

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

**O EFEITO DAS PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ
DO ESMALTE E DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA
NO TRATAMENTO DE DEFEITOS PERIIMPLANTARES.
ESTUDO HISTOMÉTRICO EM CÃES.**

MARCIO ZAFFALON CASATI
CIRURGIÃO-DENTISTA



Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica, Área de Periodontia.

PIRACICABA

- 2001 -



057020000

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

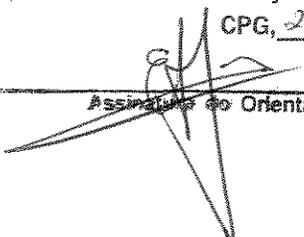
MARCIO ZAFFALON CASATI
CIRURGIÃO-DENTISTA

**O EFEITO DAS PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ
DO ESMALTE E DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA
NO TRATAMENTO DE DEFEITOS PERIIMPLANTARES.
ESTUDO HISTOMÉTRICO EM CÃES.**

ORIENTADOR: PROF. DR. ENILSON ANTÔNIO SALLUM
CO-ORIENTADOR : PROF. DR. ANTÔNIO WILSON SALLUM

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 25 / 10 / 2001


Assinatura do Orientador

Tese apresentada à
Faculdade de Odontologia
de Piracicaba - UNICAMP,
como parte dos requisitos
para obtenção do título de
doutor em Clínica
Odontológica, Área de
Periodontia.

PIRACICABA

- 2001 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Ficha Catalográfica

<p>C265e C264e</p>	<p>Casati, Marcio Zaffalon. O efeito das proteínas derivadas da matriz do esmalte e da regeneração óssea guiada no tratamento de defeitos periimplantares. Estudo histométrico em cães. / Marcio Zaffalon Casati. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2001. xii, 80f. : il.</p> <p>Orientadores : Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Ossos – Regeneração. 2. Periodontia. 3. Implantes dentários endoósseos. I. Sallum, Enilson Antônio. II. Sallum, Antônio Wilson. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p>
-----------------------------------	---

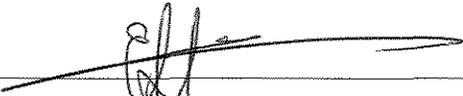
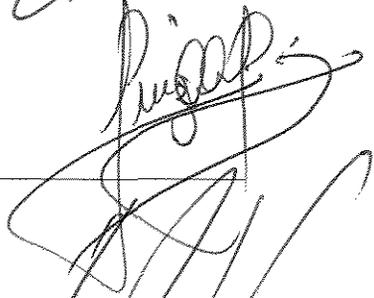
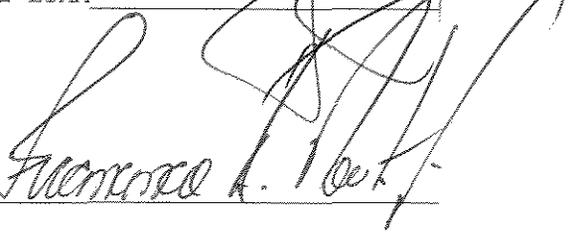
Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 02 de Julho de 2001, considerou o candidato MARCIO ZAFFALON CASATI aprovado.

- 1. Prof. Dr. ENILSON ANTONIO SALLUM 
- 2. Prof. Dr. EULOIR PASSANEZI 
- 3. Prof. Dr. WILSON ROBERTO SENDYK 
- 4. Prof. Dr. LUIS ANTONIO PUGLIESE ALVES DE LIMA 
- 5. Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR 

Aos meus pais, **Fernando Paulo e Maria Luiza**, pelo amor, dedicação, carinho e compreensão, responsáveis pela minha formação.

Aos meus avós **Gilberto**, um exemplo a ser seguido; **Maria Milta**, pelo carinho e amor; **Deolindo e Dalva**, pela proteção.

À minha irmã **Natalia**, pela amizade e carinho.

À **Carla**, pelo amor e compreensão.

À minha família,

dedico este trabalho.

Ao amigo e orientador Prof. **Dr. Enilson Antônio Sallum**
pelo grande apoio, incentivo constante e segurança
na orientação deste trabalho.

Ao amigo e mestre **Prof. Dr. Francisco H. Nociti Jr.**
pelo auxílio durante a execução deste trabalho e
pela presença marcante durante minha formação
profissional.

Agradeço a *Deus*
por esta conquista em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum e diretor associado, Prof. Dr. Frab Norberto Boscoli.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro e científico durante a execução deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Altair Antoninha Del Bel Cury, coordenadora geral dos cursos de pós-graduação da FOP/UNICAMP.

À Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo A. Gomes, coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, responsável pela área de Periodontia da FOP/UNICAMP.

À Universidade Paulista – UNIP, na pessoa do diretor do Instituto de Ciências da Saúde, Prof. Dr. Nicolau Tortamano e vice-diretor do Instituto de Ciências da Saúde Prof. Dr. José A. Jam de Mello.

Ao Coordenador do Curso de Odontologia – Campus Campinas, Prof. Dr. José Leonardo Simone.

Ao Prof. Dr. Raul G. Cafesse pelas observações e sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao amigo e mestre Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum por todos os ensinamentos e confiança em mim depositada.

Ao amigo, mestre e colega Prof. Dr. Sérgio de Toledo por ter despertado o meu interesse pela Periodontia e pelo apoio nos momentos difíceis.

À Prof^a. Dr^a. Gláucia pelo auxílio na análise estatística.

Ao Sr. Wanderlei e Luis Guedes do Amaral pelos cuidados dispensados aos animais.

À Srta. Eliete pelo subsídio imprescindível durante o curso de pós-graduação.

Ao Sr. Alexandre de Jorge e Antônio Moura, pelo transporte dos animais.

Aos amigos Cristine, Getúlio e Ivana pelo companheirismo e auxílio durante o trabalho.

Aos amigos e companheiros da UNIP Ângelo, Eudes, Fabiano, Halbert, Karina, Patrícia, Sérgio, Solimar e Vera pela compreensão e apoio.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho, e na minha formação profissional, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

<u>CAPÍTULOS</u>	<u>Pgs</u>
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
REVISÃO DA LITERATURA	6
I – Implantes dentais osseointegrados	6
II – Tratamento dos defeitos ósseos periimplantares	7
III – O princípio da regeneração óssea guiada	8
<i>III. A. Membranas não reabsorvíveis associadas aos implantes dentais</i>	10
<i>III. A. 1. Estudos Histológicos em animais</i>	10
<i>III. A. 2. Estudos Clínicos e Histológicos em humanos</i>	13
<i>III. B. Membranas reabsorvíveis associadas aos implantes dentais</i>	16
<i>III. C. Estudos comparativos (reabsorvíveis X não reabsorvíveis)</i>	19
IV – Proteínas derivadas da matriz do esmalte	21
<i>IV. A. Características e biocompatibilidade da matriz derivada do esmalte</i>	23
<i>IV. B. Estudo em culturas de células</i>	24
<i>IV. C. Estudos clínicos e histológicos</i>	25
<i>IV. D. Estudo da ação das PME sobre o tecido ósseo</i>	29
PROPOSIÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	34
I – Seleção da amostra	34
II – Anestesia	34
III – Procedimento cirúrgico de extração dos dentes	34
IV – Procedimentos cirúrgicos de criação das deiscências e colocação dos implantes	38
V – Tratamento das deiscências ósseas	41
VI – Processamento histológico	44

VII – Avaliação histométrica	44
VIII – Análise estatística	45
RESULTADOS	46
I – Observações clínicas	46
II – Observações histológicas	46
<i>II. A. Período de 1 mês de pós-operatório</i>	46
<i>II. A. Período de 3 meses de pós-operatório</i>	47
III – Resultados histométricos	52
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	79

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, histometricamente, a utilização das proteínas derivadas da matriz do esmalte (PME), associadas ou não à técnica de regeneração óssea guiada (ROG), no tratamento de deiscências ósseas peri-implantares. Foram utilizados seis cães, os quais tiveram os pré molares (p2, p3, p4) e molar (m1) mandibulares extraídos bilateralmente. Após três meses da extração, foram criadas quatro deiscências ósseas vestibulares bilaterais e instalados quatro implantes. As deiscências foram designadas aleatoriamente aos seguintes grupos: PME, ROG, associação PME + ROG e grupo controle. Após dois meses, nos mesmos animais, mais quatro deiscências foram criadas e mais quatro implantes instalados, sendo tratadas da mesma maneira. Três meses depois da primeira intervenção, os animais foram sacrificados e o material processado. As porcentagens médias obtidas para o parâmetro contato osso/implante, nos grupos PME, ROG, associação PME + ROG e grupo controle, no período de um mês de pós-operatório foram $15,03 \pm 23,76$; $12,87 \pm 9,35$; $8,52 \pm 6,89$; $3,88 \pm 5,70$, respectivamente ($p > 0,05$). No período de três meses: $18,07 \pm 13,52$; $24,42 \pm 19,88$; $36,11 \pm 17,53$; $16,96 \pm 17,77$, respectivamente ($p > 0,05$). Para o parâmetro área de novo osso na região das roscas, no período de um mês de pós-operatório, observou-se: $41,82 \pm 22,03$; $42,89 \pm 18,08$; $34,43 \pm 15,75$; $34,07 \pm 22,08$, respectivamente ($p > 0,05$). No período de três meses: $55,55 \pm 11,81$; $53,89 \pm 16,35$; $62,15 \pm 18,47$; $36,95 \pm 25,10$, respectivamente, sendo as diferenças entre o grupo controle e o grupo da associação PME + ROG estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Considerando os limites deste estudo, pode-se concluir que a associação PME + ROG proporcionou um maior preenchimento ósseo das roscas do implante, quando comparado ao grupo controle, após três meses de pós-operatório.

PALAVRAS CHAVES: implantes dentais, regeneração óssea guiada, proteínas derivadas da matriz do esmalte, deiscências ósseas.

ABSTRACT

The purpose of this study was to histometrically evaluate the use of enamel matrix protein (EMP) associated to guided bone regeneration (GBR), in the treatment of bone defects around implants. Six dogs were used in this study. The second, third, and fourth pre-molars (p2, p3, p4) and molar (m1) were extracted from both sides of the mandible. Following three months, four buccal defects were created and the implants installed. The defects were randomly assigned for each of the following groups: EMP, GBR, EMP + GBR and control. After two months, four additional defects were performed and implants installed. The same treatments were then applied. The animals were sacrificed after three months and the specimens were prepared for histometric evaluation. The mean bone-to-implant contact percentages were obtained for all the groups. The results after one month showed a mean of 15.03 ± 23.76 for the EMP group; 12.87 ± 9.35 for the GBR group; 8.52 ± 6.89 for the EMP + GBR group and 3.88 ± 5.70 for the control group ($p > 0,05$). The three-month evaluation showed a mean of 18.07 ± 13.52 ; 24.42 ± 19.88 ; 36.11 ± 17.53 ; 16.96 ± 17.77 , respectively ($p > 0,05$). The mean new bone area in the implant threads in the first month was as follows: 41.82 ± 22.03 ; $42.89 \pm 18,08$; 34.43 ± 15.75 ; 34.07 ± 22.08 , respectively ($p > 0,05$). At three months, the mean values were: 55.55 ± 11.81 ; 53.89 ± 16.35 ; 62.15 ± 18.47 ; 36.95 ± 25.10 , respectively. The differences between the control group and EMP + GBR group were statistically significant ($p < 0,05$). Within the limits of the present study, the association of EMP and GBR provided a greater implant thread bone fill when compared to the control group at the three-month evaluation.

KEY WORDS: dental implants, guided bone regeneration, enamel matrix proteins, bone defects.

INTRODUÇÃO

A procura por um substituto ideal para dentes naturais perdidos devido à cárie, doença periodontal e traumas, vêm sendo uma das maiores preocupações da odontologia. Diversos tipos e formas de implantes têm sido avaliados na tentativa de devolver ao indivíduo desdentado total ou parcial as funções mastigatória e estética.

