum efeito nas culturas e que, em baixas concentrações, a nicotina estimulou a reprodução celular. Os autores sugeriram que a nicotina não seria a única substância envolvida nas respostas teciduais provocadas pelo tabaco e que outros agentes presentes na fumaça poderiam ser responsáveis pelos efeitos negativos.

James *et al.* (1999) investigaram a ação da nicotina e do seu metabólito primário, a cotinina, sobre culturas de fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLP). Os resultados revelaram que a nicotina inibiu a adesão e o crescimento dos FLP em todas as concentrações estudadas (>1mg/ml e >0,5 mg/ml). Já a cotinina parece inibir o crescimento e adesão dos FLP na maior concentração estudada (10 µg/ml), porém esse resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa.

2.5.3. Nicotina: Estudos *in vivo*

Em 1993, Broulik & Jarab estudaram a influência da nicotina sobre a concentração óssea mineral em ratos. Foram incluídos no estudo 32 ratos, divididos em 4 grupos iguais e

submetidos ao seguinte tratamento: A- controle, B- nicotina via água de bebedouro, C- castração e D- castração e nicotina via água de bebedouro. Após 56 dias, os animais foram sacrificados e o fêmur analisado. Os resultados revelaram que os animais dos grupos B e D (grupos que receberam nicotina) apresentaram uma significativa redução na densidade óssea e no componente ósseo mineral, quando comparados aos outros grupos.

Hollinger *et al.* (1999) avaliaram o efeito da nicotina sobre o reparo ósseo em ratos que receberam enxerto ósseo autógeno. Para isso, foram criados defeitos bilaterais (4 mm de diâmetro) na região parietal de 60 animais, nos quais o lado esquerdo servia como leito doador e era deixado cicatrizar espontaneamente, e o lado direito recebia o enxerto. Parte da amostra recebeu nicotina em 3 concentrações distintas via água do bebedouro (12,5 mg/ml, 25 mg/ml e 50 mg/ml) e foi comparada com animais que não receberam nicotina. Os resultados revelaram que não houve diferenças no reparo ósseo dos defeitos que receberam enxerto autógeno, entretanto a nicotina influenciou negativamente o reparo dos leitos doadores.

Em 1999, Fung *et al.* investigaram o efeito da nicotina sobre o osso e os hormônios calciotrópicos de ratas adultas velhas. Foram utilizados no experimento 30 animais divididos em 3 grupos: A- solução salina fisiológica (n=9), B- nicotina numa dosagem de 3mg/kg/dia através de bomba osmótica (n=10) e C- nicotina numa dosagem de 4,5mg/kg/dia através de bomba osmótica (n=11). Após 3 meses de administração de nicotina, os resultados mostraram que os animais dos grupos B e C apresentaram uma diminuição no armazenamento de vitamina D. Além disso, os ratos do grupo C mostraram uma menor área vertebral, menor densidade mineral e uma taxa de aposição óssea endocortical mais baixa quando comparados aos do grupo A.

Nociti *et al.* (2000) analisaram o papel da nicotina na progressão da periodontite induzida por ligaduras em ratos. Para isso, foram utilizados 20 ratos divididos em 4 grupos, 1 controle e 3 testes que receberam as seguintes concentrações de nicotina por ml de solução fisiológica: 0,13 µl, 0,19 µl e 0,26 µl. Concluiu-se que a nicotina potencializou a progressão da doença periodontal num padrão não dose-dependente.

Num estudo subsequente realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores (Nociti *et al.*, 2001) utilizou-se a mesma metodologia para avaliar a influência de outras dosagens de nicotina na progressão da doença periodontal em ratos (0,37, 0,57 e 0,73 mg de nicotina/kg). Os resultados desse estudo mostraram um efeito dose-dependente da nicotina sobre a progressão da doença periodontal e, além disso, observou-se que a nicotina parece ter uma ação deletéria direta sobre os tecidos periodontais.

Stefani *et al.* (2002) avaliaram a influência da nicotina sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio. Foram utilizados nesse experimento 32 coelhos que receberam 2 implantes em cada tíbia (um de superfície usinada e um jateado com óxido de alumínio). Após a colocação dos implantes, os animais foram divididos em 4 grupos que receberam: a) solução fisiológica, b) 0,18 mg de nicotina/kg/dia, c) 0,56 mg de nicotina/kg/dia e d) 0,93 mg de nicotina/kg/dia. Aos 42 dias pós-operatórios, os animais foram sacrificados e secções não descalcificadas foram analisadas histometricamente através dos seguintes parâmetros: contato direto osso-implante e preenchimento ósseo das roscas. Embora tenha sido observado uma tendência numérica de que a nicotina influenciou negativamente o contato ósseo para os implantes de superfície usinada, essa diferença não foi estatisticamente significativa (média + desvio padrão: a) 34,98 + 7,52; b) 33,58 + 6,4; c) 30,13 + 4,97; d) 27,79 + 3,93). Concluiu-se, nesse estudo, que a nicotina parece não influenciar o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio.

Em 2003, César Neto *et al.* investigaram a influência da administração de nicotina, pela forma da inalação da fumaça e da aplicação sistêmica, na cicatrização óssea ao redor de implantes. Quarenta e cinco animais foram utilizados e divididos em 3 grupos: controle, inalação e aplicação subcutânea. Observou-se uma menor formação óssea ao redor de implantes de titânio em ratos que inalaram fumaça, já os ratos que receberam injeções de nicotina apresentaram resultados intermediários entre o grupo controle e o grupo que inalou fumaça sugerindo que o impacto do fumo no sucesso dos implantes, talvez esteja relacionado a mais de uma molécula presente no cigarro, e a nicotina parece contribuir parcialmente com os resultados negativos.

2.5.4. Técnicas Regenerativas na presença do fumo

Em 1995, Tonetti *et al.* movidos pelas constantes pesquisas que afirmavam haver uma pior resposta cicatricial em pacientes fumantes, delinearam um trabalho clínico com 51 pacientes em 71 defeitos intra ósseos em 51 pacientes, que foram tratados com regeneração tecidual guiada. Vinte pacientes (32 defeitos) fumavam mais de 10 cigarros por dia enquanto que o restante (31 pacientes com 39 defeitos) não fumavam. A higiene de ambos os grupos foi boa, porém os pacientes fumantes tinham índices de placa significativamente maiores do que os não fumantes. Nenhuma diferença clínica significativa em relação à porcentagem de tecido ganho no momento da remoção da membrana foi observada, porém após um ano de acompanhamento os pacientes fumantes ganharam menos inserção clínica do que os não fumantes. Concluiu-se que o fumo está associado com uma resposta reduzida após o tratamento com RTG, e pode ser o responsável, pelo menos em parte, pelos resultados observados neste estudo.

Trombelli *et al.* (1997) avaliaram a resposta cicatricial de recessões tratadas com a técnica da regeneração tecidual guiada na presença do fumo. Para isso, 22 pacientes fumantes e 13 não fumantes foram tratados com membranas de PTFE-e. A taxa de exposição da membrana foi significativamente maior nos pacientes fumantes, assim como a recessão residual. Os autores concluíram que os resultados do tratamento das recessões com a RTG é prejudicado pelo fumo.

Um estudo multicêntrico clínico e controlado foi realizado por Tonetti *et al.* (2002), com o objetivo de comparar a preservação da papila em defeitos intra ósseos profundos, com e sem o uso das PME. O fumo não foi o objetivo central, porém não foi um fator de exclusão deste experimento (até 20 cigarros/dia). Doze centros de estudo em 7 países participaram e foram incluídos na pesquisa 172 pacientes, que apresentassem pelo menos um defeito intra ósseo $\geq$ a 3mm. Foi instituído um rigoroso controle de placa pós-operatório. Os resultados deste estudo permitiram concluir que a cirurgia periodontal regenerativa com o uso das PME ofereceu benefícios em relação ao ganho de inserção clínica, redução da profundidade de sondagem e previsibilidade dos resultados quanto a

preservação da papila. Porém, os autores discutem que existem algumas variáveis que influenciam na resposta dos pacientes e provavelmente o fumo é uma das mais importantes.

3. PROPOSIÇÃO

A proposta do presente estudo foi avaliar, histometricamente, a resposta de defeitos ósseos do tipo deiscência, criado cirurgicamente em cães, tratados pela técnica de Regeneração Tecidual Guiada e da utilização de Proteínas Derivadas da Matriz do Esmalte, na presença de nicotina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos Animais

Foram utilizados 8 cães de raça indefinida (peso aproximado de 15 kg), em bom estado de saúde geral e que apresentaram dentição completamente erupcionada, em boas condições e saúde periodontal. Os animais foram submetidos a tratamento profilático, incluindo vacinação, dieta adequada e higiene corporal de acordo com a orientação do Biotério Central da UNICAMP.

4.2 Anestesia

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados após execução de anestesia, seguindo-se os passos:

-previamente à anestesia geral foi utilizada solução de cloridrato de dihidrotiazina 1,5ml/10 kg (Rompun® - Bayer do Brasil S.A., São Paulo, SP), aplicada por via intra-muscular. Este medicamento provoca relaxamento muscular generalizado, facilitando a anestesia geral posterior.

- anestesia geral com solução Tiopental Sódico a 25% (Tiopental®, Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda, Itirapina, SP, Brasil), via intravenosa, na dosagem de 0,5 ml/kg de peso corporal, sendo a via de administração mantida com soro fisiológico durante o ato cirúrgico, possibilitando doses de manutenção e hidratação.

