

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



Suzana Peres Pimentel
CIRURGIÃ-DENTISTA

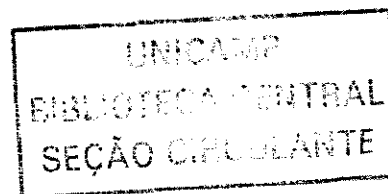
AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DERIVADA DA MATRIZ DO ESMALTE e
REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA EM DEFEITOS ÓSSEOS DO TIPO
DEISCÊNCIA.
HISTOMETRIA EM CÃES

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

PIRACICABA

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Suzana Peres Pimentel
CIRURGIÃ-DENTISTA

AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DERIVADA DA MATRIZ DO ESMALTE e
REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA EM DEFEITOS ÓSSEOS DO TIPO
DEISCÊNCIA.

HISTOMETRIA EM CÃES

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG. 05/06/03
Assinatura do Orientador

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

Orientador: Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum

Co-orientador: Francisco Humberto Nociti Jr.

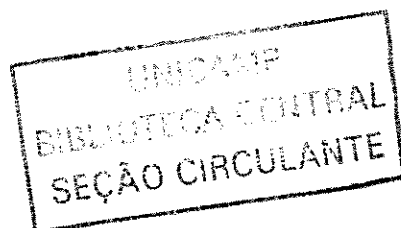
Banca examinadora : Prof. Dr Antonio Wilson Sallum

Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco

Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum

PIRACICABA

2003



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	P649a
V	EX
TOMBO BC/	55163
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/08/03
Nº CPD	

CM00187129-1

BIB ID 296360

Ficha Catalográfica

P649a Pimentel, Suzana Peres.
 Avaliação da proteína derivada da matriz do esmalte e regeneração tecidual guiada em defeitos ósseos do tipo deiscência. Histometria em cães. / Suzana Peres Pimentel. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
 x, 61f. : il.

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

I. Doença periodontal. I. Sallum, Enilson Antônio. II. Nociti Jr., Francisco Humberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

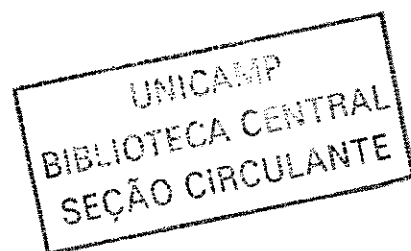


A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 14 de Fevereiro de 2003, considerou a candidata SUZANA PERES PIMENTEL aprovada.

1. Prof. Dr. ENILSON ANTONIO SALLUM

2. Prof. Dr. ÁLVARO FRANCISCO BOSCO

3. Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM



2003.2.8874

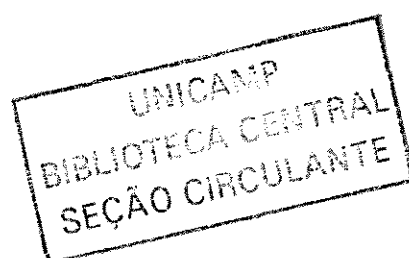
DEDICATÓRIA

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

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

Aos irmãos que a vida me deu, **Andréia Mendonça, Juliana Sanches, Livia Falcão, Luciane Torres, Renata Oliveira, Renata Spironeli, Roberta Sevá e Rodrigo Senise**, pelo carinho e apoio nas horas difíceis e por serem importante fonte de nutrição da minha alegria.

Ao meu sobrinho e afilhado **Tomás**, por ser valioso presente de Deus.



AGRADECIMENTOS

A *Deus* e a meu *anjo da guarda* pela presença constante e
trabalhosa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor

Dr. Enilson Antônio Sallum

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

Ao Professor

Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

Pela valiosa amizade e auxílios prestados durante os experimentos e ainda, pela disponibilidade, mesmo à distância, em ajudar.

Ao Professor

Antonio Wilson Sallum

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

Ao Professor

Marcio Zaffalon Casati

Pela amizade, orientação e fundamental incentivo nesta difícil caminhada.

Ao Professor

Sérgio de Toledo

Por sua serenidade e competência em ensinar.

Ao Professor

Antônio Fernando Martoreli de Lima

Por sua valiosa contribuição na minha formação acadêmica.

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

Aos meus amigos **Ângela Martins, Bruno Gurgel e Noeli Boscato**, por todo carinho, companheirismo e ajuda indispensável nessa caminhada.

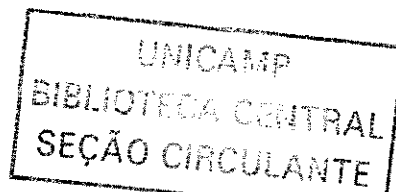
Aos meus colegas de pós-graduação, **Antonieta, Cristina, Cícero, Fernando, João, Luciana, Patrícia, Poliana, Renato e Robert** por termos caminhado juntos e por tanto tempo, sempre com respeito e sabendo que poderíamos contar uns com os outros.

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

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

A **Srta. Mariana** pela ajuda na importante fase do processamento histológico, pela amizade e esforço em fazer o melhor.

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



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

À Profa. Dra. **Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP e à Prof. Dr. **Lourenço Correr Sobrinho**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

À Prof. Dra. **Gláucia Maria Bovi Ambrosano**, pelo auxílio na realização da parte estatística deste trabalho.

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

SUMÁRIO

CAPÍTULOS	Pg.
RESUMO	01
ABSTRACT	02
1. INTRODUÇÃO	03
2. REVISÃO DA LITERATURA	06
2.1 Tipos de Cura	06
2.2 Regeneração Periodontal com Regeneração Tecidual Guiada	09
2.3 Regeneração Periodontal com Proteínas Derivadas da Matriz do Esmalte	16
2.4 Estudos comparativo de PME e RTG	24
2.5 Doenças Periodontais em cães	28
3. PROPOSIÇÃO	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Seleção dos Animais	31
4.2 Anestesia	31
4.3 Criação dos Defeitos	32
4.4 Tratamento dos Defeitos	33
4.5 Sacrificio dos animais	36
4.6 Processamento do Material	36
4.7 Histometria	37
4.8 Análise Estatística	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Observações Clínicas	40
5.2 Observações Histológicas	40
5.3 Observações Histométricas	45
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	54
8 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar, histometricamente, o processo de cura de defeitos periodontais do tipo deiscência, criado cirurgicamente em cães, tratados pela técnica de regeneração tecidual guiada (RTG) com o uso de membranas reabsorvíveis (copolímero do ácido polilático e poliglicólico) e proteínas derivadas da matriz do esmalte (PME), de forma associada e isolada. Defeitos tipos deiscência (4 X 6mm) foram criados sobre as raízes mesiais dos 3º e 4º pré-molares mandibulares, bilateralmente. Durante três meses, tiras metálicas permaneceram adaptadas aos defeitos promovendo acúmulo de placa. Após este período, os defeitos foram aleatoriamente designados a receber um dos quatro tratamentos cirúrgicos: 1) raspagem e alisamento radicular (CO); 2) regeneração tecidual guiada com membranas reabsorvíveis (RTG); 3) proteína da matriz do esmalte (PME) e 4) membrana reabsorvível associada a proteínas da matriz do esmalte (RTG + PME). Após três meses do segundo procedimento cirúrgico, os cães foram sacrificados e os espécimes processados para a análise histométrica incluindo os seguintes parâmetros: extensão do defeito, extensão do epitélio, extensão da adaptação conjuntiva, extensão do novo cemento, extensão de novo osso, posição gengival. Uma maior extensão linear de novo cemento estatisticamente significativamente ($p < 0,05$) foi observada nos sítios tratados com PME isolada (3,72mm) e associada a RTG (3,78mm), em relação ao grupo controle (2,4mm). A extensão de epitélio foi de $1,85 \pm 0,47$ mm no grupo CO; $1,35 \pm 0,62$ mm para o grupo RTG; $1,52 \pm 0,5$ mm no grupo PME e $1,15 \pm 0,63$ no grupo RTG + PME. Quanto ao epitélio sobre a raiz o grupo CO apresentou uma extensão de $1,11 \pm 0,36$ mm, o grupo RTG $0,78 \pm 0,39$ mm, $0,78 \pm 0,32$ mm para o grupo PME e $0,5 \pm 0,44$ mm para o grupo RTG + PME. A extensão de novo osso foi de $1,14 \pm 0,39$ mm para o grupo controle, $0,91 \pm 1,08$ mm para o grupo RTG; $2,01 \pm 0,82$ mm no grupo PME e $1,4 \pm 1,08$ mm para o grupo RTG + PME. Dentro dos limites deste estudo, pode se concluir que a matriz derivada do esmalte isolada ou associada às membranas reabsorvíveis foi efetiva em promover nova formação cementária e a associação dos tratamentos não proporcionou benefícios que indicassem sua utilização.

PALAVRAS CHAVE: regeneração tecidual guiada, matriz derivada do esmalte, doença periodontal, regeneração peridontal.

ABSTRACT

The goal of this investigation was to evaluate histometrically the healing of dehiscence type defect treated by open flap debridement, enamel matrix protein derivative, guided tissue regeneration and enamel matrix protein derivative associated to guided tissue regeneration. Seven mongrel dogs were used, dehiscence defects were surgically created on the mesial roots of the third and fourth lower premolars. The defects (4 x 6mm) were exposed to plaque accumulation for 3 months. After this period, the defects were randomly assigned to one of the treatment: open flap debridement (CO); guided tissue regeneration (GTR); enamel matrix derivative (EMD) or the association of Guided tissue Regeneration and enamel matrix derivative (GRT+ EMD). After 4 months of healing, the dogs were sacrificed and the blocks were processed. The histometric parameters evaluated included: gingival recession, length of epithelium, length of the epithelium in the root, length of defect, connective tissue adaptation, new cementum and new bone. A linear extension of new cementum statistically significant was found between control ($2,4\text{mm} \pm 0,79$) and the enamel matrix derivative alone ($3,72\text{mm} \pm 0,72$) or in association ($3,78\text{mm} \pm 1,1$) with guided tissue regeneration ($p < 0,05$). The extension of the epithelium was $1,85 \pm 0,47\text{mm}$ for the CO group, $1,35 \pm 0,62\text{mm}$ for the GTR-group, $1,52 \pm 0,50\text{mm}$ for the EMD-group and $1,15 \pm 0,63\text{mm}$ for the association group (GTR+EMD). The epithelium on the root was $1,11 \pm 0,36\text{mm}$ for the CO, $0,78 \pm 0,39\text{mm}$ for the GTR group, $0,78 \pm 0,32\text{mm}$ for EMD-group and $0,50 \pm 0,44\text{mm}$ for the GRT+ EMD - group. The Bone formation was $1,14 \pm 0,39\text{mm}$ in the CO-group, $0,91 \pm 1,08\text{mm}$ in the GTR - group, $2,01 \pm 0,82\text{mm}$ in the ETR- group and $1,4 \pm 1,08\text{mm}$ for the association.

