

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



ROBERT CARVALHO DA SILVA

Cirurgião Dentista

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E RADIOGRÁFICA DO
TRATAMENTO DE DEFEITOS INTRA-ÓSSEOS USANDO
AS PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DO ESMALTE
OU BARREIRAS BIODEGRADÁVEIS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica - Área de Concentração em Periodontia

PIRACICABA

2005

ROBERT CARVALHO DA SILVA

Cirurgião Dentista

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E RADIOGRÁFICA DO
TRATAMENTO DE DEFEITOS INTRA-ÓSSEOS USANDO
AS PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DO ESMALTE
OU BARREIRAS BIODEGRADÁVEIS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica - Área de Concentração em Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

Prof. Dr. Eduardo Hebling

Prof. Dr. Sérgio De Toledo

PIRACICABA

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Si38a Silva, Robert Carvalho da.
Avaliação clínica e radiográfica do tratamento de defeitos i
ósseos usando as proteínas derivadas da matriz do esmalte d
barreiras biodegradáveis. / Robert Carvalho da Silva. -- Piraci
SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Enilson Antonio Sallum.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Doença periodontal. 2. Proteínas do esmalte dentário.
3. Membranas. I. Sallum, Enilson Antonio. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Clinical and radiographic evaluation of periodontal intrabony defects treated with enamel derivative proteins or guided tissue regeneration

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Periodontal disease; Dental enamel proteins; Membranes

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Enilson Antonio Sallum; José Eduardo Cezar Sampaio; Daniela Bazan Palioto; Eduardo Hebling; Sérgio de Toledo

Data da defesa: 04/03/2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 17 de Fevereiro de 2005, considerou o candidato VINICIUS DI HIPÓLITO aprovado.

PROF. DR. MARIO FERNANDO DE GOES

PROF. DR. RICARDO MARINS DE CARVALHO

PROF. DR. MARIO ALEXANDRE COELHO SINHORETI

2005 12036

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais,

Israel José da Silva e Maria Anízia de Carvalho Silva.

Meus referenciais de vida, alicerce, motivo, razão e inspiração de tudo que eu sou e um dia me tornarei: O meu amor, respeito e infinita gratidão pela sabedoria e simplicidade com que ensinaram a mim e aos meus irmãos através do exemplo de vida, de honestidade e amor familiar os preceitos da vida em sociedade.

Pai e Mãe, palavras não podem exprimir meu respeito e amor...

Mas saibam, obrigado.

Eu amo vocês

À minha família,

À memória de meu pai.

PAPAI, OBRIGADO. Um dia a gente se encontra.

Roosevelt, Robson, Rômulo e Ronald, irmãos;
Adriana, Marly e Luciana, cunhadas;
Emilly e Camily; Daniela; Ronald Jr., Lucas e Thiago, sobrinhos;
Pela alegria de fazerem parte de minha vida.

Robson e Ronald,

Obrigado por me permitirem esta jornada. Minhas conquistas são extensão fiel do
sacrifício que vocês experimentaram confiado na honestidade do meu ideal.

À minha metade,
Andrea,
que me inspira e ilumina com seu brilho intenso de amor e dedicação
e por estar do meu lado, e ao meu lado em todos os momentos,
mesmo à distância.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima,

Pelo exemplo, empenho e dedicação em minha orientação;

pelo voto de confiança em mim depositado;

pela oportunidade desta importante etapa de minha vida.

Espero ser digno de sua amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, Prof Dr. Thales Rocha de Mattos Filho Diretor desta instituição.

À Fundação de amparo à Pesquisa do estado de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalém, coordenador do Curso de Pós Graduação.

Ao Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum, pela presteza com que se preocupou comigo em momento tão difícil e delicado.

Aos Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Prof. Dr. Sérgio de Toledo, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior e Prof. Dr Márcio Zaffalon Casati da Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela participação na minha formação acadêmica.

Aos amigos Ângela, Antonieta, Bruno, Fernando, João, Juliana, Luciana, Patrícia, Poliana, Renato e Suzana do curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica - Área de Periodontia, que juntos crescemos e buscamos conquistar nosso espaço.

Aos amigos do Mestrado Benatti, Goiano, Cléverson, Daia, Érica, Sandro, Guilherme, Fabíola, Gabriela, Danilo.

À querida colega Cristina Cunha Villar, que compartilhou conosco do mesmo sonho e amizade.

Ao amigo Danilo Lazzari Ciotti pela importante ajuda prestada durante a realização deste trabalho demonstrando a amizade sincera.

Aos amigos Joly e Aline, pelo incentivo sincero, amizade e companheirismo.

Ao amigo Paulo Fernando Mesquita de Carvalho e esposa pelo espírito de coletividade e amizade.

Aos demais amigos da graduação e pós-graduação, pelos momentos de mútua ajuda e alegria vividos.

À Eliete, secretária da Periodontia, pela imensa ajuda prestada durante a realização do curso.

Aos funcionários e pacientes, pela valiosa colaboração.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Seleção da amostra e desenho experimental	37
4.2 Consentimento para a pesquisa	38
4.3 Tratamento periodontal inicial	39
4.4 Parâmetros clínicos e radiográficos	39
4.5 Ato cirúrgico	41
4.6 Protocolo medicamentoso e pós-operatório	43
4.7 Análise estatística	44
5 RESULTADOS	59
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	97
Anexo 1 Termo de consentimento livre e esclarecido	97
Anexo 2 parâmetros clínicos e radiográficos iniciais e finais	103
Anexo 3 Artigo para publicação	105

RESUMO

Este estudo avaliou o resultado clínico e radiográfico do tratamento de defeitos intra-ósseos bilaterais e similares, usando as proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD) ou regeneração tecidual guiada (RTG) com uso de barreira biodegradável. Foram selecionados 10 pacientes com 11 pares defeitos de 1 ou 2 paredes ósseas nas proximais de dentes superiores monorradiculares ou multirradiculares sem envolvimento de bifurcação. No exame inicial e 6 meses após, foram obtidos os parâmetros índice de Placa (IPI), índice de Sangramento à Sondagem (ISS), Nível da Margem Gengival (NMG), Profundidade de Sondagem (PS), e Nível Clínico de Inserção (NCI). Imagens digitais padronizadas foram obtidas nos mesmos tempos para a determinação do Nível do Defeito Ósseo (NDO), Nível da Crista Óssea Alveolar (NCOA), o componente intra-óseo (INTRA), e ângulo dos defeitos. As imagens digitalizadas foram interpretadas para avaliar o preenchimento ósseo dos defeitos e reabsorção da crista óssea alveolar. A subtração radiográfica determinou mudanças na densidade óptica (DO) na área dos defeitos. Os valores médios para todos os parâmetros foram analisados pelo teste *t* de *Student*. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos em nenhum dos parâmetros no exame inicial ($P > 0,05$). Aos 6 meses, houve diferença estatística significativa para todos os parâmetros na comparação dentro de cada grupo, em ambos os grupos ($P < 0,05$). Na comparação entre os grupos, houve maior redução da profundidade de sondagem ($4,58 \pm 0,38$ mm x $4,09 \pm 0,42$ mm) e recessão gengival ($1,18 \pm 0,61$ mm x $0,91 \pm 0,42$ mm) no grupo RTG ($P < 0,05$). Entretanto não houve diferença estatística entre os grupos para o ganho de inserção clínica (EMD= $3,34 \pm 0,71$ mm e RTG= $3,49 \pm 0,71$ mm) ($P > 0,05$). Radiograficamente, houve maior preenchimento ósseo no grupo RTG ($53,94 \pm 4,21\%$) em relação ao grupo EMD ($48,72 \pm 7,02\%$) ($P < 0,05$). A densidade óptica melhorou em ambos os grupos (EMD= $3,55 \pm 1,05$; RTG= $4,15 \pm 0,39$), entretanto sem diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$). Estes resultados sugerem que ambas as técnicas foram efetivas no tratamento dos defeitos intra-ósseos, entretanto ocorreu maior preenchimento ósseo com a técnica da RTG.

Palavras-chave: doença periodontal, defeitos periodontais, proteínas do esmalte, membranas

ABSTRACT

This study evaluated the clinical and radiographic outcomes of the treatment of symmetrical and bilateral intrabony defects using the enamel derivative proteins (EMD) or bioabsorbable membranes (GTR). Ten subjects were screened with 11 pairs of 1 or 2 bony walls, at the proximal aspects of monoradicular or multiradicular non-furcated superior teeth. At baseline and after 6 months, the following clinical parameters were obtained: Plaque Index (PI), Bleeding Index (BI), Recession Depth (RD), Probing Depth (PD), and Clinical attachment Level (CAL). Standardized digital images were obtained at the same experimental times for determining the Osseous Defect Level (ODL), Alveolar Crest Level (ACL), intra-bony component (INTRA), and defect angle. The digital images were evaluated to access the alveolar crest resorption and bony defect fill. Digital subtraction depicted changes at Optic Density (OD) within the defects. Average values for all parameters were analyzed using Student *t* test. No statistical differences were found for any parameter between groups at baseline ($P > 0.05$). At the 6-month postop, there were statistical differences for all parameters at the within-groups comparison, at both groups ($P < 0.05$). At the inter-groups comparison, statistical differences were found between PD reduction (EMD= 4.09 ± 0.42 mm x GTR= 4.58 ± 0.38 mm) and RD (GTR= 1.18 ± 0.61 mm x EMD= 0.91 ± 0.42 mm) ($P < 0.05$); but no statistical significant differences were found between groups for CAL (EMD= 3.34 ± 0.71 mm e GTR= 3.49 ± 0.71 mm) ($P > 0.05$). Radiographic bony defect fill was more evident at GTR group ($53.94 \pm 4.21\%$) in comparison to the EMD group ($48.72 \pm 7.02\%$) ($P < 0.05$). Optic Density improved at both groups (EMD= 3.55 ± 1.05 ; GTR= 4.15 ± 0.39), but with no statistical differences between groups ($P > 0.05$). These results indicate that both surgical approaches were effective at the treatment of periodontal defects; however a bigger bony defect fill occurred following GTR therapy.

Key-words: periodontal disease, periodontal defects, enamel proteins, membranes

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é causada por bactérias contidas no biofilme dental. Inicialmente, a inflamação induzida pela presença dos microorganismos fica restrita aos tecidos moles marginais (gengivite); entretanto, na dependência de complexas interações entre fatores ligados à virulência dos microorganismos envolvidos, fatores ambientais, fatores sistêmicos e fatores genéticos, a doença pode evoluir para os tecidos periodontais de suporte (Page & Kornman, 1997). A consequência clínica dessa patologia é a perda de inserção conjuntiva e perda óssea alveolar, com formação da bolsa periodontal e/ou recessão gengival. A morfologia dos defeitos deixados pela periodontite pode ser classificada em horizontal, em que a base da bolsa periodontal está localizada coronal em relação à crista óssea alveolar; e vertical, em que o epitélio da bolsa é apical em relação à crista óssea alveolar. Os defeitos verticais são também denominados de intra-ósseos, e são classificados quanto ao número de paredes residuais em relação à superfície da raiz envolvida. Assim, defeitos de uma, duas ou três paredes são delimitados por uma, duas ou três paredes ósseas, respectivamente (Goldman & Cohen, 1958).

A base racional para o tratamento das doenças periodontais deve ser direcionada para a eliminação dos depósitos bacterianos da superfície dental por terapia periodontal convencional, em conjunto com procedimentos efetivos de higiene oral. Diversos estudos histológicos atestam a previsibilidade da terapia convencional em paralisar e controlar a periodontite. Entretanto, os defeitos deixados pela evolução das doenças permanecem (Rosling *et al.*, 1976). A regeneração periodontal, com formação de novo osso alveolar, cemento e ligamento periodontal representa o ideal a ser alcançado para o tratamento dos defeitos intra-ósseos.

Ao longo do tempo, houve três grandes momentos da terapia regenerativa. A utilização de enxertos ósseos e substitutos ósseos preenchendo os defeitos; o princípio da Regeneração Tecidual Guiada (RTG), em que uma barreira física é interposta entre os defeitos e os tecidos moles; e mais

recentemente, a engenharia dos tecidos, em que mediadores biológicos são incorporados aos procedimentos regenerativos para modular e potencializar a capacidade de reparo dos sítios. Entre estes produtos, podem ser destacadas as proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD).

A dificuldade da regeneração está relacionada ao comportamento dos diferentes tecidos periodontais durante o processo de reparo (Melcher, 1976). Nyman *et al.* (1982) sugeriram para o tratamento dos defeitos intra-ósseos a colocação de barreira física entre o tecido gengival e a superfície dental, com a finalidade de impedir o contato direto das células epiteliais e do tecido conjuntivo gengival com a superfície radicular tratada. As barreiras ou membranas permitem que as células provenientes do ligamento periodontal remanescente e do osso medular adjacente repovoem seletivamente o coágulo sem a participação das células epiteliais e conjuntivas que apresentam maior velocidade proliferativa. Melcher, em 1976, definiu que apenas as células indiferenciadas do ligamento periodontal e osso medular apresentam a capacidade de se diferenciarem em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos, que irão produzir os tecidos periodontais de suporte perdidos com a evolução das doenças, i.e., cemento, osso e ligamento periodontal, respectivamente. Esta técnica foi denominada Regeneração Tecidual Guiada (RTG) (Nyman *et al.*, 1982).

As barreiras utilizadas para a técnica de RTG devem ser biocompatíveis, não tóxicas e não imunogênicas, e devem ficar integradas aos tecidos moles. Podem ser constituídas de diferentes materiais, com configuração específica para cada necessidade clínica (Gottlow *et al.*, 1993). As membranas não reabsorvíveis atualmente usadas, constituídas de poli-tetra-fluor-etileno expandido (EPTF-e), necessitam ser removidas em uma segunda intervenção cirúrgica na qual a manipulação do retalho pode produzir perda de parte dos tecidos neo formados (Selvig, 1990; Demolon *et al.*, 1991; Becher *et al.*, 1998; Shallhorn & McClain, 1998). As membranas biodegradáveis ou reabsorvíveis não necessitam ser removidas (Becher *et al.*, 1996), e podem ser constituídas de copolímeros de ácido polilático e poliglicólico, colágeno, entre outros materiais. As

barreiras à base de polímeros láctico e glicólico não contêm aditivos e nem plastificantes, portanto os produtos de sua degradação não comprometem a saúde dos tecidos. A barreira mantém-se íntegra durante as quatro primeiras semanas, e será degradada em até oito meses. A degradação acontece por hidrólise com produção de ácido láctico e ácido glicólico que são encontrados de forma natural no organismo e eliminados no ciclo de Krebs na forma de dióxido de carbono e água (El Material Regenerativo Resolut, 1994). As barreiras à base de colágeno são fagocitadas pelos macrófagos.

Uma nova alternativa terapêutica na busca da regeneração periodontal é a utilização das proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD), comercialmente denominadas de Emdogain®. Este conceito é inovador por que derivou da observação dos eventos que ocorrem durante a odontogênese. A formação das raízes dentárias inicia-se com a migração apical da Bainha Epitelial de Hertwig. A camada interna desta estrutura é composta por células ameloblásticas que apresentam neste período de desenvolvimento breve fase secretora, na qual algumas proteínas bioativas (EMD) são liberadas no meio. Existem evidências de que a deposição temporária destas proteínas sobre a dentina precede a formação do cimento acelular (Hammarström, 1997), e que o desenvolvimento do ligamento periodontal e osso alveolar parecem ser dependentes da formação da primeira camada de cimento (Hoffman, 1960; Ten Cate *et al.*, 1997).

Portanto a observação da odontogênese gerou a base biológica da aplicação clínica das EMD sobre a superfície radicular previamente exposta à doença periodontal. Emdogain® parece ser capaz de induzir a regeneração dos tecidos perdidos “imitando” aquilo que ocorre durante sua formação. O mecanismo exato pelo qual este processo ocorre ainda não é totalmente entendido, entretanto parece estar relacionada a uma interação célula-matriz, entre as células do ligamento periodontal e as proteínas derivadas da matriz do esmalte (Hammarstöm *et al.*, 1997). O uso destas proteínas associadas aos procedimentos

regenerativos pode criar um ambiente favorável para a re-formação do cimento radicular, seguido da nova formação do osso alveolar e ligamento periodontal.

Emdogain® representa a purificação das proteínas derivadas da matriz do esmalte, principalmente as amelogeninas que constituem mais de 90% das proteínas, removidas dos germes dentários em erupção de suínos com seis meses de idade, associadas a um veículo (alginato de propileno glicol) (Gestrelus *et al.*, 1997a). As EMD são proteínas hidrofóbicas e insolúveis em condições fisiológicas; i.e. pH neutro e temperatura corpórea. Por isso, o veículo ideal para carrear estas proteínas deveria apresentar pH não-neutro e baixa temperatura de tal maneira que as mesmas permaneçam solúveis. Hammarström (1997) compararam diversos veículos e concluíram que o alginato de propileno glicol propicia as melhores condições de carrear e solubilizar as EMD. No momento em que o gel de Emdogain entra em contato com os fluidos corpóreos (pH e temperatura fisiológicos), sua viscosidade diminui drasticamente permitindo a precipitação das proteínas sobre a superfície radicular.

Estudos realizados em ratos e porcos usando EMD marcadas por isótopos radioativos indicam que as mesmas continuam a ser encontradas na região aplicada entre duas e quatro semanas, ao passo que após 2 dias não existem mais traços do veículo (Gestrelus *et al.*, 2000; Hamamoto *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* demonstraram que, durante as duas primeiras semanas de sua aplicação, as proteínas são capazes de influenciar positivamente as células do ligamento periodontal quanto à capacidade de proliferação, adesão, migração, biosíntese e formação de nódulos minerais (Gestrelus *et al.*, 1997b). A ação das EMD no nível celular e molecular pode modular favoravelmente os eventos relacionados com a regeneração periodontal. O estímulo das EMD sobre células do ligamento periodontal humano cultivadas, aumenta a atividade intracelular da adesina mono-fosfatase cíclica (AMP-c) e produzem aumento na taxa de adesão celular, proliferação celular, e taxa metabólica com subsequente produção autócrina de fatores de crescimento como o TGFβ e PDGF. Em estudo recente, Palioto *et al.* (2004), confirmaram o efeito estimulatório das EMD, associadas ou

não à IGF, sobre células do ligamento periodontal humano cultivadas *in vitro*. Neste estudo, foi observado aumento na taxa de proliferação celular, entretanto sem efeito na adesão e migração celular, e produção de colágeno. Além disso, as células epiteliais sob o mesmo desafio diminuem sua taxa de proliferação celular (Lyngstadaas *et al.*, 2001). O efeito inibitório das EMD sobre a proliferação epitelial foi claramente observado por Kawase *et al.* (2000). Neste estudo, a ação das proteínas em determinadas concentrações foi citostática, interferindo na fase G1 do ciclo de mitose, após 3 dias de desafio. Este achado é importante porque pode explicar, em parte, o ganho de inserção conjuntiva observado clinicamente quando Emdogain® é utilizado, em função da não participação epitelial durante as fases iniciais do reparo periodontal. Parkar & Tonetti (2004), investigando a influência das EMD sobre células do ligamento periodontal cultivadas, observaram diminuição da expressão de genes relacionados com a produção de mediadores inflamatórios e aumento da expressão dos genes relacionados com a produção de receptores de superfície celular e de diversos fatores de crescimento. Isto em parte pode explicar o efeito biológico das EMD durante a regeneração periodontal.

Existe grande homogeneidade entre as proteínas humanas e suínas pelo fato de que estas essencialmente não se modificaram durante a evolução (Gestrelus *et al.*, 1997; Hammarström, 1997). Apesar disso, a aplicação de proteínas heterógenas pode gerar preocupação quanto ao risco de reações imunogênicas. Petinaki *et al.* (1998) estudaram *in vitro* a capacidade das EMD em influenciar o sistema imunológico. Amostras de sangue periférico de dez doadores saudáveis foram colhidas para cultivo dos linfócitos na presença de diferentes concentrações das proteínas. Após três dias de exposição, houve apenas um discreto aumento de uma fração dos linfócitos T CD4 e diminuição dos linfócitos B CD19. Zetterström *et al.* (1997), em estudo multicêntrico, selecionaram 107 pacientes (214 sítios) com doença periodontal crônica, os quais foram submetidos a dois procedimentos regenerativos usando Emdogain® realizados com intervalo de duas a seis semanas entre as intervenções. Amostras de sangue foram removidas dos pacientes antes e após a aplicação das EMD para avaliação

imunoradiométrica dos níveis plasmáticos de IgE, IgG, IgM e IgA. Os valores encontrados foram comparadas à amostras de sangue de indivíduos não expostos às EMD (grupo controle). Nenhuma das amostras indicou desvios das variações normais estabelecidas comparadas ao grupo Controle. Os autores concluíram que o potencial imunogênico da aplicação das EMD associados a procedimentos cirúrgicos é extremamente baixo. A tolerância clínica em termos de induzir fenômenos pós-operatórios indesejáveis como dor, edema, sensibilidade radicular, entre outros, foi estudado por Heard *et al.* (2000). Questionário avaliando a presença e severidade destas seqüelas foi aplicada em 32 pacientes submetidos a duas intervenções envolvendo o uso das EMD, respeitando o intervalo de pelo menos oito semanas entre elas. Os autores não encontraram reações clínicas diferentes daquelas normalmente observadas após procedimentos cirúrgicos periodontais, e concluíram a aplicação múltipla do produto não produz impacto negativo na cicatrização periodontal.

Alguns aspectos parecem críticos para a obtenção de resultados clínicos satisfatórios após os procedimentos regenerativos. A mobilidade do retalho (Egelberg, 1987; Garret, 1993), a instabilidade do coágulo e a contaminação ou infecção do tecido formado sob a barreira (Polson & Proye, 1983) são ocorrências relativamente freqüentes e estão relacionados com o menor ganho de inserção clínica (Selvig *et al.*, 1992; Nowzari & Slots, 1994; Nowzari *et al.*, 1995; Simion *et al.*, 1994). Além disso, a adaptação, colocação e estabilização das barreiras, particularmente na região posterior, pode ser bastante difícil (Silvestri *et al.*, 2000).

No tratamento desses defeitos, um limitado e imprevisível preenchimento ósseo acompanhado do ganho de inserção clínica, podem ser confirmados por exames radiográficos e sondagens clínicas e trans-cirúrgicas (Patur & Glickman, 1962; Ramfjord *et al.*, 1975; Hill *et al.*, 1981; Selvig, *et al.*, 1992). Este resultado é consequência do reparo da ferida pela combinação da reabsorção óssea marginal e preenchimento ósseo apical (Polson & Heijl, 1978), com maior extensão nos defeitos profundos (Renvert *et al.*, 1985). Independente

do procedimento terapêutico, os defeitos compostos por duas ou três paredes proporcionam reparo com maior possibilidade de preenchimento ósseo (Cortellini *et al.*, 1990). Entretanto, a análise histológica dos defeitos intra-ósseos tratados revelou que o preenchimento ósseo pode vir acompanhado da formação de epitélio juncional longo até o nível do pré-tratamento (Caton & Zander, 1976; Caton *et al.*, 1980). Este padrão de reparo pode ser estável, mas, em consequência da extensão do epitélio, não representa verdadeira regeneração periodontal e sim a cicatrização do defeito por aderência epitelial longa (Lindhe *et al.*, 1982; Cortellini *et al.*, 1990; Cortellini *et al.*, 1993).

As técnicas regenerativas se aplicam com alta previsibilidade para os defeitos intra-ósseos profundos de duas e três paredes. A correta seleção dos defeitos e pacientes, estipular os objetivos terapêuticos, escolha da técnica apropriada, e controle das variáveis que possam interferir na resposta cicatricial, são fatores importantes no aumento da previsibilidade da terapia regenerativa (Cortellini & Tonnetti, 2000; McClain & Schallhorn, 2000; Kalpidis & Ruben, 2002).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A eficiência clínica das EMD foi analisada em estudos de casos sem grupo controle, estudos clínicos controlados em bloco ou paralelos comparando as EMD em relação ao grupo controle (instrumentação periodontal associada ou não ao gel placebo - alginato propileno glicol), EMD versus barreiras reabsorvíveis e não reabsorvíveis, e associações entre as EMD e barreiras e/ou materiais de preenchimento. As comparações entre os diferentes tratamentos foram baseadas nas alterações dos parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e recessão gengival), e parâmetros radiográficos (preenchimento ósseo). A reentrada cirúrgica para avaliação *in situ* do preenchimento ósseo do defeito foi realizada em alguns trabalhos, e em outros, dentes com indicação de exodontia por diferentes razões foram tratados com as EMD associadas ou não a outras terapias para análise histológica. Estudos pré-clínicos com avaliação histológica em animais também foram revisados.