Próteses retidas por implantes dentais osseointegrados estão relacionadas com altas taxas de sucesso e previsibilidade (**ADELL *et al.*, 1981; ZARB & SCHMITT, 1990**). A presença de contato direto entre o tecido ósseo e o implante dental sob carga mastigatória, em microscopia de luz – osseointegração – é um dos fatores relacionados com este sucesso (**BRANEMARK *et al.*, 1985**).

A qualidade e a quantidade de tecido ósseo presente na região receptora do implante são consideradas de grande importância para o sucesso desta técnica (**LEKHOLM & ZARB, 1985**). Volume ósseo insatisfatório resulta em complicações indesejáveis como exposição da superfície do implante, ou ainda, inviabilizam a utilização de implantes dentais (**JOVANOVIC, 1994**). Mesmo na presença de uma espessura óssea satisfatória, a necessidade de se trabalhar em uma situação ótima com relação ao posicionamento do implante, na busca da estética e da função ideal, pode levar a formação de deiscências ou fenestrações (**JOVANOVIC *et al.*, 1992**).

Com isso, o sucesso ou o insucesso da técnica está intimamente relacionado com a resolução de defeitos ósseos (**ZABLOTSKY *et al.*, 1991**). A presença destes defeitos está associada com exposição da superfície do implante e redução do contato osso/implante, podendo ocorrer o comprometimento do implante ou infecções peri-

implantares (**NEWMAN et al., 1988**). Tradicionalmente, estes defeitos são tratados pela técnica de regeneração óssea guiada (ROG), associada ou não a enxertos ósseos.

A ROG consiste na utilização de barreiras físicas que isolam a superfície do implante da influência não osteogênica das células do tecido conjuntivo gengival (**DAHLIN et al., 1989; ZABLOTSKY et al., 1991; JOVANOVIC et al., 1992**).

Buscando a regeneração periodontal verdadeira – novo ligamento periodontal, novo cimento (acelular de fibras extrínsecas) e novo osso – foi proposta a utilização de proteínas relacionadas ao esmalte, derivadas da bainha epitelial de Hertwig, uma vez que estas proteínas estariam envolvidas na formação de cimento acelular durante a formação do órgão dental (**SLAVKIN & BOYDE ,1975 e SLAVKIN, 1976**).

Estudos *in vitro* demonstraram que a adição de proteínas derivadas da matriz do esmalte (PME), em cultura de células, não resultou numa ação proliferativa sobre células epiteliais. No entanto, resultou em proliferação de células do ligamento periodontal, assim como no aumento da produção de proteínas e colágeno, além de estimular a formação de pontos de mineralização (**GESTRELIUS et al., 1997**).

Estudos clínicos controlados demonstraram a efetividade das PME em induzir neoformação óssea. **HEIJL et al. (1997)** avaliou a utilização destas proteínas em defeitos periodontais intra-ósseos. Análises radiográficas demonstraram que o ganho ósseo nos dentes testes tratados com matriz derivada de esmalte foi clinicamente relevante, enquanto, no grupo controle, os níveis ósseos se mostraram inalterados. Sessenta e seis por cento de preenchimento médio do defeito foi observado no grupo

teste aos 36 meses de pós-operatório, fato este observado em 93% dos defeitos tratados neste grupo.

Estudos em cultura de células demonstraram que as PME possuem atividade sobre células ósseas. **SCHWARTS et al. (2000)** observaram que as PME induziram a proliferação de osteoblastos humanos maduros e pré osteoblastos. **HOANG et al. (2000)** também encontraram um aumento na proliferação de células ósseas derivadas de osteossarcoma (MG-63), após uso das PME.

Diante das evidências clínicas (**RASPERINI et al., 1999**), radiográficas (**HEIJL et al., 1997**), histológicas (**HEIJL, 1997; ARAÚJO & LINDHE, 1998; MELLONIG, 1999; SCULEAN et al., 2000; BOYAN et al., 2000**) e celulares (**SCHWARTS et al., 2000; HOANG et al., 2000**) da ação das PME sobre a neoformação óssea e, devido à ausência de estudos avaliando a utilização destas proteínas em implantes dentais, a proposta deste estudo foi avaliar o possível efeito regenerativo das PME, associadas ou não a técnica de ROG no tratamento de defeitos ósseos peri-implantares.

REVISÃO DA LITERATURA

I – IMPLANTES DENTAIS OSSEOINTEGRADOS

Estudos longitudinais demonstraram que os implantes osseointegrados estão relacionados com altas taxas de sucesso clínico. **ADELL *et al.* (1981)** observaram 81% de sucesso na maxila e 91% na mandíbula após um acompanhamento de 15 anos, **ZARB & SCHMITT (1990)** observaram 89% de sucesso após um período de quatro a nove anos e **LINDQUIST *et al.* (1996)** um sucesso de 98,9 % após um período de 10 a 15 anos.

Estas altas taxas de sucesso são decorrentes do tipo de interface obtida entre o implante e o leito ósseo – osseointegração. A osseointegração representa uma conexão direta entre o osso vital e o implante dental sob carga mastigatória, sem a interposição de camadas de tecido mole, em microscopia óptica. Entretanto o contato direto entre implante e osso não ocorre em 100% da extensão do implante (**BRANEMARK *et al.*, 1985**).

Esta porcentagem de contato osso/implante pode ser influenciada por diversos fatores como textura da superfície do implante, tipo de material e formato do implante, qualidade óssea, técnica cirúrgica e o tempo de cicatrização (**COCHRAN, 1996**)

JOHANSSON & ALBREKTSSON (1987) demonstraram, num estudo histológico em coelhos, que existe uma correlação positiva entre a quantidade de torque necessária para a remoção do implante e a quantidade de osso em contato direto com o implante e, que estes dois parâmetros sofrem influência do tempo. Foram realizadas avaliações com três semanas, um, três, seis e doze meses após a colocação dos

implantes. No período de três semanas não foi encontrado contato direto entre osso e implante e o torque médio para a remoção dos implantes foi 10,8 Ncm. No período de um mês a porcentagem de contato osso/implante foi 20% e o torque médio 16,8Ncm. Nos períodos restantes a correlação positiva manteve-se (três meses – contato osso/implante 50 %, torque 68 Ncm; 6 meses - contato osso/implante 65 %, torque 77,6 Ncm;um ano - contato osso/implante 85 %, torque 88 Ncm).

A presença de defeitos ósseos periimplantares está associada à redução do contato osso/implante e a exposição da superfície do implante, favorecendo o surgimento de doenças periimplantares, problemas estéticos, podendo levar ao comprometimento do implante (**NEWMAN et al., 1988**).

II – TRATAMENTO DOS DEFEITOS ÓSSEOS PERIIMPLANTARES

O principal obstáculo para se obter a formação de novo osso e uma cicatrização óssea de qualidade é a rapidez com que o tecido conjuntivo se forma e se prolifera. Esta proliferação rápida do tecido conjuntivo pode prejudicar ou até mesmo impedir a osteogênese na região de um defeito ósseo (**LINDE et al, 1993**).

Na tentativa de solucionar este problema uma variedade de produtos e técnicas foram propostos baseados em quatro métodos que buscam auxiliar a nova formação óssea e o aumento do volume ósseo: **osteoidução** através do uso de fatores de crescimento; **osteocondução** pelo qual enxertos ósseos são utilizados como arcabouço para o crescimento ósseo; **distração osteogênica** através de fraturas cirurgicamente induzidas na qual dois fragmentos ósseos são separados; e

osteopromoção através da criação e manutenção do espaço necessário para neoformação óssea, com a utilização de membranas (**HÄMMERLE & KARRING, 1998; NASR, 1999**).

Vale lembrar que da mesma maneira que na doença periodontal, as terapias ósseas regenerativas – enxertos ósseos e/ou regeneração óssea guiada – não representam, *per se*, o tratamento de escolha de doenças infecciosas periimplantares. Este tipo de terapia pode ser utilizada com sucesso no tratamento dos defeitos ósseos resultantes da colocação dos implantes ou das seqüelas decorrentes da doença infecciosa periimplantar, posteriormente ao tratamento antiinfeccioso (**HÄMMERLE & KARRING, 1998**).

III – O PRINCÍPIO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

O princípio biológico da regeneração tecidual guiada foi inicialmente proposto visando a regeneração periodontal – novo cimento, novo osso, novo ligamento periodontal. Este princípio baseia-se na capacidade dos diferentes tecidos periodontais em promover a regeneração, e foi estabelecido ao longo de uma série de estudos que visaram avaliar a participação destes tecidos no processo de cura (**KARRING et al, 1980, NYMAN et al, 1980, KARRING et al, 1985**). Sua base racional surgiu dos postulados de **MELCHER (1976)**, o qual estabeleceu que as células capazes de neoformar as estruturas de sustentação dental eram as células do ligamento periodontal.

Baseado nestes estudos, foi introduzida a utilização de barreiras físicas para evitar que os tecidos periodontais incapazes de induzir a regeneração dos tecidos (epitélio e conjuntivo gengival), entrem em contato com a superfície radicular durante o processo de cura, dirigindo a proliferação das células do ligamento através desta superfície. Inicialmente, barreiras não reabsorvíveis foram utilizadas, constituídas principalmente de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e).

Posteriormente, observou-se que o princípio da regeneração tecidual guiada poderia ser utilizado em outras situações, incluindo a regeneração de tecido ósseo em defeitos de deiscência e fenestrações, defeitos localizados de rebordo alveolar e defeitos associados aos implantes imediatos (**DAHLIN *et al.*, 1989; MELLONIG & NEVINS, 1995; BUSER *et al.*, 1999**). Visando a regeneração deste tipo de tecido, uma barreira física é utilizada prevenindo o crescimento de células não osteogênicas, derivadas do tecido conjuntivo da mucosa alveolar, permitindo o crescimento de células angiogênicas e osteogênicas derivadas do espaço medular, as quais repovoam a região possibilitando a regeneração do defeito ósseo (**DAHLIN *et al.*, 1989; BECKER *et al.* 1990; NYMAN, 1991**).

Algumas complicações podem estar presentes quando da utilização desta técnica – deiscências de tecido mole com exposição prematura da membrana e possível contaminação, deslocamento da membrana durante o período de cicatrização e o seu colapso – com um efeito negativo na resposta ao tratamento (**BUSER *et al.*, 1999**).

III. A. – Membranas Não Reabsorvíveis Associadas aos Implantes Dentais

III. A. 1. – Estudos histológicos em animais

Inicialmente, membranas não-reabsorvíveis de politetrafluoretileno (PTFE-e) foram utilizadas para testar seu potencial em possibilitar a regeneração óssea ao redor de implantes de titânio.

DAHLIN *et al.* (1989) utilizaram implantes endósseos bilaterais em tíbias de coelhos para avaliar a regeneração óssea após a utilização de membranas de PTFE-e, comparando a um grupo controle sem membranas. Em todos os implantes onde foi utilizada a membrana houve formação óssea no espaço preexistente entre a membrana e o implante, o que não ocorreu nos implantes onde não foi utilizada a membrana.

BECKER *et al.* (1990) em estudo piloto, avaliaram a formação óssea em locais de deiscência associada a implantes dentais tratados com regeneração guiada em cães. Após doze semanas, foram elevados retalhos mucoperiosteais e cada cão recebeu quatro implantes, dois de cada lado da mandíbula. Em seguida, defeitos de deiscência foram criados na face vestibular de cada implante. Um implante de cada lado foi recoberto pela barreira de PTFE-e. Os resultados demonstraram que o princípio de regeneração tecidual guiada poderia ser aplicado aos implantes dentais, sendo que a formação óssea era variada, mas clinicamente significativa.