- anestesia local com lidocaína 2% (Merrel Lepetit Farmacêutica Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil), contendo epinefrina (1: 50.000), com o objetivo de reduzir a hemorragia e assegurar um efeito anestésico adequado.

4.3. Criação dos Defeitos

Após incisão intra-sulcular, um retalho vestibular, de espessura total, abrangendo a região dos pré-molares inferiores (do 1º molar ao 1º pré-molar) foi cuidadosamente elevado (figura 1). Com auxílio de microcinzéis, foi realizada a remoção de parte da tábua óssea vestibular, criando-se uma deiscência de 6 x 4 mm, sobre as raízes mesiais dos 3º e 4º pré-molares de ambos os lados da mandíbula (figura 2). A superfície radicular foi instrumentada até a remoção do cimento radicular. Uma tira matriz do tipo Tofflemire, recortada de forma a

adaptar-se à anatomia do defeito criado, foi fixada à superfície coronária através do uso de fios de amarrão ortodônticos 0,016mm (Morelli® Dental Morelli Ltda) e resina fotopolimerizável (Z100® 3M do Brasil), ficando justaposta à área do defeito (figura 3). O retalho foi adaptado em sua posição original e suturado com fio de sutura reabsorvível de vicryl 4-0 (Ethicon® - Johnson & Johnson, São Paulo) através de sutura interrompida interproximal. Após a cirurgia foi aplicado, por via intramuscular, solução analgésica de Dipirona Sódica 500mg (D500® Fort Dodge, Campinas-S.P. Brasil). Durante três meses as tiras metálicas permaneceram em posição, permitindo acúmulo de placa e inflamação gengival (figura 4).

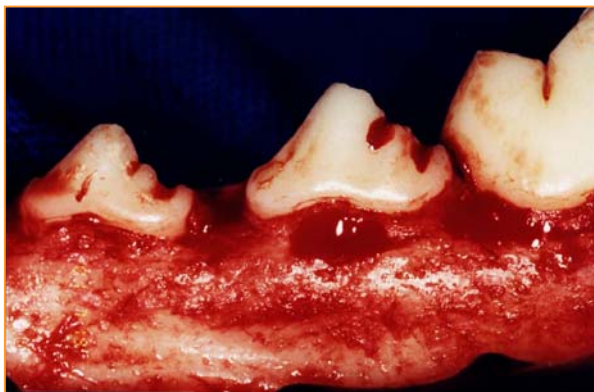


Figura 1- Exposição da tábua óssea vestibular, após retalho de espessura total



Figura 2 – Defeitos criados na raiz mesial



Figura 3 - Matriz fixada e adaptada ao defeito



Figura 4 - Após 3 meses de colocação das placas, observando o acúmulo de placa

4.4. Tratamento dos Defeitos

Após 3 meses da criação dos defeitos, as tiras de matriz foram removidas, executando-se instrumentação radicular com o objetivo de desinflamação dos tecidos para prepará-los para fase cirúrgica posterior. Decorridos 7 dias, durante os quais foi aplicada, diariamente, solução de digluconato de clorexidina a 0,12%, os retalhos foram novamente rebatidos, as superfícies radiculares instrumentadas, com curetas de Garacey 5/6, e os defeitos ósseos expostos (figura 5). Sulcos de referência, com o objetivo de viabilizar os procedimentos histométricos, foram executados na superfície radicular, um ao nível da crista

óssea do defeito, demarcando o limite apical, e outro ao nível da junção cimento-esmalte demarcando o limite coronário, com a utilização de broca esférica (Carbide 1/2- KG-Sorensen®, São Paulo) em alta rotação, sob irrigação com soro fisiológico.

Os defeitos foram tratados da seguinte forma:

- grupo 1- **CONTROLE** (CO): os sítios foram tratados pela técnica convencional de instrumentação radicular, com raspagem e alisamento radicular (figura 6).
- grupo 2- **MEMBRANA REABSORVÍVEL RESOLUT XT®** (RTG): após a instrumentação radicular, os sítios receberam as membranas reabsorvíveis de ácido polilático e poliglicólico.(Resolut XT Regenerative Material ,W.L.,Gore Associate Inc., Flagstaff,Az,USA) , adaptadas e suturadas sobre o defeito de forma a cobri-lo totalmente e com sobreposição às margens ósseas (figura 6).
- grupo 3 – **PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DO ESMALTE** (EMDOGAIN®) (PME): após a instrumentação radicular, as raízes expostas foram condicionadas durante 2 minutos com EDTA 24% (Prefgel® - Biora AB, Malmo – Sweden) e lavadas com soro fisiológico durante 1 minuto. Após o condicionamento, os sítios receberam a matriz derivada de esmalte (Emdogain® - Biora AB, Malmo – Sweden) , colocadas sobre o defeito de forma a banhá-lo totalmente (figura 7).

Os defeitos foram aleatoriamente distribuídos para receberem os tratamentos, porém, para que não houvesse o risco de contaminação da proteína em grupos que não a utilizavam, determinou-se que quando se sorteasse o grupo que utilizava o tratamento com Proteína Derivada da Matriz do Esmalte, o dente ao lado não receberia o outro tratamento.

Portanto, cada animal recebeu três tipos de tratamento, em um tipo de desenho experimental de boca dividida (“split mouth”). Os retalhos foram suturados, em todos os grupos, numa posição mais coronária (aproximadamente 1-2 mm), com fio monofilamento Gore-tex (Regenerative Material,W.L.,Gore Associate Inc., Flagstaff, Az-USA) (figura 8). As suturas dos retalhos foram removidas em duas semanas.

Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos e quatro dias depois, os cães receberam uma dose de antibiótico de uso veterinário de Penicilina/Estreptomicina (Pentabiótico Veterinário- laboratórios WYETH Ltda, São Paulo). A alimentação dos animais foi feita com dieta pastosa e um regime de aplicação tópica de digluconato de clorexidina a 0,12% foi instituído, diariamente, até o sacrifício dos animais.

No dia seguinte ao tratamento os animais começaram a receber as aplicações diárias de nicotina sistêmica de maneira subepitelial (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA), na concentração de 2mg/kg, duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas entre as aplicações. Este regime foi mantido durante o período de cicatrização, que foi de 4 meses.

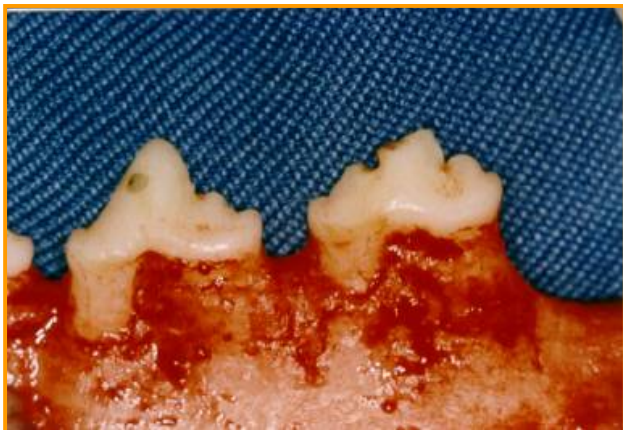


Figura 5- Exposição da tábua óssea vestibular, após retalho de espessura total rebatido



Figura 6 - Tratamento com RTG e CO, respectivamente



Figura 7 -Tratamento com PME



Figura 8 - Sutura coronária do retalho

4.5 Dosagem de Nicotina e Cotinina

No primeiro e último dia em que os animais receberam nicotina, amostras de sangue foram coletadas para avaliação da concentração de nicotina e cotinina no plasma. A primeira amostra foi coletada 15 minutos após a aplicação da nicotina e as outras amostras

foram coletadas a cada hora, até completar um período de 8 horas. Utilizou-se o sistema Vacuteiner 6ml, com o anticoagulante EDTA. As concentrações de nicotina e cotinina foram avaliadas através de método de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) compostas por duas bombas (LC-10 Advp, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), programadas por um sistema controlador (SCL-10 Advp, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), um detector de UV-Vis (SPD- 10 Advp, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) ajustado a 260nm e uma coluna Luna (Column Luna, Phenomenex, USA-150mm X 4,6mm I.D. X5µm). A fase móvel consistia de 20mM de fosfato de potássio dibásico, 20mM de fosfato de potássio monobásico contendo 0.1% de trietilamina. O pH da solução foi ajustado para 6.3 de ácido fosfórico e acetonitrila (10%) foi adicionada à solução final. Todos os reagentes utilizados para realização da medida foram graduados de acordo com HPLC. A extração das amostras seguiu a metodologia previamente descrita por Nakajima *et al.*, 2000, porém elas foram secas sob nitrogênio em temperatura ambiente. O volume da injeção das amostras era de 20µL e o limite de quantificação foi de 10ng/ml.

4.6 Sacrifício dos Animais

Decorridos 4 meses do procedimento cirúrgico de tratamento e de aplicação de nicotina, os animais foram anestesiados e sacrificados com uma dose letal de solução de pentobarbital sódico a 3% e 20ml de cloreto de potássio (KCL). As arcadas foram dissecadas e subdivididas em blocos, representando as áreas experimentais.