Hammarstöm *et al.* (1997) estudaram o efeito da aplicação das proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD) em defeitos tipo deiscência criados cirurgicamente em macacos. Os defeitos de aproximadamente 6,0 mm ápico-cervical foram criados usando bocas para a remoção do osso alveolar, na face vestibular, assim como o ligamento periodontal e cimento radicular. Diversas preparações contendo as proteínas derivadas da matriz do esmalte associados a diferentes veículos foram aplicadas sobre os defeitos antes do reposicionamento dos retalhos. Após um período pós-operatório de 8 semanas com rigoroso controle de biofilme, os animais foram sacrificados e segmentos em bloco contendo os dentes, osso e tecidos moles foram processados para análise histológica. Os sítios tratados com EMD associados ao alginato de propileno glicol como veículo foram os que melhor responderam. Houve regeneração do osso alveolar, cimento do tipo acelular e ligamento periodontal correspondentes a aproximadamente 80% do defeito inicial. A não utilização das EMD ou quando associadas a outros veículos falharam em produzir regeneração periodontal.

Heijl (1997), em trabalho subsequente, avaliou histologicamente o resultado da aplicação das EMD em defeito criado experimentalmente em um voluntário humano com problemas de posicionamento dos dentes na região anterior-inferior. Uma metodologia similar àquela apresentada no trabalho anterior foi adotada; após a abertura de retalho de espessura total o osso alveolar, cimento e ligamento periodontal relacionado ao dente 31 foram removidos com brocas e cinzéis. Marcações com brocas esféricas foram feitas na altura do osso alveolar antes e após a osteotomia para facilitar a avaliação histológica. O condicionamento radicular foi realizado com ácido orto-fosfórico a 37% durante 15 segundos para a remoção de restos orgânicos sobre a superfície radicular. Após intensa irrigação com solução fisiológica, as EMD foram aplicadas sobre o defeito cobrindo toda a superfície radicular, e o retalho foi reposicionado e suturado. Quatro meses após, o dente e os tecidos ao redor foram removidos para histometria. Foi observada nova formação de cimento do tipo acelular de fibras extrínsecas correspondente a 73% do defeito original, e 65% de novo osso. O autor concluiu que a incorporação desta nova biotecnologia tem potencial de produzir regeneração periodontal verdadeira.

Os dois trabalhos supracitados mostraram que a aplicação das EMD pode resultar em regeneração das estruturas perdidas pela evolução da doença periodontal. Por isso, representam a pedra fundamental a partir da qual diversos trabalhos foram publicados na tentativa de melhor entender os mecanismos intrínsecos envolvidos em sua aplicação, e traçar diretrizes para determinar a previsibilidade e consistência dos resultados clínicos em relação à outras terapias já estabelecidas.

A previsibilidade e magnitude na melhora dos parâmetros clínicos, em termos de redução da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, no tratamento de defeitos periodontais angulares foram avaliados por Heden *et al.* (1999). Foram tratados de forma consecutiva 108 pacientes com periodontite crônica com necessidade de cirurgia periodontal. Considerando os critérios de inclusão, i. profundidade de sondagem > 6,0 mm e i.i. presença de componente

intra-ósseo > 3,0 mm, foram selecionados 145 sítios (em que 80% dos sítios apresentavam componente intra-ósseo > 4,0 mm; 94% compostos de 1 ou 2 paredes) que foram preenchidos com Emdogain® após abertura de retalho mucoperiosteal, debridamento, biomodificação usando EDTA (24%) durante 2 minutos e irrigação abundante com solução salina. Um ano após os procedimentos, houve em média redução na profundidade de sondagem na ordem de 5,2 mm, 4,6 mm de ganho de inserção, e 0,6 mm de recessão gengival em relação aos valores do exame inicial. Houve ganho de inserção > 2,0 mm em 87% dos sítios. Radiograficamente, os defeitos foram reduzidos em profundidade 2,9 mm, e em largura 1,3 mm, correspondentes a um preenchimento ósseo médio de 69%. Entretanto foi verificado preenchimento acima dos 80% em quase a metade dos sítios operados (43%). Os autores concluíram que a resposta clínica produzida por esta modalidade de tratamento é previsível e comparável com aquela obtida com a técnica da RTG.

Em relato de casos seqüenciais, Sculean *et al.* (1999a), trataram 28 pacientes com doença periodontal crônica que contribuíram com 32 defeitos de 2 ou 3 paredes com profundidade $\geq 6,0$ mm, avaliados radiograficamente. Os parâmetros clínicos foram obtidos no exame inicial e 8 meses após, que mostraram melhoras significativas na redução da profundidade de sondagem (4,7 mm) e ganho do nível de inserção ($3,0 \pm 1,5$ mm), e aumento da recessão gengival (1,5 mm). Radiografias periapicais convencionais também foram obtidas nos mesmos tempos, cuja análise evidenciou preenchimento ósseo em 26 dos 32 defeitos tratados.

Estes achados foram confirmados por Heden (2000), que tratou de forma consecutiva 61 pacientes com periodontite crônica usando Emdogain®, em estudo com desenho experimental semelhante. Os 75 defeitos tratados eram compostos de uma ou duas paredes e componente intra-ósseo médio de 5,3 mm. Após um ano de tratamento, foram observadas significativas melhoras nos parâmetros clínicos, com 4,7 mm de redução na profundidade de sondagem e

ganho de inserção clínica de 4,2 mm. Radiograficamente, houve 3,1 mm de preenchimento ósseo do defeito, ou 70% do defeito inicial.

Pela primeira vez, em 1997, Heijl *et al.*, estudaram o potencial regenerativo das EMD associadas ao retalho modificado de Widman (grupo teste), em comparação ao ato cirúrgico e gel placebo (grupo controle). Neste estudo multicêntrico aleatório, controlado de boca dividida, participaram 33 indivíduos com 34 pares de defeitos similares na mesma arcada. Os sítios deveriam apresentar profundidade de sondagem > 6,0 mm e componente intra-ósseo > 4,0 mm predominantemente de 1 ou 2 paredes ósseas residuais. A redução da profundidade de sondagem, ganho do nível clínico de inserção e ganho do nível da crista óssea alveolar foram avaliados em 8, 16 e 36 meses após os procedimentos cirúrgicos experimentais. Os autores observaram ao longo do tempo gradativa melhoria nos parâmetros clínicos e radiográficos nos sítios do grupo teste em relação aos sítios do grupo controle. Aos 36 meses, na média, a aplicação das EMD resultou em maior ganho no nível clínico de inserção (2,2 mm versus 1,7 mm do grupo controle), e preenchimento ósseo de 66% do defeito original correspondente a ganho no nível da crista óssea alveolar de 2,7 mm. No grupo controle não houve na média alteração na altura da crista óssea alveolar. Todas as diferenças foram estatisticamente significantes em favor do grupo teste.

Okuda *et al.*, (2000), em estudo clínico controlado aleatório de boca dividido duplo-cego, compararam em 18 pares de defeitos intra-ósseos no mesmo arco a resposta clínica e radiográfica frente ao uso das EMD (grupo teste) ou placebo – alginato de propileno glicol - (grupo controle). Doze meses após, houve significativa melhora nos parâmetros clínicos em termos de redução de profundidade de sondagem (3,0 mm versus 2,22 mm) e ganho do nível clínico de inserção (1,72 mm versus 0,83 mm), acompanhados de discreto aumento na recessão gengival. Entretanto a comparação entre os grupos mostrou que os sítios do grupo teste apresentaram resultados mais promissores ($P < 0,05$). A subtração radiográfica revelou que houve preenchimento ósseo e aumento na

densidade óssea nos sítios do grupo teste, ao passo que os sítios do grupo controle perderam densidade.

Froum *et al.* (2001) comparou as EMD (53 defeitos, grupo teste) e cirurgias de acesso (31 defeitos, grupo controle), no tratamento de 23 pacientes com periodontite crônica. Os parâmetros clínicos recessão gengival, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, assim como as medidas trans-operatórias (nível da crista óssea alveolar e nível do defeito) foram avaliados no exame inicial, e um ano após durante a re-entrada cirúrgica. Em média, a redução de profundidade de sondagem e ganho do nível clínico de inserção entre os grupos foram respectivamente 2,7 mm e 1,5 mm maiores no grupo teste, e o preenchimento ósseo neste grupo foi 3 vezes maior (75% x 23%).

Retalhos modificados para preservação de papilas inter-dentais com ou sem a associação das EMD, grupos teste e controle respectivamente, foram realizados em 169 pacientes no tratamento de defeitos intra-ósseos maiores que 4,0 mm (Tonetti *et al.*, 2002). Ao final dos 12 meses deste estudo paralelo, o benefício clínico da associação das EMD aos retalhos pôde ser evidenciado pela maior redução da profundidade de sondagem ($3,9 \pm 1,7$ mm versus $3,3 \pm 1,7$ mm) e ganho de inserção clínica ($3,1 \pm 1,5$ mm versus $2,5 \pm 1,5$ mm), em relação ao retalho para instrumentação isoladamente. Quase o dobro dos sítios que foram preenchidos com Emdogain® ganhou mais de 4,0 mm de inserção quando comparados ao grupo controle (38% versus 20%). Estes resultados foram corroborados pelo trabalho de Trombelli *et al.* (2002), no qual 35 pacientes com defeitos profundos ($\geq 4,0$ mm) foram tratados com as EMD associadas a retalhos específicos direcionados a preservação dos tecidos moles supra-crestais. No exame final, entre 9 e 12 meses após as cirurgias, foi verificada redução na profundidade de sondagem ($5,4 \pm 1,8$ mm), ganho de inserção ($4,7 \pm 1,7$ mm) e preenchimento ósseo ($3,9 \pm 1,8$ mm) correspondente a 65% do defeito inicial. Houve ganho de inserção maior que 4,0 mm em 73% dos sítios e preenchimento ósseo superior a 4,0 mm em 57% dos sítios tratados. O ângulo entre a superfície

radicular e a cortical interna do defeito aumentou de $33,8^\circ \pm 12^0$ para $50,0^\circ \pm 16^\circ$, em função da reabsorção da crista óssea e preenchimento do defeito.

Em 1999, a comparação entre os princípios da RTG e da utilização da EMD foi realizada pela primeira vez no tratamento de defeitos intra-ósseos (Sculean *et al.*, 1999b). Neste estudo, 16 pares de defeitos similares no mesmo arco foram aleatoriamente tratados com Emdogain® ou com barreiras reabsorvíveis (Gore Resolut®). Os procedimentos foram realizados em momentos distintos separados por duas semanas. Para a comparação entre as terapias, apenas os parâmetros profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e recessão gengival foram avaliados nos momentos exame inicial e oito meses após. Não foi encontrada nenhuma diferença estatística para todos os parâmetros avaliados entre os grupos nos exames inicial e final. Após 8 meses, houve significativa redução da profundidade de sondagem (3,8 mm versus 4,0 mm), ganho do nível clínico de inserção (3,1 mm versus 3,0 mm), e aumento da recessão gengival (0,8 mm versus 1,1 mm), respectivamente para os grupos EMD e RTG. Os autores concluíram que ambas as terapias foram igualmente efetivas no tratamento dos defeitos periodontais e que não foi possível estabelecer superioridade clínica de uma terapia em relação à outra.

Silvestri *et al.* (2000) compararam três técnicas cirúrgicas no tratamento de defeitos intra-ósseos deixados pela evolução da doença periodontal. Trinta pacientes foram selecionados para esta pesquisa. Cada indivíduo apresentava um defeito com componente intra-ósseo > 4,0mm. Os pacientes foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: tratados com a aplicação das EMD (10 defeitos, grupo teste), barreiras não-degradáveis de EPTF-e (10 defeitos, controle positivo), e pelo retalho Modificado de Widman (10 defeitos, controle negativo). No grupo RTG as membranas foram removidas seis semanas após sua colocação. Os resultados deste trabalho foram avaliados baseados exclusivamente nas alterações dos parâmetros clínicos lineares profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e recessão gengival, avaliados imediatamente antes dos procedimentos cirúrgicos e um ano depois. Os autores constataram que o desempenho clínico das terapias

regenerativas foi semelhante com de ganho do nível clínico de inserção de 4,5 mm e 4, 8 mm, redução na profundidade de sondagem de 4,8 mm e 5,9 mm nos sítios tratados com EMD e RTG, respectivamente. Entretanto, a maior redução da profundidade de sondagem no grupo RTG foi acompanhada de maior migração da margem gengival em relação ao grupo EMD (aproximadamente 0,5 mm versus 1,0 mm). Os autores discutiram que este aspecto provavelmente está associado ao alto índice de exposição das barreiras (70%) durante as 6 primeiras semanas pós-operatórias. Ambas alternativas regenerativas foram estatisticamente superiores ao retalho modificado de Widman, que apresentou redução da profundidade de sondagem de 1,4 mm e 1,2 mm de ganho do nível clínico de inserção.

Parashis *et al.* (2004), comparam o efeito da aplicação de 3 técnicas regenerativas em defeitos de 2 ou 3 paredes com componente intra-ósseo maior que 4,0 mm. Participaram deste estudo 39 pacientes, cada um contribuindo com um defeito. Os parâmetros clínicos lineares e radiografias periapicais convencionais foram obtidos antes dos procedimentos e repetidos um ano depois. Os defeitos foram tratados de forma aleatória com osso liofilizado desmineralizado (DFDBA; 12 defeitos), barreiras biodegradáveis de ácido polilático (Guidor®; 12 defeitos), ou com as EMD (Emdogain®; 15 defeitos). Os 3 tratamentos foram igualmente efetivos na redução da profundidade de sondagem (3,6 mm; 4,4 mm; 4,3 mm), ganho do nível clínico de inserção (3,3 mm; 3,8 mm; 3,6 mm), e limitada recessão gengival (0,3 mm; 0,6 mm; 0,7 mm) respectivamente para os grupos DFDBA, RTG e EMD. Entretanto, nos grupos RTG e EMD houve discreta superioridade na resolução dos defeitos avaliados radiograficamente. No grupo RTG houve exposição das membranas em 7 dos 12 casos tratados (58,3%).

Sanz *et al.* (2004), compararam as EMD e barreiras reabsorvíveis quanto à possibilidade de promoverem a regeneração periodontal em defeitos intra-ósseos profundos, em um estudo prospectivo, multicêntrico, controlado. Completaram este estudo 67 pacientes, os quais foram aleatoriamente tratados com EMD (grupo teste, 35 sítios), ou com barreiras (grupo controle; 32 sítios). Os defeitos predominantemente de 2 paredes (aproximadamente 82% em ambos os

grupos) foram avaliados segundo a variação dos parâmetros clínicos entre o exame inicial e um ano depois. Ao final deste estudo, nenhum dos tratamentos se mostrou superior um em relação ao outro, com semelhantes alterações clínicas: redução da profundidade de sondagem ($3,8 \pm 1,5$ mm versus $3,3 \pm 1,5$ mm), ganho do nível clínico de inserção ($3,1 \pm 1,8$ mm versus $2,5 \pm 1,9$ mm), e aumento da recessão gengival ($0,6 \pm 0,9$ mm versus $0,7 \pm 0,9$ mm), respectivamente para os grupos teste e controle. A frequência de sítios com maior ou menor ganho de inserção também foi semelhante entre os grupos.

Outro trabalho clínico controlado (Zucchelli *et al.*, 2002) foi conduzido de tal forma que 90 pacientes apresentando características similares e defeitos intra-ósseos $> 3,0$ mm, foram divididos em 3 grupos: grupo teste, tratados com retalho simplificado para preservação de papilas e EMD; grupo controle positivo, tratados usando o mesmo retalho e barreiras não reabsorvíveis de EPTF-e com reforço de titânio; e o grupo controle negativo, tratados apenas com o retalho simplificado para preservação de papilas. As variáveis em estudo foram as mudanças nos parâmetros clínicos: redução da profundidade de sondagem, ganho do nível clínico de inserção e nível da margem gengival. No grupo tratado com as membranas, um segundo procedimento foi realizado após seis semanas para sua remoção. Ocorreu exposição das barreiras em 10 dos 30 casos operados (33%). Um ano depois da realização dos procedimentos experimentais houve melhora significativa em todos os grupos. Entretanto, foi observado que houve maior ganho de inserção nos grupos EMD e RTG (4,2 mm; 4,9 mm), em relação ao grupo que foi submetido exclusivamente ao retalho para instrumentação (2,6 mm). As diferenças entre os dois procedimentos regenerativos não foi estatisticamente diferente considerando este parâmetro. Ambos os grupos regenerativos produziram maior redução da profundidade de sondagem em relação ao retalho (EMD= 5,1mm; RTG= 6,5 mm; retalho= 4,5 mm). Entretanto, a comparação entre os grupos regenerativos mostrou que houve maior redução da profundidade de sondagem no grupo RTG. O aumento na recessão gengival nos grupos EMD, RTG e retalho foi respectivamente 1,0 mm, 1,6 mm e 1,9 mm. o grupo EMD

produziu a menor alteração desta variável ($P < 0,05$); entre os grupos RTG e retalho não foram encontradas diferenças.

Silvestri *et al.*, (2003) em um estudo paralelo multicêntrico envolvendo 6 centros de pesquisa, comparam as EMD e barreiras de EPTF-e no tratamento de defeitos periodontais. No grupo teste as EMD foram usadas (48 pacientes), e as barreiras no grupo controle (48 sítios). Ao final dos 12 meses de acompanhamento, ambos os grupos produziram melhoras clínicas e radiográficas semelhantes, sem diferenças estatísticas na comparação entre os grupos, sugerindo que ambas as alternativas terapêuticas são efetivas no tratamento de defeitos intra-ósseos profundos. Houve redução de profundidade de sondagem (5,3 mm versus 5,6 mm), e ganho de nível clínico de inserção de 4,1 mm no grupo teste em relação aos 4,3 mm no grupo Controle, respectivamente. O componente intra-ósseo na média, nos defeitos do grupo teste foi de 6,4 mm, e 6,1 mm no grupo controle. As membranas do grupo controle foram removidas em seis semanas pós-operatórias, mas até este momento 48% já estavam expostas. Os autores discutem que apesar da não diferença estatística observada entre os grupos, a eventual exposição das barreiras pode estar associada a contaminação e subsequente limitação do potencial regenerativo, e a perda de papilas que na região anterior superior pode representar problemas estéticos.

O efeito sinérgico entre diferentes princípios regenerativos foi estudado em alguns ensaios clínicos. A osteocondução produzida por material de preenchimento (matriz mineral óssea bovina), a osteopromoção usando barreiras excluindo a participação das células epiteliais e conjuntivas do reparo do defeito periodontal, e a ação estimuladora produzida pelas EMD sobre as células do ligamento periodontal foram combinadas de formas diferentes e comparadas entre si, tendo como controle negativo o retalho para instrumentação. Foram avaliados os parâmetros clínicos lineares, e o nível do defeito e nível da crista óssea alveolar, antes dos procedimentos e 6 meses após, quando a reentrada cirúrgica foi feita. Lekovic *et al.* (2000) avaliaram o benefício da associação da matriz mineral óssea bovina às EMD em relação ao uso isolado das proteínas no

tratamento de defeitos intra-ósseos. A redução na profundidade de sondagem e ganho do nível clínico de inserção foram respectivamente 1,5 mm e 1,4 mm mais expressivos em favor da terapia associada; assim como houve maior preenchimento ósseo neste grupo (80% versus 29%, aproximadamente). Os autores atribuíram a melhor resposta clínica à associação ao potencial osteoindutor do material de preenchimento. Lekovic *et al.* (2001) compararam o acesso para instrumentação, e a associação EMD-matriz mineral óssea bovina-barreira biodegradável composta por colágeno e ácido poliglicólico. Ambas as abordagens resultaram em diminuição da profundidade de sondagem e ganho do nível clínico de inserção. Entretanto a comparação entre os grupos mostrou resultados mais promissores com a técnica associada ($P < 0,05$). Camargo *et al.* (2001) compararam a aplicação das EMD isoladas ou associadas ao material de preenchimento. Mais uma vez, ambas as abordagens resultaram em redução de profundidade de sondagem e ganho do nível clínico de inserção em relação aos valores iniciais. Entretanto a comparação entre os grupos revelou superioridade para a técnica associada com maior redução da profundidade de sondagem (diferença aproximada de 2,3 mm), maior ganho de inserção (diferença aproximada de 2,0 mm) e maior preenchimento ósseo (aproximadamente 3,9 mm versus 1,0 mm).

Apesar de se tratarem de estudos distintos (Lekovic *et al.*, 2000; Camargo *et al.* 2001; Lekovic *et al.*, 2001) usando diferentes pacientes, a comparação entre os quatro grupos é inevitável. Segundo estes estudos, os resultados da aplicação isolada das EMD foram apenas similares aos produzidos pelo retalho para instrumentação. Por outro lado, as técnicas associadas parecem produzir efeitos clínicos mais promissores em termos de maior redução da profundidade de sondagem e ganho de nível clínico de inserção. O parâmetro preenchimento ósseo teve o melhor resultado quando a terapia tripla foi empregada. Entretanto os autores discutem que o papel isolado dos constituintes das terapias associadas é matéria de especulação e deve-se ter cautela na tomada de conclusões definitivas.

A comparação do resultado clínico obtido entre a associação da matriz mineral óssea bovina e EMD ou gel autógeno de fibronectina/fibrinogênio obtidos do sangue periférico do paciente antes das cirurgias, foi feita em estudo de desenho idêntico aos acima apresentados. Os tratamentos foram aplicados em 23 pares de defeitos intra-ósseos similares. O comportamento clínico da associação do material de preenchimento às EMD foi discretamente melhor em relação ao outro grupo, entretanto sem apresentar superioridade estatística (Lekovic *et al.*, 2001).

Zucchelli *et al.* (2003) verificaram o benefício da associação da matriz mineral óssea bovina às EMD no tratamento de defeitos periodontais. Os pacientes foram tratados com as proteínas isoladamente (30 sítios) ou associadas ao enxerto (30 sítios) e reavaliados um ano depois. O retalho simplificado de preservação de papilas foi executado em todos os casos. A comparação entre os grupos com ou sem enxerto mostrou que não houve diferenças na redução de profundidade de sondagem (6,2 mm versus 5,8 mm). Entretanto, houve maior ganho do nível clínico de inserção (5,8 mm versus 4,9 mm) e menor aumento na recessão gengival (0,4 mm versus 0,9 mm) no grupo tratado com a associação do enxerto e proteínas derivadas da matriz do esmalte. Todos os sítios que receberam o enxerto ganharam mais de 4,0 mm de inserção clínica, e apenas 64% do outro grupo melhoraram na mesma magnitude. O ângulo dos defeitos foi medido nas radiografias pré-operatórias considerando a superfície radicular e a cortical interna dos defeitos (aproximadamente 33 graus em ambos os grupos). Esta variável influenciou apenas o grupo tratado com as EMD isoladamente. Foi verificado que quanto maior o ângulo do defeito menor o preenchimento ósseo observado radiograficamente.

Velasques-Plata *et al.* (2002) e Scheyer *et al.* (2002) avaliaram o resultado do tratamento de defeitos intra-ósseos usando as EMD associadas ou não à matriz mineral óssea bovina; e o mesmo material de preenchimento associado ou não às proteínas derivadas da matriz do esmalte, respectivamente. Ambos os trabalhos usaram a mesma metodologia, considerando em cada estudo

uma amostra de 17 pacientes com defeitos bilaterais e similares compostos de 2 ou 3 paredes. Parâmetros clínicos foram obtidos antes dos procedimentos, as medidas ósseas avaliadas após a abertura dos retalhos e as terapias foram aplicadas. As medidas clínicas e reabertura cirúrgica para avaliação do preenchimento do defeito foram realizadas entre 6 e 8 meses após. A comparação intra-grupos mostrou que houve melhora significativa para todos os parâmetros avaliados considerando os tempos inicial e final nos dois estudos. Entretanto, a comparação inter-grupos, revelou que houve menor recessão gengival ($0,3 \pm 0,6$ mm versus $0,8 \pm 0,8$ mm) e maior preenchimento ósseo ($4,0 \pm 0,8$, correspondente a 77% do defeito original, versus $3,1 \pm 1,0$ mm = 65% do defeito inicial) em favor da técnica associada (EMD + material de preenchimento) em relação à aplicação isolada das EMD (Velasques-Plata *et al.*, 2002). Não foram encontradas diferenças nos outros parâmetros. Para o segundo estudo, o comportamento de todos os parâmetros foi semelhante, com redução da profundidade de sondagem ($3,9 \pm 1,3$ mm versus $4,2 \pm 1,1$ mm), ganho de inserção ($3,7 \pm 1,5$ versus $3,8 \pm 0,9$ mm), e preenchimento ósseo ($3,0 \pm 1,2$ mm = 67% do defeito original versus $3,2 \pm 1,4$ mm = 63% do defeito original), respectivamente para os sítios tratados com a matriz óssea isolada ou associados às EMD, respectivamente (Scheyer *et al.*, 2002). Os autores enaltecem o benefício clínico da associação do efeito biológico no nível celular e molecular provocado pelas EMD, e da estrutura física oferecida pelo material de preenchimento que facilita a formação e estabilização do coágulo.