Within the limits of this study it can be concluded that both groups using enamel matrix protein derivative are effective for new cementum formation, and the combined therapy did not seem to improve the results.

KEY WORDS: enamel matrix protein derivative, guided tissue regeneration, periodontal disease, periodontal regeneration.

1. INTRODUÇÃO

O uso de barreiras na terapia periodontal regenerativa tem sido associado ao conceito de Regeneração Tecidual Guiada. A hipótese feita originalmente por MELCHER, 1976, e concretizada por KARRING et al., 1980; NYMAN et al., 1982; LINDHE et al., 1982; GOTTLOW et al., 1984; sugeri que somente algumas células do periodonto podem produzir novo cemento, ligamento e osso, se a estas células forem dada oportunidade de ocupar a área da ferida. Tal situação acontece quando outras populações celulares, como por exemplo, células epiteliais ou fibroblastos gengivais, que provavelmente são os primeiros a ocupar a área do defeito, são excluídos desta região durante a cicatrização. A possibilidade de se excluir algumas células durante a cicatrização de um defeito ósseo periodontal, e se obter a regeneração dos tecidos perdidos, tem dado suporte para a utilização das chamadas barreiras ou membranas.

As primeiras barreiras usadas em cirurgia periodontal que permitiram regeneração de cemento, ligamento, e osso foram os filtros de papel (NYMAN et al., 1982), que foi a primeira evidência histológica da regeneração periodontal. No entanto este tipo de barreira não tinha algumas características fundamentais para a Regeneração Tecidual Guiada (RTG), e a partir dela, várias outras têm sido desenvolvidas na tentativa de se obter o material ideal para Regeneração Periodontal, principalmente as membranas reabsorvíveis que dispensariam um segundo ato cirúrgico (GREENSTEIN & CATON 1993).

Além das membranas, tem sido indicada a utilização de proteínas derivadas da matriz de esmalte (PME) visando à obtenção de regeneração periodontal (HAMMARSTRÖM, 1997; HEIJL et al., 1997). Este é um material

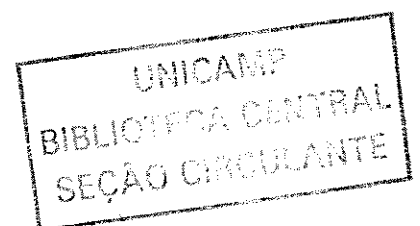
absorvível, composto por proteínas derivadas do esmalte do órgão dental formando uma matriz protéica, e tem como proteína predominante a amelogenina.

Esta indicação esta suportada pelo conhecimento do papel destas proteínas durante o desenvolvimento da raiz dental. Estudos que descreveram a cementogênese demonstraram uma íntima relação entre a bainha epitelial de Hertwig e a formação de cimento acelular (SLAVKIN & BOYDE, 1975; FOUNG et al, 1986) Desta forma, sugere-se que este material possa agir mimetizando a ação das proteínas liberadas no processo que ocorre durante o desenvolvimento embrionário dos tecidos periodontais e da raiz, na formação do cimento acelular (HAMMASTRON *et al.*, 1997) promovendo assim, a formação de nova inserção conjuntiva.

Estudos clínicos controlados mostraram a eficiência das PME em induzir regeneração. HEIJL *et al.*, (1997) avaliou a utilização destas proteínas em defeitos periodontais intra-ósseos. Análises radiográficas demonstraram que o ganho ósseo nos dentes tratados com as PME foi clinicamente relevante, enquanto que no grupo controle, os níveis ósseos se mostraram inalterados.

Estudos histológicos em animais e humanos também forneceram evidências de que o tratamento de diferentes tipos de defeitos periodontais com estas proteínas, promovem um tipo de cicatrização que é caracterizado pela formação de novo cimento com inserção de fibras colágenas e novo osso alveolar (HAMMASTRON *et al.*, 1997; YUKNA 2000). Além disso, os poucos estudos que compararam a utilização das proteínas com a RTG, relataram uma maior rapidez e facilidade de trabalho, quando se utiliza a proteína, e mostram resultados muito semelhantes daqueles encontrados com a RTG (SCULEAN *et al.*, 2001, PONTORIERO *et al.*, 1999; SCULEAN *et al.*, 1999) embora os resultados clínicos, a longo prazo, e histológicos ainda sejam limitados (HEIJL *et al.*, 1997) .

Tendo em vista que estudos histológicos são os que melhores retratam os processos regenerativos, e que comercialmente as proteínas derivadas da matriz do esmalte vieram ao mercado com uma alternativa a utilização das membranas, este trabalho teve como objetivo, avaliar histometricamente o processo de cura em defeitos ósseos do tipo deiscência, tratados pela técnica de Regeneração Tecidual Guiada e da utilização de Proteínas da Matriz do Esmalte, associadas ou isoladamente, utilizando o cão como modelo experimental.



2. REVISÃO DE LITERATURA

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

Em casos avançados da doença periodontal, alguns dentes são perdidos mesmo após o tratamento, devido principalmente às dificuldades de manutenção causada pelos defeitos ósseos remanescentes (McFALL Jr., 1982). Nesses casos, a terapia periodontal deve compreender também o tratamento dos defeitos ósseos produzidos pela doença (CAFFESSE *et al.*, 1988; CORTELLINI *et al.*, 1993a).

A terapia periodontal regenerativa visa restabelecer completamente o aparato de suporte que foi perdido como consequência da doença periodontal inflamatória (CATON *et al.*, 1993).

Vários procedimentos têm sido propostos para o tratamento de defeitos ósseos, cada um deles com diferente previsibilidade que depende além da técnica empregada, de fatores associados, como a anatomia do defeito e o controle de placa. As opções de tratamento com diferentes processos de cura dos tecidos periodontais resultantes dessas modalidades terapêuticas têm motivado discussões ao longo dos anos (MELCHER, 1976; LISTEGARTEN & ROSENBERG, 1979; CATON *et al.*, 1980).

2.1. Cura Periodontal

Procedimentos convencionais como raspagem e alisamento radicular, curetagem gengival, gengivectomia, retalhos e cirurgia óssea afetam favoravelmente defeitos anatômicos produzidos pela periodontite, através da

redução da profundidade de sondagem, tanto pela retração dos tecidos, quanto pelo ganho de inserção clínica, e durante vários anos, estas mudanças favoráveis foram interpretadas como verdadeira regeneração periodontal (ROSLING *et al.*, 1976; CATON *et al.*, 1982). Entretanto estudos posteriores demonstraram que a terapia periodontal convencional resultava primariamente em reparo (CATON *et al.*, 1980; LISTGARTEN *et al.*, 1979). CATON *et al.*, (1980) utilizando o modelo experimental em primatas, demonstraram que os procedimentos convencionais resultavam na formação de um epitélio juncional longo, sem a formação de nova inserção conjuntiva, mostrando a capacidade do epitélio em assumir rapidamente a área da ferida, impedindo a regeneração periodontal.

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

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

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

Com o surgimento dos procedimentos regenerativos, que abrem um leque de opções para a cura de defeitos periodontais, o termo Regeneração vem sido discutido, e pode ser definido como: processo de cura que reproduz ou reconstitui a arquitetura e função do tecido ferido ou perdido por ocorrência de

doença (ACADEMIA AMERICANA DE PERIODONTIA, 1986, 1992) portanto, seguindo esta definição a Regeneração Periodontal é a reconstituição do periodonto de inserção através da formação de novo ligamento, novo cimento e novo osso ao redor dos dentes que perderam estas estruturas após a instalação e progressão da doença periodontal (LYNCH, 1992). Desta forma a cura da ferida, observada na maior parte das vezes, por tecido que restaura a arquitetura ou função do tecido perdido, com formação de epitélio juncional longo, anquilose e reabsorção radicular é um processo definido como reparo (CATON & GREENSTEIN, 1993).

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

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

Os estudos clínicos têm mostrado que, embora seja possível modificar os eventos de cura de várias maneiras, a regeneração periodontal completa e previsível, ainda é um objetivo difícil de ser alcançado (HAMMARSTROM *et al.*, 1997; HEIJL *et al.*, 1997), porém o emprego da regeneração tecidual guiada e das

proteínas da matriz do esmalte, são as técnicas que mais se aproximam deste objetivo.

2.2. Regeneração Periodontal com Regeneração Tecidual Guiada

Dentre as técnicas regenerativas, a regeneração tecidual guiada (RTG) foi a mais estudada e parece ter perspectiva bastante promissora, principalmente em relação a sua eficácia clínica e previsibilidade em lesões de bifurcação grau II na superfície vestibular de molares inferiores e defeitos intra-ósseos profundos de 3 paredes.