ZABLOTSKY *et al.* (1991) avaliaram a neoformação óssea obtida após a utilização de membranas de PTFE-e, em defeitos ósseos do tipo deiscência, criados cirurgicamente em cães. Os autores observaram um preenchimento ósseo médio no grupo teste de 95,17% nos defeitos associados a implantes revestidos de hidroxiapatita

e 82,8% nos implantes de titânio com superfície jateada; no grupo controle o preenchimento médio encontrado foi de 55% e 39%, respectivamente.

Em defeitos ósseos extensos, nos quais a estabilização primária do implante fica impossibilitada, a utilização da técnica da regeneração óssea guiada, previamente a colocação dos implantes, é considerada a técnica de escolha (**HÄMMERLE & KARRING, 1998**).

O osso regenerado obtido com a utilização desta técnica, responde da mesma maneira que o osso não regenerado à colocação de implantes endósseos, mesmo após a instalação de próteses sobre estes implantes, ou seja, na presença de carga mastigatória. Como demonstrado por **BUSER et al. (1995)** ao avaliar histológica e radiograficamente quinze implantes instalados em tecido ósseo regenerado, após tratamento de defeitos ósseos criados cirurgicamente em cães, previamente a colocação dos implantes e tratados com membranas de PTFE-e.

A barreira física – membrana – utilizada na técnica da regeneração óssea guiada deverá proteger de traumas mecânicos e micro-movimentações o coágulo formado no espaço entre esta barreira e o implante/tecido ósseo. A criação e manutenção deste espaço necessário para a nova formação óssea é um dos fatores mais relevantes na utilização de membranas (**MELLONIG & NEVINS, 1995**).

JOVANOVIC et al. (1995) compararam a formação óssea obtida com a utilização de membranas de PTFE-e com e sem reforço de titânio, a um grupo controle sem membrana. As dimensões médias dos defeitos tratados foram: deiscências ósseas vestibulares - $5.1 \pm 1.03\text{mm}$ e defeitos supracorticais - $2.69 \pm 0.45\text{mm}$. Após seis meses

do tratamento os animais foram sacrificados. Nos defeitos supracorticais foi observado um ganho ósseo vertical médio de 1.82 ± 1.04 mm (membrana com reforço de titânio), 1.90 ± 0.30 mm (membrana sem reforço de titânio) e 0.53 ± 1.34 mm (grupo controle). Nas deiscências vestibulares o ganho ósseo encontrado foi de 3.33 ± 1.44 mm (membrana com reforço de titânio) 2.46 ± 0.51 mm (membrana sem reforço de titânio), e 2.76 ± 0.84 mm (grupo controle). Isto demonstra que as membranas de PTFE-e com reforço de titânio são capazes de criar e manter o espaço necessário para a regeneração óssea neste tipo de defeito, possibilitando um ganho ósseo maior que ao obtido nos grupos com membrana sem reforço de titânio e no grupo sem membrana.

Uma outra abordagem para o problema da criação e manutenção de espaço, seria a utilização de materiais de preenchimento, como enxertos ósseos autógenos, alógenos e substitutos ósseos, associados às membranas.

HÄMMERLE *et al.* (1998) avaliaram histologicamente o efeito do osso bovino mineralizado sem proteínas (Bio-Oss[®] - Geistlich AG Wolhusen, Suíça), associado ou não a membranas de PTFE-e, no tratamento de deiscências criadas cirurgicamente em macacos. Nos grupos tratados com membrana – membranas de PTFE-e + Bio-Oss e apenas membrana – foi observada superioridade em termos de ganho ósseo em altura e em contato com o implante (PTFE-e + Bio-Oss – 100% de ganho ósseo em altura e 55% de osso em direto contato com o implante; PTFE-e – 91% de ganho ósseo em altura e 64% de osso em direto contato com o implante) quando comparado aos grupos tratados com Bio-Oss apenas e o grupo controle (52% de ganho ósseo em altura e 35% de osso em direto contato com o implante; 42% de ganho ósseo em altura e 20% de osso em direto contato com o implante, respectivamente).

III. A. 2. – Estudos Clínicos e Histológicos em humanos

DAHLIN et al. (1995) avaliaram a eficácia da técnica de regeneração óssea guiada com membranas num estudo clínico multicêntrico. Foram tratadas 40 deiscências e 15 fenestrações observadas no momento da colocação dos implantes. Membranas de PTFE-e sem reforço de titânio foram utilizadas sem associá-las a enxertos ósseos ou qualquer dispositivo para criação de espaço. Após dois anos de acompanhamento foi observada uma redução média na altura da deiscência de 82%. Resultados semelhantes aos encontrados por **DAHLIN et al. (1991)** que observaram um preenchimento médio de 74,5% e por **JOVANOVIC et al. (1992)** que, ao tratarem 19 deiscências com membranas de PTFE-e notaram, no momento da reentrada, uma percentagem média de preenchimento ósseo de 89,6%.

Estes estudos sugerem que a utilização de membranas de PTFE-e é uma método viável para se obter preenchimento ósseo, observado clinicamente, em defeitos associados a implantes dentais.

Entretanto, ao analisar clínica e histologicamente o preenchimento ósseo obtido com a técnica de regeneração óssea guiada com membranas de PTFE-e, comparando-o ao preenchimento ósseo obtido num grupo controle sem membrana, **PALMER et al. (1994)** notaram que a impressão clínica de preenchimento ósseo não condiz com a presença histológica de novo osso. Neste estudo foram tratados seis pacientes portadores de duas deiscências ósseas com tamanho padronizado. As deiscências foram aleatoriamente designadas a dois grupos: grupo teste - tratadas com

membranas de PTFE-e e grupo controle – sem membrana. Após cinco meses de acompanhamento, os implantes foram removidos juntamente com o tecido ósseo. Clinicamente, o preenchimento ósseo médio obtido no grupo teste foi 80,83% e no grupo controle foi de 20,83%. Histologicamente, a área óssea que ocupava as roscas do implante no grupo teste foi 20,6% e no grupo controle 14,7%, enquanto a deiscência residual média foi 2,1mm no grupo teste e 3,3mm no grupo controle, diferenças não significantes estatisticamente.

Em 1995, **MELLONIG & NEVINS** revisaram criticamente numa “*task force*” a técnica de regeneração óssea guiada. Segundo esta revisão, os defeitos ósseos de deiscência e fenestração são os mais comuns associados aos implantes dentais, podendo ser divididos em defeitos com características que favorecem a manutenção de espaço (“*spacemaking*”) e que não favorecem (“*non-spacemaking*”). Ambos podem ser tratados com sucesso pela técnica de regeneração óssea guiada. Defeitos que não favorecem a manutenção de espaço necessitam do uso de materiais de preenchimento (enxerto autógeno e alógenos) para evitar que a membrana colabe. Defeitos que favorecem a manutenção de espaço podem ser tratados com membranas isoladamente, sendo a técnica de escolha.

A exposição prematura da membrana prejudica os resultados obtidos com a técnica de regeneração óssea guiada (**MELLONIG & NEVINS, 1995**). **SIMION et al. (1994)** compararam os aspectos clínicos e microbiológicos do processo de cicatrização de defeitos ósseos associados a colocação de implantes mediatos e imediatos, tratados com membranas de PTFE-e. Foram avaliados dez implantes divididos em dois

grupos de cinco implantes cada. No primeiro grupo (grupo A) os implantes foram colocados 30 a 40 dias após a extração dental, após completa cicatrização dos tecidos moles, possibilitando o total recobrimento da membrana, que era removida com três a seis meses de pós-operatório. No grupo B, a instalação dos implantes foi realizada logo após a extração dental, com conseqüente exposição da membrana, que foi removida 30 a 45 dias após sua colocação. A média de regeneração observada nos grupos A (sem exposição) e B (com exposição) foi 96,6% e 41,6%, respectivamente. No grupo B (com exposição), foi observado um grande número de bactérias na camada interna das membranas, demonstrando que na presença de exposição bactérias podem atravessar a estrutura destas.

A exposição de membranas na técnica de regeneração óssea guiada pode estar relacionada com a presença de periodontopatógenos, como observado por **NOWZARI & SLOTS (1995)** ao tratar nove deiscências e oito defeitos ósseos associados à colocação de implantes dentais imediatos, com membranas de PTFE-e. Nove membranas permaneceram totalmente recobertas por 36 semanas. A média de defeito ósseo residual encontrada nos implantes, que não tiveram exposição de membranas foi de 0,5mm, inferior a média de 3,2mm encontrada nos sete implantes que tiveram exposição da membrana, diferenças estatisticamente significantes. As nove membranas que não foram expostas ao meio bucal estavam livres de microorganismos cultiváveis, enquanto, na maioria das membranas expostas, foi encontrada grande quantidade de microorganismos. Análises microbiológicas realizadas previamente ao tratamento, demonstraram que os pacientes que tiveram membranas expostas eram portadores de *P. gingivalis*, *A. actinomycetencomitans*, *P.*

intermédia e *B. forsythus* e que os pacientes que não tiveram membranas expostas não eram portadores destes microorganismos. Isto demonstra que a infecção microbiana pode estar relacionada tanto com as causas da exposição prematura das membranas como também ser consequência desta. Além disso, implantes que tiveram exposição prematura e contaminação da membrana, principalmente por *P. gingivalis* e outros periodontopatógenos, apresentaram uma proporção maior de insucesso.

III. B. – Membranas Reabsorvíveis Associadas aos Implantes Dentais

A grande desvantagem dos materiais não reabsorvíveis é a necessidade do segundo ato cirúrgico para sua remoção. Do ponto de vista da morbidade do paciente, do risco de dano tecidual e da relação custo/benefício/tempo, a substituição da utilização de materiais não reabsorvíveis por reabsorvíveis seria desejável. Atualmente, as membranas de colágeno e de copolímeros de ácido láctico e ácido glicólico são as mais utilizadas e estudadas (HÄMMERLE & KARRING, 1998).

Algumas características das membranas reabsorvíveis devem ser consideradas, como a biocompatibilidade, longevidade da função como barreira - tempo de reabsorção - e capacidade de manter o espaço para a regeneração, aspectos fundamentais para a regeneração óssea.

GOTFREDSSEN et al. (1994) avaliaram a utilização de uma membrana de polihidroxibutirato-hidroxicaprolato reforçada com poliglactina 910 em implantes imediatos, num estudo histológico em cães. Os implantes foram divididos em dois grupos, grupo teste com membrana e grupo controle sem membrana. Deiscências de

tecido mole foram observadas em metade dos implantes do grupo teste. No grupo teste foi observada reação inflamatória extensa com presença de lise óssea marginal. Diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre os grupos, favorecendo o grupo controle em relação ao preenchimento ósseo do defeito.

SCHLIEPHAKE & KRACHT (1997) observaram tempo de reabsorção muito curto de uma membrana de copolímero polilático, utilizada em implantes imediatos, colocados após indução de doença periodontal, em rebordos com altura óssea reduzida, num estudo histológico em cães. Deiscências de tecido mole foram observadas com frequência no grupo tratado com membranas. Após análises histológicas e morfométricas, realizadas após três e cinco meses da colocação dos implantes, a utilização da membrana não representou aumento significativo do contato osso/implante quando comparada com um grupo controle sem membrana. Além disso, o grupo com membrana apresentou menor altura óssea do que o grupo controle no quinto mês pós-operatório.

Diante do curto tempo de reabsorção e da incapacidade de manutenção de espaço da maioria das membranas reabsorvíveis foi proposto a associação destas com enxertos ou substitutos ósseos (**MELLONIG & NEVINS, 1995; BUSER *et al.*, 1999**).

LUNDGREN *et al.* (1994) utilizaram uma membrana de ácido polilático em quatro pacientes que apresentaram seis deiscências ósseas após sua colocação. Enxerto ósseo autógeno foi associado a membrana em quatro defeitos. Foi observado preenchimento completo do defeito em quatro implantes (dois com enxerto e dois sem enxerto). Os autores concluíram que o uso desta membrana, buscando a regeneração

óssea, é viável, entretanto a associação desta com enxertos ósseos deve ser considerada.