Estes resultados foram corroborados pelo trabalho de Sculean *et al.* (2002) que avaliaram a resposta clínica da aplicação isolada das EMD ou associadas ao vidro bioativo. Cada grupo contou com 14 pacientes cada qual contribuindo com um defeito de componente intra-ósseo $\geq 3,0$ mm. Um ano após, não houve diferença estatística para todos os parâmetros avaliados entre os grupos, com redução aproximada na profundidade de sondagem de 4,0 mm, limitada recessão de 1,0 mm, e ganho de inserção de 3,0 mm.

Rosen & Reynolds (2002) associaram as EMD ao DFDBA ou FDBA, e uma barreira biodegradável de copolímeros de ácido polilático no tratamento de 22 defeitos intra-ósseos profundos. As radiografias e os parâmetros clínicos lineares profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e nível da margem gengival foram avaliados antes e 6 meses após as cirurgias. Durante as cirurgias as medidas ósseas e o número de paredes foram mensurados. Houve redução média na profundidade de sondagem de 5,4 mm e 5,8 mm, e ganho de inserção de 4,5 mm e 5,3 mm, respectivamente para a associação EMD-DFDBA-barreira e EMD-FDBA-barreira. Apesar da tendência de melhores resultados para o grupo do FDBA, os resultados não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$).

Sculean *et al.*, 1999(a) compararam histologicamente o resultado da aplicação das EMD (Emdogain®, grupo teste; 7 sítios) ou membranas reabsorvíveis (grupo controle, Resolut®, 7 sítios) em 14 dentes com doença periodontal crônica avançada indicados para extração. Após a abertura dos retalhos, foram confeccionadas marcas nas superfícies radiculares usando brocas esféricas em alta rotação, na altura da crista óssea alveolar e no fundo dos defeitos. Biomodificação com EDTA 24% durante 2 minutos foi feita apenas nos sítios do grupo teste. Seis meses após os dentes foram removidos em bloco para avaliação histométrica. Houve comportamento similar entre os grupos teste e controle quanto à redução da profundidade de sondagem (5,7 mm versus 5,8 mm), e ganho do nível clínico de inserção ($3,2 \pm 1,2$ mm versus $3,6 \pm 1,7$ mm). A histometria mostrou nova inserção conjuntiva; i.e., novo cemento com fibras colágenas inseridas, de $2,6 \pm 1,0$ mm para no grupo teste, e $2,4 \pm 1,0$ mm no grupo controle. Entretanto, houve formação de novo osso, em média de $0,9 \pm 1,0$ mm no grupo teste, e $2,1 \pm 1,0$ mm no outro grupo. O novo osso formado foi verificado em todos os sítios do grupo controle, e em 4 dos 7 casos do grupo teste. Segundo os autores, a maior quantidade e previsibilidade na nova formação óssea observada no grupo tratado com as membranas, em parte, podem ser explicadas pelo fato de que não houve nenhum caso de exposição das barreiras.

Em 2000, Sculean *et al.* em comparação histológica do desempenho clínico das EMD e RTG, usando 3 primatas saudáveis em que defeitos periodontais entre 6,0 mm e 8,0 mm de profundidade foram criados cirurgicamente na superfície distal dos segundos pré-molares e incisivos laterais de ambos os lados, superiores e inferiores (24 defeitos) usando brocas em baixa rotação. Para a cronificação dos defeitos, tiras de metal foram fixadas com resina composta sobre as superfícies radiculares antes do fechamento dos retalhos. Quatro semanas após, as tiras de metal foram removidas, e depois de três semanas adicionais as cirurgias experimentais realizadas. Após abertura de retalhos de espessura total as superfícies radiculares foram meticulosamente instrumentadas, os defeitos debridados e tratados com uma das terapias: aplicação das EMD (Emdogain[®], 6 sítios), RTG usando barreiras biodegradáveis de copolímeros de ácido glicólico (Gore Resolut[®], 6 sítios), associação das terapias (EMD + RTG, 6 sítios) ou instrumentação periodontal isoladamente (controle negativo, 6 sítios). Nos sítios em que as EMD foram usadas (12 defeitos), EDTA a 24% foi aplicada sobre a superfície radicular dos defeitos durante dois minutos, seguido de irrigação com soro fisiológico. Foi realizado rigoroso controle de placa nos animais até o período do sacrifício para análise histométrica, cinco meses após os procedimentos cirúrgicos. Nos sítios tratados exclusivamente pela instrumentação periodontal, o padrão de reparo foi o epitélio juncional longo com limitada nova formação de osso, cemento e ligamento periodontal na porção mais apical dos defeitos. A análise histológica dos espécimes tratados pelas EMD foi caracterizada pela formação de novo cemento, do tipo acelular na porção mais profunda dos defeitos e misto mais coronalmente, acompanhada de novo osso e ligamento periodontal perpendicularmente orientado. Nos sítios tratados pela técnica da RTG, o padrão de cura periodontal foi a regeneração periodontal com formação de novo cemento, predominantemente do tipo celular, novo osso e novo ligamento periodontal orientado perpendicularmente. Entretanto, nos casos em que houve exposição das barreiras a quantidade de regeneração se limitou ao fundo dos defeitos, e formação de epitélio juncional longo sobre as superfícies radiculares.

Quando a terapia combinada foi avaliada, o padrão de cicatrização foi semelhante ao observado pela técnica da EMD. Neste grupo, quando houve exposição das barreiras, da mesma forma que no grupo RTG, houve limitada regeneração. Não houve diferença estatística na análise quantitativa do novo osso e novo cemento formados entre os grupos experimentais EMD, RTG e EMD + RTG. Os autores concluíram que as três alternativas experimentais são igualmente capazes de produzir regeneração periodontal e superiores em relação à instrumentação isolada, e que não existe benefício adicional na técnica combinada.

Yukna & Mellonig (2000) avaliaram histologicamente o efeito da aplicação das EMD em defeitos periodontais associados a dentes com indicação de extração. Em dois centros de pesquisa, oito pacientes contribuíram com o total de 10 defeitos para a aplicação da terapia e posterior exodontia em bloco para análise histométrica. Os parâmetros clínicos lineares de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e recessão gengival foram obtidos imediatamente antes dos procedimentos experimentais, nos quais após abertura de retalho de espessura total e remoção do tecido de granulação, “*notchs*” de referência foram feitos na base do cálculo mais apical. A instrumentação periodontal foi realizada com instrumentos manuais e ultra-sônicos, e biomodificação feita com ácido cítrico pH=1 durante 1 minuto. Antes da aplicação das EMD, o nível da crista óssea alveolar e nível do defeito foram mensurados. Seis meses após, as medidas clínicas lineares foram reavaliadas e blocos incluindo os dentes experimentais e os tecidos adjacentes removidos, os quais foram processados para análise histológica. Os autores observaram que 60% dos defeitos cicatrizaram com regeneração periodontal verdadeira, incluindo novo osso, cemento e ligamento (3 sítios), ou nova inserção/ adaptação conjuntiva (3 sítios) com formação de cemento sem a correspondente formação óssea. Os 4 defeitos residuais cicatrizaram pela formação de epitélio juncional longo. Este estudo revelou a possibilidade das EMD promoverem a regeneração periodontal, entretanto também mostrou que a resposta clínica é inconsistente apresentando grande variabilidade em termos qualitativos e quantitativos dos tecidos formados.

Windisch *et al.* (2002) realizaram um estudo clínico-radiográfico-histológico comparando o tratamento de defeitos intra-ósseos de dentes indicados para exodontia por razões periodontais ou como parte de um planejamento protético. Os pacientes foram tratados com as EMD (6 sítios), ou com barreiras reabsorvíveis (8 sítios). Os parâmetros clínicos e radiográficos foram avaliados antes dos procedimentos e 6 meses após, quando os elementos dentais foram extraídos em blocos e preparados para a análise histométrica. Houve redução na profundidade de sondagem (5,62 mm versus 5,0 mm) e ganho no nível clínico de inserção (3,87 mm versus 2,67 mm) comparáveis entre os grupos tratados com as proteínas e barreiras, respectivamente. Radiograficamente, foi observado que o preenchimento ósseo, respectivamente para os grupos EMD e RTG, foi de 1,05 mm e 0,47 mm, sem diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$). A histometria mostrou que não houve diferença na quantidade de formação cementária (1,81 mm versus 2,29) entre os grupos EMD e RTG, respectivamente. Entretanto no grupo RTG houve maior nova formação óssea (1,93 mm versus 0,78 mm) ($P < 0,05$).

Em 2003(a), Sculean *et al.* também realizaram um estudo clínico-radiográfico-histológico em três pacientes apresentando dentes condenados periodontalmente. As medidas clínicas e radiográficas foram feitas antes dos procedimentos e seis meses após. Durante as cirurgias os defeitos foram tratados com as proteínas derivadas da matriz do esmalte associadas à matriz mineral óssea bovina (2 sítios), ou com o material de preenchimento isoladamente. Para facilitar a avaliação histométrica marcas com brocas foram feitas no fundo dos defeitos e na altura da crista óssea alveolar. Nos 3 sítios houve 4,0 mm de ganho de inserção e formação de novo osso (0,5 mm a 2,1 mm) associado a novo cimento (1,9 mm a 2,5 mm). O cimento formado foi predominantemente do tipo celular, e o ligamento periodontal com orientação perpendicular. As partículas do material de preenchimento estavam rodeadas por osso imaturo, e o epitélio juncional parava na marcação coronária. Os autores concluíram que o material de preenchimento associado ou não às EMD é capaz de não só melhorar as

condições clínicas dos dentes, mas também produzir regeneração periodontal avaliada histologicamente. É discutido que a similaridade entre os casos possa ser em função das características específicas dos defeitos, em termos da distância entre a crista óssea dos defeitos e a gengiva marginal.

O efeito da aplicação das EMD em defeitos de diferentes larguras foi avaliado histologicamente em babuínos por Cochran *et al.* (2003). Foram criados defeitos de uma parede, com largura de 1,0 mm e 2,0 mm (defeitos estreitos), e 4,0 mm e 6,0 mm (defeitos largos), bilateralmente na mandíbula de 5 animais. Em todos os animais havia pares similares de defeitos de todas as dimensões, de tal forma que um lado servia de controle para o lado oposto. A cronificação dos defeitos foi realizada usando ligaduras de fio de aço inoxidável ao redor dos dentes por um período de 2 meses. Os procedimentos cirúrgicos experimentais basicamente era a aplicação das EMD nos defeitos após a instrumentação periodontal (grupo teste), ou a instrumentação sem a aplicação das proteínas (grupo controle). Após um período de cinco meses de cicatrização os animais foram sacrificados e as peças preparadas para análise histométrica. Os resultados deste estudo mostraram que a regeneração periodontal ocorre em maior quantidade e de forma mais previsível após a aplicação das EMD, em relação aos sítios do grupo controle. Nos defeitos estreitos, houve 41% a mais de novo cemento e 31% a mais de nova formação óssea, em relação aos sítios do grupo controle. Nos defeitos largos, a magnitude de nova formação de osso e cemento foi similar entre os grupos. Entretanto, nestes defeitos, durante a fase de cronificação houve maior reabsorção da crista óssea proximal, diminuindo o potencial regenerativo dos defeitos, e por isso tornando mais difícil as comparações.

O mesmo grupo de pesquisadores, utilizando exatamente o mesmo protocolo, avaliou o impacto da associação das EMD e osso autógeno em relação ao lado controle (instrumentação isoladamente). Mais uma vez, nos defeitos estreitos, a quantidade de novo osso (4,0 mm versus 2,22 mm) e novo cemento

(3,88 mm versus 2,03 mm) foi mais expressiva nos sítios do grupo teste em relação aos sítios do grupo controle, respectivamente (Cochran *et al.*, 2003).

Sallum *et al.* (2004) confirmaram histometricamente o potencial regenerativo das EMD. Defeitos tipo-deiscência foram criados nas raízes mesiais dos terceiros e quartos pré-molares mandibulares de 7 cães. Após 3 meses de cronificação, os defeitos foram aleatoriamente tratados por instrumentação periodontal (grupo controle), EMD, RTG (usando barreiras reabsorvíveis), e EMD associadas às barreiras. Após os 4 meses de cicatrização os animais foram sacrificados e os blocos mandibulares contendo os dentes submetidos à análise histométrica. Houve maior formação de cemento nos sítios que receberam EMD e a associação EMD-barreiras, sem diferenças entre si, em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que não existe benefício na técnica associada em relação ao uso isolado de cada abordagem regenerativa.

A manutenção dos resultados a médio e longo prazo obtidos pelo uso das proteínas derivadas da matriz do esmalte foi avaliada em alguns estudos. Francetti *et al.* (2002) acompanharam 24 pacientes durante 24 meses, após o tratamento de defeitos intra-ósseos $\geq 4,0$ mm (avaliados radiograficamente) usando o retalho para preservação de papilas e instrumentação periodontal isoladamente (12 pacientes), ou associado à aplicação das EMD. As medidas clínicas e radiográficas foram feitas nos exames inicial, 1 e 2 anos depois. Em ambos os grupos foram observadas melhoras significativas nos parâmetros clínicos e radiográficos ao longo do tempo. A comparação entre os grupos mostrou que a redução na profundidade de sondagem foi maior no grupo EMD aos 12 meses, mas aos 24 meses, a diferença estatística não foi verificada. Com relação às alterações no nível clínico de inserção, houve maior ganho no grupo EMD aos 12 e 24 meses. Entretanto, entre 12 e 24 meses, o ganho de inserção no grupo EMD não foi estatisticamente diferente. Houve preenchimento ósseo avaliado radiograficamente em ambos os grupos ($P < 0,05$) comparados às radiografias iniciais. Entretanto, a comparação inter-grupos revelou maior

preenchimento em 12 meses (49,16% versus 30,14%) e 24 meses (57,44% versus 38,49%).

Sculean *et al.* (2003b) selecionaram 33 pacientes com periodontite crônica com indicação para cirurgia periodontal. Os 46 defeitos predominantemente de 2 paredes (76% dos sítios) e componente intra-ósseo médio de $4,1 \pm 1,4$ mm foram tratados com as EMD. As medidas clínicas e radiográficas foram avaliadas no exame inicial, 1 e 4 anos após. A profundidade de sondagem inicial de $8,1 \pm 1,8$ mm mudou para $3,8 \pm 1,2$ mm no exame de 1 ano, e $4,0 \pm 1,2$ mm, no exame de 4 anos. Houve melhora significativa deste parâmetro entre o exame inicial e de um ano, que foi mantido estável até o final do estudo. Houve significativo ganho de inserção aproximada de 3,0 mm ao final do primeiro ano, que foi mantido estável até o período final de 4 anos. A recessão gengival aumentou significativamente entre os exames inicial ($1,9 \pm 1,5$ mm) e de um ano ($3,2 \pm 1,8$), mas ao final dos 4 anos diminuiu para $2,8 \pm 1,2$ mm. a variação do nível da margem gengival entre os tempos 1 e 4 anos foi estatisticamente significantes. Os autores concluem que é possível manter longitudinalmente os resultados obtidos após o uso das EMD, e apontam para a necessidade de rigoroso controle de placa.

Estes resultados foram confirmados pelo trabalho de Parodi *et al.* (2004). Este estudo longitudinal de 3 anos de acompanhamento representa a continuidade dos resultados obtidos um ano após o tratamento de defeitos intra-ósseos usando as EMD (Parodi *et al.*, 2000). No trabalho inicial, 21 defeitos de uma e duas paredes foram tratados. Para a avaliação dos resultados foram medidos os parâmetros clínicos e radiográficos. Houve melhoras significativas nos parâmetros clínicos, com redução da profundidade de sondagem (4,68 mm) e ganho do nível clínico de inserção (3,12 mm), entretanto as radiografias não evidenciaram o preenchimento ósseo dos defeitos. Em 12 casos foi feita a reentrada cirúrgica que verificaram a presença de um material consistente e de coloração semelhante à do osso ao redor. Em dois casos, os dentes foram extraídos para avaliação histológica que não confirmou a formação de nova

inserção relatada em outros estudos. Aos 36 meses, os achados clínicos do primeiro estudo foram confirmados em 16 pacientes. Os autores concluíram que é possível a melhora dos parâmetros clínicos após o uso das EMD, e que estes resultados podem ser mantidos estáveis ao longo do tempo. Entretanto, na experiência dos autores as EMD não foram capazes em produzir nova inserção conjuntiva e formação de novo osso.

Sculean *et al.* (2001) compararam 4 formas de tratamento de defeitos intra-ósseos. Os 56 pacientes selecionados apresentavam um defeito de pelo menos 3,0 mm de profundidade, e foram aleatoriamente tratados com as EMD (14 sítios), barreiras biodegradáveis composta por copolímero de ácido glicólico (14 sítios), EMD + barreira (14 sítios), e acesso para instrumentação que serviram de controle negativo (14 sítios). A avaliação de um ano mostrou que todas as modalidades de tratamento produziram redução significativa na profundidade de sondagem (3,7 mm a 4,1 mm) e aumento da recessão gengival (0,7 mm a 1,7 mm), sem diferenças na comparação entre os grupos. Quanto ao ganho de nível clínico de inserção, todos os tratamentos produziram alterações significativas. Entretanto, a comparação do ganho de inserção entre os grupos mostrou que o grupo controle resultou na menor alteração ($1,7 \pm 1,5$ mm) em relação aos tratamentos regenerativos (EMD= $3,4 \pm 1,5$ mm; RTG= $3,1 \pm 1,5$ mm; EMD + RTG= $3,4 \pm 1,1$ mm) ($P < 0,05$). Por outro lado, entre as 3 formas regenerativas de tratamento, as diferenças não foram estatisticamente significantes ($P > 0,05$). Os autores concluíram que todas as 3 alternativas regenerativas são efetivas, mas não existe benefício clínico na associação das técnicas em relação a sua aplicação isolada. A maior parte da amostra que participou do estudo acima (42 dos 56 pacientes), foi acompanhada por um período de 5 anos (Sculean *et al.*, 2004). Os autores verificaram que o resultado das terapias pode ser mantido ao longo do tempo desde que os pacientes consigam manter um excelente controle de placa. Entretanto, ao final dos 5 anos não foram encontradas diferenças estatísticas para todos os parâmetros avaliados, com redução na profundidade de sondagem (2,7 mm, 4,3 mm, 3,9 mm, 4,0 mm), ganho do nível clínico de inserção

(1,3 mm, 2,9 mm, 2,7 mm, 2,6 mm), e aumento na profundidade de sondagem (1,7 mm, 1,3 mm, 1,2 mm, 1,5 mm), respectivamente para os sítios tratados com o retalho para instrumentação, EMD, barreiras reabsorvíveis e associação das barreiras e EMD.

A formulação original do Emdogain[®], que surgiu em 1997, foi inicialmente comercializada em dois frascos distintos, que deveriam ser misturados pelo menos 5 minutos antes da sua utilização clínica. Em um dos frascos havia o veículo - alginato de propileno glicol; e no outro as proteínas que se encontravam na forma liofilizada. Em 1999, a nova formulação pré-misturada do produto foi lançada no mercado. A nova embalagem contém apenas um frasco contendo o Emdogain[®] pronto para ser aplicado, em apenas um único frasco sem a necessidade da realização da mistura dos seus constituintes. Bratthall *et al.* (2001) compararam estas duas apresentações em um estudo controlado aleatório de boca dividida, no qual 88 pacientes foram tratados. Cada paciente recebeu em sítios similares no mesmo arco a formulação pré-misturada (grupo teste), e a formulação que necessitava da mistura (grupo controle). Foram avaliados os parâmetros clínicos lineares convencionais e radiografias padronizadas para verificar o preenchimento ósseo. Todas as medidas foram tomadas no exame inicial, 8 e 16 meses após, em que se verificou que ambas as apresentações produziram resultados clínicos semelhantes com ganho do nível clínico de inserção de 2,7 mm no grupo teste, e 2,9 mm no grupo controle, e 1,0 mm de preenchimento ósseo em ambos os grupos.

Duas extensas revisões de literatura apresentando metanálises sobre a eficiência clínica do uso das EMD foram publicadas (Kalpidis & Ruben, 2002; Giannobile & Somerman, 2003). Kalpidis & Ruben, 2002, compilaram os resultados de 12 estudos clínicos controlados envolvendo 317 sítios com defeitos intra-ósseos de componente intra-ósseo médio de $5,4 \pm 0,8$ mm. De forma geral, houve melhora significativa após o uso das EMD em relação às medidas iniciais, entretanto foi observada extrema variabilidade dos resultados com redução da profundidade de sondagem variando entre 1,9 mm e 5,1 mm (média de $3,2 \pm 0,9$

mm), ganho do nível de inserção variando entre 1,7 mm e 4,5 mm (média de $4,0 \pm 0,9$ mm), e aumento médio da recessão gengival de $0,9 \pm 0,4$ mm. De forma consistente, a eficiência clínica das EMD foi superior em relação à instrumentação periodontal isolada, e similar em relação à RTG. Testes estatísticos não mostraram superioridade de uma técnica regenerativa em relação à outra, e parece não existir benefício clínico na associação das EMD e barreiras comparadas às técnicas aplicadas isoladamente. Os estudos histológicos atestaram a habilidade das EMD em regenerar os tecidos periodontais perdidos. Entretanto a previsibilidade e consistência da nova formação de osso, cemento e ligamento nos seres humanos foi contestada. Giannobile & Somerman (2003) compilaram 8 estudos clínicos controlados em que as EMD foram aplicadas em 511 defeitos intra-ósseos. Os autores concluíram que existem evidências que suportam o conceito de que as EMD melhoram as condições clínicas dos dentes, mas a manutenção dos resultados a longo prazo não foi estabelecida; e que as EMD são seguras em termos de baixo potencial imunogênico mesmo após o tratamento de defeitos múltiplos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar clínica e radiograficamente o resultado do tratamento de defeitos intra-ósseos predominantemente de uma ou duas paredes, e componente intra-ósseo $\geq 4,0$ mm, usando as proteínas derivadas da matriz do esmalte ou barreira biodegradável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra e desenho experimental

Os pacientes participantes deste estudo foram selecionados na clínica de graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-Unicamp), diagnosticados com periodontite crônica moderada a avançada. Foram considerados os seguintes critérios de inclusão para participação neste estudo:

- Indivíduos saudáveis sem histórico de alterações sistêmicas que contraindiquem cirurgias periodontais, ou que façam uso de medicamentos que possam interferir com o processo de cura periodontal;
- Pacientes não fumantes;
- Apresentando pelo menos um par de defeitos intra-ósseos preferencialmente de uma ou duas paredes, e componente intra-ósseo $\geq 4,0$ mm avaliados radiograficamente;
- Localizados na maxila, em dentes monorradiculares ou em superfícies interproximais de dentes multirradiculares sem envolvimento de bifurcação;
- Presença de faixa de gengiva inserida $\geq 2,0$ mm.

Pacientes grávidas/ lactantes, ou indivíduos que não se enquadraram nos critérios de inclusão não participaram do estudo. No momento dos procedimentos cirúrgicos, os pacientes deveriam apresentar os índices de placa e de sangramento inferiores a 20%, e os dentes experimentais livres de placa bacteriana e sangramento.

Considerando os critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 10 pacientes (6 mulheres e 4 homens) com idade entre 31 e 53 anos (média de 43,3 anos). Cada paciente contribuiu com um par de defeitos; entretanto um paciente apresentou 2 pares. Assim, cada grupo foi composto por 11 pares de defeitos. A maior parte dos defeitos tratados apresentava 1 ou 2 pares ósseas (Tabela 1).

Tabela 1
Dados demográficos, e características dos defeitos.

paciente	gênero	idade	EMD			RTG		
			dente	face	N paredes	dente	face	N paredes
1	M	52	14	MV	1	25	MP	2
2	M	44	23	DP	2	13	DP	3
			13	MP	2	25	MV	1
3	H	48	23	MP	2	12	MV	2
4	M	41	14	DV	1	24	DV	1
5	H	31	26	MP	2	11	DP	2
6	H	37	12	MV	3	24	DP	3
7	M	38	24	DP	1	13	MV	1
8	M	39	25	DP	2	14	DV	2
9	H	53	13	MP	1	25	MP	2
10	M	50	14	DV	2	25	DV	2
média		43,3						

Gênero: M= mulher; H= homem; Face: M= mesial; D= distal; V= vestibular; P= palatina.

4.2 Consentimento para a pesquisa

Este estudo foi conduzido de acordo com os preceitos determinados pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde emanados do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp. A explicação dos possíveis riscos e implicações, bem como os benefícios esperados e a importância do experimento, foi feita a todos os pacientes envolvidos neste estudo, que assinaram o Termo de Consentimento para autorizar o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp recebendo o protocolo número 027/2001.