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

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

Com o objetivo de avaliar o papel das células do tecido conjuntivo gengival no processo de cura, NYMAN *et al.* (1980) induziram periodontite nos pré-molares mandibulares de cães, através da colocação de ligaduras de algodão

ao redor dos dentes até que a destruição dos tecidos periodontais atingisse a metade do comprimento radicular. Posteriormente, as ligaduras foram removidas e os dentes limpos. Retalhos de espessura total vestibular e lingual foram elevados e a raiz exposta foi instrumentada e polida. As coroas dentais foram removidas, o nível da crista óssea foi demarcado através de um sulco na superfície radicular e as raízes foram cuidadosamente extraídas e transplantadas para um defeito criado cirurgicamente nas partes edêntulas da mandíbula, de modo que o dente, em posição horizontal, permanecesse com uma metade da circunferência radicular voltada para o osso e outra metade voltada para o tecido conjuntivo gengival do retalho que a recobria. Os resultados histológicos, após 3 meses, demonstraram que havia reabsorção radicular em ambas as circunferências radiculares, apesar de AUKHIL *et al.* (1986) afirmarem que o grau de reabsorção provocado pelo tecido conjuntivo derivado do osso era maior em comparação ao do retalho.

KARRING *et al.* (1980) avaliaram o potencial do tecido ósseo em promover a regeneração periodontal, utilizando de metodologia semelhante à descrita por NYMAN *et al.*, 1980, diferenciando-se apenas no aspecto de que as raízes permaneceram em posição vertical, completamente circundada por tecido ósseo, sendo a porção mais coronária da raiz coberta pelo tecido conjuntivo gengival, evitando a migração epitelial e contaminação pela placa bacteriana. Os resultados histológicos de 3 meses demonstraram reinserção conjuntiva na parte mais apical da raiz, onde havia ligamento periodontal viável, ao passo que na porção mais coronária, onde a superfície radicular foi exposta à doença e desprovida do ligamento periodontal ou gengiva, os fenômenos de anquilose e reabsorção radicular foram preponderantes.

Nestes dois estudos citados anteriormente, os achados histológicos demonstraram áreas de reabsorção radicular e anquilose também na porção apical das raízes, provavelmente devido ao traumatismo do ligamento periodontal, causado pelos movimentos de extração e transplante dentais. Provavelmente isso

levou a migração dos tecidos de granulação, derivados do osso e do tecido conjuntivo gengival para região de contato com a superfície radicular, causando reabsorção e anquilose, prevenindo também a migração coronária das células do ligamento periodontal (KARRING *et al.*, 1985). Em vista disso, modificaram a metodologia anterior, no sentido de que as raízes permaneceram no local e foram cobertas pelo retalho após a instrumentação radicular. A análise histológica revelou uma quantidade razoável de formação de nova inserção na porção coronária das raízes, onde o periodonto de inserção foi perdido após a indução de periodontite, demonstrando que as células do ligamento periodontal são capazes de formar nova inserção.

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

O primeiro relato de um dente humano tratado de acordo com o princípio da RTG foi feito por NYMAN *et al.*, (1982) em um incisivo lateral inferior com periodontite avançada indicado para extração. No ato do procedimento cirúrgico, a sondagem clínica da face vestibular média era de 11mm da junção cimento esmalte ao fundo do defeito. Após a instrumentação radicular cuidadosa, um filtro milipore foi colocado sobre o defeito, 2mm aquém da junção cimento esmalte e 1mm apical à crista óssea, e fixado com resina. Após 3 meses do procedimento cirúrgico, o dente foi removido em bloco, juntamente com a parede

vestibular periodontal. Observou-se microscopicamente a formação de nova inserção que se estendia 7mm do fundo do defeito em direção coronária.

NYMAN *et al.*, (1982), em um outro estudo, utilizando 3 macacos, removeram a tábua óssea vestibular e proximal da porção mediana da raiz de incisivos e caninos até 2mm apical à crista óssea marginal. Antes do reposicionamento e sutura do retalho as raízes foram instrumentadas, sulcos de referência foram realizados determinando a posição coronária e apical do osso remanescente, então, um filtro milipore foi posicionado, como uma barreira, entre o retalho e a superfície radicular. A análise histológica da porção mediana da raiz, realizada 6 meses após o procedimento cirúrgico, mostrou que houve a formação de novo cemento com fibras colágenas inseridas em todos os espécimes, sendo mais espesso o cemento na região apical. Também foram observadas fibras colágenas, paralelas à superfície radicular, sem inserção ao cemento, nas áreas mais coronárias.

GOTTLOW *et al.* (1984) utilizaram defeitos ósseos do tipo deiscência em 3 macacos. A porção gengival que recobria o defeito foi removida permitindo a exposição da superfície radicular à placa por um período de 6 meses. Decorrido este período, novo retalho foi elevado, as raízes foram instrumentadas, as coroas removidas, os canais radiculares preenchidos, e os retalhos suturados visando completo recobrimento das raízes. No grupo experimental, antes da sutura, as raízes foram cobertas por um filtro milipore. A avaliação histológica, executada após 3 meses de cicatrização, revelou que nova inserção conjuntiva (novo cemento com fibras colágenas inseridas) se formou em todas as raízes do grupo experimental, em uma extensão que variou de 0,9 a 6,8mm, enquanto que no grupo controle esta extensão foi de 0 a 2,5mm. Áreas onde não houve formação de cemento apresentaram fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície radicular, e reabsorção radicular sendo esta mais freqüente no grupo controle. A formação óssea ocorreu no grupo experimental em 7 dos 9 espécimes, em uma extensão de 20 a 100% da superfície do defeito. Enquanto que no grupo controle

ocorreu em 2 dos 6 espécimes, em uma proporção de 40 a 60%. Concluiu-se que o uso da membrana entre o retalho e a superfície radicular favoreceu a repopulação da área de cura pelas células do ligamento periodontal, não encontrando correlação entre formação do cemento e regeneração óssea. Neste modelo tanto células do ligamento periodontal quanto células do tecido ósseo poderiam invadir o sítio de cura, entretanto anquilose não foi observada nos sítios testes nem nos controle, indicando que a capacidade das células do ligamento migrarem é maior ou igual a das células do tecido ósseo.

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

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

Muitos estudos foram feitos com o objetivo de demonstrar que, da mesma maneira que as membranas não reabsorvíveis, as membranas reabsorvíveis também cumpriam seu papel em barrar a migração epitelial.

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

CAFFESSE *et al.* (1994) usaram 9 cães nos quais foram criados cirurgicamente defeitos de furca Classe II, onde foram avaliadas duas membranas produzidas a partir do copolímero de ácido glicólico e ácido láctico (RESOLUT®), membranas não reabsorvíveis de PTFE-e (GORE-TEX®) foram utilizadas como controle. Após seis meses de cicatrização, observou-se que as três barreiras foram efetivas na prevenção da migração apical do epitélio juncional e na promoção de tecido ósseo e nova inserção. O processo de reabsorção das membranas iniciou-se em 4 semanas, sendo que após 24 semanas ainda foram detectados pequenos fragmentos das mesmas. Concluiu-se que a utilização deste tipo de membranas reabsorvíveis proporcionaram resultados semelhantes aos obtidos no grupo controle.

SALLUM *et al.* (1998) avaliaram histometricamente a resposta dos tecidos periodontais em defeitos do tipo deiscência criados cirurgicamente em cães. Os defeitos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: utilização da técnica de regeneração tecidual guiada com membrana reabsorvível Guidor® (grupo teste) ou terapia cirúrgica convencional (grupo controle). Os resultados encontrados demonstraram que a formação de nova inserção conjuntiva foi significativamente maior nos sítios teste do que no controle (2.79 ± 0.74 mm e 1.47 ± 0.20 mm respectivamente) ($p < 0.05$). A migração apical do epitélio também

foi reduzida nos sítios teste ($p < 0.05$). Não foram encontradas diferenças na resposta do tecido ósseo. Os autores concluíram que a membrana reabsorvível Guidor[®], foi efetiva em bloquear a migração apical do epitélio e a proliferação do tecido conjuntivo, promovendo nova inserção.

Usando uma metodologia semelhante PEREIRA *et al.* (2000) utilizaram 6 cães com o objetivo de comparar histológica e histometricamente o processo de cicatrização de defeitos de deiscência tratados com RTG, utilizando membranas não reabsorvíveis de politetrafluoretileno e reabsorvíveis de ácido polilático, comparados ao controle (retalho para raspagem). Os resultados mostraram uma maior quantidade de novo cemento nos sítios tratados com RTG, independente do tipo de membrana que foi utilizado, quando comparado com o controle. Nenhuma diferença estatística foi encontrada quando se compararam as duas membranas, exceto na área óssea onde houve um resultado ligeiramente maior para o grupo tratado com a membrana de politetrafluoretileno. Os autores concluíram que ambas as barreiras foram igualmente eficazes para a formação de novo cemento, e que as membranas não reabsorvíveis podem resultar um pouco mais de área óssea, quando comparadas com as não reabsorvíveis.

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

reabsorvíveis, embora, em longo prazo, as respostas se tornaram similares para ambas as membranas.

2.3. REGENERAÇÃO PERIODONTAL COM PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DO ESMA;TE

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

A bainha radicular epitelial de Hertwig consiste em uma extensão apical do órgão dental, e sua camada mais interna representa uma extensão da camada de ameloblastos da coroa (HEIJL *et al.*, 1997). Existem grandes evidências de que a bainha radicular secreta proteínas da matriz do esmalte durante a formação radicular e este tipo de proteína está, possivelmente envolvida na formação do cimento acelular durante o processo de desenvolvimento dental. Vários estudos realizados nos últimos 20 anos já suportavam cientificamente esta hipótese (SLAVKIN & BOYDE, 1975; SLAVKIN, 1976; LINDSKOG, 1982a, b; LINDSKOG & HAMMARSTROM, 1982; SLAVKIN *et al.*, 1989a,b; HAMMARSTROM, 1997a, b).

Em 1982, numa série de três trabalhos LINDSKOG, 1982a,b; LINDSKOG & HAMMARSTROM, 1982 demonstraram através de estudos *in vitro* (*in vitro*) e com microscopia eletrônica de varredura que a camada mais interna da bainha radicular epitelial de Hertwig tem um estágio secretor e que, um material

semelhante à matriz do esmalte é formado sobre a superfície radicular previamente à formação do cimento.