HOCKERS *et al.* (1999) compararam a utilização de membranas reabsorvíveis de colágeno (Bio-Gide[®]) associadas ou não a enxerto ósseo autógeno e um substituto ósseo não orgânico composto da porção óssea mineral bovina (Bio-oss[®]). Foram tratados defeitos ósseos periimplantares que favoreciam a criação e manutenção de espaço. Quatro grupos experimentais foram utilizados neste estudo: 1) Membrana de colágeno; 2) Membrana de colágeno associada ao osso autógeno; 3) Membrana de colágeno associada ao substituto ósseo; 4) Controle negativo. Após quatro meses de pós-operatório, os animais foram sacrificados e análises histométricas foram realizadas. O crescimento ósseo em sentido vertical mostrou um preenchimento ósseo do defeito inicial de 45,3% no grupo tratado com membrana; 68,5% no grupo tratado com membrana e enxerto autógeno; 77,6% no grupo com membrana e o substituto ósseo e 22% no controle. Em relação a porcentagem de contato osso/implante, foi observado 56,7% de contato no grupo tratado com membrana; 46,2% no grupo tratado com membrana e enxerto autógeno; 56,6% no grupo com membrana e o substituto ósseo e 60,4% no grupo controle. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, provavelmente devido ao pequeno número de animais utilizados no estudo (três cães).

III. C. – *Estudos Comparativos (REABSORVÍVEIS X NÃO REABSORVÍVEIS)*

Ao comparar a membrana de PTFE-e com uma membrana reabsorvível de colágeno, ambas associadas a um material de enxertia óssea, **ZITZMANN et al. (1997)** observaram um preenchimento ósseo médio de 92% com a membrana reabsorvível e com a membrana de PTFE-e de 78%, diferenças estatisticamente não significantes ($p>0,94$). Ainda, encontraram que no grupo tratado com membranas não reabsorvíveis foi observada exposição da membrana em 44% dos casos, sendo necessária a remoção precoce de parte dessas membranas.

Entretanto, **HÜRZELER et al. (1997)** observaram superioridade da membrana não reabsorvível de PTFE-e ao compará-la a uma membrana reabsorvível de poli (D,L-láctico) – co-trimetilcarbonato, no tratamento de defeitos circunferenciais que possibilitaram a exposição de 4-5mm da porção coronal do implante. A média de contato osso/implante observada com a membrana reabsorvível foi 32% e com a membrana de PTFE-e 58%.

Esta superioridade da membrana de PTFE-e, em relação ao contato osso/implante, também foi observada por **KOHAL et al. (1999)** que observou uma porcentagem média de contato de 37,5%, após o tratamento de deiscências ósseas com membranas reabsorvíveis (copolímero sintético glicólico e láctico). No grupo tratado com membranas de PTFE-e a porcentagem de contato foi 51,5% e no grupo controle (sem membrana) 46,3%.

Um fator que pode influenciar nestes resultados negativos associados às membranas reabsorvíveis é o processo de reabsorção destas. **SCHLIEPHAKE et al. (2000)** notaram um padrão de regeneração óssea semelhante entre membranas

reabsorvíveis de ácido poliláctico e membranas de PTFE-e após três meses de cicatrização. Porém, aos seis meses, a regeneração óssea obtida com as membranas reabsorvíveis não pode ser observada, provavelmente devido ao processo de degradação destas membranas.

MELLONIG et al. (1998) também não observou resultados positivos após utilizar uma membrana reabsorvível de um copolímero láctico e glicólico no tratamento de deiscências. Os autores compararam esta membrana à membrana de PTFE-e e a um grupo controle sem membrana. A média de contato ósseo encontrado no grupo tratado com membrana reabsorvível foi 24,6%, no grupo da membrana não reabsorvível 76,2% e no grupo controle 42,0%. A área de novo osso observada nos grupos tratados com membrana reabsorvível, não reabsorvível e controle foram, 1,1mm²; 4,8mm² e 0,8mm², respectivamente.

Ao associar um enxerto ósseo desmineralizado seco e congelado - DFDBA - às membranas utilizadas no estudo anterior, **MELLONIG et al. (1998)** observaram resultados mais significativos após o tratamento do mesmo tipo de defeito ósseo em relação ao contato osso/implante (membrana reabsorvível 17,8 %, membrana reabsorvível associada ao DFDBA 68,9%, membrana não reabsorvível associada ao DFDBA 83,3% e controle 5,5%) e à área do novo osso (membrana reabsorvível 0,2 mm², membrana reabsorvível associada ao DFDBA 12,3 mm², membrana não reabsorvível associada ao DFDBA 25,7 mm² e controle 6,0 mm²).

IV – PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DO ESMALTE (PME)

O uso de PME para obter regeneração periodontal foi descrito recentemente. Esta utilização está fundamentada no 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 do cimento acelular (**SLAVKIN & BOYDE, 1975; SLAVKIN, 1976; LINDSKOG, 1982^{a, b}; LINDSKOG & HAMMARSTROM, 1982; SLAVKIN *et al.*, 1989^{a, b} ; FONG *et al.*, 1996; HAMMARSTROM, 1997^{a, b}**).

A bainha epitelial de Hertwig consiste de uma extensão apical do órgão dental, e sua camada mais interna representa uma extensão da camada de ameloblastos da coroa (**HEIJL *et al.*, 1997**).

Estudos *in vitro* e com microscopia eletrônica de varredura (**LINDSKOG, 1982^{a, b}; LINDSKOG & HAMMARSTROM, 1982**), demonstraram que a camada interna da bainha epitelial de Hertwig tem um estágio secretor, que pode estar associado à produção de um material semelhante a matriz do esmalte, recobrando a superfície radicular, previamente à formação do cimento. Além disso, foi demonstrado que o cimento acelular contém proteínas imunologicamente relacionadas com as proteínas presentes na matriz do esmalte (**SLAVKIN *et al.*, 1989b**).

Em 1997, um grupo de pesquisadores suecos, baseados nas informações que esclareceram os eventos biológicos característicos do desenvolvimento radicular, demonstraram a indução de regeneração periodontal através da reprodução desses eventos em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Com o objetivo de avaliar se a aplicação das PME pode promover regeneração dos tecidos periodontais, **HAMMARSTROM et al. (1997)** realizaram um estudo histológico 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 à 37%, foram aplicadas preparações contendo as PME e só então, os retalhos foram reposicionados e suturados. Os dentes do quadrante contralateral eram usados como controle, sendo que após o condicionamento ácido era aplicado apenas uma solução veículo, sem o conteúdo proteico. A avaliação em microscopia óptica e comparações morfométricas revelaram que houve regeneração periodontal significativa com presença de cemento acelular firmemente aderido à dentina, ligamento periodontal e osso alveolar no grupo tratado com as proteínas derivadas da matriz do esmalte. Nesse mesmo estudo, também foram testadas diversas preparações contendo frações específicas das proteínas da matriz do esmalte. Com isso, observou-se que as propriedades relativas à regeneração periodontal estavam associadas a amelogenina, que é o constituinte principal das proteínas da matriz do esmalte.

O mecanismo que está por trás da iniciação do processo de regeneração ainda não está claro (**HAMMARSTROM et al., 1997; HEIJL, 1997; GESTRELIUS et al., 1997^b**). Os vários estudos realizados com PME na indução de regeneração periodontal, apenas dão indícios de como esse mecanismo pode ocorrer.

IV. A. CARACTERÍSTICAS E BIOCOMPATIBILIDADE DA MATRIZ DERIVADA DO ESMALTE

As PME, atualmente disponíveis comercialmente - EMDOGAIN[®], tem como componente principal a amelogenina, que é o constituinte hidrofóbico do agregado de proteínas da matriz do esmalte. Esta característica da amelogenina faz com que ocorra uma agregação proteica em áreas úmidas (**ZETTERSTROM et al., 1997**).

O produto é apresentado em duas vias, uma constituída pela solução veículo, o alginato de propilenoglicol e a outra pelas PME congeladas a seco. Quando misturadas, obtém-se um gel viscoso, que facilita a manipulação e que deve ser aplicado através de uma seringa, de acordo com as instruções do fabricante.

A viscosidade da formulação é dependente do pH e da temperatura. A 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 (**GESTRELIUS et al., 1997^a**).

Através de estudos com o derivado da matriz do esmalte radiomarcado, em ratos e porcos, **GESTRELIUS et al. (1997^a)** demonstraram que o complexo de proteínas insolúveis permaneceu em quantidades detectáveis no sítio de aplicação por duas semanas. Quando testada somente a aplicação do veículo de alginato de propilenoglicol, o mesmo deixou o sítio de aplicação dentro de 24 horas em raízes de primeiros molares superiores de ratos.

A segurança do tratamento com PME foi avaliada clínica e imunologicamente por **ZETTERSTROM et al. (1997)**. O material demonstrou boa tolerância e baixo

potencial imunogênico. Análises de amostras de sangue retiradas antes e após a utilização do derivado de matriz do esmalte não indicaram alterações nos níveis de anticorpos específicos, nem mesmo em pacientes propensos a reações alérgicas. Resultados semelhantes foram obtidos por **PETINAKI et al. (1998)**, os quais observaram uma pequena proliferação de linfócitos T CD4, *in-vitro*, não representando uma indução de resposta imune significativa.

Os autores sugerem que a exposição do organismo às PME durante os primeiros estágios do desenvolvimento dental pode induzir normalmente uma tolerância a essas proteínas que são reconhecidas pelo sistema imune como “proteínas próprias”. Também parece haver muita homogeneidade entre a proteína humana e a suína, encontrada no EMDOGAIN[®], o que pode explicar a ausência de reações adversas.

GESTRELIUS et al. (1997)^a verificaram, *in vitro*, a capacidade de adsorção das PME às superfícies minerais e proteicas, utilizando como modelos de superfícies minerais partículas de hidroxiapatita e óxido de alumínio revestido com fosfato e como modelo de superfície proteica o colágeno. Segundo os autores, o derivado da matriz do esmalte tem a capacidade de adsorver e de formar camadas múltiplas tanto sobre superfície mineral como em superfície proteica.

IV. B. Estudos em Cultura de Células

Avaliando a ação das proteínas derivadas do esmalte sobre o epitélio, **KOWASE et al. (2000)** observou, num estudo utilizando cultura de células epiteliais,

que estas proteínas agem como um agente citostático para as células epiteliais, inibindo significativamente o crescimento destas células.

Com o propósito de se obter esclarecimentos sobre a ação da matriz derivada do esmalte sobre células do ligamento periodontal, **GESTRELIUS et al. (1997)^b** realizaram um estudo, *in vitro*, com cultura de células do ligamento periodontal. Os autores constataram aumento na proliferação de células do ligamento periodontal, contudo, sem haver proliferação de células epiteliais; aumento na produção total de proteínas pelas células do ligamento periodontal e uma maior formação de nódulos minerais. Entretanto, não houve efeito significativo sobre a migração e adesão celular. Também foi investigado se as PME estariam ligadas ou continham fatores polipeptídicos, como fatores de crescimento ou moléculas de adesão. A análise através de imunoadesões não detectou nenhuma dessas moléculas.

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

IV. C. Estudos Clínicos e Histológicos

Diante da dificuldade em se avaliar, histologicamente, em humanos o tipo de reparação conseguida após técnicas regenerativas, devido aos aspectos éticos relacionados a biópsias em bloco, modelos animais são geralmente utilizados. Como

no estudo de **ARAÚJO & LINDHE (1998)**, que 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.

SCULEAN et al. (2000) avaliaram o uso da associação de membranas reabsorvíveis e proteínas derivadas do esmalte, em defeitos intra-ósseos, em macacos, comparando esta associação ao uso isolado de ambos materiais e um grupo controle. Não foram encontradas diferenças entre os grupos tratados, provavelmente, devido ao pequeno número de animais utilizados no estudo (três animais). 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.