4.3 Tratamento periodontal inicial

Os pacientes foram submetidos um a dois meses antes do procedimento experimental a instrução de higiene oral e tratamento periodontal inicial composto por instrumentação periodontal supra e sub-gengival, avaliação oclusal, e remoção de fatores retentivos de placa. Os pacientes foram monitorados pelos índices dicotômicos de placa e de sangramento à sondagem, e foram mantidos com valores inferiores a 20% durante todo o experimento.

Modelos de estudo foram obtidos de todos os pacientes para confecção de guias de orientação das medidas clínicas realizadas durante o estudo. Os guias foram construídos usando placas de PVC e plastificador a vácuo, sendo recortados para adaptação na superfície oclusal dos dentes. Canaletas foram confeccionadas nos guias de orientação para permitir a reprodutibilidade das medições entre os exames, quanto à posição e inclinação da sonda.

4.4 Parâmetros clínicos e radiográficos

Todos os parâmetros avaliados neste estudo foram avaliados uma semana antes e 6 meses após os procedimentos experimentais, e foram obtidos pelo mesmo operador (RCS). Os parâmetros clínicos dicotômicos da presença de placa (IPI) e sangramento à sondagem (ISS) (Ainamo & Bay, 1975) foram obtidos considerando as faces mesial, distal, vestibular e palatina de todos os dentes. O índice de placa foi definido como o percentual de sítios com presença de placa visível a olho nu, ou evidenciado com a parte lateral de uma sonda milimetrada convencional (PCP-UNC 15, Hu-Friedy). O índice de sangramento foi definido pelo percentual de sítios com sangramento após a sondagem usando a mesma sonda.

Os parâmetros clínicos lineares nível da margem gengival (NMG), definido como a distância da junção cimento-esmalte (JCE) até margem gengival, e profundidade de sondagem (PS), definido como a distância da margem gengival até o fundo da bolsa periodontal foram obtidos com o auxílio do sistema de sondagem computadorizado (Florida Probe, Gainesville, FL, USA.) (Figuras 1 e 2).

O nível clínico de inserção (NCI) foi definido como a soma de PS e NMG. Quando a JCE não estava visível, a margem de alguma restauração foi usada como referência para as medições. Estas medidas foram obtidas em 6 pontos ao redor dos dentes em estudo: mesio-vestibular, disto-vestibular, mesio-palatina, disto-palatina, e no centro das faces vestibular e palatina. Para as comparações, apenas o sítio mais profundo na região interproximal foi utilizado.

Radiografias padronizadas digitais foram obtidas como auxílio do sistema de imagem digital (Sens-A-Ray, New Image do Brasil. Imp. Exp. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3). Para a padronização das tomadas radiográficas o sensor de carga acoplada foi associado ao guia intra-oral que permitiu a obtenção das imagens em diferentes períodos com o mínimo de distorção. O posicionamento intra-oral foi determinado com o registro oclusal utilizando silicona de adição (Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil.) e o extra-oral com o sistema Rinn XCP[®] (Rinn Corporation, Elgin IL USA.) (Figuras 4, 5, e 6). O posicionador intra-oral foi armazenado durante o período experimental. O tempo de exposição usado foi de 0,22 segundos em aparelho com 60 kV e 10 mA em corrente elétrica estabilizada.

Os parâmetros radiográficos avaliados foram:

- Nível do defeito ósseo (NDO) - distância entre a JCE e o fundo do defeito onde o espaço do ligamento periodontal apresentasse largura considerada normal (Figura 7);
- Nível da crista óssea (NCO) - distância entre a JCE e a projeção da crista óssea alveolar sobre a superfície radicular (Figura 8);
- O componente intra-ósseo ósseo foi definido pela subtração:
$$\text{INTRA} = (\text{NDO} - \text{NCO});$$
- Ângulo do defeito – definido em graus pela superfície radicular e cortical óssea do defeito (Figura 9).

As diferenças entre as imagens obtidas nos exames inicial e final, definiram a reabsorção da crista óssea, e a porcentagem de preenchimento ósseo usando a fórmula:

$$\frac{(\text{INTRA inicial}) - (\text{INTRA final})}{(\text{INTRA inicial})} \times 100$$

A subtração radiográfica foi realizada considerando os pares de radiografias digitalizadas obtidas nos exames inicial e 6 meses após usando *software* específico (ImageLab – New Image do Brasil. Imp. Exp. Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Após a equalização das radiografias por método não paramétrico para reduzir diferenças no contraste das imagens (Ruttimann *et al.*, 1986), estas foram sobrepostas para coincidir pontos de referência em comum e permitir a obtenção da imagem subtraída, que mostram ganho ou perda da densidade óptica (DO) em função da terapia aplicada.

4.5 Ato cirúrgico

A anti-sepsia intra-bucal foi feita com bochecho de digluconato de clorexidina 0,12% por 1 minuto, e a extra-bucal com solução de digluconato de clorexidina à 2% (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda., Piracicaba, SP, Brasil). A anestesia foi realizada por infiltração local utilizando solução de lidocaína à 2% com adrenalina 1:100.000 (Lidocaína – Alphacaina, Adrenalina 1:100.000, DFL Ind. e Com. Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Retalhos mucoperiostais nas faces vestibular e lingual foram elevados partindo de incisões intra-sulculares. Quando possível, técnicas específicas direcionadas para a preservação das papilas interdentais e tecidos moles supra-crestais foram usadas. Os critérios observados na escolha da técnica de preservação de papilas foram:

- Largura do espaço interdental, avaliando a distância entre os dentes acometidos pelo defeito, na altura da JCE,

- Distância do ponto de contato (se presente) até a crista óssea marginal (sondagem óssea),
- Face de predominância do defeito (sondagem óssea).

Se necessário, incisões verticais relaxantes foram feitas mesial e/ou distal aos defeitos para facilitar o acesso aos sítios e favorecer o fechamento dos retalhos por primeira intenção. Todo o tecido de granulação foi removido e a superfície radicular tratada com instrumentos manuais. Os defeitos foram categorizados quanto ao número de paredes ósseas residuais. A superfície radicular foi biomodificada para a remoção da lama dentinária e exposição da matriz colágena peri e inter-tubular com aplicação tópica de solução saturada de cloridrato de doxiciclina (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) na concentração de 50 mg/ml durante 4 minutos (Stabholz *et al.*, 1996). Irrigação abundante com solução fisiológica foi feita para remover os restos do biomodificador. Nenhum recontorno ósseo foi realizado.

A seguir os defeitos foram aleatoriamente divididos em sítios do grupo teste e controle. Nos sítios do grupo teste (EMD), os defeitos foram tratados com as proteínas derivadas da matriz do esmalte (Emdogain® – Biora AB, Malmö, Suécia). O gel de Emdogain® foi aplicado com cânula romba estéril a partir do fundo do defeito até que o mesmo fosse completamente preenchido. No grupo controle (RTG), membranas de ácido polilático e poliglicólico (Gore - Resolut XT®, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ, USA) foram escolhidas segundo as características do defeito, recortadas e adaptadas sobre os defeitos e estendo sobre a crista óssea alveolar pelo menos 3,0 mm. As membranas foram fixadas com sutura reabsorvível (Resolut suture material, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ, USA). Em ambos os grupos, os retalhos foram reposicionados na altura ou coronal em relação à JCE, e fixados com suturas tipo colchoeiro modificada usando fio não reabsorvível de PTFE-e (Gore-Tex suture material, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ, USA). Entretanto no grupo teste, as suturas foram pré-colocadas, mas só foram finalizadas após a colocação do gel de Emdogain®. As suturas foram removidas após 14 dias. Todos os procedimentos

foram feitos no mesmo ato cirúrgico pelo operador (RCS). Caso ocorresse exposição accidental da membrana antes de completado o período de degradação (entre quatro e seis semanas), um dos seguintes procedimentos foram adotados: exposição sem inflamação gengival - manutenção da barreira e reforço do controle químico de placa bacteriana; exposição da barreira acompanhada de inflamação gengival - eliminação do sítio do experimento, e quando possível a remoção da barreira.

As figuras 10 a 17, e 21 a 28 ilustram uma seqüência clínica no tratamento dos sítios do grupo RTG e EMD, respectivamente. As figuras 18 a 20, e 29 a 31 representam a avaliação radiográfica dos sítios RTG e EMD, respectivamente.

4.6 Protocolo medicamentoso e pós-operatório

Para redução do estresse e complicações pós-operatórias como dor e edema, cada paciente recebeu em dose única 750 mg de paracetamol e 4,0 mg de betametasona. Para os casos de pacientes muito ansiosos, foram prescritos 5,0 mg de diazepam. Durante o pós-operatório foi adotado o seguinte protocolo: quatro doses diárias de 750 mg de paracetamol durante 48 horas.

Os pacientes foram orientados para não usarem formas mecânicas de higienização (escova dental e fio dental) durante as duas primeiras semanas. Após este período, foi permitido o uso de escovação suave por mais duas semanas, e um mês depois dos procedimentos cirúrgicos foi restituída a normalidade quanto ao controle mecânico do biofilme. O controle químico da placa bacteriana foi instituído por bochecho e aplicação tópica duas vezes ao dia com solução de digluconato de clorexidina a 0,12% durante 4 semanas do ato operatório. Os pacientes foram monitorados pelo próprio operador em retornos periódicos durante todo o experimento, com controle profissional de placa bacteriana semanal nos dois primeiros meses e mensal até completar o período de seis meses pós-operatório.

4.7 Análise Estatística

A estatística descritiva considerou a média $\pm$ desvio padrão (SD). Os dados foram analisados pelo teste “t” pareado de Student para comparações dentro de cada grupo, considerando os tempos inicial e final, e comparações entre os grupos, considerando a diferença entre os valores inicial e final de cada parâmetro. O nível de significância para a rejeição da hipótese nula foi estipulado em $\alpha = 0,05$.



Figura 1 - Sistema de sondagem eletrônica.



Figura 2 - Posicionamento do guia para padronização de obtenção das medidas clínicas.



Figura 3 - Sistema de radiografia digitalizada.



Figura 4 - Guia intra-oral acoplado ao sensor digital.

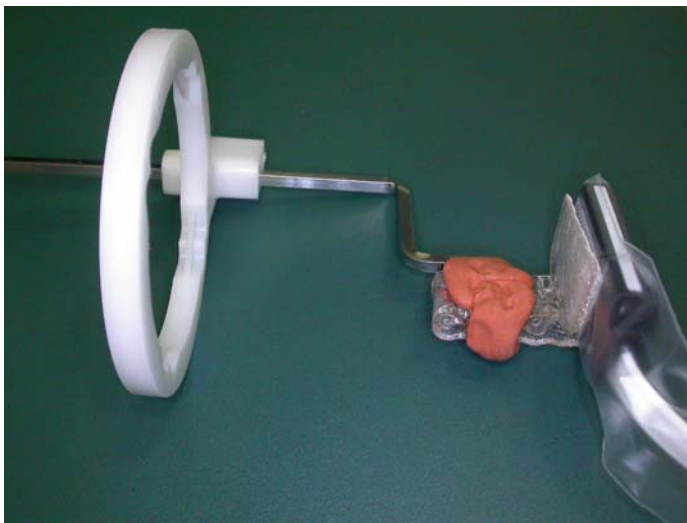


Figura 5 - Posicionador extra-oral associado ao guia intra-oral.



Figura 6 - Posicionamento do sensor digital e guias durante a exame radiográfico.

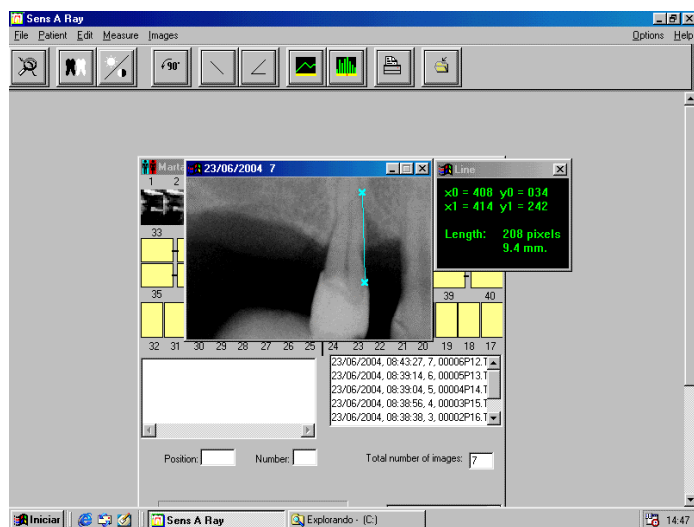


Figura 7 - Avaliação do Nível do Defeito ósseo.

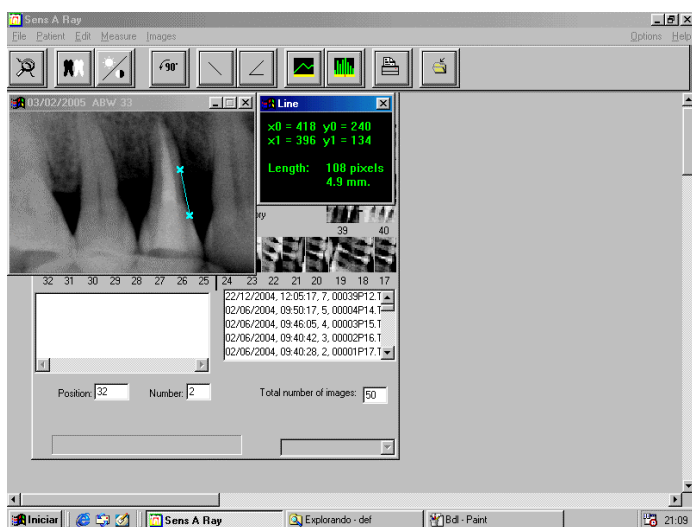


Figura 8 - Avaliação da Crista óssea Alveolar.

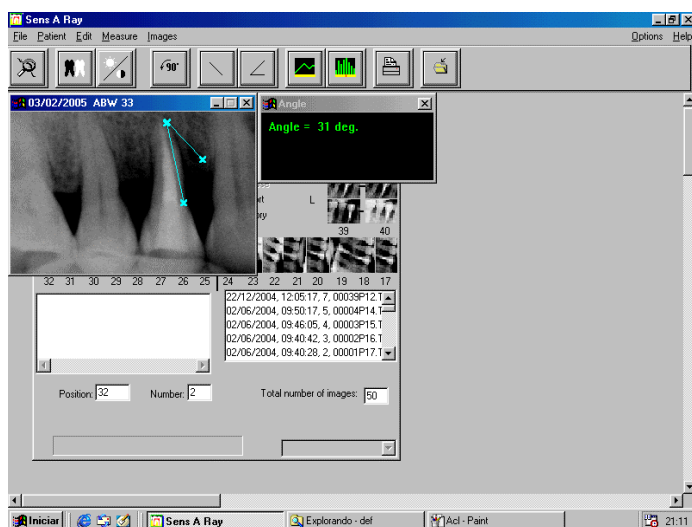


Figura 9 - Avaliação do ângulo do defeito.



Figura 10 - Sítio RTG; Vista vestibular, pré-operatório



Figura 11 - Sítio RTG; Vista palatina, pré-operatório



Figura 12 - Dedridamento dos defeitos



Figura 13 - Membrana adaptada e suturada



Figura 14 - Pós-operatório imediato, lado vestibular



Figura 15 - Pós-operatório imediato, lado palatino



Figura 16 - Sítio RTG; Vista vestibular, 6 meses após



Figura 17 - Sítio RTG; Vista palatina, 6 meses após



Figura 18 - Radiografia inicial



Figura 19 - Radiografia final

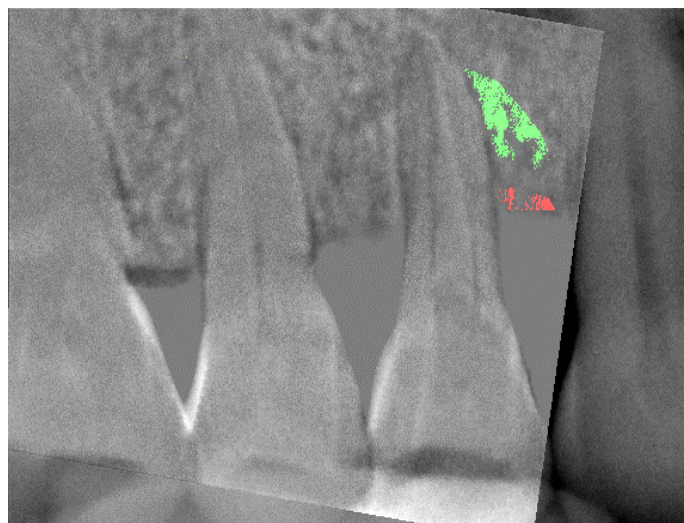


Figura 20 - Subtração radiográfica



Figura 21 - Sítio EMD; Vista vestibular, pré-operatório



Figura 22 - Sítio RTG; Vista palatina, pré-operatório



Figura 23 - Dedridamento dos defeitos



Figura 24 - Aplicação das EMD



Figura 25 - Pós-operatório imediato, lado vestibular



Figura 26 - Pós-operatório imediato, ladopalatino



Figura 27 - Sítio EMD; Vista vestibular, 6 meses após



Figura 28 - Sítio EMD; Vista palatina, 6 meses após



Figura 29 - Radiografia inicial

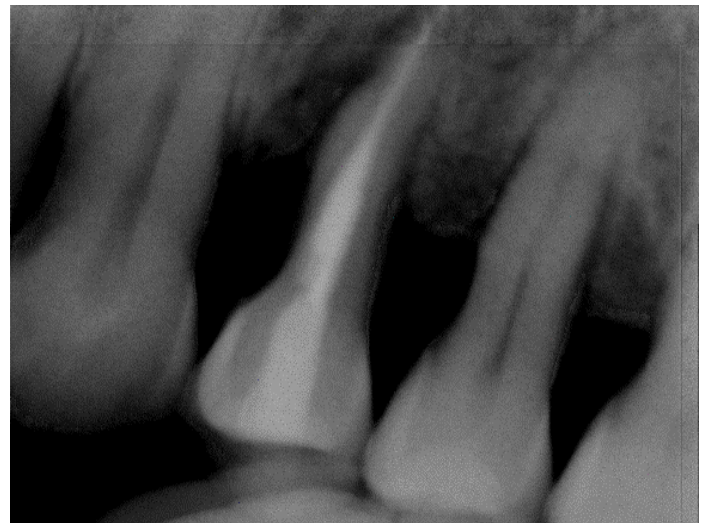


Figura 30 - Radiografia final

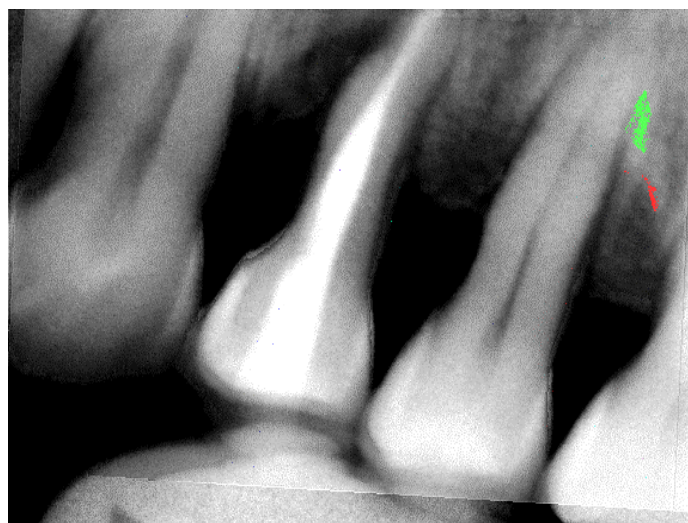


Figura 31 - Subtração radiográfica

5 RESULTADOS

Todos os pacientes toleraram bem os procedimentos, sem complicações pós-operatórias, e cooperaram com o protocolo proposto. As médias para o IPI foram $17,88 \pm 2,17$ % e $17,13 \pm 1,59$ %, e para o ISS $18,52 \pm 1,59$ % e $15,83 \pm 2,30$ %, obtidos respectivamente nos exames inicial e final (Tabela 2). Para estes índices não foram encontradas diferença estatística significativa entres os períodos de observação ($P > 0,05$). Os dentes em estudo se mantiveram livres de placa durante todo o estudo.

Tabela 2
Valores médios percentuais e desvios padrão dos Índices de Placa (IPI) e de Sangramento à Sondagem (ISS), entre os exames inicial e final

	inicial	final	<i>P</i>
IPI	$17,88 \pm 2,17$	$17,13 \pm 1,52$	0,056
ISS	$18,52 \pm 1,59$	$15,83 \pm 2,30$	0,051

Teste *t* de Student; nível de significância = $P < 0,05$.

IPI = Índice de Placa; ISS = Índice de Sangramento à Sondagem.

Os valores médios e desvio padrão para os parâmetros clínicos lineares entre os tempos experimentais, assim como a comparação entre os grupos podem ser vistos nas tabelas 3, 4 e 5. No exame inicial, não houve diferença estatística entre os grupos para todos os parâmetros avaliados ($P > 0,05$), mostrando equivalência entre os grupos (Tabela 3).

Em ambos os grupos, considerando os tempos inicial e final, houve diferença estatística significativa para todos os parâmetros avaliados ($P < 0,05$). No grupo EMD, o nível da margem gengival (NMG) mudou de $0,98 \pm 1,21$ mm para $1,81 \pm 0,77$ mm (aumento médio de $0,91 \pm 0,42$ mm). A profundidade de sondagem (PS) mudou de $7,18 \pm 0,58$ para $3,09 \pm 0,26$ mm (diminuição de $4,09 \pm 0,42$ mm). Os valores correspondentes para o nível clínico de inserção (NCI) foram de $8,09 \pm 1,46$ mm e $4,90 \pm 0,93$ mm (melhora de $3,34 \pm 0,71$ mm (Tabela 4).

No grupo RTG, o NMG aumentou $1,18 \pm 0,61$ mm, a PS diminuiu em média $4,58 \pm 0,38$ mm, e o NCI melhorou em $3,49 \pm 0,71$ mm (mudando de $8,51 \pm 1,02$ mm para $5,10 \pm 0,70$ mm) (Tabela 4). Entre a segunda e terceira semanas pós-operatórias, houve exposição de 6 das 11 membranas colocadas (54,54%). Entretanto, não houve inflamação severa ou supuração, e as porções expostas das barreiras desintegraram dentro de 10 dias.

A comparação entre os grupos pode ser avaliada na Tabela 5. Houve diferença estatística entre os grupos nos parâmetros NMG e PS ($P < 0,05$). Em média, houve maior redução da profundidade de sondagem ($0,49 \pm 0,42$ mm) acompanhada de maior recessão gengival ($0,45 \pm 0,45$ mm) nos sítios do grupo RTG. Entretanto, a diferença entre os grupos aos 6 meses no ganho de inserção clínica ($0,14 \pm 0,73$ mm) não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$).

Tabela 3
Valores médios (mm) e desvio padrão entre os sítios do grupo EMD e RTG, no exame inicial

	<i>EMD</i>	<i>RTG</i>	<i>P</i>
NMG	$0,98 \pm 1,21$	$1,07 \pm 1,17$	0,28
PS	$7,18 \pm 0,57$	$7,44 \pm 0,62$	0,15
NCI	$8,09 \pm 1,46$	$8,51 \pm 1,02$	0,20
NDO	$8,98 \pm 1,39$	$9,40 \pm 0,99$	0,20
NCOA	$4,58 \pm 1,18$	$4,98 \pm 1,05$	0,18
INTRA	$4,40 \pm 0,61$	$4,33 \pm 0,37$	0,36
ANGULO	$32,91 \pm 5,03$	$32,27 \pm 3,26$	0,38

Teste *t* de *Student*; nível de significância = $P < 0,05$.

NMG = Nível da Margem Gengival; PS = Profundidade de Sondagem; NCI = Nível Clínico de Inserção.

NDO = Nível do Defeito Ósseo; NCOA = Nível da Crista Óssea Alveolar; INTRA= componente intra-ósseo.

Tabela 4

Valores médios (mm) e desvio padrão para os parâmetros clínicos Nível da Margem Gengival (NMG), Profundidade de Sondagem (PS), e Nível Clínico de Inserção (NCI) nos exames inicial e final dos sítios EMD e RTG

	EMD			RTG		
	inicial	final	P	inicial	final	P
NMG	0,98 ± 1,21	1,81 ± 0,77	0,0001	1,07 ± 1,17	2,25 ± 0,83	0,0001
PS	7,18 ± 0,58	3,09 ± 0,26	0,0001	7,44 ± 0,62	2,85 ± 0,32	0,0001
NCI	8,09 ± 1,46	4,90 ± 0,93	0,0001	8,51 ± 1,02	5,10 ± 0,70	0,0001

Teste *t* de *Student*; nível de significância = $P < 0,05$

NMG = Nível da Margem Gengival; PS = Profundidade de Sondagem; NCI = Nível Clínico de Inserção.