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

Parece então, que a deposição temporária de proteínas da matriz do esmalte sobre a superfície radicular é um passo essencial e prévio à formação do cimento acelular, e que, a formação do ligamento periodontal e osso alveolar é dependente da formação do cimento acelular (HAMMARSTROM, 1997a,b; HAMMARSTROM *et al.*, 1997; HEIJL, 1997). Este fato também está de acordo com o estudo de TEN CATE que, em 1975, demonstrou que o cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar não constituem apenas uma unidade funcional que ancora os dentes nas maxilas, mas o desenvolvimento destes 3 tecidos também ocorre simultaneamente.

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

Num primeiro estudo, composto por 3 experimentos, HAMMARSTROM, em 1997b, identificou, inicialmente *in vitro*, a presença e distribuição de amelogenina no ápice em formação de pré-molares humanos e de molares de ratos em desenvolvimento.

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

No último experimento deste estudo (HAMMARSTROM, 1997b), foi investigado histologicamente, o tipo de tecido neoformado após a aplicação de matriz do esmalte exógena, em cavidades experimentais produzidas na superfície radicular de incisivos de macacos, removidos de seus respectivos alvéolos. As cavidades foram preparadas na superfície mesial de incisivos laterais, sendo que nas cavidades teste, foi aplicada a matriz do esmalte, e nas cavidades controle nada foi aplicado. Os dentes foram, então, reimplantados e após 8 semanas, observou-se nas cavidades testes a formação de um tecido histologicamente idêntico ao cimento acelular de fibras extrínsecas. Este tecido era firmemente aderido à dentina subjacente e fibras colágenas se estendiam a partir do cimento. Já nas cavidades controle, houve formação irregular de uma camada espessa de tecido duro, celular, fracamente aderido à dentina e parecido com osso imaturo.

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

periodontal quase completa do cimento acelular firmemente aderido à dentina, do ligamento periodontal e do osso alveolar.

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

Numa segunda parte desse estudo (GESTRELIUS *et al.*, 1997a), os autores descreveram o efeito das proteínas da matriz do esmalte em uma solução veículo de alginato de propilenoglicol sobre células do ligamento periodontal ao longo do tempo *in vivo*. Incisivos de macacos foram extraídos e 2/3 do cimento foi removido longitudinalmente na superfície mesial. Após o condicionamento ácido, foi aplicada a matriz do esmalte em alginato de propilenoglicol nas superfícies dos dentes testes, e nas de controle nada foi aplicado. Os dentes eram, então, imediatamente reimplantados. Para avaliação em microscopia eletrônica de varredura, os dentes foram progressivamente extraídos nos 3º, 7º, 14º dias. De acordo com os resultados obtidos, as superfícies testes ficaram inicialmente cobertas por uma rede de fibras protéicas e foram continuamente colonizadas por células semelhantes a fibroblastos até atingirem uma média de cobertura celular correspondente a 3/4 da superfície. Já as superfícies controle tornaram-se continuamente cobertas por placa bacteriana e atingiram uma cobertura celular equivalente a 1/8 da superfície.

Com o propósito de obter maiores esclarecimentos sobre mecanismos e fatores necessários para que ocorra a regeneração periodontal, GESTRELIUS *et al.*, 1997b desenvolveram modelos de estudo *in vitro* para avaliar a capacidade

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

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

MELLONIG, em 1999, mostrou um outro caso de histologia humana após terapia regenerativa com proteínas da matriz do esmalte. Neste estudo, o derivado da matriz do esmalte foi aplicado em um defeito periodontal intra-ósseo de 3 paredes na mesial de um canino inferior esquerdo, apresentando um componente intra-ósseo de 5,0 mm. Clinicamente, foi observada uma redução de 5,0 mm na profundidade de sondagem, um ganho de inserção clínica de 4,0 mm e um preenchimento ósseo radiográfico limitado, 6 meses após o procedimento cirúrgico. A avaliação histológica, no mesmo período de avaliação, demonstrou uma fina camada de cimento acelular sobre o cimento original, áreas de osso maduro e lamelar com poucas áreas de formação óssea imatura e fibras do ligamento periodontal paralelas à superfície radicular.

HEIJL *et al.*, em 1997, compararam o efeito, em longo prazo, do tratamento cirúrgico de defeitos intra-ósseos associado ao gel de proteínas da matriz do esmalte, EMDOGAIN®, e um gel placebo. O estudo multicêntrico,

caracterizado por um modelo *split-mouth*, envolveu 33 pacientes que apresentavam 34 pares de sítios teste e controle. As avaliações clínicas e radiográficas foram feitas aos 8, 16 e 36 meses. O ganho médio de inserção clínica do grupo teste em relação ao controle aos 8 meses foi de 2,1mm e 1,5mm; aos 16 meses foi de 2,3mm e 1,7mm e aos 36 meses foi de 2,2mm e 1,7mm, respectivamente, e as diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes a cada período. Para o nível ósseo radiográfico, o grupo teste apresentou em média um ganho de 0,9mm, enquanto que o grupo controle apresentou em média uma perda de 0,1mm aos 8 meses. Aos 16 meses de avaliação, o grupo teste apresentou um ganho médio inserção de 2,2mm e o controle uma perda média de 0,2mm, e aos 36 meses o grupo teste continuou apresentando um ganho ósseo médio de 2,6mm comparado aos níveis ósseos inalterados no grupo controle.

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

Ainda avaliando as modificações nos parâmetros clínicos de sondagem após tratamento regenerativo de defeitos periodontais intra-ósseos com proteínas

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

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

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

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

o derivado da matriz do esmalte, nem mesmo em pacientes propensos a reações alérgicas.

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

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

2.4. Estudos comparativos de PME e RTG

A regeneração tecidual guiada (RTG) é, possivelmente, um dos tratamentos mais pesquisados nos últimos anos e chega a ser classificado como “gold standard” quando se fala em regeneração periodontal (CAFFESSE *et al.*, 1994). As proteínas derivadas do esmalte surgiram como uma possível alternativa à utilização das barreiras, que segue não o caminho de exclusão de células, e sim o de estimulação delas. Vários autores realizaram trabalhos que comparam estas

duas técnicas regenerativas a fim de demonstrar a real equivalência, superioridade, ou até o possível sinergismo destes procedimentos em obtenção de cimento, ligamento e osso alveolar.

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

DONOS *et al.* (1998), em um estudo com macacos, também utilizaram em defeitos de furca III a RTG e PME. Foram feitos três grupos de tratamento, um em que se utilizava a PME, outro com membranas e um terceiro que associava as duas técnicas. As análises histológicas mostraram que nos grupos onde houve a associação das terapias e no grupo com somente RTG, ocorreu quase um recobrimento total das superfícies previamente exposta. No grupo onde foram utilizadas somente as PME não houve um completo fechamento dos defeitos em nenhum dos casos.

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

técnicas regenerativas superiores ao procedimento controle (acesso à raspagem), após o período de um ano de avaliação.

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

Avaliações clínica e histológica em humanos, após tratamentos regenerativos de defeitos intra-ósseos, também foram investigadas por SCULEAN *et al.* (1999b). O estudo compreendeu quatorze defeitos intra-ósseos avançados em dentes com extração indicada, que foram tratados preliminarmente com derivado da matriz do esmalte ou com membranas reabsorvíveis. Com 6 meses de pós-operatório, os resultados clínicos demonstraram para o grupo que recebeu tratamento com as proteínas do esmalte, um ganho médio no nível de inserção de

3,2mm, e para o grupo tratado com regeneração tecidual guiada esse ganho médio foi de 3,6mm. As avaliações histométricas revelaram para o grupo tratado com as proteínas do esmalte, uma média de 2,6mm de nova inserção de tecido conjuntivo acompanhado de 0,9mm de novo osso alveolar. No grupo tratado com regeneração tecidual guiada, a média de nova inserção de tecido conjuntivo foi de 2,4mm e a média de novo osso alveolar foi de 2,1mm. A avaliação histológica também mostrou que após ambas as formas de terapia regenerativa, o cemento neoformado tinha um caráter predominantemente celular. De acordo com os resultados, os autores concluíram que ambas as formas de tratamento promovem formação de nova inserção de tecido conjuntivo, contudo, o tratamento com o derivado da matriz do esmalte pode não resultar, previsivelmente, na formação de cemento acelular em defeitos intra-ósseos humanos. Além disso, o tratamento com regeneração tecidual guiada parece promover regeneração óssea num grau maior do que o tratamento com as proteínas do esmalte.

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

SCULEAN *et al.* (2000) dando continuidade aos trabalhos que comparam os tratamentos com PME e membranas reabsorvíveis, utilizaram 3 macacos com a finalidade de avaliar histologicamente a cicatrização de defeitos intra ósseos bilaterais confeccionados cirurgicamente, e concluíram que os grupos testados e a associação deles podem promover a regeneração. No grupo controle a cicatrização foi caracterizada por um epitélio juncional longo e regeneração periodontal ficou limitada somente na porção mais apical do defeito,

os defeitos tratados com RTG apresentaram regeneração periodontal quando as membranas não foram expostas, defeitos tratados com PME apresentaram regeneração em várias extensões, e a combinação das terapias não demonstrou melhora nos resultados. As médias observadas de novo osso foram: membranas $2,0 \pm 1,1$ mm; proteínas derivadas do esmalte $1,4 \pm 0,9$ mm; associação $2,1 \pm 1,1$ mm; controle $0,7 \pm 1,1$ mm.

SCULEAN *et al.* (2001) em um estudo prospectivo utilizou 56 pacientes em que cada um possuía no mínimo um defeito periodontal de pelo menos 6 mm, e foram aleatoriamente tratados com PME, membranas reabsorvíveis, associação dos tratamentos ou controle. Nestes pacientes foram avaliados o índice de placa, índice gengival, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível de inserção, antes do tratamento e reavaliados após 1 ano. Os autores puderam concluir que não houve diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros avaliados entre os três grupos testados entre si, e estes mesmos grupos mostraram melhores resultados, estatisticamente significativa, no nível de inserção clínica e profundidade de sondagem quando os compara ao grupo controle.