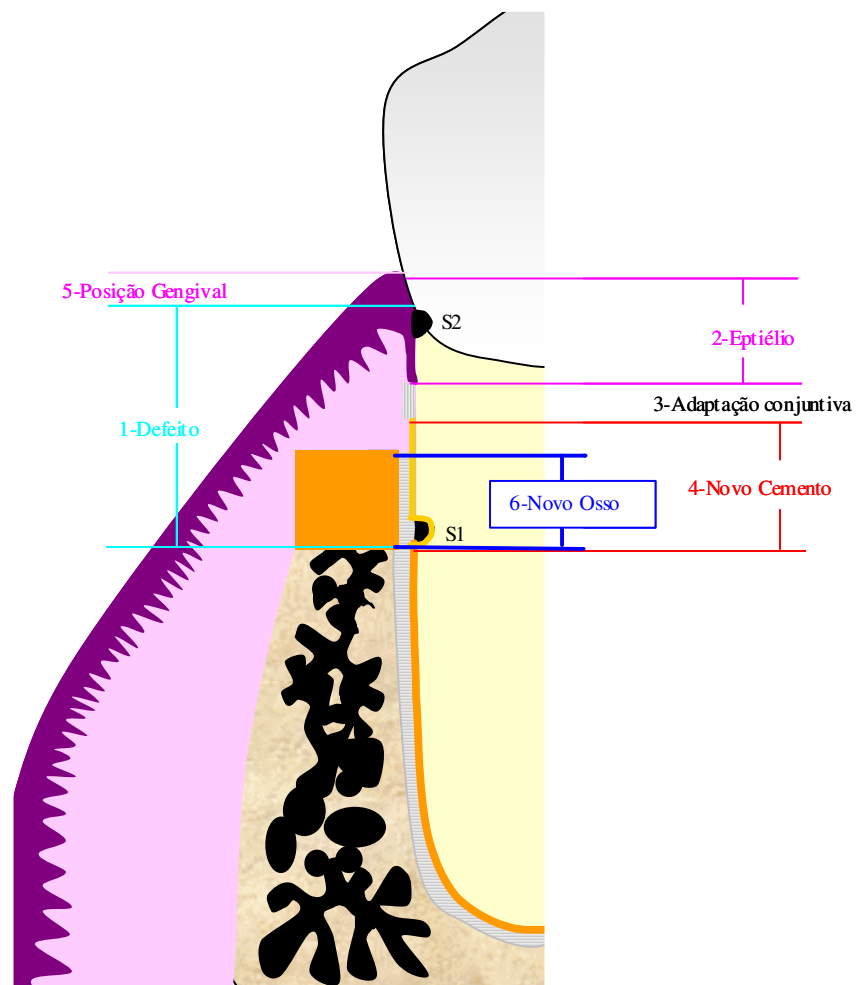
4.7. Processamento do Material

Os blocos foram colocados imediatamente em solução tamponada de formol a 10% para fixação, permanecendo nesta solução por uma semana. Após lavagem em água corrente, os blocos foram então descalcificados em solução de Morse (ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20%, em partes iguais). As peças foram envolvidas em compressa de gaze e colocadas suspensas de maneira a ficarem submersas na solução, porém sem entrar em contato com o fundo do recipiente. Após 1 mês no descalcificador, as peças foram reduzidas, selecionando-se a raiz mesial. A solução de descalcificação foi trocada a

cada dois dias, sendo o tempo total de descalcificação previsto de 3-4 meses. O progresso da descalcificação foi avaliado com perfuração das áreas em que não havia interesse direto. Os espécimes descalcificados foram lavados em água corrente, colocados em solução de sulfato de sódio a 5% por 48 horas, novamente lavados, procedendo-se o processamento laboratorial de rotina com desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados, com espessura de 7 µm e orientação vestibulo-lingual, corados com H.E. e Tricrômico de Masson.

4.8. Histometria

Foram utilizadas 5 lâminas representativas do terço mediano da raiz para as medidas histométricas e posteriormente calculada a média final de cada parâmetro. As imagens foram digitalizadas e a histometria foi realizada utilizando os seguintes equipamentos: um microscópio óptico Diastar (Cambridge Instruments, Buffalo, NY, USA), com objetiva para aumento de 2,5/0,10, acoplado a uma câmera de vídeo DXC-107 A/107 AP (Sony electronics inc., Japan). Adaptado ao microscópio, um microcomputador 486 DX-66 mhz e um software analisador de imagens (Mocha, Jandel Scientific, San Rafael, L.A., USA). A avaliação histométrica foi realizada tomando-se como referência o sulco apical (S1) e o sulco coronário (S2) e consistiu das seguintes distâncias (Esquema I):



Esquema I: Referências das distâncias histométricas avaliadas

1- limite apical do sulco apical ao limite coronário do sulco coronário = **Extensão do defeito**

2-distância da margem gengival ao limite apical do epitélio juncional = **Extensão do epitélio**

3-limite apical do epitélio juncional ao limite coronário do novo cimento = **Extensão da adaptação conjuntiva**

4-limite apical do sulco apical ao limite coronário do novo cimento = **Extensão do novo cimento**

5- margem gengival ao limite coronário do sulco coronário = **Posição Gingival**

6-limite apical do sulco apical à crista óssea = **Extensão de Novo Tecido Ósseo**

A extensão do **Epitélio Sobre A Raiz** foi calculada subtraindo-se da extensão do epitélio total a extensão da posição gengival.

4.9. Análise Estatística

Os resultados histométricos foram submetidos à análise estatística e foi verificado não haver normalidade entre os dados. Desta forma, teste não paramétrico de Friedman foi realizado entre os grupos.

5. RESULTADOS

5.1. Observações Clínicas

Clinicamente, o processo de cura demonstrou-se favorável em todos os grupos. O recobrimento completo foi obtido em 18 dos 24 defeitos utilizados. Dois sítios pertencentes de cada grupo (CO, RTG e PME) apresentaram retração gengival residual entre 0,5mm e 1,4mm.

5.2. Observações Histológicas

Em todos os grupos, o padrão de cura observado foi o desenvolvimento de um epitélio juncional na parte coronária do defeito, atingindo áreas mais apicais no grupo controle (figura 9). Uma camada contínua de novo cemento foi formada nos espécimes de todos os grupos estendendo-se coronariamente em diferentes graus, entretanto, no grupo PME (figura 10), a extensão coronária do novo cemento foi mais evidente do que no grupo Controle. O grupo RTG se apresentou em uma posição intermediária em relação à quantidade de cemento, entre o controle e o grupo que utilizou matriz derivada do esmalte, sendo que em alguns espécimes foram encontrados restos da membrana ainda não reabsorvida (figura 11). Regeneração ocorreu em todos os grupos, principalmente na parte apical do defeito, porém no grupo PME a regeneração se estendeu um pouco mais coronariamente. O cemento formado após a aplicação da PME, foi predominantemente cemento celular (figura 12).

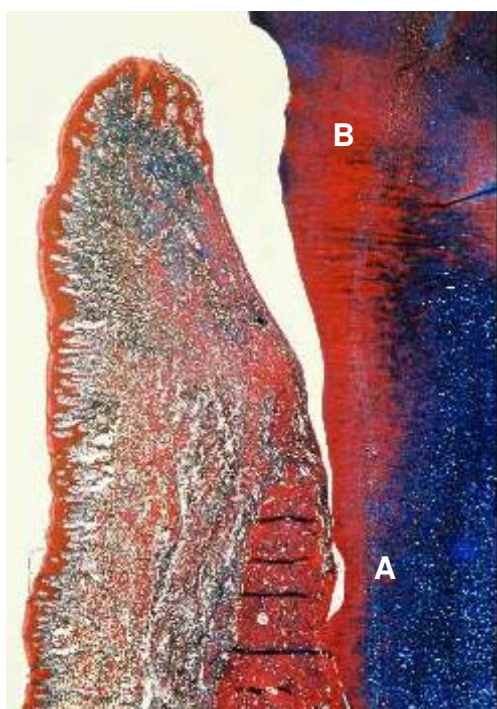


Figura 9 - Grupo CO: aumento de 2,5X, sulco apical (A), sulco coronário (B). Coloração de Tricrômico de Masson.

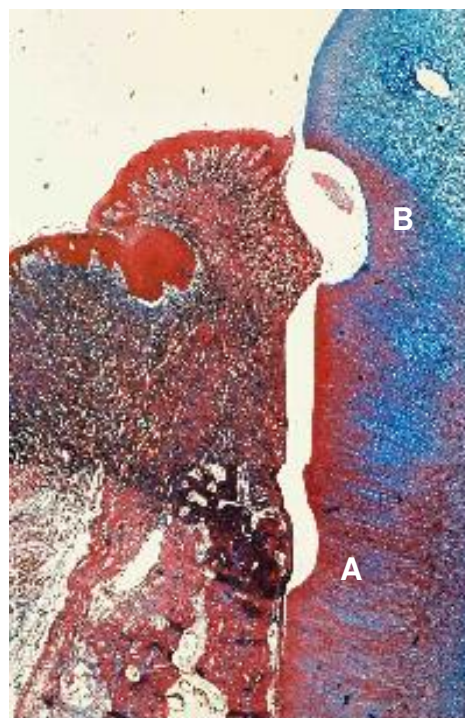


Figura 10 – Grupo PME: aumento de 2,5X, sulco apical (A), sulco coronário (B). Coloração de Tricrômico de Masson.