Tabela 5

Valores médios (mm) e desvio padrão entre os sítios EMD e RTG para os parâmetros clínicos Nível da Margem Gengival (NMG), Profundidade de Sondagem (PS), e Nível Clínico de Inserção (NCI).

	EMD	RTG	DIFERENÇA	P
NMG	0,91 ± 0,42	1,18 ± 0,61	0,45 ± 0,45	0,03
PS	4,09 ± 0,42	4,58 ± 0,38	0,49 ± 0,42	0,001
NCI	3,34 ± 0,71	3,49 ± 0,71	0,14 ± 0,73	0,26

Teste *t* de *Student*; nível de significância = $P < 0,05$.

NMG = Nível da Margem Gengival; PS = Profundidade de Sondagem; NCI = Nível Clínico de Inserção.

As tabelas 6 e 7 destacam os valores obtidos nos parâmetros radiográficos obtidos nos tempos inicial e final. Não houve diferença estatística em nenhum dos parâmetros na comparação entre os grupos considerando os valores iniciais ($P > 0,05$) (Tabela 3). Entretanto, houve diferença estatística na comparação intra-grupos, considerando os valores inicial e final, em ambos os grupos ($P < 0,05$). No grupo EMD, a média do NDO foi $8,98 \pm 1,40$ mm no exame inicial e $7,00 \pm 1,13$ mm no exame final, o NCOA mudou de $4,58 \pm 1,19$ mm para $4,75 \pm 1,18$ mm. INTRA diminuiu de $4,40 \pm 0,61$ mm para $2,24 \pm 0,39$ mm. No grupo RTG, os valores inicial e final foram respectivamente $9,40 \pm 0,10$ mm e $7,20 \pm 1,08$ mm (NDO), $4,98 \pm 1,05$ mm e $5,21 \pm 1,07$ mm (NCOA), e $4,33 \pm 0,37$ mm e $1,99 \pm$

0,23 mm (INTRA) (Tabela 6). Considerando as mudanças no NDO, NCOA e INTRA, foram calculados a reabsorção da crista óssea alveolar e preenchimento dos defeitos, em ambos os grupos (tabela 7). A reabsorção da crista óssea alveolar nos grupos EMD e RTG foram respectivamente $0,17 \pm 0,06$ mm e $0,23 \pm 0,11$ mm. Houve em média $0,05 \pm 0,12$ mm mais reabsorção no grupo RTG em relação ao grupo EMD ($P > 0,05$). O preenchimento ósseo foi estatisticamente maior no grupo RTG ($2,43 \pm 0,36$ mm), em relação ao grupo EMD ($2,14 \pm 0,48$ mm) ($P > 0,05$). Estes valores representam preenchimento ósseo percentual de $53,94 \pm 4,21$ (%), e $48,72 \pm 7,02$ (%) nos grupos RTG e EMD, respectivamente.

Tabela 6

Valores médios (mm) e desvio padrão para os parâmetros clínicos Nível do Defeito Ósseo (NDO), Nível da Crista Óssea Alveolar (NCOA) e Componente Intra-ósseo (INTRA) nos exames inicial e final dos sítios teste e controle

	EMD			RTG		
	inicial	final	<i>P</i>	inicial	final	<i>P</i>
NDO	$8,98 \pm 1,40$	$7,0 \pm 1,13$	0,0001	$9,4 \pm 0,10$	$7,2 \pm 1,08$	0,0001
NCOA	$4,58 \pm 1,19$	$4,75 \pm 1,18$	0,0001	$4,98 \pm 1,05$	$5,21 \pm 1,07$	0,0001
INTRA	$4,40 \pm 0,61$	$2,24 \pm 0,39$	0,0001	$4,33 \pm 0,37$	$1,99 \pm 0,23$	0,0001

Teste *t* de Student; nível de significância = $P < 0,05$.

NDO = Nível do Defeito Ósseo; NCOA = Nível da Crista Óssea Alveolar; INTRA= componente intra-ósseo.

Tabela 7

Valores médios (mm) e desvio padrão entre os sítios EMD e RTG para os parâmetros clínicos Reabsorção da Óssea Alveolar, e Preenchimento ósseo dos defeitos.

	EMD	RTG	DIFERENÇA	P
Reabsorção óssea	0,17 ± 0,06	0,23 ± 0,11	0,05 ± 0,12	0,08
Preenchimento ósseo	2,14 ± 0,48	2,43 ± 0,36	0,28 ± 0,70	0,10

Teste *t* de Student; nível de significância = $P < 0,05$.

A Tabela 8 evidencia a comparação entre os grupos para a densidade óptica (DO). A subtração radiográfica mostra que após 6 meses a DO aumentou em $3,55 \pm 1,05$ pontos de níveis de cinza no grupo EMD e $4,15 \pm 0,39$ no grupo RTG. A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Tabela 8

Valores médios e desvio padrão entre os sítios EMD e RTG para o parâmetro Densidade óptica (níveis de cinza).

	EMD	RTG	DIFERENÇA	P
DO	3,55 ± 1,05	4,15 ± 0,39	0,61 ± 1,12	0,05

Teste *t* de Student; nível de significância = $P < 0,05$.

DO= Densidade óptica.

6 DISCUSSÃO

Este estudo clínico controlado de boca dividida foi conduzido para comparar duas técnicas regenerativas: o uso das proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD) e barreiras reabsorvíveis em defeitos intra-ósseos maiores que 4,0 mm, predominantemente de uma ou duas paredes ósseas. Defeitos com estas características apresentam menor potencial regenerativo que os defeitos de 3 paredes (Tonetti *et al.*, 1996; Cortellini & Tonetti, 2000). Portanto, os sítios tratados no presente estudo são mais desafiadores quanto à possibilidade de nova formação dos tecidos perdidos pela evolução da doença periodontal; i.e., osso, cemento e ligamento periodontal. Aproximadamente 90% dos sítios EMD (10 dos 11 defeitos) e 80% dos sítios do grupo RTG (9 dos 11 defeitos), apresentavam uma ou duas paredes ósseas residuais. O componente intra-ósseo médio dos sítios dos grupos EMD e RTG eram respectivamente de $4,4 \pm 0,61$ mm e $4,33 \pm 1,99$ mm. O desenho “*split-mouth*” deste estudo permitiu que cada paciente recebesse os dois tratamentos em condições clínicas semelhantes, eliminando a variabilidade ligada às condições dos pacientes que poderia prejudicar as comparações. Desta forma os resultados obtidos devem ser atribuídos exclusivamente aos tratamentos propostos.

Os índices de placa e sangramento à sondagem foram mantidos abaixo de 20% durante todo o estudo, e os dentes submetidos aos procedimentos experimentais com ausência de placa bacteriana (Tabela 2). Por esta razão a resposta clínica aos procedimentos não foram influenciados pelo controle de placa dos pacientes. Diversos estudos mostraram que a ausência de placa é fundamental para a obtenção de resultados clínicos e a manutenção dos mesmos longitudinalmente (Francetti *et al.*, 2002; Sculean *et al.*, 2003; Parodi *et al.*, 2004; Sculean *et al.*, 2004).

Existe grande variabilidade de resultados observados na literatura quanto às mudanças clínicas e radiográficas obtidas após o uso das EMD e princípios da RTG. Kalpidis & Ruben (2002) compilaram em metanálise diversos estudos usando as EMD e observaram redução média de profundidade de

sondagem de $3,2 \pm 0,9$ mm (variando entre 1,9 mm e 5,1 mm), ganho de inserção de $4,0 \pm 0,9$ mm (variação de 1,7 mm a 4,5 mm), e recessão gengival média de $0,9 \pm 0,4$ mm. Cortellini & Tonetti (2000), em outra metanálise de estudos usando o princípio da RTG, reportam médias de ganho de inserção clínica e redução de profundidade de sondagem respectivamente de $3,86 \pm 1,69$ mm e $3,35 \pm 1,19$ mm. Nossos resultados são comparáveis aos resultados supracitados, com redução na profundidade de sondagem ($4,09 \pm 0,42$ mm versus $4,58 \pm 0,38$ mm), ganho do nível clínico de inserção ($3,34 \pm 0,71$ mm versus $3,49 \pm 0,71$ mm) e aumento da recessão gengival ($0,91 \pm 0,42$ versus $1,18 \pm 0,61$ mm), respectivamente para os grupos EMD e RTG. Estes resultados confirmam a previsibilidade de ambas as abordagens regenerativas em melhorar as condições clínicas de dentes associados aos defeitos intra-ósseos.

Sculean *et al.* (1999), compararam as EMD e barreiras reabsorvíveis e revelaram alterações clínicas semelhantes, com redução da profundidade de sondagem (3,8 mm x 4,0 mm), melhora do nível clínico de inserção (3,1 mm x 3,0 mm) e recessão gengival (0,8 mm x 1,1 mm) respectivamente para os grupos EMD e RTG. Não houve diferença estatística entre os grupos para estas variáveis. Outros estudos confirmam a equivalência entre as duas modalidades de tratamento (Silvestri *et al.*, 2000; Parashis *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2004). Entretanto, no presente estudo houve maior redução de profundidade de sondagem e maior recessão gengival no grupo RTG, de aproximadamente 0,5 mm para ambos os parâmetros ($P < 0,05$). Nossos resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Zucchelli *et al.* (2002), em que os autores compararam as EMD, barreiras não reabsorvíveis e retalhos para instrumentação no tratamento de defeitos periodontais. Foi observado que ambas as terapias regenerativas foram superiores em relação ao grupo controle, entretanto houve maior redução da profundidade de sondagem (6,5 mm versus 5,1 mm), e aumento da recessão gengival (1,6 mm versus 1,0 mm) no grupo RTG.

A interpretação clínica destas alterações deve ser feita com cautela. A profundidade de sondagem residual ao final dos 6 meses deste estudo foi de 3,09

mm no grupo EMD, e 2,85 mm no grupo RTG. Do ponto de vista clínico, estas medidas são favoráveis para as medidas de higienização, uma vez que profundidades residuais entre 3,0 mm e 4,0 mm apresentam menor probabilidade de sofrer perda de inserção futura (Badersten *et al.*, 1985).

Considerando a equivalência entre os tratamentos com relação ao ganho de inserção clínica observados presente trabalho, a maior redução da profundidade de sondagem é parcialmente explicada pela maior recessão gengival após o uso das barreiras. A recessão da margem gengival após a técnica da RTG pode ser acompanhada por seqüelas indesejáveis do ponto de vista estético e funcional. A perda das papilas interdentais na região ântero-superior relacionadas à recessão gengival representa problema estético de difícil resolução, cujo tratamento normalmente depende de enxertos de tecidos moles que aumentam a morbidade do tratamento e apresentam resultados imprevisíveis.

O aumento da recessão gengival aumenta também a probabilidade de exposição das barreiras, que por sua vez estão associadas a um menor ganho de inserção clínica e riscos de complicações como a formação de abscessos (De Sanctis *et al.*, 1996; Nowzari *et al.*, 1996). A taxa de exposição de barreiras reportada na literatura varia entre 70% a 80% dos casos (Cortellini & Tonetti, 2000). Em nosso estudo, houve exposição das barreiras em 54,54% dos casos (6 das 11 membranas colocadas). Nestes casos, a degradação da porção exposta das barreiras ocorreu dentro uma a duas semanas não acompanhadas de inflamação ou supuração. Nenhum sítio foi excluído, e os pacientes foram acompanhados regularmente para reforço do controle químico e mecânico do biofilme.

Em média, a recessão gengival que ocorreu após o uso das EMD ou barreiras não biodegradáveis no estudo de Zucchelli *et al.* (2002) foi estatisticamente maior no grupo das barreiras (1,6 mm versus 1,0 mm). Entretanto, quando a proporção de sítios que mostraram maior ou menor recessão gengival é analisada, observou-se que 87% dos sítios tratados com as EMD apresentaram recessão abaixo de 1,0 mm; ao passo que no outro grupo quase a

metade (47%) dos sítios mostraram mais 2,0 mm de recessão pós-operatória. Estes achados foram confirmados pelos nossos resultados, com aumento da recessão de $0,91 \pm 0,42$ mm e $1,18 \pm 0,61$ mm nos grupos EMD e RTG, e maior proporção de sítios com recessão acima de 1,0 mm no grupo RTG (63,6% versus 36,4%). No trabalho de Silvestri *et al.* (2000), houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos RTG e EMD quanto à recessão gengival (1,0 mm e 0,5 mm, respectivamente), e 70% de exposição de barreiras.

A frequência de exposição das barreiras pode ser reduzida nos casos em que retalhos específicos para a preservação das papilas e tecidos moles são usados (Lekovic *et al.*, 2001; Tonetti *et al.*, 2002; Trombelli *et al.*, 2002; Zucchelli *et al.*, 2002). No presente estudo, sempre que possível, manobras para a preservação das papilas interdentalis foram empregadas. Entretanto, ainda assim ocorreu exposição das barreiras em 54,54% dos casos. Estes dados estão de acordo com os resultados de Zucchelli *et al.* (2002) em que ocorreu exposição das barreiras em 33% dos casos (10 dos 30 casos tratados), usando o mesmo tipo de retalho. Portanto, a seleção do tipo de retalho considerando as características anatômicas do espaço interdental e localização/morfologia do defeito direciona para maiores ganhos do nível clínico de inserção associados à menor recessão da margem gengival.

A sofisticação oferecida por retalhos específicos também proporciona maior proteção ao coágulo que se forma após os procedimentos regenerativos. É estabelecido que micromovimentos do retalho possam prejudicar a estabilidade inicial do coágulo formado entre o retalho e a superfície radicular, prejudicando o curso natural do tipo de cura periodontal esperada (Claffey, 1997). Por isso, a maior parte dos estudos considera a não utilização de medidas mecânicas de higiene oral durante o pós-operatório imediato. Neste estudo, foi adotado um protocolo em que os pacientes fizeram bochechos com digluconato de clorexidina 0,12% duas vezes ao dia durante 4 semanas e foram orientados a não promoverem escovação e uso do fio dental pelo mesmo período. Outros pesquisadores adotaram a utilização do antimicrobiano por até 2 meses (Silvestri

et al., 2003) e encontraram ganho de nível clínico de inserção de 4,1 mm no grupo EMD, e 4,3 mm no grupo RTG, sugerindo que este protocolo é efetivo.

A mobilidade dental durante as fases iniciais da cicatrização, também pode interferir com a estabilidade do coágulo formado. O ato da instrumentação periodontal pode aumentar temporariamente a mobilidade dos dentes, principalmente em situações de ampla perda óssea. Baseados neste princípio, Lekovic *et al.* (2000, 2001a,b) e Camargo *et al.* (2001) esplintaram os dentes que seriam submetidos às terapias regenerativas usando as EMD associadas a material de preenchimento e barreiras. Em nosso estudo, a fixação de dentes com mobilidade não foi feita prévia aos procedimentos cirúrgicos. De fato, observamos que durante nas duas primeiras semanas pós-operatórias, houve discreto aumento da mobilidade dental em diversos sítios. O fato de que a mobilidade dental durante as fases iniciais de reparo possa ter influenciado nossos resultados não pode ser excluído.

A avaliação das medidas lineares pode ser influenciada pelos métodos de avaliação empregados. A força aplicada, a forma e diâmetro da sonda, angulação e ponto de sondagem entre momentos distintos, e a consistência e estado inflamatório do tecido gengival podem prejudicar a obtenção destes parâmetros. Este estudo utilizou uma sonda eletrônica de pressão controlada com marcações a cada 0,2 mm, ao passo que a maior parte dos trabalhos na literatura avaliou as medidas clínicas com sondas milimetradas manuais. A utilização da sonda eletrônica de pressão controlada diminui a possibilidade de vieses na avaliação dos parâmetros e elimina a relativa subjetividade da leitura visual das medidas, uma vez que este tipo de sonda permite a captura automática dos dados pelo acionamento do pedal acoplado à sonda e ao computador. A inclusão de metodologias mais sensíveis, como o uso das sondas eletrônicas de pressão controlada, possa auxiliar na comparação entre diferentes abordagens terapêuticas.

A análise radiográfica feita em nosso estudo, considerando as alterações do nível da crista óssea alveolar e nível do defeito ósseo, revelou que houve

semelhante reabsorção da crista óssea entre os grupos (EMD: $0,17 \pm 0,06$ mm; RTG: $0,23 \pm 0,11$ mm). A diferença entre estas medidas de $0,05 \pm 0,12$ mm não foi significativa ($P > 0,05$). Entretanto, houve maior preenchimento ósseo no grupo RTG ($2,43 \pm 0,36$ mm), em relação ao grupo EMD ($2,14 \pm 0,48$ mm). Estes valores representam o preenchimento ósseo de $53,94 \pm 4,21$ % e $48,72 \pm 7,02$ % dos defeitos iniciais, respectivamente para os grupos RTG e EMD.

Diversos estudos mostraram preenchimento ósseo dos defeitos na avaliação radiográfica após o tratamento de defeitos intra-ósseos usando Emdogain® ou barreiras degradáveis e não degradáveis (Heijl, 1997; Heden *et al.*, 1999; Sculean *et al.*, 1999; Heden, 2000; Okuda, 2000). Apesar da previsibilidade de melhora nos parâmetros clínicos, houve grande inconsistência nos resultados radiográficos quanto ao preenchimento ósseo dos defeitos, variando de 0% até cerca de 70%. Comparações radiográficas precisas são difíceis porque dependem da obtenção de pares radiografias padronizadas quanto ao método de obtenção (convencional versus digital; cone longo versus cone curto), geometria e processamento (automático ou manual). O tempo de obtenção entre as radiografias inicial e final também pode influenciar na avaliação. É estabelecido que alterações radiográficas após procedimentos regenerativos dependam do grau de mineralização óssea. Entretanto, o processo de maturação óssea é lento e pode levar bem mais tempo para ser radiograficamente evidenciado. Alterações na densidade óssea podem ser notadas até dois anos após as terapias regenerativas (Tonetti *et al.*, 1998; Eickholz *et al.*, 1998).

A subtração radiográfica propicia maior precisão na avaliação das alterações ósseas seguidas da terapia regenerativa (Brägger *et al.*, 1991; Jeffcoat, 1992; Caton & Greenstein, 1993; Joly *et al.*, 2002; Palioto *et al.*, 2003). No presente estudo, a DO melhorou em média $3,55 \pm 1,05$ pontos de cinza no grupo EMD, e $4,15 \pm 0,39$ no grupo RTG ($P > 0,05$). Entretanto, a flutuação na voltagem e o tempo de exposição podem causar mudanças na densidade e contraste das imagens obtidas. No presente estudo, uma corrente elétrica estabilizada (110V) foi usada, e tempo de exposição fixado em 0,22 segundos. A geometria das imagens

obtidas em tempos deferentes também pode prejudicar a subtração radiográfica (Duckworth *et al.*, 1983; Rudolph & White, 1988). Neste sentido, o posicionador intra-bucal associado ao extra-bucal foram empregados, e efetivos para diminuir diferenças geométricas nos pares radiográficos.

Parece existir correlação positiva entre o preenchimento ósseo e ganho de inserção e o ângulo do defeito periodontal. Tonetti *et al.* (1993) analisaram pares de radiografias padronizadas obtidas antes da terapia regenerativa usando barreiras, e 15 a 18 meses após, e observaram que quanto maior o ângulo dos defeitos menor foi o ganho de inserção clínica. Cortellini & Tonetti (1999), avaliaram o tratamento de 242 defeitos com a técnica da RTG, e concluíram que em média os defeitos com ângulo estreitos ($\leq 25^{\circ}$) ganhavam 1,5 mm de inserção a mais que os defeitos largos ($\geq 37^{\circ}$). Em estudo recente, Tsitoura *et al.* (2004), avaliaram o impacto do ângulo do defeito no resultado do tratamento de defeitos intra-ósseos usando as EMD. Foram analisados 67 pares de radiografias periapicais obtidas antes do tratamento e um ano depois. Por meio de análise de regressão logística, foi determinado que a probabilidade de ganho de inserção superior a 4,0 mm, é 2,464 vezes maior em sítios com ângulo $\leq 22^{\circ}$, em relação aos defeitos de ângulo $\geq 36^{\circ}$. No presente trabalho o ângulo dos defeitos do grupo EMD aumentaram de $32,90 \pm 5,03$ graus para $39,18 \pm 6,46$ graus ($P < 0.05$), e $32,27 \pm 3,26$ graus para $41,09 \pm 2,55$ graus no grupo RTG ($P < 0.05$). Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Trombelli *et al.* (2002), em que o ângulo dos defeitos aumentaram de $33,8 \pm 12$ graus para $50,0 \pm 16$ graus. Entretanto, no trabalho de Trombelli *et al.* (2002) houve maior ganho de inserção clínica que no presente estudo ($4,7 \pm 1,7$ mm versus $3,34 \pm 0,71$ mm). A diferença no ganho de inserção entre os dois estudos pode parcialmente ser explicada pelas características dos sítios tratados.

A relação entre o ganho ósseo radiográfico e o ganho ósseo real nem sempre é fiel. No estudo de Windish *et al.* (2002), avaliações clínicas e radiográficas foram feitas em dentes que seriam extraídos. Após 6 meses do tratamento usando as EMD ou barreiras biodegradáveis, os dentes foram

extraídos em bloco para análise histométrica. A relação entre o ganho ósseo na radiografia e na histometria foi de 0,47 mm / 1,93 mm para o grupo RTG. Estas diferenças foram estatisticamente significantes. Os valores correspondentes para o grupo EMD foram respectivamente 1,05 mm e 0,78 mm ($p>0,05$). Apesar da discrepância dos resultados radiográficos e histométricos entre os dois grupos, não houve diferenças estatísticas no comportamento dos parâmetros clínicos, com semelhante redução na profundidade de sondagem e ganho do nível clínico de inserção. Isto aponta para o fato de que nem sempre o ganho de inserção clínica é acompanhado por preenchimento ósseo. Parece que estes dois fenômenos não são necessariamente correlacionados (Nyman *et al.*, 1982; Lindhe *et al.*, 1984). Do ponto de vista clínico a não observação de ganho ósseo radiográfico não implica necessariamente em falha da intervenção regenerativa (Windisch *et al.*, 2002).

Hammarstöm *et al.* (1997) e Heijl (1997) correlacionaram a aplicação das EMD em defeitos periodontais à formação de novo cemento acelular, osso e ligamento periodontal. Entretanto, os estudos histológicos mais recentes atestam a habilidade das EMD em regenerar os tecidos periodontais perdidos, mas contestam a previsibilidade de formação do cemento acelular em seres humanos (Kalpidis & Ruben, 2002). A discussão sobre o tipo de cemento formado; i.e. celular, acelular ou misto parece não ter relevância clínica. Sculean *et al.* (2000) e Yukna & Mellonig (2000) mostraram, em análise histométrica, que as EMD, barreiras biodegradáveis ou a combinação de ambas produzem diferentes padrões de celularidade do novo cemento. Entretanto também observaram que ocorre a mesma frequência de artefatos histológicos (espaço entre a superfície radicular e novo cemento) entre os grupos, sugerindo que a resistência deste tecido não é influenciada por sua celularidade.

A maior parte dos estudos associando as EMD ao tratamento de defeitos periodontais adotaram diferentes protocolos de uso de antibióticos, com a intenção de diminuir a possibilidade de infecção pós-operatória. A hipótese de que a resposta ao tratamento pudesse ser, pelo menos em parte, atribuída ao antibiótico não pode ser descartada. Em nosso estudo, antibióticos sistêmicos não foram

empregados. Sculean *et al.* (2001) desenvolveram um estudo em que um grupo de pacientes foi tratado usando as EMD associadas a um protocolo antimicrobiano (grupo Teste: 17 pacientes; 250 mg de amoxicilina + 250 mg de metronidazol, 3 vezes ao dia durante 7 dias), e um outro grupo sem a administração do antibiótico (grupo Controle: 17 pacientes). Um ano após o início do estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas na comparação entre os grupos quanto à melhora nos parâmetros clínicos lineares, com redução da profundidade de sondagem de 4,6 mm e ganho no nível clínico de inserção de 3,5 mm para os sítios do grupo Teste, em relação aos valores correspondentes do grupo Controle (4,6 mm e 3,3 mm), respectivamente. Os resultados dos dois estudos apontam para que a administração de antibióticos durante o pós-operatório na maior parte dos casos é desnecessária desde que os pacientes participem de um rigoroso programa de controle de placa.

Segundo orientação do fabricante, o protocolo de utilização do Emdogain® inclui a biomodificação da superfície radicular com ácido tetracético diaminoetileno (EDTA) na concentração de 24% (pH=6,7) durante dois minutos para remoção da lama dentinária produzida pelo ato da instrumentação periodontal. Isto cria um ambiente favorável, sem a presença de restos orgânicos, para a precipitação das EMD sobre a superfície radicular (Blomlöf *et al.*, 1996). Outros efeitos da biomodificação radicular incluem a abertura dos túbulos dentinários e exposição da matriz colágena peri e intertubular que possivelmente liberam fatores de crescimento contidos no cimento e dentina que possam influenciar positivamente as células do ligamento periodontal durante a cura periodontal (Hanes *et al.*, 1991; Blomlöf *et al.*, 1997).