2.5. Doenças periodontais em cães

Dentre os modelos animais experimentais para o estudo do periodonto, o cão é um dos mais utilizados por ser de fácil de manipular e cooperativo durante o experimento (NAVIA, 1977). Além disso, a junção dentogengival e o tamanho dos dentes são similares ao dos humanos embora haja diferenças anatômicas, topográficas, fisiológicas e de flora bacteriana. Sua dentição permanente, completa e funcional aos 6 meses de idade, possui em cada arcada 3 incisivos, 2 caninos, 4 pré molares e, quanto aos molares ,2 maxilares e 3 mandibulares (PAGE & SCHROEDER, 1982).

A utilização de modelos animais é crucial para se avaliar o potencial de novos tratamentos periodontais reconstrutivos com o intuito de desenvolver regimes terapêuticos em que se objetive aumentar as perspectivas de regeneração periodontal em humanos, apesar da extrapolação de dados ser limitada, uma vez que há diferença em alguns parâmetros, como arquitetura, espessura, densidade e remodelação óssea (WIKESJÖ & SELVING, 1999). Segundo FROST, em 1964, o ciclo de remodelação é mais rápido nos cães do que nos humanos. Mesmo assim, os animais mais utilizados nos estudos de regeneração periodontal são os macacos e cães, pela similaridade de progressão da doença periodontal, baseada nas semelhanças microbiológicas, imunológicas e clínicas com os achados humanos (WEINBERG, 1999).

3. PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar, histometricamente, o processo de cura de defeitos periodontais, do tipo deiscência, criados cirurgicamente em cães, com a utilização das barreiras reabsorvíveis e proteínas derivadas da matriz do esmalte, comparando os resultados obtidos com o uso destes produtos de forma isolada e associada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção dos animais

Foram utilizados 7 cães, de raça indefinida (peso aproximado de 15 kg), em boa saúde geral e que apresentaram dentição completamente erupcionada, em boas condições, e saúde periodontal. Os animais foram submetidos a tratamento profilático, incluindo vacinação, dieta adequada e higiene corporal de acordo com a orientação do Biotério Central da UNICAMP.

4.2. Anestesia

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

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

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

4.3. Criação dos defeitos

Após incisão intra-sulcular, um retalho vestibular, de espessura total, abrangendo a região dos pré-molares inferiores (do 1º molar ao 1º pré-molar) foi cuidadosamente elevado (figura 1). Com microcinzéis, foi realizada a remoção de parte da tábua óssea vestibular, criando-se uma deiscência de 6 x 4 mm, sobre as raízes mesiais dos 3º e 4º pré-molares de ambos os lados da mandíbula (figura2). A superfície radicular foi instrumentada até a remoção do cimento radicular. Uma tira matriz do tipo Tofflemire, recortada de forma a adaptar-se à anatomia do defeito criado, foi fixada à superfície coronária através do uso de fios de amarrão ortodônticos 0,016mm (Morelli® Dental Morelli Ltda) e resina fotopolimerizável (Z100® 3M do Brasil), ficando justaposta à área do defeito (figura3). O retalho foi adaptado em sua posição original e suturado com fio de sutura reabsorvível de vicryl 4-0 (Ethicon® - JOHNSON & JOHNSON, SÃO PAULO) através de sutura interrompida interproximal. Após a cirurgia foi aplicado, via intramuscular, solução analgésica de Dipirona Sódica 500mg (D500® Fort dodge, Campinas S.P. Brasil). Durante três meses, as tiras metálicas permaneceram em posição, permitindo acúmulo de placa e inflamação gengival (figura 4).

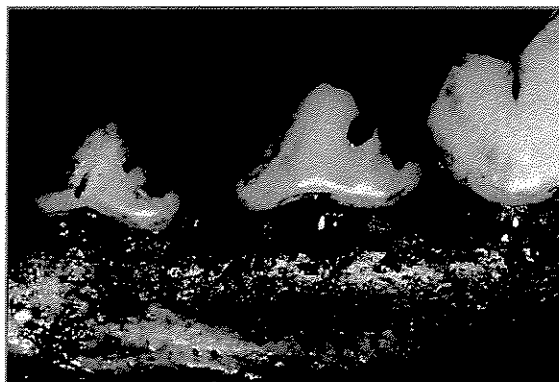


Figura 1- Exposição da tábua óssea vestibular, após retalho de espessura total

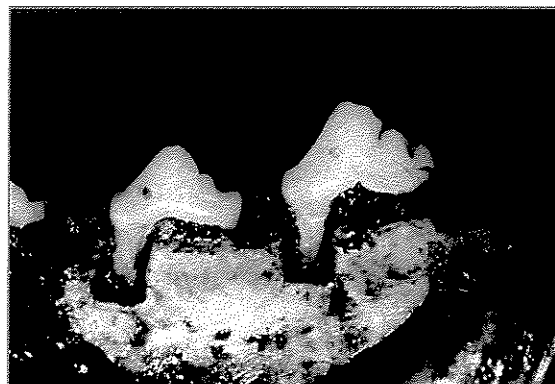


Figura 2 – Defeitos criados na raiz mesial



Figura 3 - Matriz fixada e adaptada ao defeito

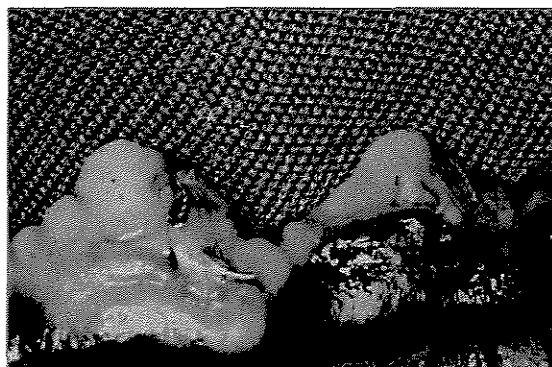


Figura 4 - Após 3 meses de colocação das placas, observando o acúmulo de placa

4.4. Tratamento dos Defeitos

Após 3 meses da criação dos defeitos, as tiras de matriz foram removidas, executando-se instrumentação radicular com o objetivo de desinflamação dos tecidos para prepará-los para fase cirúrgica posterior. Decorridos 7 dias, durante os quais foi aplicada, diariamente, solução de digluconato de clorexidina a 0,12%, os retalhos foram novamente rebatidos, as superfícies radiculares instrumentadas e os defeitos ósseos expostos (figura 5). Sulcos de referência, com o objetivo de viabilizar os procedimentos histométricos foram executados na superfície radicular, um ao nível da crista óssea do defeito, demarcando o limite apical, e outro ao nível da junção cimento-esmalte demarcando o limite coronário, com a utilização de broca esférica (*Carbide 1/2- KG-Sorensen®*, São Paulo) em alta rotação, sob irrigação com soro fisiológico.

Os defeitos foram tratados da seguinte forma:

- grupo 1- **CONTROLE** (CO): os sítios foram tratados pela técnica convencional de instrumentação radicular, com raspagem e alisamento radicular (figura 6).
- grupo 2- **MEMBRANA REABSORVÍVEL RESOLUT XT®** (RTG): após a instrumentação radicular, os sítios receberam as membranas

reabsorvíveis de ácido polilático e poliglicólico.(Resolut XT Regenerative Material ,W.L.,Gore Associate Inc., Flagstaff,Az,USA) , adaptadas sobre o defeito de forma a cobri-lo totalmente e com sobreposição às margens ósseas (figura 6).

- grupo 3 – **PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DO ESMALTE (EMDOGAIN®)** (PME): após a instrumentação radicular, as raízes expostas foram condicionadas durante 2 minutos com EDTA 24% (Prefgel® - Biora AB, Malmo – Sweden) e lavadas com soro fisiológico durante 1 minuto, após o condicionamento os sítios receberam a matriz derivada de esmalte (Emdogain® - Biora AB, Malmo – Sweden) , colocadas sobre o defeito de forma a banha-lo totalmente (figura 7).

- grupo 4 - **MEMBRANA REABSORVÍVEL RESOLUT XT® e PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DO ESMALTE (EMDOGAIN®)** (RTG+PME): após a instrumentação radicular, as raízes expostas foram condicionadas durante 2 minutos com EDTA 24% (Prefgel® - Biora AB, Malmo – Sweden) e lavadas com soro fisiológico durante 1 minuto, após o condicionamento os sítios receberam a matriz de esmalte, colocadas sobre o defeito de forma a banha-lo totalmente e membranas adaptadas sobre o defeito de forma a cobri-lo totalmente e com sobreposição às margens ósseas (figura 7).