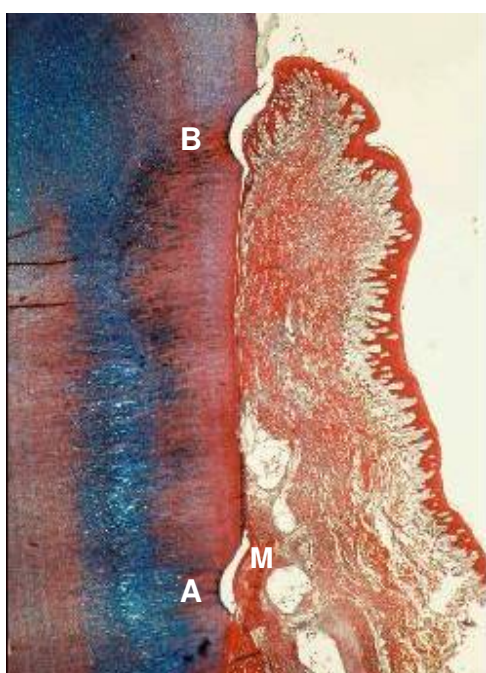


Figura 11- Grupo RTG: aumento de 2,5X, sulco apical (A), sulco coronário (B). Restos da membrana ainda não reabsorvidos (M). Coloração de Tricrômico de Masson.

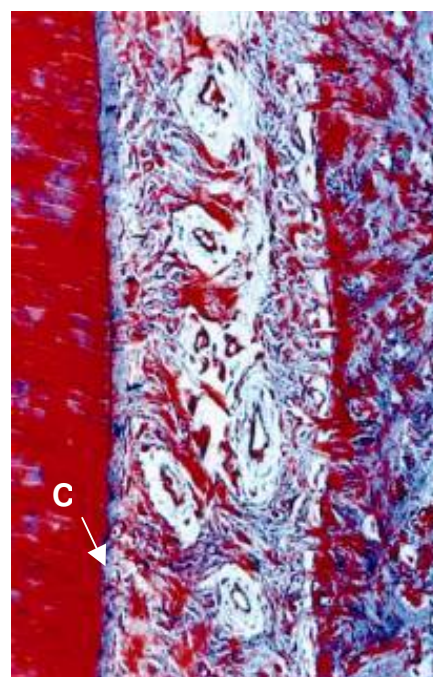


Figura 12- Grupo PME: área de ligamento periodontal e de formação de cemento celular (C). Coloração de Tricrômico de Masson.

5.3. Observações Histométricas

Os resultados histométricos de posição gengival, epitélio total, epitélio na raiz, adaptação conjuntiva, novo cimento, novo osso, posição gengival, recessão e tamanho do defeito são mostrados na tabela 1. Considerando as médias em milímetros, houve diferença estatisticamente significativa na extensão de novo cimento. O grupo PME ($5,32 \pm 0,73\text{mm}$) demonstrou obter maior formação de cimento do que o grupo CO ($3,6 \pm 1,1\text{mm}$) ($p \leq 0,05$), porém, não apresentaram diferenças estatísticas significantes quando comparados ao grupo RTG ($4,05 \pm 1,8\text{mm}$). Quanto à formação de epitélio, o grupo PME ($0,63 \pm 0,35\text{mm}$) teve uma menor formação epitelial, seguido no grupo RTG ($1,23 \pm 0,99\text{mm}$) e do grupo CO ($1,71 \pm 0,61\text{mm}$) porém, sem diferenças estatísticas significantes. O grupo PME teve uma formação de adaptação conjuntiva de $0,36 \pm 0,27\text{mm}$, enquanto que os grupos RTG e CO tiveram uma adaptação de $0,15 \pm 0,21\text{mm}$, também sem diferenças estatísticas significantes. A formação de novo osso foi maior no grupo PME ($2,52 \pm 1,34\text{mm}$) e os grupos CO e RTG obtiveram neoformações ósseas semelhantes ($1,55 \pm 0,93\text{mm}$ e $1,56 \pm 0,96\text{mm}$ respectivamente) e sem diferenças estatísticas significantes. Quanto ao parâmetro de recessão gengival, o grupo CO apresentou recessão de $0,36 \pm 0,48\text{mm}$, o grupo RTG de $0,25 \pm 0,34\text{mm}$ e o grupo PME de $0,02 \pm 0,07\text{mm}$, igualmente sem diferenças estatísticas significantes.

Tabela 1: Média, desvio padrão (DP) e mediana (em mm) para os parâmetros avaliados no grupo controle (CO), regeneração tecidual guiada (RTG) e proteína derivada da matriz do esmalte (PME).

	CO (n=8) Média ± DP mediana	RTG (n=8) Média ± DP mediana	PME (n=8) Média ± DP mediana	P *
Epitélio	1,71±0,61 1,65	1,23±0,99 0,85	0,63±0,35 0,55	0,07
Adaptação	0,15±0,22	0,15±0,21	0,36±0,27	0,41
Conjuntiva	0,05	0,05	0,35	
Novo Cimento	3,60±1,14 B 3,65	4,05 ±1,80 AB 4,20	5,32± 0,73A 5,30	0,01 *
Novo Osso	1,55±0,93 1,55	1,56±0,96 1,25	2,52± 1,34 2,45	0,09
Recessão	-0,36± 0,48	-0,25± 0,34	-0,02± 0,07	0,31
Gengival	-0,3	0	0	
Defeito	5,85± 1,05 5,75	5,66± 1,13 5,35	6,36± 0,71 6,25	0,07

*Médias com letra diferentes são diferentes estatisticamente. ($P \leq 0.05$) –
Teste de Friedman.

5.4. Observações Plasmáticas

O período de monitoramento dos níveis séricos de cotinina e nicotina demonstraram um padrão similar no primeiro e último dia de administração da nicotina (gráficos 1 e 2). O nível sérico mais alto de nicotina foi observado 15 minutos após a administração e uma redução tempo-dependente ocorreu. Foi observada uma significativa redução do nível sérico da nicotina após a primeira hora, havendo uma tendência à estabilização após a terceira hora. Com relação aos níveis séricos da cotinina, o valor mais alto foi observado após a primeira hora, sendo que uma tendência de estabilização foi notada após a quarta hora. Interessante notar que, no primeiro dia de administração da nicotina, os níveis séricos de nicotina/cotinina foram ligeiramente maiores que no último dia de administração.

GRÁFICO 1- Concentração plasmática de nicotina dos 15 aos 480 minutos após a primeira aplicação subcutânea de nicotina no primeiro (A) e no último dia (B).