O EDTA, com pH próximo ao neutro, age como quelante das moléculas de cálcio, e por isso não produz necrose tecidual (Sampaio *et al.*, 2003). Entretanto, esse mecanismo de remoção da lama dentinária pode influenciar a deposição de células sanguíneas sobre a superfície radicular prejudicando a formação do coágulo (McShine *et al.*, 1991), que é fundamental para a regeneração periodontal (Caton & Greenstein, 1993). Este conceito foi sustentado

por Leite & Sampaio (2004), em que diferentes agentes biomodificadores foram aplicados sobre a superfície radicular de dentes extraídos para avaliar por microscopia eletrônica de varredura a deposição de células sangüíneas. No estudo supracitado, O EDTA apresentou os piores resultados.

Outros agentes biomodificadores têm sido intensamente estudados. Entre eles, o cloridrato de tetraciclina e cloridrato de doxiciclina. A doxiciclina, um tipo de tetraciclina, apresenta grande capacidade de remoção da lama dentinária e exposição da matriz colágena peri e intertubular (Barkhordar *et al.*, 1997; Madison & Hokett, 1997; Ciotti, 2004), comparável com a efetividade do EDTA (Bergenholtz & Babay, 1998). Além disso, a doxiciclina oferece efeitos adicionais, como a grande substantividade sobre a superfície radicular e subsequente liberação sem perder a sua atividade antibacteriana (Demirel *et al.*, 1991), e propriedade anticolagenolítica (Mader *et al.*, 1984; Stabholz *et al.*, 1993; Hanemaaijer *et al.*, 1998). No entanto, o pH da tetraciclina e doxiciclina é baixo (ácido), e seu mecanismo de ação é por desmineralização, que pode causar necrose superficial dos tecidos periodontais na dependência da concentração e tempo de aplicação (Blomlöf, 1996).

Enquanto a maior parte dos estudos utilizou o EDTA, alguns outros fizeram uso do ácido fosfórico a 37% durante 15 segundos (Heijl, 1997; Sculean *et al.*, 1999). Em nosso estudo, pela primeira vez, uma solução de cloridrato de doxiciclina na concentração de 50 mg/ml durante 4 minutos foi usada como agente biomodificador. O EDTA apresenta o mesmo potencial de remoção da lama dentinária em relação à doxiciclina, entretanto, as propriedades antimicrobianas e não antimicrobianas da doxiciclina devem ser levadas em conta na escolha do agente biomodificador (Alger *et al.*, 1990; Dyer *et al.*, 1993; Delazari *et al.*, 1999). Até o momento os instrumentos periodontais de avaliação dos procedimentos terapêuticos não foram capazes de verificar benefícios clínicos quanto à utilização ou não dos agentes biomodificadores na resposta ao tratamento. Entretanto, o efeito biológico favorável com seu uso, direciona para a incorporação deste passo operatório nos procedimentos regenerativos. Por outro lado, no trabalho de

Parashis *et al.* (2004), nenhuma solução para biomodificação foi usada. Os resultados clínicos não foram diferentes entre as terapias (EMD, RTG, ou DFDBA), sugerindo que a descontaminação mecânica representa o aspecto mais importante da terapia periodontal.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, concluímos que 6 meses após o tratamento de defeitos intra-ósseos usando as proteínas derivadas da matriz do esmalte ou barreiras biodegradáveis, ambas as técnicas regenerativas foram efetivas. Entretanto o preenchimento ósseo usando a técnica RTG foi mais evidente.

REFERÊNCIAS*

Acuray – Raio x digital. São Paulo. New Image, 1996. (**Catálogo** 01/96).

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**. 1975; 25(4): 229-35.

Alger FA, Solt CW, Vuddhakanok S, Miles K. The histologic evaluation of new attachment in periodontally diseased human roots treated with tetracycline-hydrochloride and fibronectin. **J Periodontol**. 1990; 61(7): 447-55.

Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. VII. Bleeding, suppuration and probing depth in sites with probing attachment loss. **J Clin Periodontol**. 1985; 12(6): 432-40.

Barkhordar RA, Watanabe LG, Marshall GW, Hussain MZ. Removal of intracanal smear by doxycycline in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 1997; 84(4): 420-23.

Becker W, Becker BE, Berg L, Prichard J, Caffesse R, Rosenberg E. New attachment after treatment with root isolation procedures: Report for treated Class III and Class II furcation and vertical osseous defects. **Int J Periodontol Restorative Dent**. 1988; 8(3): 8-23.

Becker W, Becker BE, Mellonig J, Caffesse RG, Warrer K, Caton JG, *et al*. A prospective multi-center study evaluating periodontal regeneration for Class II furcation invasions and intrabony defects after treatment with a bioabsorbable barrier membrane: 1-year results. **J Periodontol**. 1996; 67(7): 641-9.

• De acordo com a norma utilizada na FOP/Unicamp, baseado no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com Medline.

Bergenholtz A, Babay N. Scanning electron microscopy of the root surface texture of extracted periodontally diseased teeth following various etching and chelating regimens. **Int J Periodont Rest Dent.** 1998; 18(2): 171-9.

Blomlof JP, Blomlof LB, Lindskog SF. Smear layer formed by different root planing modalities and its removal by an ethylenediaminetetraacetic acid gel preparation. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 1997; 17(3): 242-9.

Blomlof JP, Blomlof LB, Lindskog SF. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. **J Periodontol.** 1996; 67(9): 841-5.

Bragger U, Burgin W, Lang NP, Buser D. Digital subtraction radiography for the assessment of changes in peri-implant bone density. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1991; 6(2): 160-6.

Bratthall G, Lindberg P, Havemose-Poulsen A, Holmstrup P, Bay L, Soderholm G, *et al.* Comparison of ready-to-use EMDOGAIN-gel and EMDOGAIN in patients with chronic adult periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2001; 28(10): 923-9.

Caffesse, R. G., Smith, B. A., Duff, B., Morrison, E. C., Merrill, D. & Becker, W. Class II furcations treated by guided tissue regeneration in humans. Case reports. **Journal of Periodontology.** 1990; 61(8): 510-4.

Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB, Madzarevic M. The effectiveness of enamel matrix proteins used in combination with bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects in humans. **J Clin Periodontol.** 2001; 28(11): 1016-22.

Cardaropoli G, Leonhardt AS. Enamel matrix proteins in the treatment of deep intrabony defects. **J Periodontol**. 2002; 73(5): 501-4.

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

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

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

Ciotti, DL. Análise descritiva da aplicação de doxiciclina na superfície radicular de dentes humanos, por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de dispersão de energia [**dissertação**]. Piracicaba (SP): UNICAMP; 2004.

Claffey N. New attachment and tissue regeneration. Review. **Int Dent J**. 1992; 42(2): 71-7.

Cochran DL, Jones A, Heijl L, Mellonig JT, Schoolfield J, King GN. Periodontal regeneration with a combination of enamel matrix proteins and autogenous bone grafting. **J Periodontol**. 2003; 74(9):1269-81.

Cochran DL, King GN, Schoolfield J, Velasquez-Plata D, Mellonig JT, Jones A. The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. **J Periodontol**. 2003; 74(7):1043-55.

Cortellini P, Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. **Periodontol 2000**. 2000; 22: 104-32. Review.

Cortellini P, Tonetti, M. Radiographic defect angle influences the outcomes of GTR therapy in intrabony defects. **77th General Session of the IADR**, Vancouver, 1999.

Cortellini P, Pini Prato GP, Tonetti MS. Guided tissue regeneration with different materials. **Int J Periodontol Restorative Dent**. 1990; 10(2): 136-51.

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

Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti M. Periodontal regeneration of human intrabony defects with titanium reinforced membranes. A controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**. 1995; 66(9), 797–803.

De Sanctis M, Zucchelli G, Clauser C. Bacterial colonization of bioabsorbable barrier material and periodontal regeneration. **J Periodontol**. 1996; 67(11): 193-200.

Delazari FMC, Gerlach RF, Joly JC, Lima AFM. Scanning electron microscopy study of the effect of tetracycline HCL on smear layer removal and fibrin network formation. **Braz Dent J**. 1999; 10(2): 1-87.

Demirel K, Baer PN, McNamara TF. Topical application of doxycycline on periodontally involved root surfaces in vitro: Comparative analysis of substantivity on cementum and dentin. **J Periodontol**. 1991; 62(5): 312-16.

Demolon Ia, Moncla BI, Persson R. Bacterial colonization associated with the guided regeneration procedure. **J Dent Res.** (Special issue), Abstract # 537, 1991.

Duckworth JE, Judy PF, Goodson JM, Socransky SS. A method for the geometric and densitometric standardization of intraoral radiographs. **J Periodontol.** 1983; 54(7): 435-40.

Dyer BL, Caffesse RG, Nasjleti CE, Morrison EC. Guided tissue regeneration with dentin biomodification. **J Periodontol.** 1993; 64(11): 1052-60.

Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissues. **J Periodontol Res.** 1987; 22(3): 233-42.

Eickholz P, Kim TS, Holle R. Regenerative periodontal surgery with non-resorbable and biodegradable barriers: results after 24 months. **J Clin Periodontol.** 1998; 25(8): 666-76.

El Material Regenerativo Resolut. Italy: W.L.GORE, 1994. (**catálogo** 03/95).

Francetti L, Del Fabbro M, Basso M, Testori T, Weinstein R. Enamel matrix proteins in the treatment of intra-bony defects. A prospective 24-month clinical trial. **J Clin Periodontol.** 2004; 31(1): 52-9.

Froum SI, Weinberg MA, Rosenberg E, Tarnow D. A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: a 12-month re-entry study. **J Periodontol.** 2001; 72(1): 25-34.

Garret S, Bogle G. Periodontal regeneration: a review of flap management. **Periodontol 2000.** 1993; 1: 100-8.

Gestrelius S, Lyngstadaas SP, Hammarstrom L. Emdogain--periodontal regeneration based on biomimicry. **Clin Oral Investig**. 2000; 4(2):120-5. Review.

Gestrelius S, Andersson C, Lidström, Hammarström L, Sommerman MJ. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. **J Clin Periodontol**. 1997b; 24(9 pt 20): 685-692.

Gestrelius S, Andersson C, Johansson AC, Persson E, Brodin A, Rydhag L, *et al*. Formation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. **J Clin Periodontol**. 1997a; 24(9 pt 20): 678-84.

Giannobile WV, Somerman M. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. **Ann Periodontol**. 2003; 8(1): 193-204.

Goldman H, Cohen DW. The intrabony pocket: classification and treatment. **J Periodontol** 1958; 29: 272–91.

Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. **J Periodontol**. 1993; 64(11): 1157-65.

Gunsolley JC, Elswick RK, Davenport JM. Equivalence and superiority testing in regeneration clinical trials. **J Periodontol**. 1998; 69(5): 521-7.

Hamamoto Y, Kawasaki N, Jarnbring F, Hammarstrom L. Effects and distribution of the enamel matrix derivative Emdogain in the periodontal tissues of rat molars transplanted to the abdominal wall. **Dent Traumatol**. 2002; 18(1): 12-23.

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

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; 24(9 Pt 2): 669-77.

Hanemaaijer R, Visser H, Koolwijk P, Sorsa T, Salo T, Golub LM *et al.* Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemical modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. **Adv Dent Res.** 1998; 12(2): 114-8.

Hanes PJ, O'Brien NJ, Garnick JJ. A morphological comparison of radicular dentin following root planing and treatment with citric acid or tetracycline HCl. **J Clin Periodontol.** 1991; 18(9): 660-8.

Heard RH, Mellonig JT, Brunsvold MA, Lasho DJ, Meffert RM, Cochran DL. Clinical evaluation of wound healing following multiple exposures to enamel matrix protein derivative in the treatment of intrabony periodontal defects. **J Periodontol.** 2000; 71(11): 1715-21.

Heden G. A case report study of 72 consecutive Emdogain-treated intrabony periodontal defects: clinical and radiographic findings after 1 year. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 2000; 20(2): 127-39.

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; 26(12): 855-60.

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

Hill RW, Ramfjord S, Morrison EC. Four types of periodontal treatment compared over two years. **J Periodontol**. 1981; 52(11): 655-62.

Hoffman R. Formation of periodontal tissues around subcutaneously transplanted hamster molars. **J Dental Res**. 1960; 39: 781-798.

Jeffcoat MK. Digital radiology for implant treatment planning and evaluation. **Dentomaxillofac Radiol**. 1992; 21(4): 203-7.

Joly JC, Palioto DB, de Lima AF, Mota LF, Caffesse R. Clinical and radiographic evaluation of periodontal intrabony defects treated with guided tissue regeneration. A pilot study. **J Periodontol**. 2002; 73(4): 353-9.

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

Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM. Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. **J Periodontol Res**. 2000; 35(5): 291-300.

Leite FRM, Sampaio, JEC. Efeito do condicionamento radicular com EDTA, tetraciclina e ácido cítrico na adesão de células sanguíneas sobre a superfície radicular [**dissertação**]. Araraquara (SP): UNESP; 2004.

Lekovic V, Kenney EB, Carranza FA, Martignoni M. The use of autogenous periosteal grafts as barriers for treatment of Class II furcation involvements in lower molars. **Journal of Periodontology**. 1991; 61(12): 775-80.

Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Kenney EB, Vasilic N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. **J Periodontol.** 2001; 72(5): 583-9.

Lekovic V, Camargo Pm, Weinlaender M, Nedic M, Aleksic Z, Kenney EB. A comparison between enamel matrix proteins used alone or in combination with bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony periodontal defects in humans. **J Periodontol.** 2000; 71(7): 1110-6.

Lekovic V, Camargo Pm, Weinlaender M, Vasilic N, Djordjevic M, Kenney EB. The use of bovine porous bone mineral in combination with enamel matrix proteins or with an autologous fibrinogen/fibronectin system in the treatment of intrabony periodontal defects in humans. **J Periodontol.** 2001; 72(9): 1157-63.

Lindhe J, Nyman S, Karring T. Connective tissue reattachment as related to presence or absence of alveolar bone. **J Clin Periodontol.** 1984; 11(1): 33-40.

Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L, Bratthall G. Healing following surgical / non surgical treatment of periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1982; 9(2): 115-28.

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

Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S. Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. **J Clin Periodontol.** 2001; 28(2):181-8.

Mader CI, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. **J Endo**. 1984; 10(10): 477-83.

Madison JG, Hokett SD. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscope study. **J Periodontol**. 1997; 68(8): 739-45.

Magnusson I, Fuller WW, Heins PJ, Rau CF, Gibbs CH, Marks RG, Clark WB. Correlation between electronic and visual readings of pocket depth with a newly developed constant force probe. **J Clin Periodontol**. 1988; 15(3): 180-184.

McClain PK, Schallhorn RG. Focus on furcation defects--guided tissue regeneration in combination with bone grafting. **Periodontol 2000**. 2000; 22: 190-212. Review.

McShine RL, Das PC, Sibinga CT, Brozovic B. Effect of EDTA on platelet count and other platelet parameters in blood and blood components collected with CPDA-1. **Vox Sang**. 1991; 61(2): 84-9.

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol**. 1976; 47(5): 256-260.

Mellonig JT. Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery: technique and clinical and histologic case report. **Int J Periodontics Restorative Dent**. 1999; 19(1): 8-19.

Mombelli A, Lang N, Nyman S. Isolation of periodontal species after guided tissue regeneration. **Journal of Periodontology**. 1993; 64(11 Suppl): 1171-5.

Nowzari H, Slots J. Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. **J Clin Periodontol**. 1994; 21(3): 203-10.

Nowzari H, Matian F, Slots J. Periodontal pathogens on polytetrafluoroethylene membrane for guided tissue regeneration inhibit healing. **J Clin Periodontol**. 1995; 22(6): 469-74.

Nowzari H, Macdonald ES, Flynn J, London RM, Morrison JI, Slots J. The dynamics of microbial colonization of barrier membranes for guided tissue regeneration. **J Periodontol**. 1996; 67(7): 694-702.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol**. 1982; 9(4): 290-6.

Okuda K, Mamose M, Miyazaki A, Murata M, Yokoyama S, Yonezawa Y, *et al*. Enamel matrix derivative in the treatment of human intrabony osseous defects. **J Periodontol** 2000; 71(12): 1821-8.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000**. 1997; 14: 9-11.

Palioto DB, Joly JC, de Lima AF, Mota LF, Caffesse R. Clinical and radiographic treatment evaluation of class III furcation defects using GTR with and without inorganic bone matrix. **J Clin Periodontol**. 2003; 30(1): 1-8.

Parashis A, Andronikaki-Faldami A, Tsiklakis K. Clinical and radiographic comparison of three regenerative procedures in the treatment of intrabony defects. **Int J Periodontics Restorative Dent**. 2004; 24(1): 81-90.

Parkar MH, Tonetti M. Gene expression profiles of periodontal ligament cells treated with enamel matrix proteins in vitro: analysis using cDNA arrays. **J Periodontol.** 2004; 75(11): 1539-46.

Parodi R, Liuzzo G, Patrucco P, Brunel G, Santarelli Ga, Birardi V, *et al.* Use of Emdogain in the treatment of deep intrabony defects: 12-month clinical results. Histologic and radiographic evaluation. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 2000; 20(6): 584-95.

Patur B, Glickman I. Clinical and radiographic evaluation of the post-treatment healing of infrabony pockets. **J Periodontol.** 1962; 33: 164-171.

Petinaki E, Nikolopoulos S, Castanas E. Low stimulation of peripheral lymphocytes, following in vitro application of Emdogain. **J Clin Periodontol.** 1998; 25(9): 715-20.

Polson AM, Heijl LC. Osseous repair in infrabony periodontal defects. **J Clin Periodontol.** 1978; 5(1): 13-23.

Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. **J Periodontol.** 1983; 54(3): 141-7.

Ramfjord SP, Knowles JW, Nissle RR, Burgett FG, Shick RA. Results following three modalities of periodontal therapy. **J Periodontol.** 1975; 46(9): 522-26.

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; 12(8): 619-29.

Ricci G, Rasperini G, Silvestri M, Cocconcelli PS. In vitro permeability evaluation and colonization of membranes for periodontal regeneration by *Porphyromonas gingivalis*. **J Periodontol**. 1996; 67(5): 490-6.

Rosen PS, Reynolds MA. A retrospective case series comparing the use of demineralized freeze-dried bone allograft and freeze-dried bone allograft combined with enamel matrix derivative for the treatment of advanced osseous lesions. **J Periodontol**. 2002; 73(8): 942-9.

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

Rudolph DJ, White SC. Film-holding instruments for intraoral subtraction radiography. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1988; 65(6): 767-72.

Ruttimann UE, Webber RL, Schmidt E. A robust digital method for film contrast correction in subtraction radiography. **J Periodontal Res**. 1986; 21(5): 486-95.

Sallum EA, Pimentel SP, Saldanha JB, Nogueira-Filho GR, Casati MZ, Nociti FH, *et al*. Enamel matrix derivative and guided tissue regeneration in the treatment of dehiscence-type defects: a histomorphometric study in dogs. **J Periodontol**. 2004; 75(10):1 357-63.

Sampaio JE, Rached RS, Pilatti GL, Theodoro LH, Batista LH. Effectiveness of EDTA and EDTA-T brushing on the removal of root surface smear layer. **Pesqui Odontol Bras**. 2003; 17(4): 319-25.

Sander L, Karring T. New attachment and bone formation in periodontal defects following treatment of submerged roots with guided tissue regeneration. **Journal of Clinical Periodontology**. 1995; 22(4): 295–9.

Sanz M, Tonetti MS, Zabalegui I, Sicilia A, Blanco J, Rebelo H, *et al.* Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or barrier membranes: results from a multicenter practice-based clinical trial. **J Periodontol.** 2004; 75(5): 726-33.

Scheyer ET, Velasquez-Plata D, Brunsvold MA, Lasho DJ, Mellonig JT. A clinical comparison of a bovine-derived xenograft used alone and in combination with enamel matrix derivative for the treatment of periodontal osseous defects in humans. **J Periodontol.** 2002; 73(4): 423-32.

Sculean A, Reich E, Chiantella Gc, Brex M. Treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative (Emdogain): a report of 32 cases. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 1999b; 19(2): 157-63.

Sculean A, Chiantella GC, Miliauskaite A, Brex M, Arweiler NB. Four-year results following treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative: a report of 46 cases. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 2003b; 23(4): 345-51.

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; 27(7): 466–72.

Sculean A, Blaes A, Arweiler N, Reich E, Donos N, Brex M. The effect of postsurgical antibiotics on the healing of intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins. **J Periodontol.** 2001; 72(2): 190-5.

Sculean A, Barbe G, Chiantella GC, Arweiler NB, Berakdar M, Brex M. Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. **J Periodontol.** 2002; 73(4): 401-8.

Sculean A, Windisch P, Keglevich T, Chiantella GC, Gera I, Donos N. Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative combined with a bovine-derived xenograft. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 2003a; 23(1): 47-55.

Sculean A, Donos N, Windisch P, Brex M, Gera I, Reich E, *et al.* Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration. **J Periodontal Res.** 1999a; 34(6): 310-22.

Selvig KA, Kersten BG, Chamberlain AD, Wikesjo UM, Nilveus RE. Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using e-PTFE membranes. Scanning electron microscopic evaluation of retrieved membranes versus clinical healing. **J Periodontol.** 1992; 63(12): 974-8.

Selvig KA, Nilveus RE, Fitzmorris L, Kersten B, Khorsandi SS. Scanning electron microscopic observations of cell population and bacterial contamination of membranes used for guided tissue regeneration in humans. **J Periodontol.** 1990; 61(8): 515-520.

Shallhorn R, McClain P. Combined osseous composite grafting, root conditioning and guided tissue regeneration. **Int J Periodontol Restorative Dent.** 1988; 8(1): 9-31.

Silvestri M, Ricci G, Rasperini G, Sartori S, Cattaneo V.. Comparison of treatments of infrabony defects with enamel matrix derivative, guided tissue regeneration with a non-resorbable membrane and Widman modified flap. **J Clin Periodontol.** 2000; 27(8): 603-10.

Silvestri M, Sartori S, Rasperini G, Ricci G, Rota C, Cattaneo V. Comparison of infrabony defects treated with enamel matrix derivative versus guided tissue regeneration with a nonresorbable membrane. **J Clin Periodontol**. 2003; 30(5): 386-93.

Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. **Int J Periodontol Restorative Dent**. 1994; 14(2): 167-80.

Stabholz A, Kettering J, Aprecio R, Zimmerman G, Baker PJ, Wikesjo UM. Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCL or chlorhexidine: an in vitro study. **J Clin Periodontol** 1993; 20(8): 557-62.

Steffensen B, Webert HP. Relationship between the radiographic periodontal defect angle and healing after treatment. **J Periodontol**. 1989; 60(5): 248-54.

Ten Cate RC, Mills C, Solomon G. The development of the periodontium. A transplantation and autoradiographic study. **The Anatomical Records**. 1971; 170(3): 365-80.

Tonetti MS, Prato GP, Cortellini P. Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery. **J Clin Periodontol**. 1996; 23(6): 548-56.

Tonetti MS, Pini Prato G, Williams RC, Cortellini P. Periodontal regeneration of human infrabony defects. III. Diagnostic strategies to detect bone gain. **J Periodontol**. 1993; 64(4): 269-77.

Tonetti Ms, Cortellini P, Suvan Je, Adriaens P, Baldi C, Dubravec *et al.* Generalizability of the added benefits of guided tissue regeneration in the treatment of deep intrabony defects. Evaluation in a multi-center randomized controlled clinical trial. **J Periodontol.** 1998; 69(11): 1183-92.

Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adriaens P, Dubravec D *et al.* Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. A multicentre randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol.** 2002; 29(4): 317-25.

Trombelli L. Periodontal regeneration in gingival recession defects. **Periodontol** 2000. 1999; 19: 138-50. Review.

Trombelli L, Bottega S, Zucchelli G. Supracrestal soft tissue preservation with enamel matrix proteins in treatment of deep intrabony defects. **J Clin Periodontol.** 2002; 29(5): 433-9.

Tsitoura E, Tucker R, Suvan J, Laurell L, Cortellini P, Tonetti M. Baseline radiographic defect angle of the intrabony defect as a prognostic indicator in regenerative periodontal surgery with enamel matrix derivative. **J Clin Periodontol.** 2004; 31(8): 643-7.

Van Der Velden U, de Vries JH. The influence of probing force on the reproducibility of pocket depth measurements. **J Clin Periodontol.** 1980; 7(5): 414-20.

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; 71(1): 31-43.

Velasquez-Plata D, Scheyer Et, Mellonig JT. Clinical comparison of an enamel matrix derivative used alone or in combination with a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. **J Periodontol.** 2002; 73(4): 433-40.