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

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

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

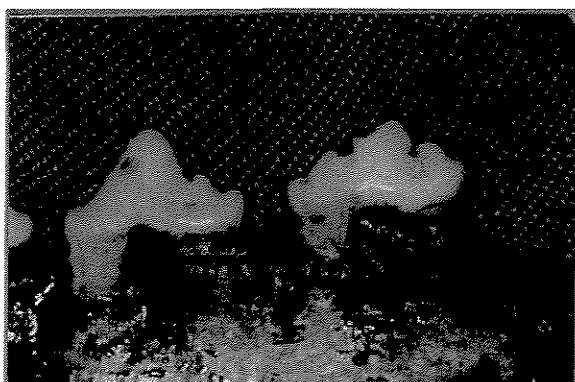


Figura 5- Exposição da tábua óssea vestibular, após retalho de espessura total rebatido

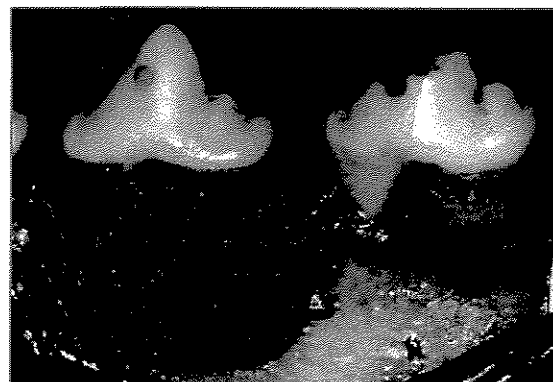


Figura 6 - Tratamento com RTG e CO, respectivamente

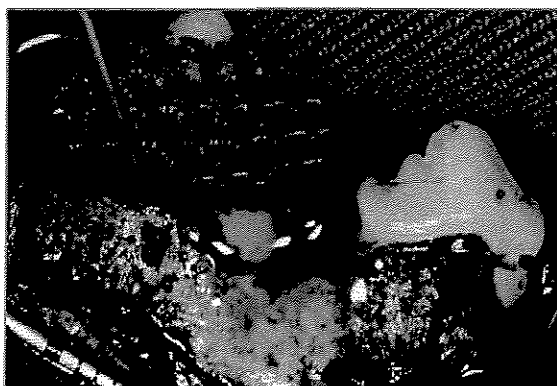


Figura 7 - Tratamento com RTG+PME e PME respectivamente

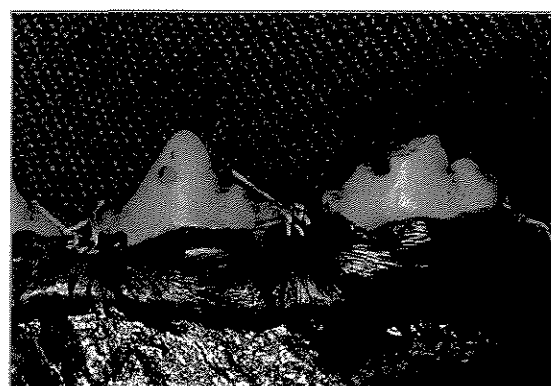


Figura 8 - Sutura coronária do retalho

4.5 Sacrifício dos Animais

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

4.6. Processamento do Material

Os blocos foram colocados imediatamente em solução tamponada de formol a 10% para fixação, permanecendo nesta solução por uma semana. Após lavagem em água corrente, os blocos foram então descalcificados em solução de Morse (ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20%, em partes iguais). As peças foram envolvidas em compressa de gaze e colocadas suspensas de maneira a ficarem submersas na solução, porém sem entrar em contato com o fundo do recipiente. Após 1 mês no descalcificador, as peças foram reduzidas, selecionando-se a raiz mesial. A solução de descalcificação foi trocada a cada dois dias, sendo o tempo total de descalcificação previsto de 3-4 meses, o progresso da descalcificação foi avaliado com perfuração das áreas que não havia interesse direto. Os espécimes descalcificados foram lavados em água corrente, colocados em solução de sulfato de sódio a 5% por 48 hs, novamente lavados, procedendo-se a tramitação laboratorial de rotina com desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados, com espessura de 7 μ m e orientação vestibulo-lingual, corados com H.E. e Tricrômico de Masson.

4.7. Histometria

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

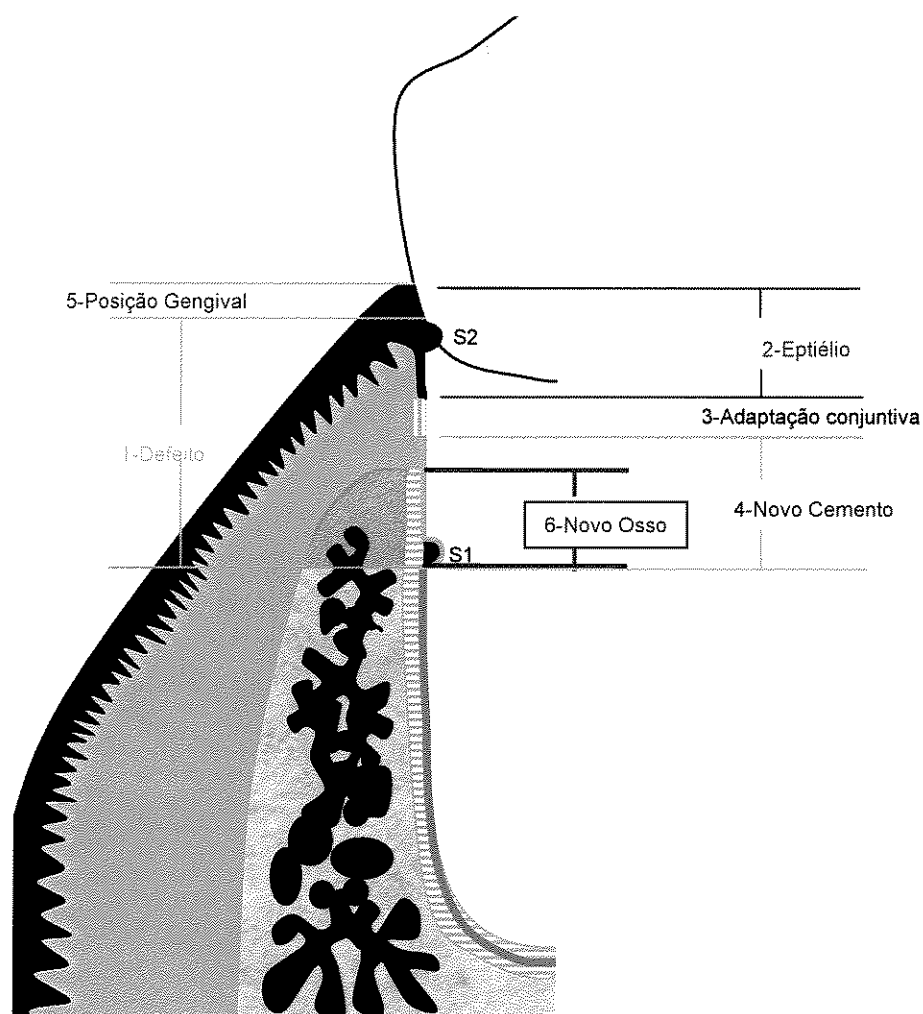


Figura I - Distâncias avaliadas

- 1- limite apical do sulco apical ao limite coronário do sulco coronário = Extensão do defeito
- 2-distância da margem gengival ao limite apical do epitélio juncional = Extensão do epitélio
- 3-limite apical do epitélio juncional ao limite coronário do novo cimento = Extensão da adaptação conjuntiva
- 4-limite apical do sulco apical ao limite coronário do novo cimento = Extensão do novo cimento
- 5- margem gengival ao limite coronário do sulco coronário =Posição Gengival
- 6-limite apical do sulco apical à crista óssea = Extensão de Novo Tecido Ósseo

Um outro parâmetro avaliado foi o de EPITÉLIO SOBRE A RAIZ, que foi calculado subtraindo-se da extensão do epitélio total a extensão da posição gengival.

4.8. Análise Estatística

Os dados histométricos foram submetidos à análise estatística através do teste de Anova – dois critérios, para verificar se havia diferença estatística entre os grupos, e no grupo onde houve diferença foi utilizado o teste de Kruscall Wallis.

5. RESULTADOS

5.1. Observações Clínicas

Clinicamente, o processo de cura demonstrou-se favorável em todos os grupos. O recobrimento completo do defeito foi obtido em 26 dos 28 defeitos utilizados, dois sítios pertencentes ao mesmo cão, dos grupos Controle e PME + RTG apresentaram retração gengival residual de 1 e 0,1 mm respectivamente. Um sítio pertencente ao grupo PME + RTG apresentou exposição da membrana após uma semana da realização das cirurgias, associada a uma inflamação gengival leve, sendo adotada a aplicação diária de clorexidina gel 1%, até que houvesse a degradação da porção exposta.

5.2. Observações Histológicas

Em todos os grupos, o padrão de cura observado foi o desenvolvimento de um epitélio juncional na parte coronária do defeito, atingindo áreas mais apicais no grupo controle (figura 9 e 10). Uma camada contínua de novo cemento foi formada nos espécimes de todos os grupos estendendo-se coronariamente em diferentes graus. Entretanto no grupo PME (figura 13) e no grupo RTG+PME (figura 15), a extensão coronária do novo cemento foi mais evidente do que no grupo Controle. O grupo RTG (figura 11) apresentou-se em uma posição intermediária quanto à quantidade de cemento, entre o controle e os grupos que utilizaram matriz derivada do esmalte, e em alguns espécimes foi encontrado restos da membrana ainda não reabsorvida (figura 12). Regeneração ocorreu em todos os grupos, principalmente na parte apical do defeito, porém no grupo PME (Figura 14) e PME + RTG (figura 16), a regeneração se estendeu um pouco mais coronariamente.



Figura 9 - Grupo CO: aumento de 1,25X, sulco apical (A), sulco coronário (B). Coloração de Tricrômico de Masson.



Figura 10 – Grupo CO: aumento de 5X, limite apical da formação do epitélio (C).



Figura 11- Grupo RTG: aumento de 2,5X, sulco apical (A), sulco coronário (B). Coloração de Tricrômico de Masson.



Figura 12 – Grupo RTG: aumento de 5X, limite apical da formação do epitélio (C), restos da membrana reabsorvível(DE).



Figura 13- Grupo PME: aumento de 2,5X, sulco apical (A), sulco coronário (B). Coloração de Tricrômico de Masson.



Figura 14 – Grupo PME: aumento de 5X no sulco coronário, limite apical da formação do epitélio (C), limite coronário da formação de cimento (E).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



Figura 15- Grupo RTG + PME: aumento de 1,25X, sulco apical (A), sulco coronário (B). Coloração de Tricrômico de Masson.