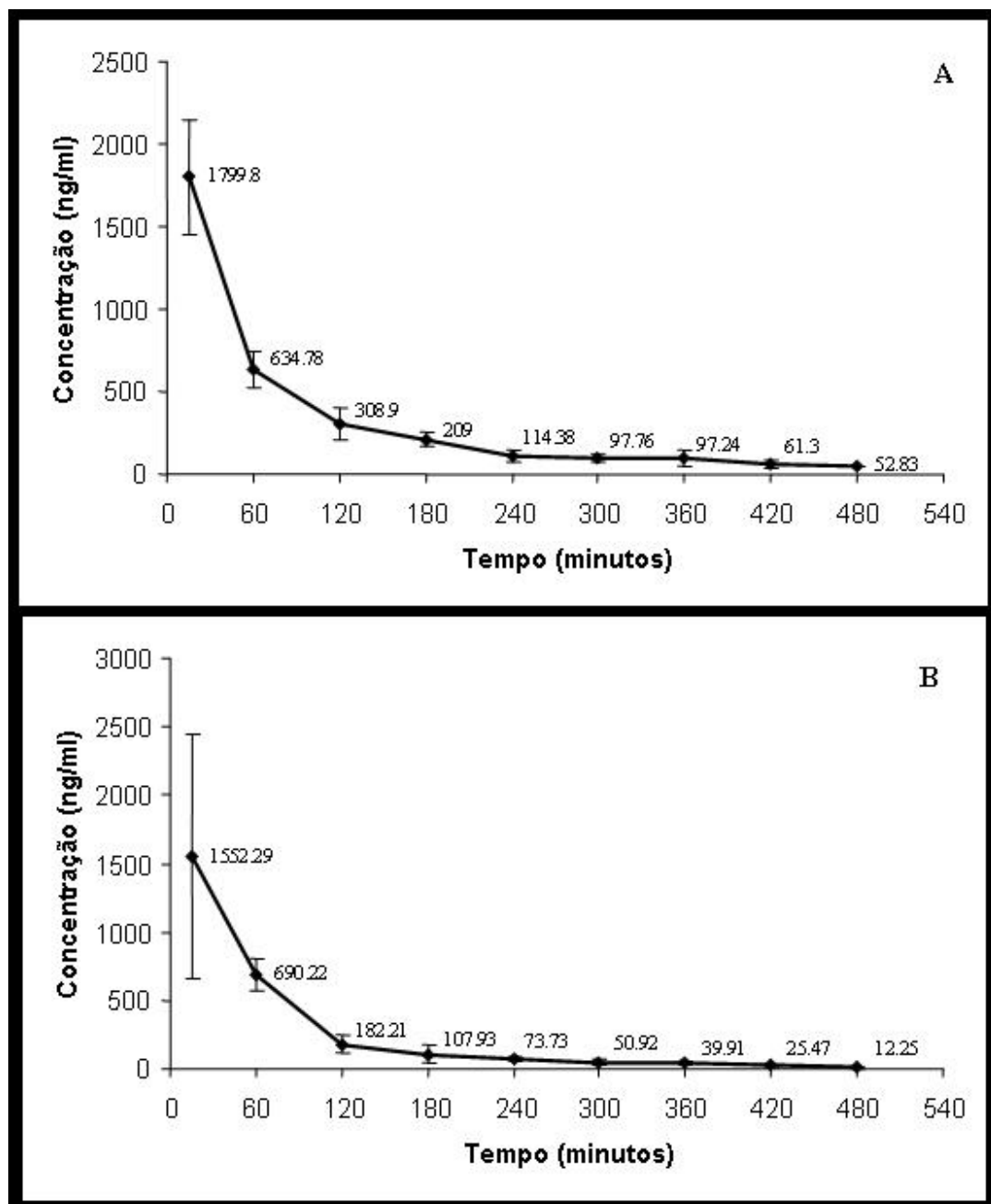
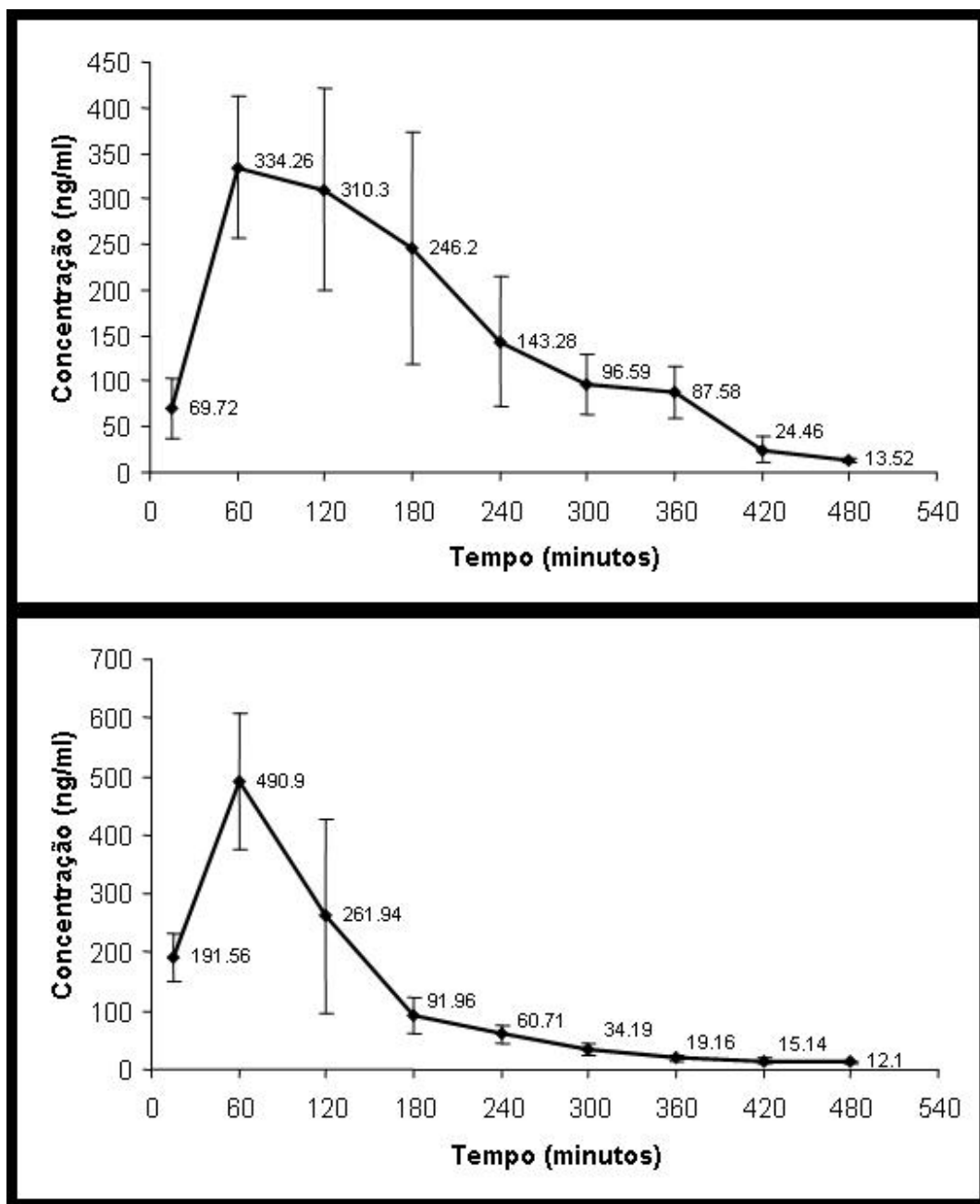


GRÁFICO 2- Concentração plasmática de cotinina dos 15 aos 480 minutos após a primeira aplicação subcutânea de nicotina no primeiro (A) e no último dia (B).



6. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar histometricamente, a resposta de defeitos ósseos do tipo deiscência, criado cirurgicamente em cães, tratados pela técnica de Regeneração Tecidual Guiada (Resolut XT ®) e da utilização de Proteínas Derivadas da Matriz do Esmalte (Emdogain®), na presença de nicotina. O grupo que utilizou a proteína derivada da matriz do esmalte mostrou resultados quantitativos estatisticamente superiores ao grupo controle, em relação à formação de cemento. Todos os outros parâmetros avaliados não tiveram diferenças estatísticas significativas.

Diante da dificuldade em se avaliar histologicamente em humanos o tipo de reparação conseguida após técnicas regenerativas, devido aos aspectos éticos relacionados à obtenção de biópsias em bloco, modelos animais são geralmente utilizados. Histologicamente, estudos em primatas não humanos mostraram que em modelo de defeito agudo cirurgicamente criado, pode ser esperada regeneração espontânea de aproximadamente 50 a 70%, o que leva a uma dificuldade em interpretar os resultados (Caton *et al.*, 1994). No presente estudo, optou-se pela criação cirúrgica dos defeitos de deiscência em pré-molares inferiores (p3 e p4), seguido por cronificação destes defeitos por um período de 3 meses de acúmulo de placa bacteriana. Este período que antecede o tratamento dos defeitos permite que o possível potencial de regeneração espontânea do defeito não seja incluído na avaliação histométrica, já que o ponto de referência apical para as medições foi colocado sobre as raízes no momento da realização dos tratamentos a serem avaliados (Kon *et al.*, 1991). A metodologia utilizada neste experimento por meio da criação cirúrgica de defeitos, permitiu a obtenção de defeitos de deiscência bilaterais semelhantes entre si (tabela 1), e manutenção de uma altura óssea interproximal, o que seria difícil de se obter com defeitos induzidos por ligadura.

Quanto ao efeito que o uso de cigarros exerce sobre às técnicas regenerativas periodontais, o número de estudos é limitado. Poucos trabalhos, como de Tonetti *et al.* (1995) e Trombelli *et al.* (1997), avaliaram clinicamente a influência do consumo de cigarros sobre os resultados obtidos pela técnica de Regeneração Tecidual Guiada, e ambos

relataram que clinicamente o paciente fumante apresenta uma pior resposta após o tratamento com RTG em relação aos parâmetros avaliados. Nenhum trabalho clínico avaliou a resposta das proteínas derivadas da matriz no fumante. Portanto este é o primeiro trabalho histológico que estuda o efeito que a nicotina (um dos principais componentes do cigarro) exerce sobre as técnicas de regeneração na presença da nicotina.

Existe pouca informação a respeito da concentração plasmática de nicotina e cotinina após a administração subcutânea de nicotina. Desta forma, este estudo foi realizado com o objetivo de se alcançar concentrações plasmáticas semelhantes a de um fumante. As amostras de sangue foram coletadas aos 15 minutos e a cada hora, durante um período de 8 horas, no primeiro e no último dia em que os cães receberam a aplicação subcutânea de nicotina. Estes dias foram escolhidos para avaliar se as aplicações de 2mg/kg alcançariam a média das concentrações de um indivíduo fumante e se haveria algum efeito cumulativo durante todo o período de utilização da droga (4 meses). Embora altas taxas de concentração tenham sido alcançadas (nas primeiras 4 horas), nossos dados se mostram similares àqueles relatados em fumantes (González *et al.*, 1996) que consomem cerca de 20 a 30 cigarros/dia. Além disso, mesmo a droga tendo sido usada por um longo período, as concentrações de cotinina/nicotina se mostraram similares no primeiro e último dia, não havendo nenhum efeito cumulativo.

Embora o delineamento deste estudo tenha alcançado as concentrações plasmáticas de um paciente fumante, é importante ressaltar que existem diferenças morfológicas e fisiológicas entre humanos e cães sendo o metabolismo do cão mais rápido do que o dos seres humanos. Além disso, o fumante mantém esta alta concentração durante todo seu tempo em vigília, fumando um cigarro a cada 15 minutos ou a cada meia hora, somente abaixando esta concentração durante o sono. Já o presente estudo, manteve ao longo do dia 2 picos de alta concentração plasmática que diminuía gradativamente até a próxima aplicação. Outras formas de aplicação, como o uso de mini bombas osmóticas subcutâneas utilizadas por Riebel *et al.* (1995) e Fung *et al.* (1999) ou ainda a administração da nicotina na água de consumo, utilizado por Hollinger *et al.* (1999), talvez

pudessem ter sido empregadas, porém esta última metodologia dificulta a quantificação das doses consumidas pelos animais, e as minibombas são ativadas durante todo o dia, mantendo a alta concentração plasmática constante.