Wennstrom JL, Lindhe J. Some effects of enamel matrix proteins on wound healing in the dento-gingival region. **J Clin Periodontol.** 2002; 29(1): 9-14.

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

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; 71(5):752-759.

Zetterstrom O, Andersson C, Eriksson L, Fredriksson A, Friskopp J, Heden G, *et al.* Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects. **J Clin Periodontol.** 1997; 24(9 Pt 2): 697-704.

Zucchelli G, Amore C, Montebugnoli L, De Sanctis M. Enamel matrix proteins and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a comparative controlled clinical trial. **J Periodontol.** 2003; 74(12): 1725-35.

Zucchelli G, Bernardi F, Montebugnoli L, De Sanctis M. Enamel matrix proteins and guided tissue regeneration with titanium-reinforced expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of infrabony defects: a comparative controlled clinical trial. **J Periodontol.** 2002; 73(1): 3-12.

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações dispostas neste termo foram fornecidas por Robert Carvalho da Silva (Mestrando em Clínica Odontológica na Área de Periodontia e executor do projeto) e Prof. Antonio Fernando Martorelli de Lima (Orientador), objetivando firmar acordo formal por escrito, mediante o qual o indivíduo objeto da pesquisa autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

I - Título do projeto de pesquisa:

“AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE DEFEITOS INTRA-ÓSSEOS UTILIZANDO PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE”

II - Objetivo:

Este estudo pretende avaliar a extensão e a previsibilidade do ganho de inserção clínica e preenchimento de defeitos intra-ósseos similares e bilaterais, intra-ósseos, em dentes monorradiculares ou em superfícies radiculares interproximais de dentes multirradiculares sem envolvimento de bifurcação, após a aplicação da matriz derivada do esmalte ou a com a técnica de regeneração tecidual guiada.

III - Justificativa:

As técnicas regenerativas consistem na exclusão das células epiteliais e do tecido conjuntivo gengival, para permitir a colonização seletiva do coágulo por células provenientes do ligamento periodontal e osso alveolar medular que tem capacidade de diferenciação em células produtoras de osso, ligamento periodontal e cemento radicular (osteoblastos, fibroblastos e cementoblastos). O repovoamento celular seletivo permitirá a reconstituição do periodonto de

sustentação destruído pela doença periodontal crônica. A forma clássica de atingir esse objetivo é a colocação de uma barreira física entre a superfície radicular tratada e o retalho.

Recentemente foi sugerida mais uma modalidade de tratamento dos defeitos intra-ósseos, com a aplicação sobre a superfície radicular tratada de fatores de crescimento, dentre eles as proteínas derivadas do esmalte. As proteínas derivadas do esmalte favorecem o preenchimento ósseo do defeito e a formação de cemento acelular para a inserção perpendicular de fibras colágenas do ligamento periodontal.

IV - Procedimentos clínicos:

Serão selecionadas 10 pacientes adultos saudáveis e não fumantes, de ambos os sexos, com idade variando entre 20 e 60 anos, que deverão apresentar defeitos bilaterais aleatoriamente divididos em sítios teste e controle. Nesses pacientes serão selecionados defeitos intra-ósseos compostos por 2 paredes ósseas e componente intra-ósseo $\geq 5,0\text{mm}$, provocados pela doença periodontal crônica em dentes monorradiculares ou em superfícies radiculares interproximais de dentes multirradiculares sem envolvimento de bifurcação.

Os pacientes serão submetidos dois meses antes do procedimento experimental a detalhada instrução de higiene oral e tratamento periodontal inicial consistindo de remoção de depósitos supra e subgengival, de tecido cariado e fatores de retenção de placa como excesso de restaurações.

Os pacientes serão monitorados pelos índices dicotômicos de placa e de sangramento à sondagem, devendo manter valores inferiores a 20% durante todo o experimento. No exame inicial serão apurados os parâmetros clínicos lineares profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e nível da margem gengival utilizando o sistema computadorizado de sondagem Florida Probe[®], e parâmetros radiográficos nível do defeito ósseo (distância entre a junção cimento esmalte e o fundo do defeito), nível da crista óssea (distância entre a junção cimento esmalte e a crista óssea alveolar), área e a densidade óptica utilizando o

sistema de radiografia digital AcuRay®. Todos os parâmetros serão avaliados novamente oito meses após. Os defeitos serão tratados com instrumentos manuais, rotatórios e ultra-sônicos a partir de retalhos mucoperiostais. Os sítios teste serão tratados com proteínas da matriz do esmalte - Emdogain® e os sítios controle serão tratados com barreira biodegradável Resolut®. Os dados obtidos nos sítios teste e controle serão submetidos ao teste “t” de Student em programa estatístico computadorizado.

V - Desconforto ou risco esperados

O procedimento experimental proposto pode ocasionar desconforto pós-operatório similar ao que ocorreria após a execução de técnicas convencionais de tratamento da doença periodontal, sendo facilmente suportado com terapia analgésica. Todos os materiais que serão utilizados são biocompatíveis e foram testados previamente em humanos com sucesso.

VI – Benefícios esperados:

As técnicas regenerativas têm como principal vantagem a associação do tratamento da doença ao tratamento dos defeitos provocados pela mesma, e promove resultados clínicos e histológicos melhores do que os obtidos com a instrumentação periodontal convencional isolada. Esperamos, com este trabalho, fornecer novos dados clínicos para a compreensão da terapêutica periodontal.

Com relação aos voluntários, esperamos a obtenção de saúde periodontal acompanhada de melhora no prognóstico dos dentes tratados, em ambos os grupos experimentais.

VII – Métodos alternativos existentes:

As técnicas de tratamento das bolsas periodontais pela instrumentação periodontal convencional, associadas ou não a aberturas de retalhos podem ser suficientes para reduzir ou eliminar a inflamação gengival, e prevenir o avanço da destruição periodontal. Entretanto, com as técnicas convencionais os defeitos

ósseos persistem, e a cura da doença periodontal ocorre com a formação e adaptação epitelial, resultado clínico muitas vezes considerado insatisfatório.

VIII – Forma de acompanhamento e assistência:

Após os procedimentos experimentais, os pacientes receberão acompanhamento semanal durante as seis semanas subsequentes e mensal, até o período do novo exame, sob a responsabilidade do executor deste projeto (Robert Carvalho da Silva).

IX – Direitos dos voluntários:

Todos os voluntários têm garantido o seu direito de receber todos os esclarecimentos sobre a metodologia a ser empregada, antes e durante o curso do projeto. Além disso, todos os voluntários têm plena liberdade de recusa de participação ou de retirada do consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. Os dados coletados e as informações pessoais são confidenciais para assegurar a privacidade dos participantes.

X – Ressarcimento de despesas e formas de indenização:

Não haverá ônus material ou financeiro para os pacientes, portanto, não será necessário nenhum ressarcimento de despesa. No caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa, as formas de indenização serão definidas judicialmente no foro local, de acordo com a legislação vigente.

XI – Consentimento formal para participação em pesquisa clínica:

Por este instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu, _____(nome), _____ (nacionalidade), _____ (profissão), portador do RG _____, e do CIC _____, residente e domiciliado à _____, na cidade de _____, tenho com absoluta consciência dos procedimentos a que vou me submeter para tratamento da doença periodontal existente em meus dentes nos termos relacionados nas disposições anteriores. Esclareço ainda que este consentimento não exime a responsabilidade do profissional que executará os procedimentos experimentais.

Por estar de acordo com o teor do presente termo, assino abaixo o mesmo.

Piracicaba, ____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



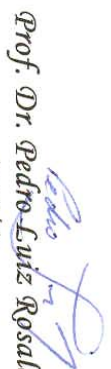
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do tratamento de defeitos intra-ósseos utilizando proteínas da matriz do esmalte", sob o protocolo nº **027/2001**, do Pesquisador **Robert Carvalho da Silva**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **Antônio Fernando Martorelli de Lima**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/M/S, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 17 de abril de 2001

We certify that the research project with title "Evaluation of intrabony defects treatment using enamel matrix proteins", protocol nº **027/2001**, by Researcher **Robert Carvalho da Silva**, responsibility by Prof. Dr. **Antônio Fernando Martorelli de Lima**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, April 17 2001


Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Anexo 2

Parâmetros clínicos – exame inicial

	EMD							RTG						
	NMG	PS	NCI	NDO	NCO	Intra	Ang.	PS	NMG	NCI	NDO	NCO	Intra	Ang.
1	0,6	7,2	7,8	9,8	5,8	4	31	0,2	7,2	7,4	9,6	5,8	3,8	29
2	0,4	6,8	7,2	8	3,6	4,4	29	3	6,8	9,8	10,6	6,2	4,4	31
3	3	7,6	10,6	11	6,2	4,8	28	3,2	7,2	10,4	10,8	6	4,8	29
4	3	7,4	10,4	10,8	5,8	5	33	1,6	6,6	8,2	8,6	5	3,6	31
5	0,2	6	6,2	6,6	3,4	3,2	42	0,4	8,2	8,6	9,2	4,8	4,4	30
6	0	6,8	6,8	7,8	4	3,8	39	2	7,2	9,2	10,2	6	4,2	32
7	1,4	8	9,4	10	5	5	31	0,2	7,8	8	8,6	3,8	4,8	30
8	0,2	6,8	7	8	3,4	4,6	26	0,2	7,2	7,4	8	3,6	4,4	39
9	0,4	7	7,4	8,2	3,2	5	35	0,2	7	7,2	8	3,4	4,6	37
10	0,2	7,6	7,8	8,8	4	4,8	38	0,4	8	8,4	10	5,8	4,2	34
11	0,6	7,8	8,4	9,8	6	3,8	30	0,4	8,6	9	9,8	4,4	4,4	33

Parâmetros clínicos – exame final

	EMD							RTG						
	NMG	PS	NCI	NDO	NCO	Intra	Ang.	NMG	PS	NCI	NDO	NCO	Intra	Ang.
1	1,6	3,2	4,8	7,8	6	1,8	37	1,6	2,8	4,4	8	6,2	1,8	39
2	1	3	4	5,9	3,7	2,2	38	3,8	2,6	6,4	8,7	6,3	2,4	37
3	3,2	3,2	6,4	8,6	6,4	2,2	35	3,2	2,4	5,6	8,4	6,4	2	42
4	3,2	3,2	6,4	8	6	2	52	2	2,4	4,4	6,9	5,3	1,6	46
5	1,6	2,8	4,4	5,6	3,6	2	45	1,6	3,4	5	6,8	5	1,8	38
6	1	3	4	5,9	4,1	1,8	46	3,4	2,8	6,2	8,1	6,1	2	40
7	2,2	3,6	5,8	7,8	5,2	2,6	37	1,8	3,2	5	6,1	4	2,1	42
8	1,2	2,6	3,8	5,7	3,5	2,2	28	2	2,8	4,8	5,8	3,9	1,9	43
9	1,6	3,2	4,8	6,5	3,5	3	38	2	2,8	4,8	5,6	3,5	2,1	41
10	1,4	3	4,4	7	4,2	2,8	40	2,2	3	5,2	7,9	6	1,9	43
11	2	3,2	5,2	8,3	6,1	2,1	35	1,2	3,2	4,4	6,9	4,6	2,3	41

Índices de placa e sangramento à sondagem

	EMD			
	IPI		ISs	
	inicial	final	inicial	final
1	13,5	14,2	16,7	1,5
2	17,3	15,1	18,9	19,8
3	19,5	18,3	22	18
4	20	18	17	14,8
5	18,9	17,6	17,7	18,6
6	17,3	16	18,9	19,1
7	17,8	18,3	17,7	15
8	15,1	17,1	19	17,2
9	19,6	18,2	19,9	18
10	19,8	18,5	17,4	16,3

Avaliação radiográfica

	EMD				RTG			
	REAB.	PREEN.	%	DO	REAB.	PREEN.	%	DO
1	0,2	2,2	55	4,12	0,4	2	52,63	4,55
2	0,1	2,2	50	3,34	0,1	2	45,45	4
3	0,2	3	59	4,56	0,4	2,8	58,33	3,99
4	0,2	1,2	60	4	0,3	2	55,55	4,45
5	0,2	2	37,5	2,23	0,2	2,6	59,09	4,89
6	0,1	2	52,6	3,45	0,1	2,2	52,38	3,78
7	0,2	2,4	52	3,99	0,2	2,7	56,25	4,57
8	0,1	2,4	52,2	4,99	0,3	2,5	56,81	4
9	0,3	2	40	2,99	0,1	2,5	54,34	3,9
10	0,2	2	16	1,34	0,2	2,3	57,76	3,8
11	0,1	1,7	44,7	4	0,2	2,1	47,72	3,78

Anexo 3

Clinical and radiographic evaluation of periodontal intrabony defects treated with enamel derivative proteins or guided tissue regeneration.

Robert Carvalho da Silva *

Julio Cesar Joly *

Enilson Antonio Sallum*

Antonio Fernando Martorelli de Lima *

Dimitris N Tatakis †

* Department of Prosthodontics and Periodontics, School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

† Section of Periodontology, College of Dentistry, The Ohio State University, Columbus, OH, USA.

CORRESPONDING AUTHOR:

Robert Carvalho da Silva

Department of Prosthodontics and Periodontics - School of Dentistry of Piracicaba - University of Campinas - Avenida Limeira, 901 - 13414-018 - Piracicaba - Sao Paulo, Brazil.

e-mail: dasilvarc@terra.com.br

RUNNING TITLE: "EMD versus GTR for intra-bony treatment"

ABSTRACT

This study evaluated the clinical and radiographic outcomes of the treatment of symmetrical and bilateral intrabony defects using the enamel derivative proteins (EMD) or bioabsorbable membranes (GTR). Ten subjects were screened with 11 pairs of 1 or 2 bony walls, at the proximal aspects of monoradicular or multiradicular non-furcated superior teeth. At baseline and after 6 months, the following clinical parameters were obtained: Plaque Index (PI), Bleeding Index (BI), Gingival margin Level (RD), Probing Depth (PD), and Clinical attachment Level (CAL). Standardized digital images were obtained at the same experimental times for determining the Osseous Defect Level (ODL), Alveolar Crest Level (ACL), intra-bony component (INTRA), and defect angle. The digital images were evaluated to access the alveolar crest resorption and bony defect fill. Digital subtraction depicted changes at Optic Density (OD) within the defects. Average values for all parameters were analyzed using Student *t* test. No statistical differences were found for any parameter between groups at baseline ($P > 0.05$). At the 6-month postop, there were statistical differences for all parameters at the within-groups comparison, at both groups ($P < 0.05$). At the inter-groups comparison, statistical differences were found between PD reduction (EMD= 4.09 ± 0.42 mm x GTR= 4.58 ± 0.38 mm) and RD (GTR= 1.18 ± 0.61 mm x EMD= 0.91 ± 0.42 mm) ($P < 0.05$); but no statistical significant differences were found between groups for CAL (EMD= 3.34 ± 0.71 mm e GTR= 3.49 ± 0.71 mm) ($P > 0.05$). Radiographic bony defect fill was more evident at GTR group ($53.94 \pm 4.21\%$) in comparison to the EMD group ($48.72 \pm 7.02\%$) ($P < 0.05$). Optic Density improved at both groups (EMD= 3.55 ± 1.05 ; GTR= 4.15 ± 0.39), but with no statistical differences between groups ($P > 0.05$). These results indicate that both surgical approaches were effective at the treatment of periodontal defects; however a bigger bony defect fill occurred following GTR therapy.

Key-words: periodontitis, periodontal defects, enamel proteins, membranes

INTRODUCTION

Periodontitis is an infectious disease that destroys the periodontium apparatus¹. The inflammatory phase of the disease is addressed by means of mechanical decontamination, i.e. scaling and root planning². However the periodontal defects produced are not properly corrected. The ultimate goal of periodontal therapy is the regeneration of lost tissues, with new bone, root cementum and periodontal ligament. Through time, several regenerative strategies have been developed and tested, including guided tissue regeneration (GTR) and, more recently, the use of enamel derivative proteins (EMD)³.

GTR therapy aims the exclusion of epithelial and connective tissues from the periodontal defect by placing of a physical barrier between the flap and root surface, allowing selective repopulation of the coagulum by undifferentiated cells from periodontal ligament space^{4,5}. Both non-absorbable and absorbable membranes have been used with similar clinical and histological outcomes, attesting the high predictability of this surgical approach. However, the use of non-absorbable barriers, as the e-PTFE material, adds the necessity of a second surgical procedure to remove the membrane. On the other hand, absorbable barriers, such made of collagen or polylactic and polyglycolic acids, do not require a second intervention. The drawback of GTR is the high frequency of membrane exposure during initial healing that can jeopardize the clinical results.

Recently, a novel regenerative approach has been introduced based on the observation of natural tooth development⁶. Enamel derivative proteins (EMD) are secreted by ameloblast-like cells of Hertwig's epithelial root sheath during

early root development and play crucial role at the formation of the acellular cementum. There is growing evidence that temporary deposition of EMD on developing root triggers the formation of periodontal ligament and alveolar bone^{7,8}.

Emdogain[™] represents the commercially available formulation associating glycol propylene alginate and EMD extracted from porcine six-month developing tooth buds, and acts mimicking the original periodontium formation. The exact mechanism by which EMD influence healing is yet not completely understood. However, is related with complex cellular-matrix interactions^{9,10}. *In vitro* assays have shown that EMD positively stimulates human cultivated periodontal ligament cells to produce growth factors and increase cellular activity^{9,11}. Several Clinical and histological studies have proven this concept setting the biologic basis for its usage associated with regenerative procedures¹²⁻²⁷.

The aim of this clinical and radiographic study was to evaluate the effect of EMD or GTR, using a biodegradable barrier (Gore-Resolut[®]), for the treatment of intrabony defects.

MATERIAL AND METHODS

Patient selection and experimental design

Ten patients, 4 males and 6 females (31 to 53 years old; mean age, 43.3 years) were recruited at the under-graduate clinic of the School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas, SP, Brazil. Table 1 includes demographic details. Informed consent was signed by each of the subjects after thorough

explanation of the nature, risks and benefits of the clinical investigation and associated procedures. The University's Ethical Committee approved the consent form and experimental protocol.

For inclusion in this study, the following criteria were required: 1) systemic health subjects, with no contraindications to periodontal surgery; 2) no use of drugs such as antibiotics, corticoids, chemotherapeutics or immunological modulators that might alter the expected response of the oral tissues; 3) no smoking; 4) presence of at least one pair of symmetric and contra-lateral 1-2 walls interproximal intrabony defects around maxillary teeth, with no furcation involvement; 5) presence of at least 2 mm of keratinized tissue, 7) radiographic evidence of intrabony defects ≥ 4 mm in depth.

The study protocol involved a screening appointment to verify eligibility, followed by initial therapy to establish optimal plaque control and gingival health conditions; surgical therapy; and postoperative clinical and radiographic evaluation 6 months later.

Randomization

At the start of the surgical appointment, bilateral defects were randomly assigned by coin toss to the test group (EMD)[‡] and control group (GTR), using a bioabsorbable membrane[§] (Table 1).

[‡] Emdogain® – Biora AB, Malmö, Switzerland.

[§] Resolut regenerative material, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ, USA.

Clinical Parameters

The following clinical parameters were assessed by a trained and calibrated examiner at baseline and 6 months after surgery:

- Plaque index (PI) and bleeding on probing (BOP), both dichotomic, considering 4 sites per tooth: mesial, distal, vestibular and lingual, using a conventional probe (PCP-UNC 15, Hu-Friedy);
- Recession Depth (RD), measured as the distance from the cemento-enamel junction (CEJ) to the gingival margin (GM);
- Probing Depth (PD), measured as the distance from the GM to the bottom of the gingival sulcus;
- Clinical Attachment Level (CAL), defined as the sum of RD and PD.

The measurements were made at 6 sites around study teeth: mesiovestibular, midvestibular, distovestibular, mesiolingual, midlingual and distolingual. An automated system^{||} was used to assess RD, PD, and CAL to the nearest 0.2 mm. A custom stent was used for probe positioning. For clinical comparisons only the deepest proximal measurement was recorded. When CEJ was not visible, one surrogate landmark such as a restoration margin was used.

^{||} Florida Probe, Gainesville, FL, USA.

Radiographic Parameters

The radiographic analysis was carried out using the digital system, Sens-A-Ray[¶]. The sensor was positioned with an acrylic device coupled to a bite block in vinyl polysiloxane [#] at each site. The equipment was mounted in a RINN XCP^{**} aiming device in order to retain reproducible projection with exposure settings of 60 kV and 10mA for 0.22 seconds. Digital radiographs were taken at baseline and 6 months after surgery. The following radiographic parameters were recorded:

- The Bone Defect Level (BDL) - distance from CEJ to the bottom of the defect where the periodontal ligament space was considered to have a normal width;
- The Alveolar Crest Level (ACL) - distance from CEJ to the projection of alveolar crest along the root surface;
- Intrabony defect (INTRA) - defined as the subtraction: INTRA= BDL - ACL;
- Defect Angle - determined in degrees by the root surface and vertical cone wall of the defect.

Assuming the differences between baseline and 6-month images, alveolar crest resorption was calculated, and % defect fill was calculated using the formula:

$$\frac{(\text{Baseline INTRA}) - (\text{Final INTRA})}{(\text{Final INTRA})} \times 100$$

[¶] Sens-A-Ray, New Image do Brasil. Imp. Exp. Ltda., São Paulo, SP , Brazil.

[#] Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil.

^{**} Rinn Corporation, Elgin, IL, USA.

Digital subtraction was performed using the two images (baseline and 6 months), that were initially equalized by a non-parametric method²⁸ to reduce variation in density and contrast. The images were then subtracted and analyzed to visualize changes in optical density (OD). To ensure that the images were properly equalized and amenable to subtraction, reference points that had supposedly not changed during the study were used as a "standard area". Thus, the changes in the bone defect that were greater than in the "standard area" were considered as gain in optical density representing new bone. Measurements were made blindly with respect to test and control groups (Figures 5 and 6).

Initial therapy

Initial periodontal therapy consisted of oral hygiene instructions, manual and ultrasonic subgingival instrumentation, and coronal polishing 1 to 2 months prior to surgery. Restorative treatment needs in non-study teeth were also addressed. Immediately prior to baseline, alginate impressions of the maxillae were obtained and casts were made. Casts were used for fabrication of custom PVC stents, used during clinical parameter assessment to assure reproducibility of probe position and angulation between appointments, and not as reference point for the clinical measurements.

Surgical procedures

For analgesia and postoperative edema control, each patient was given a single dose of 4 mg betamethasone^{††} and 750 mg acetaminophen^{‡‡} 1 hour prior to surgery. Anxious patients were also given 5 mg Diazepam^{§§}. Extraoral antisepsis was performed with a 2.0% chlorhexidine solution^{|||} and intraoral with 0.12% chlorhexidine rinse^{|||}. Anesthesia was achieved with lidocaine 2.0% with 1:100.000 epinephrine^{¶¶}.

Full thickness mucoperiosteal flaps were raised vestibularly and lingually following intrasulcular incisions. Maximal care was taken to preserve interdental soft tissues. Whenever possible preservation papillae techniques were used, selected according to width of the interdental space, distance from the contact/area to bone crest, and morphology and location of the defect ²². Vertical releasing incisions were placed mesial or distal to the treated defects when necessary for better access, or in order to achieve better closure of the surgical site. All granulation tissue was removed from the defects and roots were thoroughly hand instrumented. No osteoplasty was performed. Roots conditioning was performed with doxycycline solution (50 mg/ml) ^{|||} for 4 minutes in order to remove the smear layer and allow the precipitation of EMD onto the root surfaces free of organic remnants. Extensively saline irrigation was performed to remove rests of the root conditioner.

^{††} Celestone ® - Schering - Plough Ind. Quím. e Farm. S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^{‡‡} Tylenol ® - Cilag Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP, Brazil.

^{§§} Valium ® - Roche Produtos Quím. e Farm. S/A, São Paulo, SP, Brazil.

^{|||} Proderma Farmácia de Manipulação Ltda, Piracicaba, SP, Brazil.

On the test sites, Emdogain™ was applied according to instructions given by manufacture. The defects were filled with the EMD gel using a sterile syringe. On the control sites, a bioabsorbable membrane (Gore - Resolut XT™) was prepared to cover 2-3 mm beyond the defect and sutured with a bioabsorbable suture^{##}. The flaps were sutured into their original position or slightly coronally to CEJ with e-PTFE^{**} mattress sutures taking particular care to cover the membrane. In the test sites the e-PTFE^{**} suture were loosely placed before the application of EMD gel into the defects, and afterwards tighten. Sutures were removed 14 days after surgery. Both surgical procedures were performed at the same appointment. No periodontal dressing was used.

Figures 1 to 8 and 12 to 19 illustrates the surgical procedures at GTR and EMD sites, respectively. Figures 9 to 11 and 20 to 22 shows the radiographic evaluation.