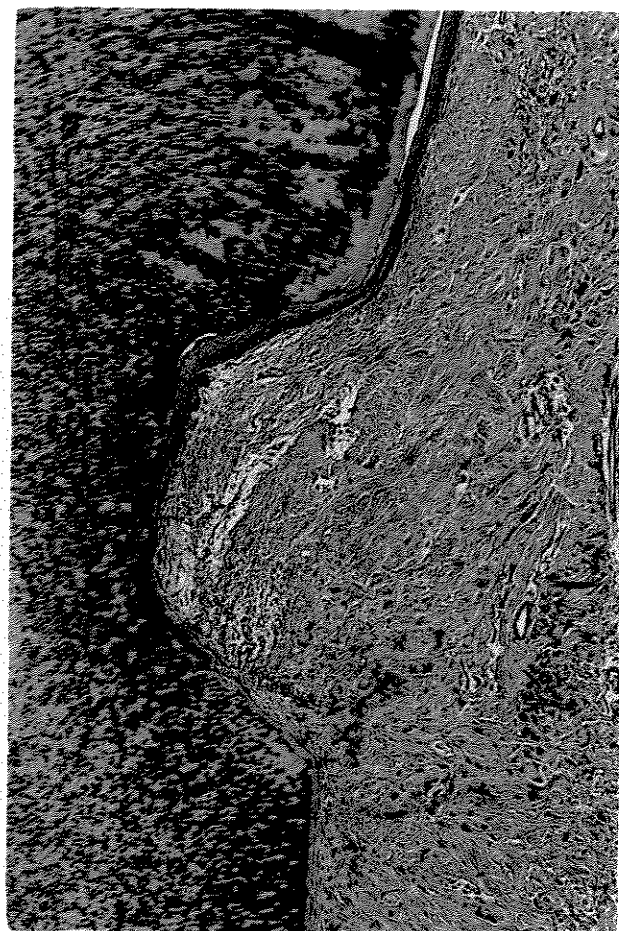


Figura 16 – Grupo RTG + PME: aumento de 5X no sulco coronário, limite apical da formação do epitélio (C), limite coronário da formação de cimento (E).

5.3. OBSERVAÇÕES HISTOMÉTRICAS

Os resultados histométricos de posição gengival, epitélio total, epitélio na raiz, adaptação conjuntiva, novo cemento, novo osso, posição gengival, retração e tamanho do defeito são mostrados na tabela 1. Considerando as médias em milímetros, mostradas na tabela 1, não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros avaliados entre os grupos exceto na extensão de novo cemento. O grupo PME e o grupo RTG+PME apresentaram valores quantitativos na formação de cemento maiores do que o grupo controle ($p \leq 0.05$), porém quando comparados entre si ou comparados ao grupo RTG não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Tabela 1: Média, desvio padrão (DP) e variação (em mm) para os parâmetros avaliados no grupo controle (CO), regeneração tecidual guiada (RTG), matriz derivada do esmalte (PME) e a associação de RTG e PME (RTG + PME)

	CO (n=7) média ± DP (amplitude)	RTG (n=7) média ± DP (amplitude)	PME (n=7) média ± DP (amplitude)	RTG+PME (n=7) média ± DP (amplitude)	P *
Posição Gengival	0,6 ± 0,79 (-1,0/1,5)	0,57 ± 0,38 (0,1/1,1)	0,74 ± 0,34 (0,4/1,2)	0,52 ± 0,53 (-0,1/1,4)	0,75
Epitélio total	1,85 ± 0,47 (1,2/2,4)	1,35 ± 0,62 (0,7/2,3)	1,52 ± 0,50 (0,8/2,4)	1,15 ± 0,63 (0,1/1,9)	0,072
Epitélio da Raiz	1,11 ± 0,36 (0,6/1,6)	0,78 ± 0,39 (0,2/1,5)	0,78 ± 0,32 (0,4/1,2)	0,5 ± 0,44 (0,0/1,3)	0,10
Adap. Conjuntiva	0,07 ± 0,12 (0,0/0,3)	0,08 ± 0,1 (0,0/0,2)	0,05 ± 0,078 (0,0/0,2)	0,04 ± 0,05 (0,0/0,1)	0,81
Novo Cimento	a 2,4 ± 0,79 (1,4/3,6)	ac 3,01 ± 0,66 (2,0/3,9)	bc 3,72 ± 0,72 (2,9/4,5)	bc 3,78 ± 1,1 (2,2/5,3)	0,031 *
Novo Osso	1,14 ± 0,39 (0,7/1,7)	0,91 ± 1,08 (-0,9/2,8)	2,01 ± 0,82 (0,8/3,0)	1,4 ± 1,08 (-0,3/2,7)	0,10
Rec. Gengival	-0,14 ± 0,37 (-1,0/0,0)	0,0 ± 0,0 (0,0/0,0)	0,0 ± 0,0 (0,0/0,0)	-0,01 ± 0,03 (0,0/0,1)	0,54
Defeito	3,72 ± 0,62 (2,9/4,5)	3,9 ± 0,59 (3,2/4,7)	4,58 ± 0,62 (3,7/5,5)	4,37 ± 0,79 (3,5/5,5)	0,097

*Médias que mostram letras diferentes, são estatisticamente diferentes (P<0.05) – ANOVA.

Os resultados histométricos de retração gengival, epitélio sobre a raiz, adaptação conjuntiva, e novo cemento estão expressos no gráfico 1 em porcentagens de recobrimento do defeito.

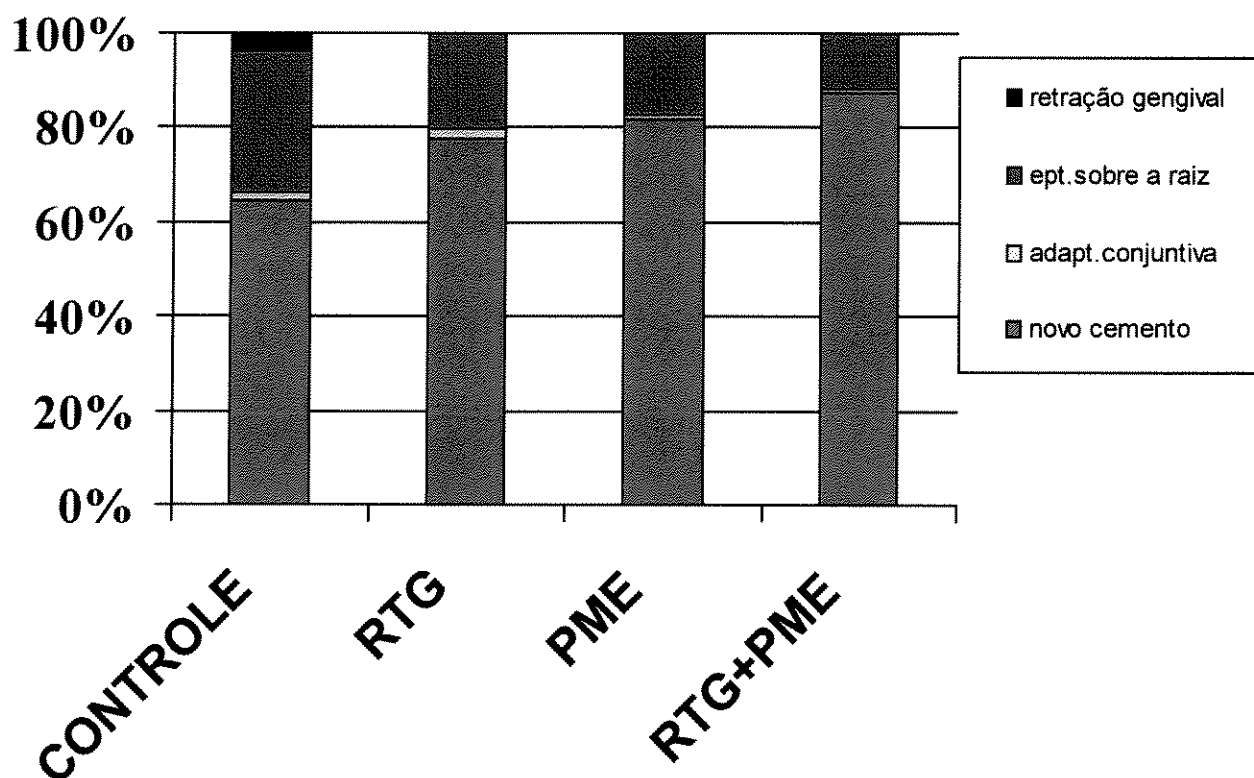


Gráfico1: Valores histométricos percentuais de retração gengival, epitélio sobre a raiz, adaptação conjuntiva e cemento, expressos da extensão do defeito após o tratamento Controle, Regeneração tecidual Guiada (RTG), Proteína da Matriz do Esmalte (PME) e associação Regeneração Tecidual Guiada e Proteína da Matriz do Esmalte (PME+RTG).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de comparar, histometricamente, a utilização das proteínas da matriz do esmalte (Emdogain®), das membranas reabsorvíveis (Resolut XT ®) e a associação destes dois tratamentos em defeitos do tipo deiscência, criado cirurgicamente em cães.

Os grupos que utilizaram proteína da matriz do esmalte, tanto isolada quanto associada a RTG mostraram resultados quantitativos, em relação à formação de cimento, estatisticamente superiores ao grupo controle. Todos os outros parâmetros avaliados não tiveram diferenças estatísticas.

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

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

O padrão de cicatrização observado no presente estudo em defeitos tratados com raspagem e alisamento radicular seguido de reposicionamento de retalho (CO), caracterizou-se pela formação de um epitélio longo estendendo-se em direção apical em níveis variados. Nos defeitos tratados com técnicas regenerativas, houve uma tendência para a formação de um epitélio, tanto total quanto epitélio sobre a raiz, menos extenso quando comparados ao grupo controle, porém sem diferenças estatísticas significantes, como observado anteriormente em outros estudos histológicos (CATON & NYMAN *et al.*, 1980; CATON *et al.*, 1980; PEREIRA *et al.*, 2000), que mostram o mesmo padrão de cicatrização. A regeneração tecidual guiada com a colocação de membranas inibe fisicamente a migração de células epiteliais para área do defeito (CATON *et al.*, 1980), permitindo que somente as células vindas do ligamento e do osso ocupem esta área e contribuindo para que haja a formação de um epitélio menos extenso.