Clinicamente, nos sítios que receberam tratamentos regenerativos se observou aspecto pós-operatório favorável, ou seja, ausência de inflamação gengival. As medidas tomadas com objetivo de evitar a contaminação (antibiótico/ clorexidina) associadas à biocompatibilidade do material que compõe a barreira (Caffesse *et al.*, 1994, Pereira *et al.*, 2000) e as proteínas derivadas da matriz do esmalte (Hammastron *et al.*, 1997b, Zetterström *et al.*, 1997), foram efetivas na manutenção de saúde gengival, com aspectos semelhantes ao grupo controle.

O padrão de cicatrização observado no presente estudo em defeitos tratados com raspagem e alisamento radicular seguido de reposicionamento de retalho (CO) caracterizou-se pela formação de um epitélio longo se estendendo em direção apical (1,71mm). Nos defeitos tratados com técnicas regenerativas houve uma tendência para a formação de um epitélio menos extenso quando comparado ao grupo controle (RTG 1,23mm e PME 0,63mm), porém sem diferenças estatísticas significantes, como observado anteriormente em outros estudos histológicos (Caton & Nyman *et al.*, 1980; Caton *et al.*, 1980; Pereira *et al.*, 2000; Sculean *et al.*, 1999), que mostraram o mesmo padrão de cicatrização mesmo na ausência de nicotina.

A regeneração tecidual guiada com a colocação de membranas inibe fisicamente a migração de células epiteliais para a área do defeito (Caton *et al.*, 1980), permitindo que células originadas do ligamento e do osso ocupem esta área e contribuindo para que haja a formação de um epitélio menos extenso. Já as proteínas derivadas do esmalte, em estudos com cultura de células, demonstraram ter efeito na adesão celular, mitose, biossíntese e diferenciação dos fibroblastos (Gestrelius *et al.*, 1997). Mecanismos específicos da ação das proteínas em contato com as células, nos primeiros momentos de cicatrização, parecem ter um tipo específico de ação que melhora a adesão de fibroblastos do ligamento periodontal, porém não tem efeito sobre os fibroblastos gengivais e células

epiteliais (Van Der Pauw *et al.*, 2000), indicando um comportamento seletivo, considerado vantajoso nos estágios iniciais de cicatrização para a formação de uma maior nova inserção (ligamento, cimento e osso) e um epitélio juncional de menor extensão. Embora estudos *in vitro* mostrem que a presença da nicotina produz efeitos negativos em fibroblastos (Sayders *et al.*, 2002; Tanur *et al.*, 2000; James *et al.*, 1999) e iniba adesão e crescimento de fibroblastos do ligamento periodontal de humanos (Giannopoulou *et al.*, 1999, James *et al.*, 1999) os resultados histométricos encontrados no presente estudo foram semelhantes aos encontrados na literatura por Sallum *et al.* (2004), Sculean *et al.* (1999) e Sculean *et al.* (2000), em que as técnicas regenerativas foram testadas na ausência da nicotina.

Quanto ao cimento, os resultados deste estudo mostraram uma maior formação de novo cimento ($p < 0.05$) no grupo tratado com proteína derivada da matriz do esmalte (PME), quando comparados aos defeitos tratados com retalho para raspagem e alisamento radicular ($CO\ 3,60 \pm 1,14\text{mm}$), demonstrando um potencial neoformador de cimento quando se utiliza a proteína. Por outro lado, quando se faz a comparação entre a quantidade de neoformação de cimento no grupo que utilizou a RTG ($4,05 \pm 1,80\text{mm}$) e o grupo da PME ($5,32 \pm 0,73\text{mm}$), não houve diferença estatística entre os grupos, que foram igualmente eficazes, assim como mostrado nos trabalhos de Sculean *et al.* (2000), Windisch *et al.* (2002) e Sallum *et al.* (2004).

No presente estudo, o cimento formado após a aplicação das PME foi predominantemente do tipo celular. Embora o princípio da Proteína Derivada da Matriz do Esmalte tenha sido desenvolvido com a premissa da formação de cimento acelular com fibras extrínsecas, como demonstrado em estudos animais e humanos (Hammarstrom 1997, Hammarstrom *et al.*, 1997, Heijl 1997), o cimento formado em defeitos periodontais intra-ósseos em humanos é principalmente celular (Sculean *et al.*, 1999) ou misto celular/acelular (Sculean *et al.*, 2000). Porém no presente trabalho, quando a fina área de cimento depositada ao longo do defeito apresentou células, em menor ou em maior quantidade, foi classificado como cimento celular.

Mosely & Finseth (1977) demonstraram que a fumaça do cigarro pode causar a diminuição da microcirculação, enquanto Johnson *et al.* (1989), também mostraram alterações morfológicas na microcirculação oral de ratos após administração de nicotina, o que indiretamente poderia influenciar o aparecimento das recessões gengivais. As pequenas recessões gengivais do presente estudo não tiveram diferenças estatísticas significantes quando foram feitas as comparações entre os grupos, concordando com dados de Cortellini *et al.* (1991), Casati *et al.* (2001) e Sallum *et al.* (2004). A magnitude dos dados mostra uma tendência da retração ser maior no grupo CO ($-0,36 \pm 0,48\text{mm}$), seguido da RTG ($-0,25 \pm 0,34\text{mm}$) e posteriormente da PME ($-0,02 \pm 0,07\text{mm}$); desta forma, se houve uma pequena influência da nicotina sobre a microcirculação sanguínea, ela influenciou em menor quantidade o grupo das PMEs.

Quanto à formação de novo tecido ósseo, são encontrados na literatura estudos que relataram não haver uma influência negativa da nicotina sobre funções celulares envolvidas no reparo ósseo. Peacock *et al.* (1993) observaram estímulo da proliferação e adesão dos fibroblastos após administração de baixas concentrações de nicotina. Yuhara *et al.* (1999) relataram aumento da deposição de íons cálcio e da produção da fosfatase alcalina em células osteogênicas e decréscimo da atividade de osteoclastos pela nicotina. Bernzweig *et al.* (1998) associaram a aplicação de nicotina com redução da produção de mediadores inflamatórios relacionados com a ativação de osteoclastos. Esta influência negativa também não foi notada no presente estudo, embora na presença da nicotina, esteja de acordo com os encontrados na literatura por Caffesse *et al.* (1988), Sallum *et al.* (1998), quando compararam as membranas aos grupos controle, não encontrando diferenças estatisticamente significantes em neoformação óssea, mesmo na ausência da nicotina.

Quanto às proteínas da matriz do esmalte, poucos estudos avaliaram histometricamente a neoformação óssea em defeitos de deiscência. Sallum *et al.* (2004), neste mesmo tipo de defeito, também não encontraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos CO, RTG e PME. Por outro lado, Sculean *et al.* (2000 a), em humanos, e Sculean *et al.* (1999) em animais, avaliaram este parâmetro em defeitos intra ósseos, e

embora não tenham encontrado diferenças estatisticamente significantes, nestes trabalhos havia a tendência de formação de mais osso nos grupos que utilizavam da técnica a RTG, enquanto no presente trabalho, numericamente, o grupo das PME foi o que apresentou maior formação óssea. Provavelmente isso deve-se ao fato dos defeitos utilizados por Sculean *et al.* (2000 a e 1999) serem defeitos infra ósseos profundos, mais favoráveis à regeneração tecidual guiada.

O tipo de defeito é um dos fatores que influencia muito o parâmetro de neoformação óssea, e o defeito de deiscência utilizado no presente trabalho é relativamente favorável às duas técnicas de regeneração, por possuir paredes laterais e não ser muito profundo. Donos *et al.* (1998), em um estudo histológico, compararam a utilização da matriz derivada do esmalte e membranas, isoladas ou associadas, mostrando que a associação dos tratamentos parece ter resultados quantitativos de preenchimento ósseo tão bons quanto os da RTG sozinha, bem como ambas serem superiores ao tratamento com PME isoladamente e ao controle. A discrepância destes resultados em relação ao presente estudo, no qual o grupo da RTG não mostrou aumentar a quantidade de formação óssea, deve-se ,provavelmente, ao defeito supra alveolar de furca III utilizado. Em defeitos de furca III, células capazes de produzir regeneração só podem se originar do fundo do defeito, enquanto que em deiscência além da parte apical também podem se originar das paredes laterais do defeito, através das células do ligamento periodontal (Gotllow *et al.*, 1986, Becker *et al.*, 1988, Karring *et al.*, 1993, Pontoriero *et al.*, 1995b). Araújo *et al.* (1998) também utilizaram defeito de furca III, porém, somente compararam a membrana (nos dois lados do defeito) com a associação das proteínas às membranas, e também não encontraram diferenças entre os grupos.

Diversos tipos celulares estão envolvidos no processo de reparação periodontal. Inicialmente, um grande número de hemácias envoltas numa rede de fibrina estão presentes. Em um período subsequente este coágulo é povoado por fibroblastos e inicia-se a formação de vasos sanguíneos, caracterizando um tecido de granulação. Durante o reparo, este coágulo é predominantemente povoado por fibroblastos gengivais e o epitélio oral

migra em direção apical, formando um epitélio juncional longo sobre a raiz. Já os procedimentos regenerativos visam a exclusão epitelial e das células do conjuntivo gengival, favorecendo a migração de cementoblastos e osteoblastos para a região. Embora exista uma série de evidências laboratoriais demonstrando um efeito negativo da nicotina sobre fibroblastos e osteoblastos, no presente estudo, a nicotina não foi capaz de impedir a reparação e a regeneração periodontal. Em vista disso devemos salientar que existem mais de 2000 substâncias potencialmente tóxicas na fumaça de cigarros e os resultados observados nestes estudos podem estar relacionados a outras moléculas além da nicotina. Outros componentes da fumaça de cigarros, como a acroleína e o acetaldeído, mostraram-se citotóxicos para fibroblastos gengivais (Caetano *et al.*, 2000).