Considerando que a principal desvantagem dos estudos experimentais em modelo animal é a interpretação relativa a previsibilidade em humanos, **HEIJL (1997)** realizou um estudo para avaliar histologicamente o efeito das PME na regeneração periodontal de um defeito de deiscência vestibular, criado experimentalmente em humano. A avaliação em microscopia óptica polarizada e transmitida revelou um

processo de cura caracterizado pela formação de cimento acelular associado com ligamento periodontal e osso alveolar.

MELLONIG (1999) publicou outro caso de histologia humana após terapia regenerativa com proteínas da matriz do esmalte. Neste estudo, o derivado da matriz do esmalte foi aplicado em um defeito periodontal intra-ósseo de três paredes na mesial de um canino inferior esquerdo, apresentando um componente intra-ósseo de 5,0mm. Clinicamente, foi observado uma redução de 5,0mm na profundidade de sondagem, um ganho de inserção clínica de 4,0mm e preenchimento ósseo radiográfico parcial, seis 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.

Comparações clínicas e histológicas em humanos, após tratamento regenerativo de defeitos intra-ósseos com membranas reabsorvíveis e proteínas derivadas da matriz do esmalte, foram realizadas por **SCULEAN et al. (1999)**. O estudo compreendeu quatorze defeitos intra-ósseos avançados em dentes com extração indicada. Com seis meses de pós-operatório, 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 cimento 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 cimento 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.

HEIJL et al. (1997) compararam o efeito em longo prazo do tratamento cirúrgico de defeitos intra-ósseos associado ao gel de PME e um gel placebo. O estudo foi multicentro, caracterizado por um modelo "split-mouth", envolvendo 33 pacientes que apresentavam 34 pares de dentes teste e controle. As avaliações clínicas e radiográficas foram feitas com 8, 16 e 36 meses. Para o nível ósseo radiográfico, o grupo teste apresentou em média um ganho de 0,9mm, enquanto o grupo controle apresentou em média uma perda de 0,1mm aos 8 meses. Com 16 meses de avaliação, o grupo teste apresentou um ganho médio de 2,2mm e o controle uma perda média de 0,2mm. Aos 36 meses o grupo teste continuou apresentando um ganho ósseo médio de 2,6mm, comparados com níveis ósseos inalterados no grupo controle. Diferenças estatisticamente significante foram encontradas entre os grupos, em relação ao ganho clínico de inserção e ganho ósseo radiográfico.

Em dois relatos de casos clínicos envolvendo o tratamento de defeitos intra-ósseos tratados com as proteínas derivadas da matriz do esmalte, **RASPERINI et al.**

(1999) verificaram resultados clínicos favoráveis através de procedimentos cirúrgicos de reentrada. No primeiro caso, após tratamento de um defeito ósseo de duas e três paredes, foi observado ganho clínico de inserção de 8mm, e preenchimento ósseo do defeito de 6mm, aos 12 meses de pós-operatório. No segundo caso, o ganho clínico de inserção observado foi de 5mm, aos 18 meses de pós-operatório. Da mesma maneira que no primeiro caso, foi encontrado no procedimento de reentrada tecido ósseo neoformado. Nos dois casos houve uma correlação entre o tecido duro neoformado e o aumento da radiopacidade óssea radiográfica.

IV- Estudos da Ação das PME Sobre o Tecido Ósseo

Estudos em cultura de células demonstraram que as PME não só são capazes de estimular a proliferação e migração das células oriundas do ligamento periodontal e do tecido conjuntivo gengival, como também de células ósseas (HOANG *et al.* 2000; SCHWARTS *et al.*, 2000).

HOANG *et al.* 2000 criaram feridas de três milímetros de extensão em placas para cultura de tecidos, compostas por células derivadas de ligamento periodontal humano, fibroblastos gengivais e células ósseas derivadas de osteossarcoma (MG-63). Estas células foram tratadas com PME, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB) e fator de crescimento do tipo insulina (IGF-I). Todas as culturas demonstraram um aumento na taxa de preenchimento da ferida quando tratadas com as PME, em comparação com grupos não tratados. As células do ligamento periodontal mostraram uma resposta mais rápida (um e três dias após a criação da ferida), ao

tratamento com PME, do que as células ósseas e fibroblastos gengivais, entretanto, após seis dias, não foram observadas diferenças entre as culturas após o uso das PME. O tratamento com as PME demonstrou resultados mais favoráveis do que o tratamento com PDGF-BB e com IGF-I.

SCHWARTS *et al.* (2000) avaliaram a ação das PME, em três estágios da maturação óssea (proliferação, diferenciação e síntese de matriz). Para a realização deste estudo, foram utilizadas cultura de osteoblastos em diferentes estágios de maturação: pré-osteoblastos (células 2T9, derivadas da calvária de ratos transgênicos), osteoblastos imaturos (células MG63, derivadas de osteossarcoma) e osteoblastos maduros (osteoblastos humanos normais). Os resultados demonstraram que o uso das PME induziu a proliferação dos pré osteoblastos, entretanto, não estimulou a atividade da fosfatase alcalina nestas células. Nos osteoblastos imaturos, (MG63) houve uma inibição dose-dependente no número de células, porém, foi observado aumento na atividade de fosfatase alcalina e na produção de osteocalcina, também foi encontrado um aumento dose-dependente nos níveis de fator de crescimento de transformação (TGF- β 1). Estas culturas não apresentaram aumento na produção de proteínas colágenas e não colágenas. Nos osteoblastos maduros, o uso das PME estimulou a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina. Devido a estas características, segundo os autores, as PME teriam uma característica osteocondutora.

Embora as PME não contenham fatores de crescimento, estas aumentam os níveis de fator de crescimento de transformação (TGF- β 1) em cultura de fibroblastos

oriundos do ligamento periodontal e do tecido conjuntivo gengival e em cultura de células ósseas. (SCHWARTS *et al.*, 2000; VAN DER PAUW *et al.*, 2000).

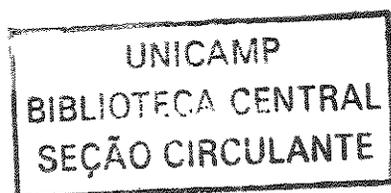
O TGF- β é um fator de crescimento multifuncional, geralmente responsável pela produção de matriz, sendo um dos fatores de crescimento predominante na matriz óssea. O TGF- β tem se demonstrado quimiotático para células ósseas, podendo estimular ou inibir sua proliferação dependendo do estado de diferenciação das células ósseas, condição da cultura e da concentração utilizada. Estudos, *in vivo*, demonstraram que se injetado próximo a tecido ósseo pode induzir formação óssea (COCHRAN & WOZNEY, 1999).

Buscando maiores esclarecimentos da ação das PME sobre a nova formação óssea, BOYAN *et al.* (2000) implantaram quantidades diferentes de PME (2 e 4 mg) isoladamente ou associadas a enxertos ósseos desmineralizados congelados e secos (DFDBA) ativos - com potencial osteoindutor comprovado previamente - e inativos - sem potencial osteoindutor - no tecido muscular de ratos. Foram avaliados 8 tipos de tratamento: 2mg e 4mg de PME isoladamente, 2mg e 4mg de PME + DFDBA ativo, 2mg e 4mg de PME + DFDBA inativo, DFDBA ativo isoladamente e DFDBA inativo isoladamente. Os implantes que continham DFDBA inativo, 2mg e 4mg de PME isoladamente, 2mg e 4mg de PME + DFDBA inativo não induziram a formação de novo osso. Os grupos tratados DFDBA ativo isoladamente, 2mg e 4mg de PME + DFDBA ativo demonstraram potencial para indução óssea, entretanto o tratamento com 4mg de PME + DFDBA ativo resultou num aumento da indução óssea de 1,4 vezes quando comparado aos outros grupos tratados com DFDBA ativo. Estes resultados

demonstraram que as PME não possuem características osteoindutoras, uma vez que usadas isoladamente não foram capazes de induzir formação óssea. Entretanto, quando usadas em conjunto com um material osteoindutor, as PME aumentaram a quantidade de nova formação óssea. Esta propriedade era dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração dessas proteínas maior era a indução óssea. Segundo os autores, pode haver um componente, diferente da amelogenina, presente nestas proteínas, responsável por esta característica osteocondutora.

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar, histometricamente, o tratamento de defeitos ósseos peri-implantares do tipo deiscência, criados cirurgicamente em cães, através da utilização de proteínas derivadas da matriz do esmalte e da técnica de regeneração óssea guiada com membranas reabsorvíveis.



MATERIAL E MÉTODOS

I- Seleção da Amostra

Foram selecionados para este estudo seis cães sem raça definida, adultos, fêmeas, com aproximadamente dois anos de idade, pesando em média 25 kg, com bom estado de saúde geral e dentição completa. Os cães foram submetidos a tratamento profilático incluindo vacinação, dieta e higiene, de acordo com as recomendações do Biotério da Unicamp.

II- Anestesia

Anteriormente aos procedimentos cirúrgicos, os cães foram sedados com cloridrato de dihidrotiazina, intra-muscular (Rompun[®]- Bayer do Brasil S.A., São Paulo, S.P., Brasil), na dose de 1,5 ml/ 10 kg. A anestesia geral foi induzida pela administração intravenosa de tiopental sódico (Tiopental[®]- Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda., Itapira, S.P., Brasil) na dose de 1,0 ml/kg e complementada com anestesia local (xilocaína 2% Merrel Lepetit Farmacêutica Ltda, Santo Amaro, S.P., Brasil.). A via intravenosa foi mantida com soro fisiológico durante o ato cirúrgico, possibilitando a hidratação do animal e a administração de doses de manutenção do anestésico.

III- Procedimento Cirúrgico de Extração dos Dentes

Três meses antes da instalação dos implantes e criação das deiscências foram realizadas extrações bilaterais do segundo, terceiro e quarto pré-molar e primeiro molar inferiores (figura 1). Para isso foram realizadas incisões intra-sulculares nas faces vestibular e lingual, estendendo-se da mesial do primeiro pré molar (P1) até mesial do segundo molar (M2) inferiores de ambos os lados.

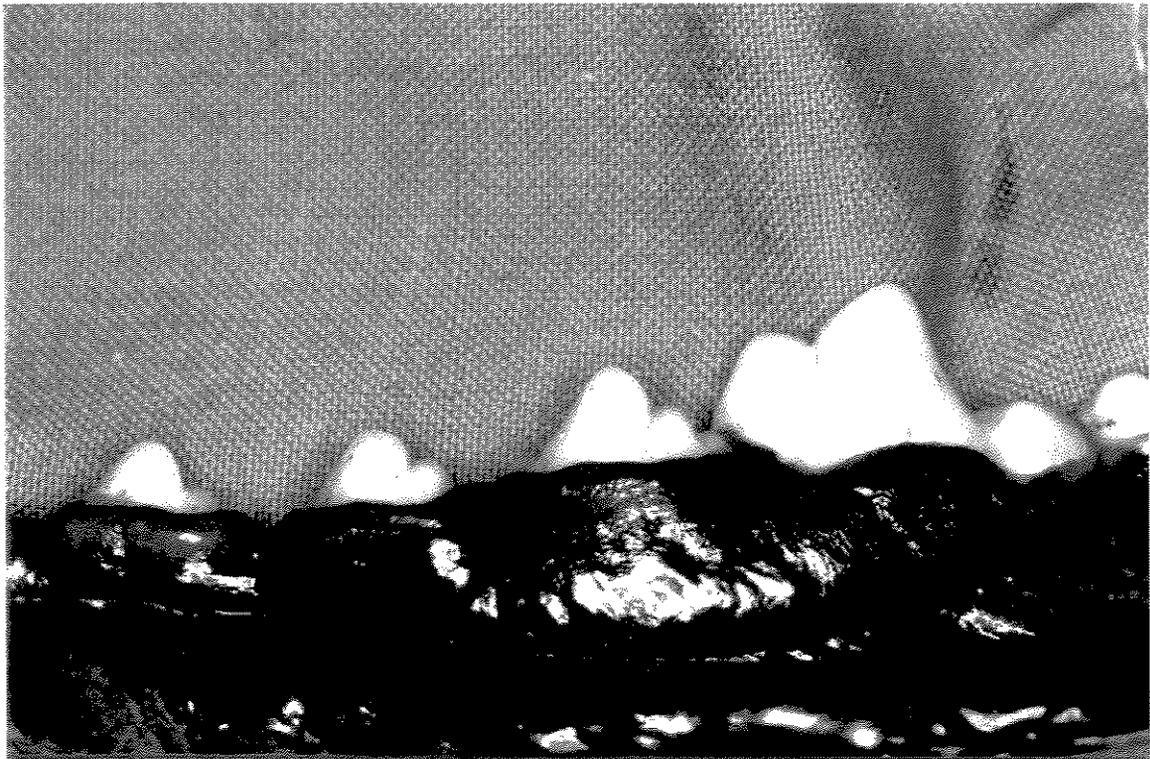


Figura 1 – Aspecto clínico inicial dos pré-molares (P2, P3, P4) e do primeiros molares inferiores, previamente o rebatimento do retalho.