Já as proteínas derivadas do esmalte, em estudos com cultura de células, demonstraram ter efeito na adesão celular, mitose, biossíntese e diferenciação (GESTRTELIUS *et al.*, 1997). Mecanismos específicos da ação das proteínas em contato com as células, nos primeiros momentos de cicatrização, parecem ter um mecanismo de ação específico que melhora a adesão de fibroblastos do ligamento periodontal, porém não tem efeito sobre os fibroblastos gengivais e células epiteliais, (VAN DER PAUW *et al.*, 2000), indicando um comportamento seletivo, considerado vantajoso nos estágios iniciais de

cicatrização. Embora estes dados *in vitro* nos dêem uma idéia do comportamento das células em contato com as PME, não se pode extrapolar estes resultados para experimentos *in vivo*, pois existem outros mecanismos que funcionam simultaneamente que podem modificar o comportamento celular.

Quanto ao cimento, os resultados deste estudo mostraram uma maior formação de novo cimento ($p < 0.05$) no grupo tratado com matriz derivada do esmalte (PME) isoladamente e no grupo da matriz derivada do esmalte em associação com regeneração tecidual guiada (RTG+ PME), quando comparados aos defeitos tratados com retalho para raspagem e alisamento radicular (CO), demonstrando um possível potencial para a utilização das proteínas. Por outro lado, a quantidade de neoformação de cimento observada quando se faz a comparação entre os grupo que usaram a RTG e a proteína derivada de esmalte isoladamente ou associadas, estas foram igualmente eficazes e não houve diferença estatística entre os grupos, assim como mostrado nos trabalhos de SCULEAN *et al.*, (2000) e WINDISCH *et al.* (2002). Estes dados indicam que clinicamente a combinação das duas terapias pode não trazer benefícios relevantes (SCULEAN *et al.*, 2000), provavelmente pela RTG e PME terem processos de cicatrização diferentes, que não necessariamente interagem entre si.

No presente estudo, o cimento formado após a aplicação da PME isolada ou associada à membrana, foi predominantemente cimento celular. Embora o princípio da Matriz Derivada do Esmalte tenha sido desenvolvido com a premissa da formação de cimento acelular com fibras extrínsecas em estudos animais e humanos, como encontraram HAMMARSTROM 1997, HAMMARSTROM *et al.*, 1997, HEIJL 1997, o cimento formado em defeitos periodontais infra-ósseos em humanos é principalmente celular (SCULEAN *et al.*, 1999) ou misto celular/acelular (SCULEAN *et al.*, 2000), porém no presente trabalho quando a fina área de cimento depositada ao longo do defeito

apresentou células, em menor ou em maior quantidade, foi classificado como cimento celular.

O parâmetro de retração gengival não teve diferenças estatísticas significantes quando foram feitas as comparações entre os grupos, concordando com dados de CORTELLINI *et al.* (1991), CASATI *et al.* (2001), porém a magnitude dos dados mostra uma tendência da retração ser maior no grupo controle e no grupo da associação RTG+PME, porém este fato ocorreu provavelmente porque em um dos animais houve exposição da membrana neste grupo e conseqüentemente contaminação bacteriana, fato este muito freqüente na maioria dos estudos que utilizam membrana (SANDER & KARRING 1995, SCULEAN *et al.*, 2000, WINDISCH *et al.*, 2002). Esta observação associada ao fato de que todos os três tratamentos regenerativos resultaram em quantidades semelhantes de regeneração, pode sugerir que do ponto de vista clínico, o tratamento com PME pode ser mais indicado do que o tratamento com RTG, já que não se corre o risco de exposição das barreiras, especialmente em casos onde a fixação adequada e a cobertura completa das membranas pelo retalho são difíceis de serem obtidas.

Quanto à formação de novo tecido ósseo, os resultados deste estudo também não mostraram diferença estatística nas comparações entre os grupos. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por CAFFESSE *et al.* (1988) e SALLUM *et al.* (1998), quando comparavam as membranas aos grupos controle e também não encontravam diferenças estatisticamente significantes em neoformação óssea. Quanto às proteínas da matriz do esmalte, poucos estudos histológicos foram feitos que avaliassem histométricamente a neoformação óssea em defeitos de deiscência, SCULEAN *et al.* (2000 a), e SCULEAN *et al.* (1999) em trabalhos com humanos e animais, respectivamente, avaliaram este parâmetro e, assim como no presente estudo, não encontraram diferenças estatisticamente significantes, porém nestes trabalhos havia a formação de mais osso nos grupos que utilizavam da técnica da RTG, enquanto no presente

trabalho, numericamente o grupo que apresentou maior formação óssea, foi o grupo que utilizou as proteínas. Isso, provavelmente deve-se ao fato dos defeitos utilizados por Sculean *et al.* (2000 a e 1999) serem defeitos mais favoráveis para a regeneração tecidual guiada.

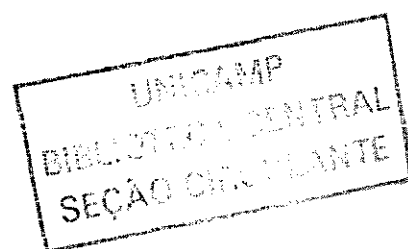
O tipo de defeito é um dos fatores que mais influencia a neoformação óssea, e o defeito de deiscência utilizado pelo presente trabalho é relativamente favorável á regeneração, por possuir paredes laterais e não ser muito profundo. DONOS *et al.* (1998), em um estudo histológico, compararam a utilização da matriz derivada do esmalte e membranas, isoladas ou associadas, mostraram que a maneira associada dos tratamentos parece ter resultados quantitativos de preenchimento ósseo tão bons quanto os da RTG sozinha, e ambas serem superiores ao tratamento com PME isoladamente e ao controle. A discrepância destes resultados em relação ao presente estudo, no qual o grupo da associação e os grupos RTG e PME não mostraram aumentar a quantidade de formação óssea, deve-se ao tipo de defeito, pois o padrão de cicatrização de defeitos de deiscência é diferente do padrão de defeito supra alveolar de furca III. Em defeitos de furca III células capazes de produzir regeneração só podem se originar do fundo do defeito, enquanto que em deiscência além da parte apical também podem se originar nas laterais do defeito, através das células do ligamento periodontal (GOTLOW *et al.*, 1986, BECKER *et al.*, 1988, KARRING *et al.*, 1993, PONTORIERO *et al.*, 1995b). ARAÚJO *et al.* (1998), também utilizaram defeito de furca III, porém somente compararam a associação dos tratamentos com a membrana isolada e também não encontraram diferença entre os grupos.

A possibilidade das Proteínas derivadas da matriz do esmalte influenciarem positivamente na formação óssea, foi demonstrada por CASATI *et al.* (2002) em um trabalho em que se realizou a confecção de defeitos de deiscência ao redor de implantes, e estes defeitos foram tratados com RTG, PME e a associação dos tratamentos, e embora não estatisticamente significante, o

grupo da associação apresentou resultados melhores do que o tratamento isolado.

Quanto às dificuldades encontradas pelo presente trabalho, deve-se destacar o fato de ser um estudo realizado em animais, muito difícil o controle destes, principalmente nos primeiros dias pós-operatório que são de extrema importância.

As membranas nos últimos 20 anos e as proteínas derivadas do esmalte nos últimos 5 anos, foram objeto de inúmeras pesquisas sobre regeneração, mas ainda pouco se pode afirmar sobre a utilização delas. O presente trabalho mostrou que a utilização das proteínas associadas ou não à RTG, pode influenciar quantitativamente a formação de cimento quando comparadas ao grupo controle, porém nenhum dos outros parâmetros mostraram diferenças estatísticas entre os grupos. Ainda outros estudos são necessários para que se possa esclarecer o quanto as proteínas e membranas influenciam na regeneração, e principalmente se é válido a associação dos tratamentos.



7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites do nosso trabalho podemos concluir que:

A Proteína Derivada da Matriz do Esmalte, de forma isolada ou associada à Regeneração tecidual guiada, foi eficiente em promover neoformação de cimento quando comparada ao grupo controle, e a associação dos tratamentos regenerativos não mostrou melhora dos resultados quando comparada aos tratamentos isolados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec*. 1996 Jun; 245(2):267-92. Review.
Casati MZ, Sallum EA, Caffesse RG, Nociti FH Jr, Sallum AW, Pereira SL. Guided tissue regeneration with a bioabsorbable polylactic acid membrane in gingival recessions. A histometric study in dogs. *J Periodontol*. 2000 Feb;71(2):238-48.

Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr, , Caffesse RG Sallum AW. Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence –type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol*. 2002 Jul;73(7): 789-96

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

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

Caton J, Nyman S, Zander H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *J Clin*

Periodontol. 1980 Jun; 7(3):224-31.

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

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

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

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

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

Foung D.C, Slaby I, Hammarstrom L. Amelin: an enamel-related protein transcribed in the cells of the epithelial root sheath. *J Bone Miner Res*, 1986 Jul; 11(7): 892-898.

Froum SJ, 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 Jan; 72(1):25-34,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Karring T, Nyman S, Lindhe J, Sirirat M. Potentials for root resorption during

periodontal wound healing. *J Clin Periodontol*, 1984 Jan; 11(1):41-52.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*, 1976

May; 47(5):256-60.

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

Navia JM Animal models in dental research. Alabama: University of Alabama Press 1977: p.169

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

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

Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*. 1980 Oct;7(5):394-401

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sculean A, Windisch P, Keglevich T, Fabi B, Lundgren E, Lyngstads PS.

Presence of an enamel matrix protein derivative on human teeth following periodontal surgery. *Clin Oral Investig*. 2002 Sep; 6(3):183-7.

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

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 nonresorbable membrane and Widman modified flap. A pilot study. *J Clin Periodontol*. 2000 Aug; 27(8):603-10.

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

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

Slavkin HC, Diekwisch T. Evolution in tooth developmental biology: of morphology and molecules. *Anat Rec*. 1996 Jun; 245(2):131-50. Review.

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

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

Van der Pauw MT, Van den Bos T, Everts V, Beertsen W. Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of

periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 2000 Jan; 71(1):31-43.

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

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

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

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