Postoperative protocol

Subjects were prescribed analgesics (acetaminophen^{‡‡} 750 mg q.i.d.) for 2 days and twice daily 0.12% chlorhexidine rinse^{||||} for 4 weeks. Subjects were instructed to abstain from brushing and flossing the maxillary teeth until suture removal (14 days), and to consume only soft foods during the first week. They were also instructed to avoid any other mechanical trauma to the treated sites.

^{¶¶} Lidocaína – Alphacaina, Adrenalina 1:100.000, DFL Ind. E Com. Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^{||||} Proderma Farmácia de Manipulação Ltda, Piracicaba, SP, Brazil.

^{##} Resolut suture material, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ, USA

^{**} Gore-Tex suture material, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ, USA.

^{‡‡} Tylenol® - Cilag Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP, Brazil.

^{||||} Proderma Farmácia de Manipulação Ltda, Piracicaba, SP, Brazil.

Subjects were enrolled in a periodontal maintenance program (professional plaque control), weekly for the first 4 weeks and then monthly until the end of the study period. In cases of membrane exposure before the time necessary for degradation, the membranes were maintained with reinforced chemical control.

Statistical analysis

Descriptive statistics were expressed as mean $\pm$ standard deviation (S.D). Data were analyzed using Student *t* test for paired observations to assess changes obtained within and between groups. The significance level for rejection of the null hypothesis was set at $\alpha = 0.05$.

RESULTS

All patients tolerated the surgical procedures well, experienced no postoperative complications, and complied with the study protocol. During the course of the study, wound healing was uneventful, and Plaque and bleeding on probing Index were kept below 20% (Table 2).

The descriptive statistics for the clinical parameters at baseline and after 6 months, for both groups, as well as the mean differences within and between groups are presented in Table 3, 4 and 5. At baseline, no statistically significant differences were found between the 2 groups for any of the parameters evaluated, showing groups equivalence (Table 3).

In both groups, statistically significant changes from baseline were found for all parameters ($P < 0.05$) (Table 4). In the EMD group, RD increased by 0.91 ± 0.42 mm (mean $\pm$ SD), PD decreased by 4.09 ± 0.42 mm, and CAL improved by 3.34 ± 0.71 mm. The corresponding values for the GTR group were RD increase of 1.18 ± 0.61 mm, PD reduction of 4.58 ± 0.38 mm, and CAL improvement of 3.49 ± 0.71 mm. In this group, between the second and third weeks post-operatively, 6 from the 11 membranes placed (54.54%) became exposed. However, not accompanied by severe inflammation or suppuration. No membrane had to be removed nor any site eliminated from the study.

Table 5 depicts the intergroup comparison at 6 months. Statistically significant differences were found between the control and test groups only for RD and PD ($P < 0.05$). There was average more PD reduction (0.49 ± 0.42 mm) and RD (0.45 ± 0.45 mm) on GTR sites. However, no significant differences were observed for CAL (0.14 ± 0.73 mm) between groups ($P > 0.05$).

Radiographic evaluations are presented at Tables 3, 6 and 7. No statistically significant differences were found between the 2 groups at baseline exam for ACL, BDL and INTRA ($P > 0.05$) (Table 3). At 6 months, both groups showed statistically significant differences for ACL, BDL and INTRA (Table 6) ($P < 0.05$). No significant differences were found between groups for alveolar bone resorption ($P > 0.05$), but GTR group showed statistically more defect fill in comparison to EMD group (2.43 ± 0.36 mm versus 2.14 ± 0.48 mm) representing $53.94 \pm 4.21\%$ and $48.72 \pm 7.02\%$, respectively, for GTR and EMD groups ($P < 0.05$) (Table 7).

Table 8 depicts the comparison of both groups for optic density OD. Digital subtraction reveals at 6-month evaluation that there was OD gain at both groups (EMD: 3.55 ± 1.05 gray level; GTR: 4.15 ± 0.39 gray level). No statistical differences were found between groups ($P > 0.05$).

DISCUSSION

The objective of this split-mouth, randomized, controlled clinical trial was to compare clinically and radiographically the outcomes of the treatment of predominantly 1-2 intrabony defects ≥ 4.0 mm, using enamel derivative proteins (EMD: Test group), and bioabsorbable membranes (GTR: Control group). Considering the study design and the groups' homogeneity at baseline, differences in clinical outcomes can be attributed to the treatments employed.

All subject enrolled in this study complied with protocol in term of maintaining a high level of oral hygiene, with PI and BOP below 20% throughout the 6 months of evaluation (Table 2). Several surveys highlighted the importance of good plaque control in order to achieve and sustain longitudinally favorable clinical results (Francetti *et al.*, 2002; Sculean *et al.*, 2003; Parodi, Santarelli & Gaspareto, 2004; Sculean *et al.*, 2004).

The literature presents great variability of clinical changes following regenerative procedures^{3,29}. Recent meta-analysis of studies using EMD reported PD reduction of 3.2 ± 0.9 mm (ranging from 1.9 mm e 5.1 mm), RD increase of 0.9

± 0.4 mm, and CAL improvement of 4.0 ± 0.9 mm (ranging from 1.7 mm to 4.5 mm)³ (Kalpidis & Ruben, 2002). Cortellini & Tonetti (2000)²⁹, in another meta-analysis involving GTR procedures, reported 3.86 ± 1.69 mm CAL gain, and 3.35 ± 1.19 mm PD reduction. Our results are within the variability of the aforementioned studies, with PD reduction by 4.09 ± 0.42 mm and 4.58 ± 0.38 mm, RD increase by 0.91 ± 0.42 and 1.18 ± 0.61 mm, and CAL gain of 3.34 ± 0.71 mm and 3.49 ± 0.71 mm, respectively for EMD and GTR groups. Those data confirm the predictability of both surgical approaches.

Several studies have shown equivalence of clinical results following usage of EMD and barriers membranes, with no superiority of one technique over the other^{14,18,25,26}. In the present study, there was approximately 0.5 mm more increase in RD and decrease in PD at the GTR group in comparison with the EMD group ($P < 0.05$). Our results are in agreement with those reported by Zucchelli *et al.* (2002)³⁰ in which periodontal defects were treated using EMD, bioabsorbable membranes or open flap debridement. Both regenerative approaches were more effective than periodontal instrumentation alone, and as in our study, it was observed more recession increase (1.6 mm versus 1.0 mm) and PD reduction (6.5 mm versus 5.1 mm) at the GTR group.

The clinical interpretation of those results must be done with great caution. The average residual PD at the end of this study was 3.09 mm at the EMD group, and 2.85 mm at the RTG group, which are amenable for adequate plaque control³¹. However, CAL change was similar between groups (3.34 mm versus 3.49 at EMD

and GTR groups respectively) ($P > 0.05$). Thus, the bigger decrease in PD at GTR sites might be explained, at least in part, by the higher post-op recession experienced by that group, that can be accompanied by aesthetical and functional undesirable sequels. The lost of proximal soft tissues, specially at upper front teeth, are of difficult management which treatment relies on soft tissue grafts that increase the morbidity of treatment and has unpredictable results.

Increase in gingival recession associated with GTR procedure, increases the possibility of membrane exposure that potentially decreases the likelihood of obtaining CAL gain and defect fill, with more complication events such as abscess formation^{32,33,18,30}. Cortellini & Tonetti (2000)²⁹ reported 70% to 80% frequency of membrane exposure. In our study, 6 out of the 11 (54.54%) membranes became exposed between the second and third weeks post-op. In those cases, the exposed portion of the membranes degraded within a couple of weeks. Plaque control reinforcement was enough to prevent barrier contamination and gingival inflammation. No membrane needed to be removed nor any site eliminated from the study.

Specially designed flaps to preserve interdental soft tissues have shown to decrease the frequency of membrane exposure^{34,30,21,22}. In our study, whenever possible, such sophisticated incisions were performed. However, even so, 54.54% of the membranes became exposed. These results are in accordance with those reported by Zucchelli *et al.* (2002)³⁰, which using similar flap designs observed 33% of membrane exposure. Nevertheless, papilla preservation

techniques are effective to protect the coagulum and regenerating tissues during early healing. Thus, its use should be considered in the dependence of the site characteristics to improve the predictability of the procedure²¹.

The electronic probe used to evaluate the soft tissue changes in this study eliminates the relative subjective reading error of the naked eye. Most studies used conventional manual probes at the nearest 0.5 mm or 1.0 mm to evaluate soft tissue changes. The inclusion of more sensitive diagnostic instruments such as the electronic probe might help interpret different regenerative approaches.

The radiographic analysis performed demonstrated similar alveolar crest resorption between groups (0.17 ± 0.06 mm versus 0.23 ± 0.11 mm), respectively for EMD and GTR groups ($P > 0.05$). Our results are in accordance with those reported by Joly *et al.* (2002)³⁵ who compared GTR and root instrumentation alone in treatment of intrabony defects, but smaller than other reports using EMD associated or not with other regenerative approaches. The differences observed at this parameter can partially be explained by the studies' outlines. However, there is some evidence that bone resorption is probably a phenomenon caused by flap procedure rather than the treatment itself³⁶.

There was more bony defect fill at the GTR group (2.43 ± 0.36 , representing $53.94 \pm 4.21\%$) in comparison with EMD group (2.14 ± 0.48 mm representing $47.18 \pm 12.55\%$) ($P < 0.05$). Several reports have shown radiographic bony defect fill using both surgical therapies^{12,14,13,16,17}. However,

despite the predictability of regenerative procedures in terms of clinical improvement, there is great inconsistency of radiographic evidence of defect fill. Radiographic evaluation is complex because pairs of standardized images relative to their geometric symmetry, and method of obtainment/development are necessary.

The length of time between the baseline and final image can also influence the radiographic evaluation, because bone mineralization process is slow and might need several months to be visualized. Optic density changes can still be observed two years following regenerative treatment^{37,38}. Windish *et al.* (2000)³⁹ compared the radiographic and histometric results following EMD or GTR procedures in teeth scheduled for extraction due Periodontitis. They observed that radiographic bone gain does not match histometric analysis. There is evidence that those phenomena are not necessarily correlated, and in the clinical point of view absence of radiographic bony defect fill do not represent failure of the regenerative approach^{5,40,39}.

Digital subtraction allows for more precise detection of subtle hard tissue changes^{35,41-44}. In the present study, OD improved in both groups 3.55 ± 1.05 and 4.15 ± 0.39 , respectively for EMD and GTR groups ($P > 0.05$). Variation in voltage and exposition time can cause changes in density and contrasts of serial radiographs and impair the results of subtraction radiography. In this study, the voltage was stabilized (110v) and the time of exposition (60 kV and 10mA for

0.22 seconds) was predetermined. The intra-oral holder with the bite block was effective for minimizing geometric differences^{45,28}.

There is a positive correlation between defect fill and pre-treatment defect angle, i.e., the narrower the defect, the higher CAL improvement⁴⁶. At our study, the mean defect angle of EMD group changed from 32.90 ± 5.03 degrees to 39.18 ± 6.46 degrees ($P < 0.05$), and at GTR group from 32.27 ± 3.26 degrees to 41.09 ± 2.55 degrees ($P < 0.05$). At the study of Trombelli *et al.* (2002)²², the defect angle shifted from 33.8 ± 12 to 50.0 ± 16 degrees, and CAL gain of 4.7 ± 17 mm. The CAL improvement of the present study was 3.34 ± 0.71 mm. The difference between the results of these studies may be partly explained by deeper defects of Trombelli *et al.* (2002)²² study. In a recent study published by Tsitoura *et al.* (2004)⁴⁷, it was found that the probability of obtaining CAL gain > 3.0 mm was 2,46 times higher when the defect angle was ≤ 22 degrees than when it was ≥ 36 degrees, suggesting that the defect angle might be used as a positive prognostic indicator of treatment outcomes.

Most of studies using regenerative procedures used different systemic antibiotics protocol in order to decrease the likelihood of post-op infection. The fact that the medication may impact the clinical outcomes can not be discharged. In our study no antibiotics were prescribed. Our results are in agreement with the reported by Sculean *et al.* (2001)⁴⁸, who did not find any differences at the clinical outcome following EMD application using or not systemic post-op antibiotics. Those results supports the concept that routine antibiotics prescription following

regenerative surgery are most of the time unnecessary if patients participate on a rigid plaque control program.

Root biomodification can remove the smear layer produced by scaling and root planning. According to instructions given by the manufacturer, root biomodification using 24% EDTA for 2 minutes is indicated before Emdogain™ placement in order to allow EMD to precipitate onto root surface devoid of organic rests⁴⁹. Root biomodification can also promote collagen matrix exposure, possibly liberating growth factors within cementum and dentin that could positively influence periodontal ligament cells during healing^{50,51}. However, the mechanism by which EDTA acts might impair blood cells to adhere onto the root surface jeopardizing clot formation, because EDTA is calcium chelant of calcium ions which are important at coagulation process⁵². Leite & Sampaio (2004)⁵³ supported this concept using scanning electron microscopy to evaluate blood cells deposition on root surface of extracted teeth following several biomodificators application. It was found that EDTA produced the worst results.

Other root biomodificators such as doxycycline have been intensely investigated. Doxycycline is as effective as EDTA to remove the smear layer⁵⁴⁻⁵⁷, but presents other advantages as its substantivity to root surface, bacteriostatic properties, and anticollagenolytic effect⁵⁸⁻⁶¹.

As far as we have knowledge, this study was the first to use hidroclorori doxycycline (50 mg/ml) during 4 minutes associated with EMD usage. Our results are not different from those using EDTA or other biomodificators. Parashis,

Andronikaki-Faldami & Tsiklakis (2004)²⁵ did not use any root biomodification agent associated with the use of EMD, GTR and graft material in the treatment of periodontal defects. No difference at the clinical outcomes were evident, suggesting that mechanical means of decontamination represents the most important aspect of therapy.

In conclusion, within the limits of this experiment, both regenerative approaches were effective to produce CAL gain, but bony defect fill following GTR using bioabsorbable membranes was more evident than sites treated with enamel derivative proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grant # 02/11465-0 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

The authors dedicate this paper to the memory of Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima who was tragically killed in a motor vehicle accident in December 2003. He used to say, "One man's success is only evident when his ideas are carried forward by others." He was a dear friend, colleague, and mentor who inspired and continues to inspire his students and colleagues.

REFERENCES

1. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol** 2000. 1997; 14: 9-11.
2. Rosling B, Nyman S, Lindhe J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. **J Clin Periodontol**. 1976; 3(1): 38-53.
3. Kalpidis Cd, Ruben MP. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. **J Periodontol**. 2002; 73(11): 1360-76. Review.
4. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol**. 1976; 47(5): 256-260.
5. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol**. 1982; 9(4): 290-6.
6. Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. **J Clin Periodontol**. 1997; 24(9 Pt 2): 658-68.
7. Hoffman R. Formation of periodontal tissues around subcutaneously transplanted hamster molars. **J Dental Res**. 1960; 39: 781-798.
8. Ten Cate RC, Mills C, Solomon G. The development of the periodontium. A transplantation and autoradiographic study. **The Anatomical Records**. 1971; 170(3): 365-80.
9. Gestrelus S, Andersson C, Johansson AC, Persson E, Brodin A, Rydhag L, *et al*. Formation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. **J Clin Periodontol**. 1997a; 24(9 pt 20): 678-84.
10. 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; 24(9 Pt 2): 669-77.
11. Palioto DB, Joly JC, de Lima AF, Mota LF, Caffesse R. Clinical and radiographic treatment evaluation of class III furcation defects using GTR with and without inorganic bone matrix. **J Clin Periodontol**. 2003; 30(1): 1-8.

12. Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. **J Clin Periodontol.** 1997; 24(9 Pt 2): 693-6.
13. 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; 26(12): 855-60.
14. Sculean A, Donos N, Windisch P, Brex M, Gera I, Reich E, *et al.* Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration. **J Periodontal Res.** 1999a; 34(6): 310-22.
15. Sculean A, Reich E, Chiantella Gc, Brex M. Treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative (Emdogain): a report of 32 cases. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 1999b; 19(2): 157-63.
16. Heden G. A case report study of 72 consecutive Emdogain-treated intrabony periodontal defects: clinical and radiographic findings after 1 year. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 2000; 20(2): 127-39.
17. Okuda K, Mamose M, Miyazaki A, Murata M, Yokoyama S, Yonezawa Y, *et al.* Enamel matrix derivative in the treatment of human intrabony osseous defects. **J Periodontol** 2000; 71(12): 1821-8
18. Silvestri M, Ricci G, Rasperini G, Sartori S, Cattaneo V.. Comparison of treatments of infrabony defects with enamel matrix derivative, guided tissue regeneration with a non-resorbable membrane and Widman modified flap. **J Clin Periodontol.** 2000; 27(8): 603-10.
19. 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; 27(7): 466–72.
20. Froum SI, Weinberg MA, Rosenberg E, Tarnow D. A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: a 12-month re-entry study. **J Periodontol.** 2001; 72(1): 25-34.

21. Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adriaens P, Dubravec D *et al.* Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. A multicentre randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol.** 2002; 29(4): 317-25.
22. Trombelli L, Bottega S, Zucchelli G. Supracrestal soft tissue preservation with enamel matrix proteins in treatment of deep intrabony defects. **J Clin Periodontol.** 2002; 29(5): 433-9.
23. Silvestri M, Sartori S, Rasperini G, Ricci G, Rota C, Cattaneo V. Comparison of infrabony defects treated with enamel matrix derivative versus guided tissue regeneration with a nonresorbable membrane. **J Clin Periodontol.** 2003; 30(5): 386-93.
24. Zucchelli G, Amore C, Montebugnoli L, De Sanctis M. Enamel matrix proteins and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a comparative controlled clinical trial. **J Periodontol.** 2003; 74(12): 1725-35.
25. Parashis A, Andronikaki-Faldami A, Tsiklakis K. Clinical and radiographic comparison of three regenerative procedures in the treatment of intrabony defects. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 2004; 24(1): 81-90.
26. Sanz M, Tonetti MS, Zabalegui I, Sicilia A, Blanco J, Rebelo H, *et al.* Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or barrier membranes: results from a multicenter practice-based clinical trial. **J Periodontol.** 2004; 75(5): 726-33.
27. Sallum EA, Pimentel SP, Saldanha JB, Nogueira-Filho GR, Casati MZ, Nociti FH, *et al.* Enamel matrix derivative and guided tissue regeneration in the treatment of dehiscence-type defects: a histomorphometric study in dogs. **J Periodontol.** 2004; 75(10): 1357-63.
28. Ruttimann UE, Webber RL, Schmidt E. A robust digital method for film contrast correction in subtraction radiography. **J Periodontol Res.** 1986; 21(5): 486-95.
29. Cortellini P, Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. **Periodontol 2000.** 2000; 22: 104-32. Review.

30. Zucchelli G, Bernardi F, Montebugnoli L, De SM. Enamel matrix proteins and guided tissue regeneration with titanium-reinforced expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of infrabony defects: a comparative controlled clinical trial. **J Periodontol.** 2002; 73(1): 3-12.
31. Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. VII. Bleeding, suppuration and probing depth in sites with probing attachment loss. **J Clin Periodontol.** 1985; 12(6): 432-40.
32. De Sanctis M, Zucchelli G, Clauser C. Bacterial colonization of bioabsorbable barrier material and periodontal regeneration. **J Periodontol.** 1996; 67(11): 193-200.
33. Nowzari H, Macdonald ES, Flynn J, London RM, Morrison JI, Slots J. The dynamics of microbial colonization of barrier membranes for guided tissue regeneration. **J Periodontol.** 1996; 67(7): 694-702.
34. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Kenney EB, Vasilic N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. **J Periodontol.** 2001; 72(5): 583-9.
35. Joly JC, Palioto DB, de Lima AF, Mota LF, Caffesse R. Clinical and radiographic evaluation of periodontal intrabony defects treated with guided tissue regeneration. A pilot study. **J Periodontol.** 2002; 73(4): 353-9.
36. Cortellini P, Pini Prato GP, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *J Periodontol* 1993;64:254-260.
37. Tonetti Ms, Cortellini P, Suvan Je, Adriaens P, Baldi C, Dubravec *et al.* Generalizability of the added benefits of guided tissue regeneration in the treatment of deep intrabony defects. Evaluation in a multi-center randomized controlled clinical trial. **J Periodontol.** 1998; 69(11): 1183-92.
38. Eickholz P, Kim TS, Holle R. Regenerative periodontal surgery with non-resorbable and biodegradable barriers: results after 24 months. **J Clin Periodontol.** 1998; 25(8): 666-76.

39. Windisch P, Sculean A, Klein F, Toth V, Gera I, Reich E, *et al.* Comparison of clinical, radiographic, and histometric measurements following treatment with guided tissue regeneration or enamel matrix proteins in human periodontal defects. **J Periodontol.** 2002; 73(4): 409-17.
40. Lindhe J, Nyman S, Karring T. Connective tissue reattachment as related to presence or absence of alveolar bone. **J Clin Periodontol.** 1984; 11(1): 33-40.
41. Bragger U, Burgin W, Lang NP, Buser D. Digital subtraction radiography for the assessment of changes in peri-implant bone density. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1991; 6(2): 160-6.
42. Jeffcoat MK. Digital radiology for implant treatment planning and evaluation. **Dentomaxillofac Radiol.** 1992; 21(4): 203-7.
43. Caton J, Greenstein G. Factors related to periodontal regeneration. **Periodontol 2000.** 1993; 1: 9-15.
44. Palioto DB, Joly JC, de Lima AF, Mota LF, Caffesse R. Clinical and radiographic treatment evaluation of class III furcation defects using GTR with and without inorganic bone matrix. **J Clin Periodontol.** 2003; 30(1): 1-8.
45. Duckworth JE, Judy PF, Goodson JM, Socransky SS. A method for the geometric and densitometric standardization of intraoral radiographs. **J Periodontol.** 1983; 54(7): 435-40.
46. Tonetti MS, Pini Prato G, Williams RC, Cortellini P. Periodontal regeneration of human intrabony defects. III. Diagnostic strategies to detect bone gain. **J Periodontol.** 1993; 64(4): 269-77.
47. Tsitoura E, Tucker R, Suvan J, Laurell L, Cortellini P, Tonetti M. Baseline radiographic defect angle of the intrabony defect as a prognostic indicator in regenerative periodontal surgery with enamel matrix derivative. **J Clin Periodontol.** 2004; 31(8): 643-7.
48. Sculean A, Blaes A, Arweiler N, Reich E, Donos N, Brex M. The effect of postsurgical antibiotics on the healing of intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins. **J Periodontol.** 2001; 72(2): 190-5.

49. Blomlof JP, Blomlof LB, Lindskog SF. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. **J Periodontol.** 1996; 67(9): 841-5.
50. Hanes PJ, O'Brien NJ, Garnick JJ. A morphological comparison of radicular dentin following root planing and treatment with citric acid or tetracycline HCl. **J Clin Periodontol.** 1991; 18(9): 660-8.
51. Blomlof JP, Blomlof LB, Lindskog SF. Smear layer formed by different root planing modalities and its removal by an ethylenediaminetetraacetic acid gel preparation. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 1997; 17(3): 242-9.
52. McShine RL, Das PC, Sibinga CT, Brozovic B. Effect of EDTA on platelet count and other platelet parameters in blood and blood components collected with CPDA-1. **Vox Sang.** 1991; 61(2): 84-9.
53. Leite FRM, Sampaio, JEC. Efeito do condicionamento radicular com EDTA, tetraciclina e ácido cítrico na adesão de células sanguíneas sobre a superfície radicular [dissertação]. Araraquara (SP): UNESP; 2004.
54. Madison JG, Hokett SD. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscope study. **J Periodontol.** 1997; 68(8): 739-45.
55. Barkhordar RA, Watanabe LG, Marshall GW, Hussain MZ. Removal of intracanal smear by doxycycline in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1997; 84(4): 420-23.
56. Ciotti, DL. Análise descritiva da aplicação de doxiciclina na superfície radicular de dentes humanos, por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de dispersão de energia [dissertação]. Piracicaba (SP): UNICAMP; 2004.
57. Bergenholtz A, Babay N. Scanning electron microscopy of the root surface texture of extracted periodontally diseased teeth following various etching and chelating regimens. **Int J Periodont Rest Dent.** 1998; 18(2): 171-9.

58. Mader CI, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. **J Endo**. 1984; 10(10): 477-83.
59. Hanemaaijer R, Visser H, Koolwijk P, Sorsa T, Salo T, Golub LM *et al*. Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemical modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. **Adv Dent Res**. 1998; 12(2): 114-8.
60. Demirel K, Baer PN, McNamara TF. Topical application of doxycycline on periodontally involved root surfaces in vitro: Comparative analysis of substantivity on cementum and dentin. **J Periodontol**. 1991; 62(5): 312-16.
61. Stabholz A, Kettering J, Aprecio R, Zimmerman G, Baker PJ, Wikesjo UM. Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCL or chlorhexidine: an in vitro study. **J Clin Periodontol** 1993; 20(8): 557-62.