Um retalho de espessura total foi elevado e os pré-molares (P2, P3 e P4) e molares inferiores (M1), de ambos os lados, foram seccionados através da bifurcação de suas raízes com auxílio de brocas (Carbide FG nº 701 - SS White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro - R.J., Brasil.) em alta rotação e irrigação contínua com soro fisiológico estéril a 0.9% (figura 2). As raízes mesial e distal foram removidas separadamente, os alvéolos curetados (figura 3) e os tecidos reposicionados e suturados (figura 4).

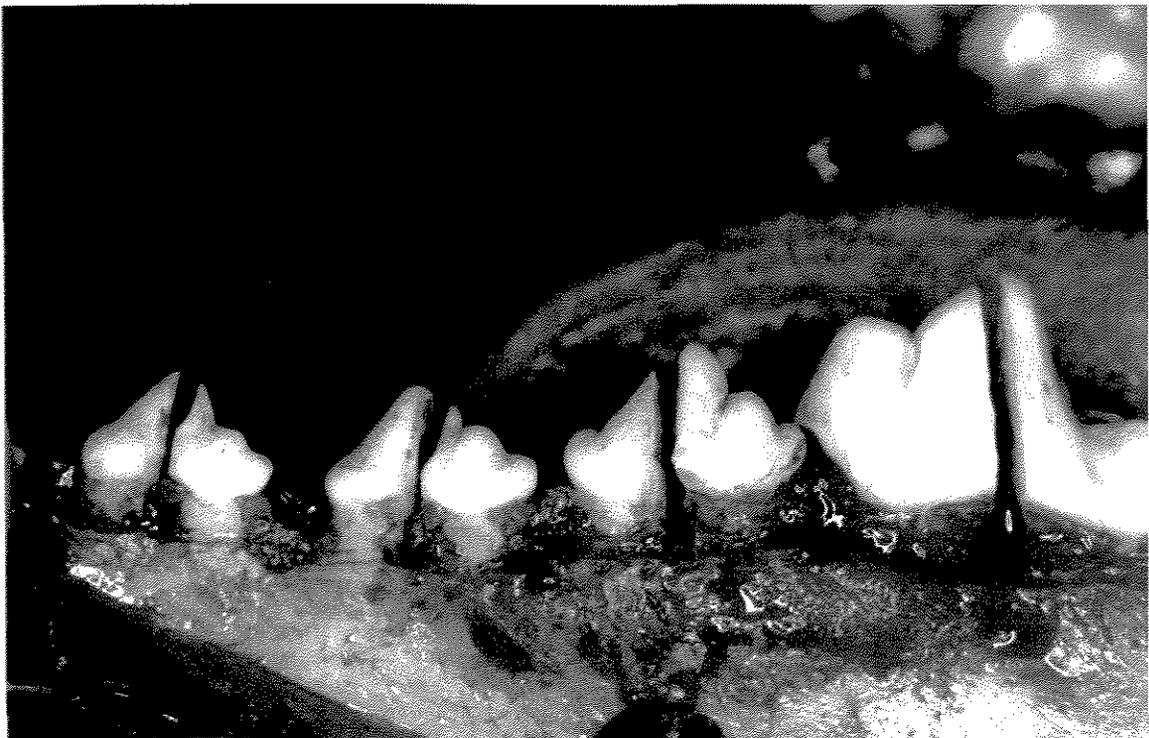


Figura 2 – Aspecto clínico dos dentes P2, P3, P4 e M1 após elevação do retalho de espessura total e seccionamento das coroas através da bifurcação.

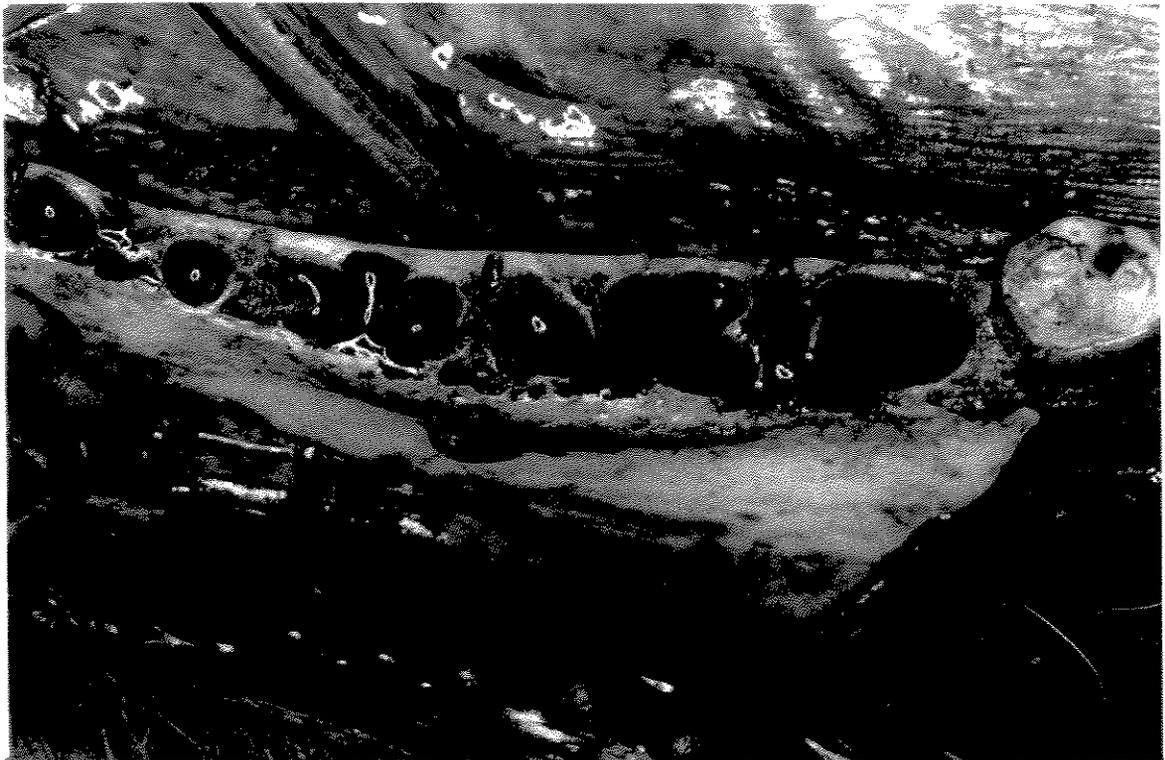


Figura 3 – Aspecto clínico do rebordo alveolar após extração dos dentes P2, P3, P4 e M1 e curetagem dos alvéolos.

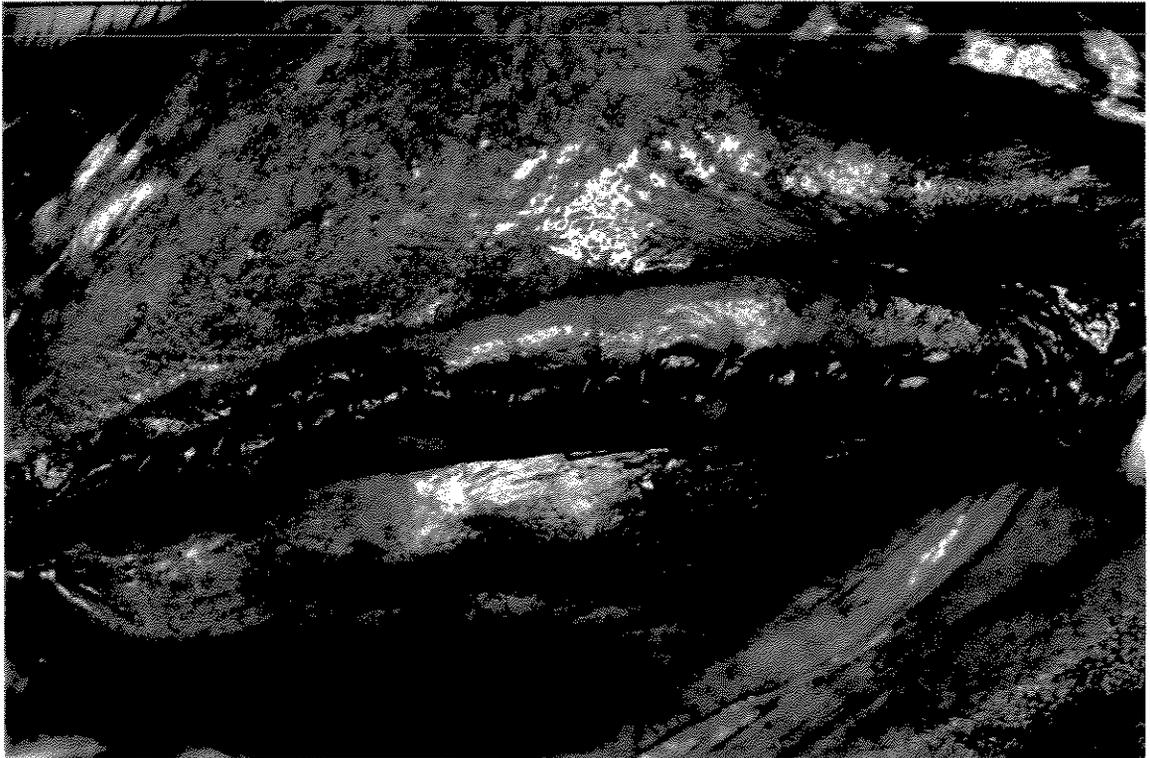


Figura 4 – Aspecto clínico após a extração dos dentes P2, P3, P4 e M1 e sutura dos retalhos.

IV- Procedimentos Cirúrgicos de Criação das Deiscências e Colocação dos Implantes

Três meses após a extração dos dentes (ZABLOTSKY, *et al.* 1991), foi realizada uma incisão sobre o rebordo ósseo que se estendeu da distal do P1 até a mesial do M2, retalho de espessura total foi elevado com a finalidade de expor o tecido ósseo subjacente (figura 5 e 6).