Estudos em animais tentando diferenciar a influência da fumaça do cigarro como um todo, e só da nicotina foram realizados, César-Neto *et al.* (2003) colocaram implantes de titânio em tíbias de ratos e observaram uma menor formação óssea ao redor dos implantes nos animais que inalaram fumaça; já os que receberam injeções de nicotina apresentaram resultados intermediários entre o grupo controle e o grupo que inalou fumaça. Ainda buscando respostas para mesma dúvida Benatti *et al.* (submitted) avaliaram a influência da fumaça do cigarro e da nicotina na regeneração periodontal espontânea em ratos e observaram que apenas a fumaça do cigarro, não a nicotina, diminuiu a densidade óssea e o preenchimento do defeito. Stefani *et al.* (2002), em um estudo com implantes colocados em tíbias de coelho, observaram que a formação óssea ao redor de implantes não foi afetada pela administração sistêmica de nicotina.

Os resultados do presente estudo devem ser avaliados com cautela pois ainda outros estudos são necessários para que se possa esclarecer o quanto a presença da nicotina influencia nas técnicas regenerativas, e se estas técnicas são contra indicadas para pacientes fumantes.

7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites do nosso trabalho podemos concluir que:

A regeneração ocorreu em várias extensões em todos os tipos de tratamento, mesmo na presença na nicotina.

Na presença da Nicotina, a Proteína Derivada da Matriz do Esmalte, foi a técnica Regenerativa mais eficiente em promover neoformação cementária quando comparada ao controle.

REFERÊNCIAS *

Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000 Dec;71(12):1874-81.

Araújo MG, Lindhe J. GTR treatment of degree III furcation defects following application of enamelmatrix proteins. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 1998 Jun;25(6):524-30

Aukhil I, Simpson DM, Suggs C, Pettersson E. In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. An experimental study using physical barriers. *J Clin Periodontol*. 1986 Oct; 13(9):862-8.

Becker W, Becker BE, Berg LE. Periodontal treatment without maintenance. A retrospective study in 44 patients. *J Periodontol*. 1984 Sep; 55(9):505-9.

Benatti BB; Cesar Neto JB; Furtado PG, Sallum EA; Nociti Jr FH Smoking may affect the self-healing capacity of periodontal tissues. A histologic study in rats. *Journal Periodontology* Submitted

Bergstrom J, Eliasson S, Preber H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J Periodontol*. 1991 Apr;62(4):242-6. Erratum in: *J Periodontol* 1991 Dec;62(12):809.

Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec*. 1996 Jun; 245(2):267-92. Review.

Broulik, P.D., Jarab, J. The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content in mice. *Horm Metab Res*. 1993, v.25, n.4, p.219-221

Caffesse RG, Nasjleti CE, Morrison EC, Sanchez R. Guided tissue regeneration: comparison of bioabsorbable and non-bioabsorbable membranes. Histologic and histometric study in dogs. *J Periodontol*. 1994 Jun;65(6):583-91.

Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol*, 1988 Sep; 59(9):589-94.

Caton J, Nyman S, Zander H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *J Clin Periodontol*. 1980 Jun; 7(3):224-31.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP baseada no modo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

Caton J, Proye M, Polson A. Maintenance of healed periodontal pockets after a single episode of rootplaning. *J Periodontol*, 1982 Jul; 53(7):420-4.

Caton J, Zander HA. Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. *J Clin Periodontol* 1976 Feb; 3(1):54-8.

Caton JG, Greenstein G. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 1993 Feb; 1:9-15

Cattaneo V, Cetta G, Rota C, Vezzoni F, Rota MT, Gallanti A, Boratto R, Poggi P. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 2000 Mar;71(3):425-32.

Cesar-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H Jr, Nociti FH Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol*. 2003 Oct;74(10):1454-9.

Cortellini P, Pini Prato G, Baldi C, Clauser C. Guided tissue regeneration with different materials. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 1990; 10(2):136-51.

Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *J Periodontol*, 1993 Apr; 64(4):254-60.

Cury PR, Jeffcoat MK, Sallum AW, Cafesse R, Nociti Junior FH, Sallum EA. Clinical and radiographic evaluation of guided tissue regeneration in the treatment of class II furcation defects. A randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2003 Sep;16

Donos N, Sculean A, Glavind L, Reich E, Karring T. Wound healing of degree III furcation involvements following guided tissue regeneration and/or Emdogain. A histologic study. *J Clin Periodontol*. 2003 Dec;30(12):1061-8.

Fung YK, Iwaniec U, Cullen DM, Akhter MP, Haven MC, Timmins P. Long-term effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in adult female rats. *Pharmacol Toxicol*. 1999 Oct;85(4):181-7.

Garret S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1996;1:621-666

Gennaro AR. *Remington farmacia*. 19 ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 1998. 3020p.

Gestrelus S, Andersson C, Johansson AC, Persson E, Brodin A, Rydhag L, Hammarstrom L. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol*. 1997 Sep; 24(9 Pt 2):678-84.

Gestrelius S, Andersson C, Lidstrom D, Hammarstrom L, Somerman M. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*. 1997 Sep; 24(9 Pt 2):685-92.

Giannopoulou C, Geinoz A, Cimasoni G.(1999) Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Journal of Clinical Periodontology* Jan;26(1):49-55

Gottlow J, Karring T, Nyman S. Guided tissue regeneration following treatment of recession-type defects in the monkey. *J Periodontol* 1990 Nov; 61(11):680-5.

Gonzalez YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, De Nardin E. Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res*. 1996 Feb;75(2):796-802.

Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984 Sep; 11(8):494-503.

Greenstein G, Caton JG. Biodegradable barriers and guided tissue regeneration.*Periodontol* 2000, 1993 Feb; 1:36-45. Review.

Hammarstrom L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*, 1997 Sep; 24(9 Pt 2):669-77.

Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997 Sep; 24 (9 Pt 2):658-68. Review.

Hanes PJ, Schuster GS, Lubas S. Binding, uptake and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1991 v.62, n.1, p.147-152

Haverstock BD, Mandrachia VJ. Cigarette smoking and wound healing: implications in foot and ankle surgery. *J Foot Ankle Surg*1998 v.31, n.1, p.69-74

Heden G, Wennstrom J, Lindhe J. Periodontal tissue alterations following Emdogain treatment of periodontal sites with angular bone defects. A series of case reports. *J Clin Periodontol*. 1999 Dec;26(12):855-60.

Heijl L, Heden G, Svardstrom G, Ostgren A. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol*. 1997 Sep; 24(9 Pt 2):705-14.

Heijl L. regeneration Periodontal with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodonto*, 1997 Sep; 24(9 Pt 2):693-6.

Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res*. 1999 Jun 15;45(4):294-301. Erratum in: *J Biomed Mater Res* 1999 Sep 5;46 (3):438-9.

Holm G. Smoking as an additional risk for tooth loss. *J Periodontol*. 1994 Nov;65 (11):996-1001

James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1999; 70:518-525.

James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1999 May;70(5):518-25.

Jones JK, Triplett RG. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *J Oral Maxillofac Surg* 1992, 50 (3), 237-240

Kalpidis CD, Ruben MP. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *J Periodontol*. 2002 Nov;73(11):1360-76. Review.

Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol*, 1985 Jan; 12 (1):51-60.

Karring T, Nyman S, Lindhe J, Sirirat M. Potentials for root resorption during periodontal wound healing. *J Clin Periodontol*, 1984 Jan; 11(1):41-52.

Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol*. 1980 Apr;7(2):96-105

Klaassen CD. Agentes tóxicos ambientais não-metálicos. Poluentes atmosféricos, solventes e vapores, e pesticidas. In: GOODMAN, L.S. Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. 9 ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana, 1996, p.1240-1257.

Laurell L, Gottlow J. Guided tissue regeneration update. *Int Dent J* 1998 Aug; 48(4):386-98. Review.

Lindhe J, Ericsson I. The effect of elimination of jiggling forces on periodontally exposed teeth in the dog. *J Periodontol* 1982 Sep;53 (9):562-7.

Lindskog S, Hammarstrom L. Formation of intermediate cementum. III: 3H-tryptophan and 3H-proline uptake into the epithelial root sheath of Hertwig in vitro. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1982; 2(2):171-7.

Lindskog S. Formation of intermediate cementum. I: early mineralization of aprismatic enamel and intermediate cementum in monkey. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1982; 2 (2):147-60.

Lindskog S. Formation of intermediate cementum. II: a scanning electron microscopic study of the epithelial root sheath of Hertwig in monkey. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1982; 2(2):161-9.

Listgarten MA, Rosenberg MM. Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J Periodonto*, 1979 Jul; 50(7):333-44.

Lynch SE. Methods for evaluation of regenerative procedures. *J Periodontol* 1992 Dec; 63(12 Suppl):1085-92.