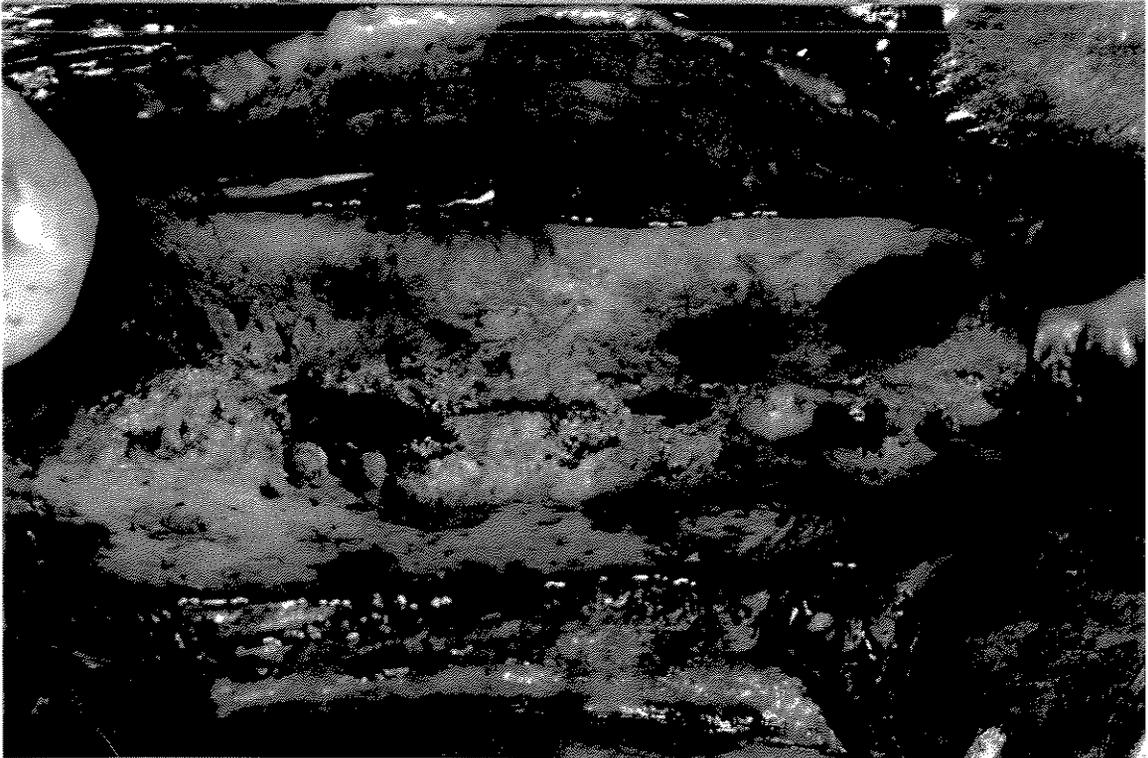


Figura 5 – Aspecto clínico do rebordo alveolar após rebatimento do retalho de espessura total.

Foram preparados dois leitos ósseos bilaterais para posterior colocação dos implantes de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente ao preparo dos leitos, foram produzidos quatro defeitos ósseos, tipo deiscência (figura 7), na vestibular dos leitos dos implantes, com dimensões de 3.5 mm de largura por 5.0 mm de profundidade, com o auxílio de brocas (Carbide FG nº 701 - SS White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro - R.J., Brasil.) e de microcinzeis. Uma vez criadas as deiscências ósseas vestibulares, quatro implantes de titânio comercialmente puro - comprimento: 8.5 mm / 3.75 mm de diâmetro (3i Implant Innovations, Palm Beach Gardens, EUA) foram colocados - dois para cada lado da mandíbula. Após a instalação dos implantes, os defeitos ósseos de deiscência foram tratados, os tecidos

reposicionados e suturados. Após sessenta dias, foi realizada uma nova incisão mesialmente aos implantes previamente colocados, sem que estes fossem expostos, e mais quatro implantes (dois para cada lado da mandíbula) foram colocados após o preparo do leito cirúrgico e criação de deiscências ósseas vestibulares, as quais tinham as mesmas dimensões que as previamente realizadas e foram tratadas da mesma maneira que na primeira intervenção. Foi administrado Pentabiótico® (Laboratório Wyeth- Whitehall Ltda, São Paulo - S.P., Brasil.) intra-muscular imediatamente após a colocação de todos os implantes.

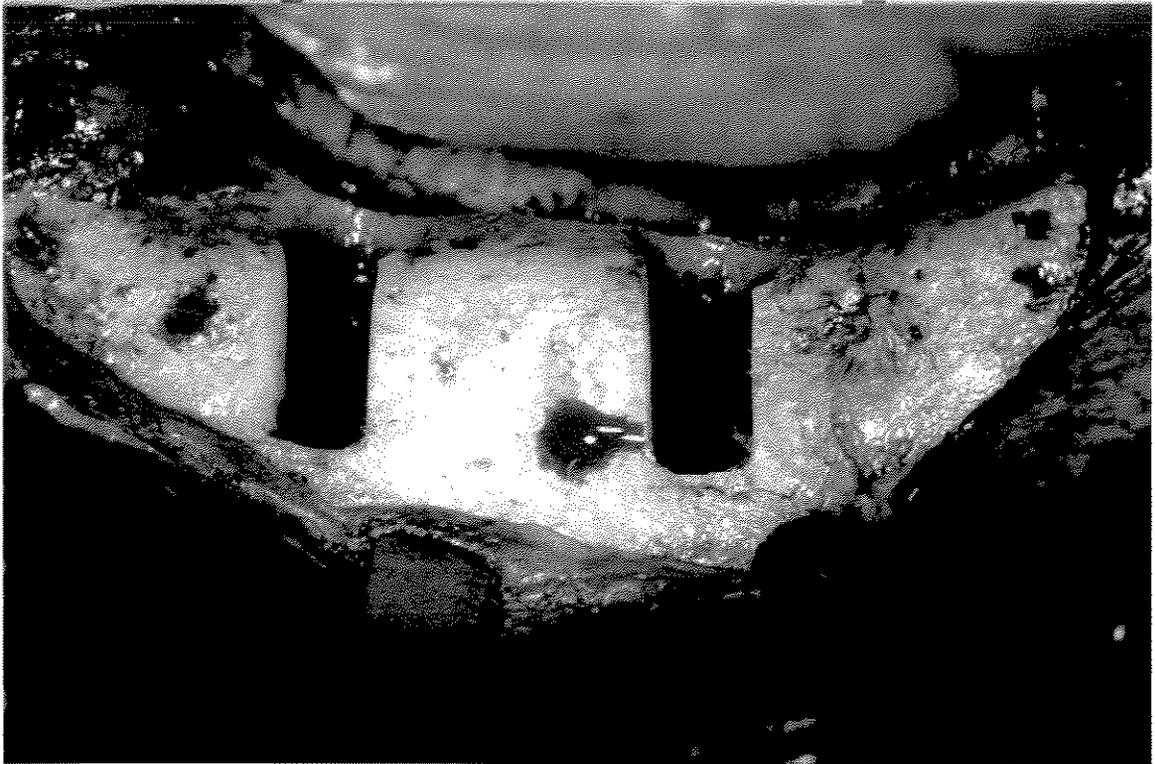


Figura 6 – Aspecto clínico do rebordo alveolar após rebatimento do retalho de espessura total e criação das deiscências ósseas vestibulares (5mm X 3,5mm).

V- Tratamento das Deiscências Ósseas

Posteriormente a inserção dos implantes, os defeitos ósseos de deiscência

foram aleatoriamente divididos. Foi realizado um sorteio inicial para separar os grupos, nos quais foram utilizadas proteínas derivadas da matriz do esmalte (PME). Com isso os grupos tratados com a matriz estavam em um mesmo hemi-arco. Em um novo sorteio, foi dividido o restante dos grupos por hemi-arco. Foram utilizados quatro grupos experimentais:

1- controle negativo (a deiscência não recebeu nenhum tratamento);

2- PME (Emdogain[®], Biora AB, Malmö, Suécia) (figura 8)

3- ROG com membrana reabsorvível de copolímero láctico e glicólico (Resolut XT[®], W. L. Gore & Associates, INC., Flagstaff, Arizona, EUA.)

4- PME + ROG com membrana reabsorvível de copolímero láctico e glicólico (figura 9)

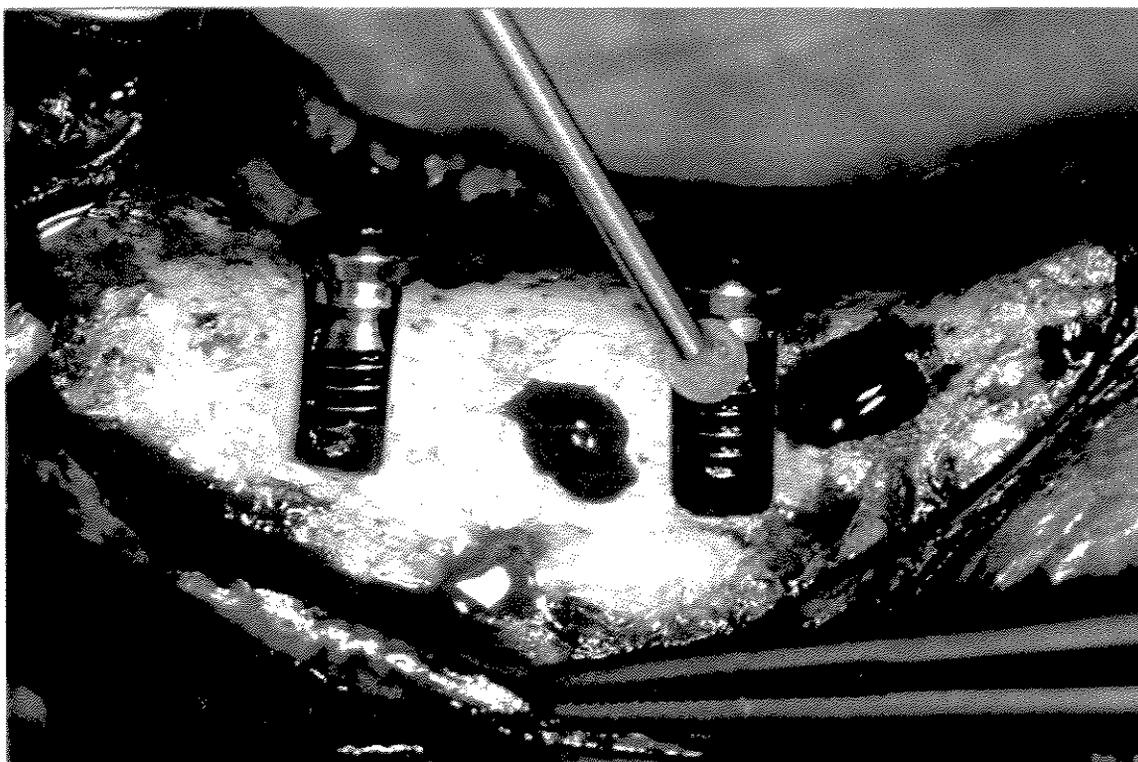


Figura 7 – Aspecto clínico do rebordo alveolar no momento da aplicação das PME, após criação das deiscências ósseas vestibulares e colocação dos

implantes.