Masters LB, Mellonig JT, Brunsvold MA, Nummikoski PV. A clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in combination with tetracycline in the treatment of periodontal osseous defects. *J Periodontol.* 1996 Aug;67(8):770-81.

McFall WT Jr. Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. A long-term study. *J Periodontol.* 1982 Sep;53(9):539-49.

McGuire JR, McQuade MJ, Rossmann JA, Garnick JJ, Sutherland DE, Scheidt MJ, Van Dyke TE. Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. *J Periodontol.* 1989 Apr;60(4):176-81

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976 May; 47(5):256-60.

Mellonig JT. Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery: Technique and clinical and histological case report. *Int J Periodont Rest Dent* Carol Stream 1999, (19), 8-19,.

Mosely LH, Finseth F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. *Hand* 1977 (9), .97-101

Moskow BS, Karsh F, Stein SD. Histological assessment of autogenous bone graft. A case report and critical evaluation. *J Periodontol.* 1979 Jun; 50(6):291-300.

Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP, Sallum EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol.* 2000 Sep;71(9):1460-4.

Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA, Sallum AW. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontol*. 2001 Dec;36(6):361-6.

Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol*, 1982 May; 9(3):257-65.

Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*. 1980 Oct;7(5):394-40

Pabs MJ, Pabs KM, Collter JA, et al. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol* 1995; 66:1047-1055

Payne JB, Johnson GK, Reinhardt RA, Dyer JK, Maze CA, Dunning DG. Nicotine effects on PGE2 and IL-1 beta release by LPS-treated human monocytes. *J Periodontal Res*. 1996 Feb;31(2):99-104.

Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Dunning DG, Patil KD. The association of cigarette smoking with alveolar bone loss in postmenopausal females. *J Clin Periodontol*. 2000 Sep;27(9):658-64.

Peacock ME, Sutherland DE, Schuster GS, Brennan WA, O'Neal RB, Strong SL, Van Dyke TE. The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1993 Jul;64(7):658-65.

Pereira SLS, Sallum AW, Casati MZ, Caffesse RG, Weng D, Nociti FH Comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in the treatment of dehiscence-type defects. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol*. 2000 Aug;71(8):1306-14

Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Azar-Avidan O, Noff M. Collagen membranes prevent the apical migration of epithelium during periodontal wound healing. *J Periodontal Res*, 1987 Jul; 22(4):331-3.

Pontoriero R, Wennstrom J, Lindhe J. The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled clinical study. *J Clin Periodontol*. 1999 Dec; 26(12):833-40.

Quinones CR, Caffesse RG. Current status of guided periodontal tissue regeneration. *Periodontol* 2000, 1995 Oct; 9:55-68. Review.

Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, Hill RW, Kerry GJ, Appleberry EA, Nissle RR, Stults DL. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol*. 1987 Sep; 14(8):445-52.

Ramos WPB, Ramos AO. Abuso de drogas. In: SILVA, P. *Farmacologia*. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.161

Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJS. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 197(1), 36-43

Raulin LA, McPherson JC 3rd, McQuade MJ, Hanson BS. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *J Periodontol*. 1988 May;59(5):318-25.

Renvert S, Nilveus R, Egelberg J. Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. V. Effect of root planing versus flap surgery. *J Clin Periodontol*, 1985 Sep; 12(8):619-29.

Reynolds EF. Supplementary drugs and other substances (nicotine). In Martinadale the Extra Pharmacopeia, 31 ed., Londres, Royal Pharmaceutical Society, 1996.p.1594

Reynolds MA, Bowers GM. Fate of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony defects. *J Periodontol*, 1996 Feb; 67(2):150-7.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Alcalóides de pirina-piridina. In: Robbers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. 1 ed. São Paulo, Editorial Premier, 1997, 166-168.

Rosen PS, Marks MH, Reynolds, M.A. Influence of smoking on long-term clinical results of intrabony defects treated with regenerative therapy. *J Periodontol* 1996; 67(11), 1159-1163

Rosling B, Nyman S, Lindhe J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. *J Clin Periodontol*, 1976 Feb; 3(1):38-53.

Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr, Marcantonio RA, de Toledo S. New attachment achieved by guided tissue regeneration using a bioresorbable polylactic acid membrane in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998 Oct; 18(5):502-10.

Sallum EA, Pimentel SP, Saldanha, JB Nociti FH Jr, Casati MZ, Sallum AW Guided Tissue Regeneration in the dehiscence defect. Histomorphometric study in dogs. Accepted in *Journal Periodontology* 2004

Scabbia A, Cho KS, Sigurdsson TJ, Kim CK, Trombelli L. Cigarette smoking negatively affects healing response following flap debridement surgery. *J Periodontol*. 2001 Jan;72(1):43-9.

Sculean A, Donos N, Blaes A, Lauermann M, Reich E, Brex M. Comparison of enamel matrix proteins and bioabsorbable membranes in the treatment of intrabony periodontal defects. A split-mouth study. *J Periodontol*. 1999 Mar;70(3):255-62.

Sculean A, Donos N, Brex M, Karring T, Reich E. Healing of fenestration-type defects following treatment with guided tissue regeneration or enamel matrix proteins. An experimental study in monkeys. *Clin Oral Investig*. 2000 Mar; 4(1):50-6.

Sculean A, Donos N, Brex M, Reich E, Karring T. Treatment of intrabony defects with guided tissue regeneration and enamel-matrix-proteins. An experimental study in monkeys. *J Clin Periodontol*. 2000 Jul; 27(7):466-72.

Sculean A, Donos N, Schwarz F, Becker J, Brex M, Arweiler NB. Five-year results following treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 2004 Jul;31(7):545-9.

Sculean A, Windisch P, Keglevich T, Fabi B, Lundgren E, Lyngstads PS. Presence of an enamel matrix protein derivative on human teeth following periodontal surgery. *Clin Oral Investig*. 2002 Sep; 6(3):183-7.

Sculean A, Windisch P, Chiantyella CG, Donos N, Brex M, Reich E. Treatment of intrabony defect with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. A prospective controlled clinical study. *J Clin Periodontol*, 2001 may; 28(5):397-403.

Sherwin, M.A., Gastwirth, C. M. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. *J Foot Surg* 1990; 29 (1) 84-87

Shiloah J, Patters MR, Waring MB. The prevalence of pathogenic periodontal microflora in healthy young adult smokers. *J Periodontol*. 2000 Apr;71(4):562-7.

Silverstein P. Smoking and wound healing. *Am J Med.*, v.93, p.22-24, Jul. 1992. [supplement,1a].

Slavkin HC, Boyde A. Cementum: an epithelial secretory product? *J Dent Res*, Washington 1975; 53(157) [Abstract, 409].

Slavkin HC, Bringas P Jr, Bessem C, Santos V, Nakamura M, Hsu MY, Snead ML, Zeichner-David M, Fincham AG. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontal Res*, 1989 Jan; 24(1):28-40.

Slavkin HC. Towards a cellular and molecular understanding of periodontics. Cementogenesis revisited. *J Periodontol*, 1976 May; 47(5):249-55. Review.

Stefani CM, Nogueira F, Sallum EA, de TS, Sallum AW, Nociti FH Jr. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *J Periodontol*. 2002 Feb;73(2):206-12.

Ten Cate AR (1994), oral histology: development, structure and function. 4th edition, p. St Louis : Mosby

Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adriaens P, Dubravec D, Fonzar A, Fourmouis I, Mayfield L, Rossi R, Silvestri M, Tiedemann C, Topoll H, Vangsted T, Wallkamm B. Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. *J Clin Periodontol*. 2002 Apr;29(4):317-25.

Tonetti M S, Pini-Prato G, Cortellini P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. *J Clin Periodontol* 1995; 22(3), 229-234

Tripton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995; 66 (12), 1056-1064

Trombelli L, Scabbia A. (1997) Healing response of gingival recession defects following guided tissue regeneration procedures in smokers and non-smokers *Journal of Clinical Periodontology* Aug;24(8):529-33

Van Der Pauw MT, Van den Bos T, Everts V, Beertsen W. Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 2000 Jan; 71(1):31-43.

Vergara J.A., Quinones CR, Nasjleti CE, Caffesse RG. Vascular response to guided tissue regeneration procedures using nonresorbable and bioabsorbable membranes in dogs. *J Periodontol*. 1997 Mar; 68(3):217-24.

Windisch P, Sculean A, Klein F, Toth V, Gera I, Reich E, Eickholz P. Comparison of clinical, radiographic, and histometric measurements following treatment with guided tissue regeneration or enamel matrix proteins in human periodontal defects. *J Periodontol*, 2002 Apr; 73(4):409-17.

Wiskejö UME, Selving K. A Periodontal wound healing in regeneration. *Periodontol* 2000 1999 Copenhagen, (19), 21-39

Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S, Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol*. 1999 Nov 3;383(3):387-93.

Yukna CN, Yukna RA. Multi-center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human Class II furcations. *J Periodontol*. 1996 Jul;67(7):650-7.

Yukna RA, Mellonig JT. Histologic evaluation of periodontal healing in humans following regenerative therapy with enamel matrix derivative. A 10-case series. *J Periodontol*. 2000 May;71(5):752-9.

Zetterstrom O, Andersson C, Eriksson L, Fredriksson A, Friskopp J, Heden G, Jansson B, Lundgren T, Nilveus R, Olsson A, Renvert S, Salonen L, Sjostrom L, Winell A, Ostgren A, Gestrelus S. Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol*. 1997 Sep; 24(9 Pt 2):697-704.