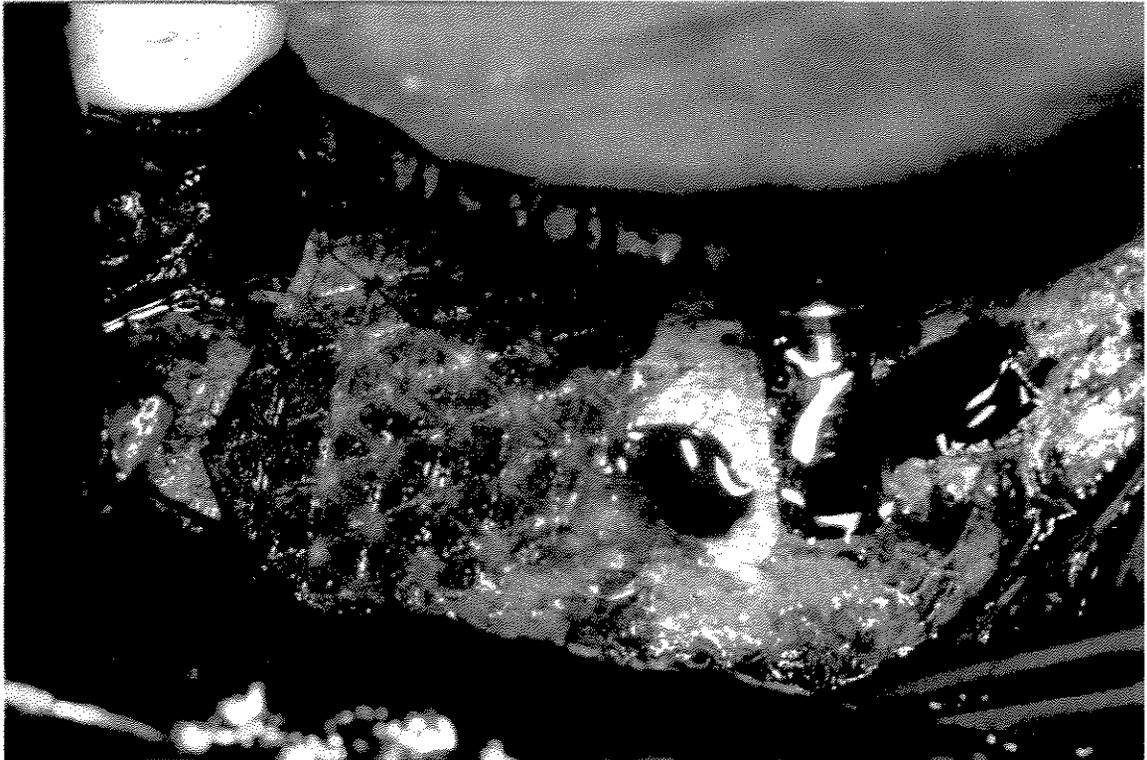


Figura 8 –Aspecto clínico do rebordo alveolar no momento da adaptação da membrana reabsorvível, após a aplicação das PME, criação das deiscências ósseas vestibulares e colocação dos implantes.

Nos implantes selecionados para receber a membrana reabsorvível, esta foi recortada e ajustada sobre o local do defeito ósseo, ultrapassando dois a três mm das margens do defeito. Os retalhos foram reposicionados e suturados com suturas interrompidas e contínuas de maneira a recobrir totalmente os implantes (figura 10).

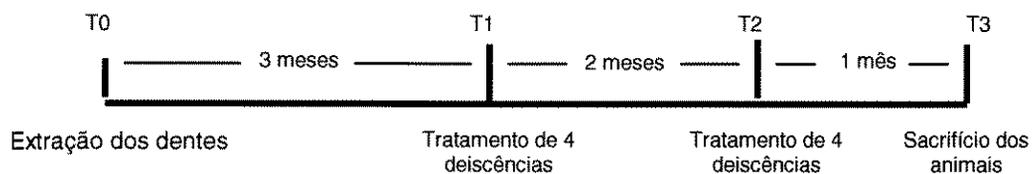


Figura 9 – Aspecto clínico do rebordo alveolar após sutura do retalho e tratamento das deiscências ósseas vestibulares.

VI - Processamento Histológico

Três meses após a colocação dos quatro primeiros implantes, os animais foram sacrificados com dose letal do anestésico, possibilitando uma avaliação dos resultados após um e três meses de reparo. (Ilustração 1)

Ilustração 1 – Delineamento do Estudo



As mandíbulas foram removidas e os tecidos circunvizinhos aos implantes foram seccionados em blocos e colocados em formol neutro tamponado à 4%. Após o processo de fixação e posterior lavagem com água, os espécimes foram desidratados em solução de álcool etílico sob constante agitação.

A infiltração plástica foi realizada com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC® - Kulzer, Wehrheim, Alemanha.) e álcool etílico, seguindo variações gradativas, finalizando com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro, sob agitação constante. Após a infiltração plástica, os espécimes foram incluídos em resina e polimerizados.

Os blocos foram removidos do molde e montados em lâminas acrílicas com o auxílio da resina Technovit 4000® (Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Através da utilização de um sistema de corte (Exakt - Cutting. System, Apparatebau Gmbh, Hamburgo, Alemanha.) (DONATH & BREUNER, 1982), foram realizados cortes preliminares e secções espessas (300 - 500 μm) foram obtidas. Estas secções foram submetidas a um sistema de microdesgaste (Exakt - Cutting. System, Apparatebau Gmbh, Hamburgo, Alemanha.), que resultou em secções de aproximadamente 70 a 85 μm de espessura, correspondentes ao centro do defeito ósseo criado. Posteriormente ao desgaste, as lâminas foram coradas com azul de toluidina à 1%.

VII - Avaliação Histométrica

Com o auxílio de um programa para análise de imagens (Image Pro, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) os seguintes parâmetros foram avaliados:

1) *Extensão da superfície óssea em contato direto com a superfície das roscas do*

implante relativas a região do defeito .

II) Área de tecido ósseo presente em cada rosca relativa a região do defeito (SENNERBY et al., 1992).

VIII - Análise Estatística

Foram obtidos o posto médio, as médias e o desvio padrão para cada parâmetro, em cada animal (unidade experimental), para cada período do estudo, o qual teve um desenho experimental em bloco ao acaso. Na análise estatística, foi utilizado inicialmente o teste de Friedman, que permitiu comparar os diferentes tratamentos realizados. Nos parâmetros em que o teste de Friedman detectou diferenças, foi aplicado o teste não paramétrico de comparações múltiplas.

RESULTADOS

I – OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

O processo de cura foi caracterizado por uma resposta tecidual favorável. Não houve exposição da membrana em nenhum animal, em nenhum momento do estudo. Não foram observados quadros de infecção aguda (abscessos ou supuração) nem inflamação em nenhum dos 48 implantes usados no estudo.

II – OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS

Todos os grupos tratados demonstraram o mesmo padrão de nova formação óssea nos respectivos períodos. Nenhum tratamento resultou em diferenças histológicas que justificassem a descrição deste separadamente, portanto, as descrições foram feitas de acordo com o período do estudo, uma vez que, diferenças entre os períodos tratados puderam ser observadas.

II. a. – Período de 1 mês de pós-operatório.

Todos os 24 implantes utilizados neste período do estudo estavam osseointegrados, uma vez que, contato direto do osso com o implante pode ser observado em microscopia óptica. Nos grupos tratados com membranas, estas puderam ser observadas em toda a sua extensão estando integradas ao tecido conjuntivo adjacente. Este tecido pode ser observado entre a membrana e o tecido ósseo neoformado e pré-existente, sem a presença de proliferação epitelial sobre as superfícies coronárias da membrana e dos implantes. Não foi observada reação

inflamatória próxima a nenhuma membrana utilizada neste período do estudo (figuras 10 e 11).

O processamento histológico utilizado permitiu distinguir, principalmente neste período, o tecido ósseo pré-existente do tecido ósseo neoformado, uma vez que o novo tecido ósseo foi corado com um tom azul mais escuro (figura 10 a 13). Tecido conjuntivo foi encontrado entre o implante e o osso neoformado, o qual apresentou grande quantidade de espaços medulares e células ósseas caracterizando um tecido ósseo imaturo (figura 10 a 13).

II. b. – Período de 3 meses de pós-operatório.

Da mesma maneira que no outro período do estudo, todos os implantes utilizados neste período estavam osseointegrados. As membranas apresentaram-se em fase adiantada de degradação, entretanto, esta degradação não foi acompanhada por uma reação inflamatória. Novo osso também foi observado em todos os grupos do estudo (PME, PME + ROG, ROG e controle), apresentando uma maior quantidade em relação ao primeiro período. Também foi possível distinguir o novo osso do osso pré-existente pela diferença de coloração, entretanto, a coloração azulada observada com 3 meses de pós-operatório, não foi tão intensa quanto com 1 mês de pós-operatório. Neste período, o tecido neoformado imaturo estava em fase de remodelação, porém, com menor quantidade de espaços medulares e de células do que com 1 mês de pós-operatório.

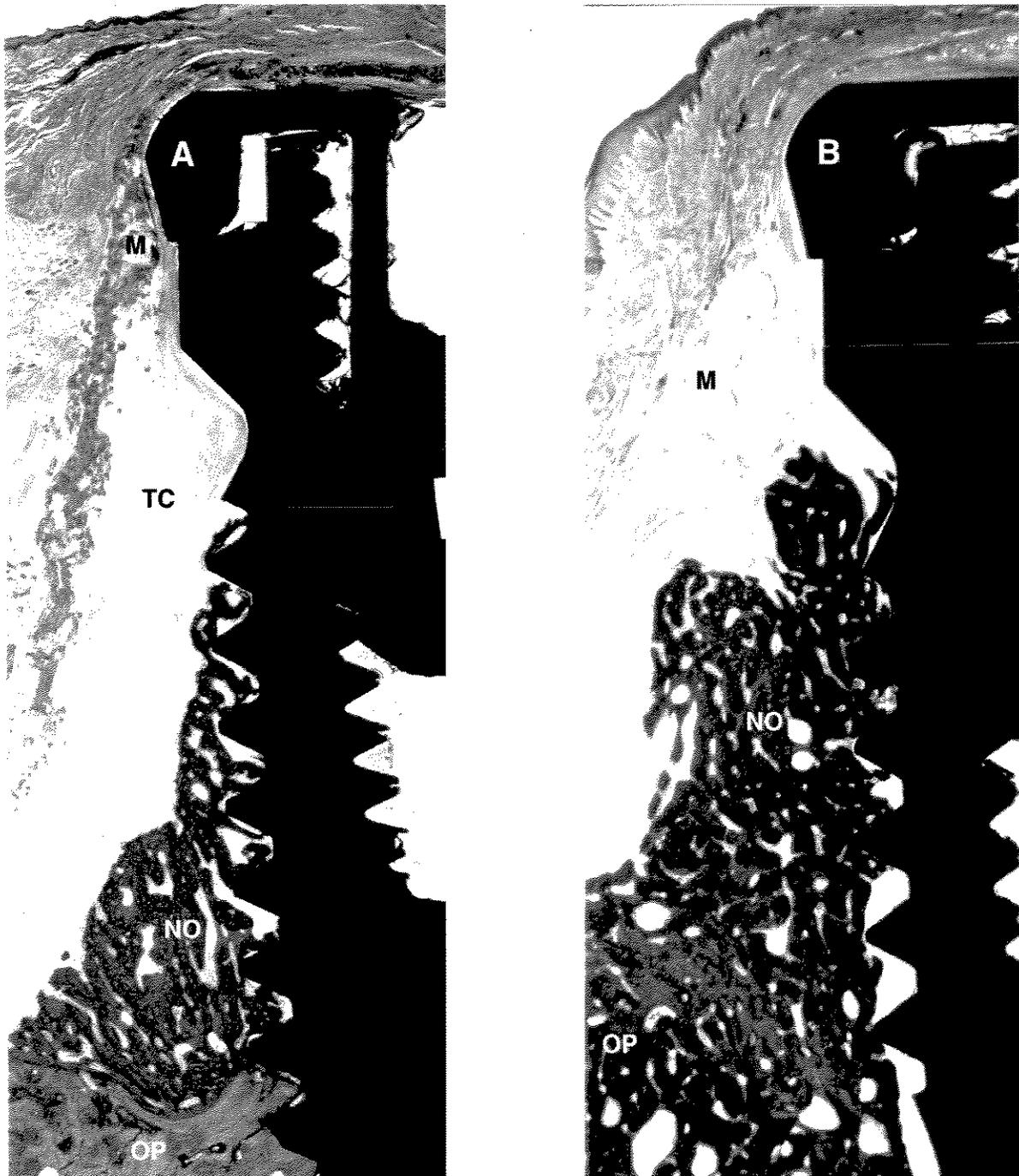


Figura 10 – Grupo ROG – um mês (A) e três meses (B): Aspecto microscópico do novo osso (NO) corado em azul intenso com um mês de pós operatório e, aos três meses, com menor diferença de coloração em relação ao osso pré-existente (OP). A membrana (M) apresenta-se em fase adiantada de degradação aos três meses e em fase inicial com um mês. Notar a presença do tecido conjuntivo (TC) entre a membrana e o novo osso. Azul de toluidina 1%. (25x a. o.).

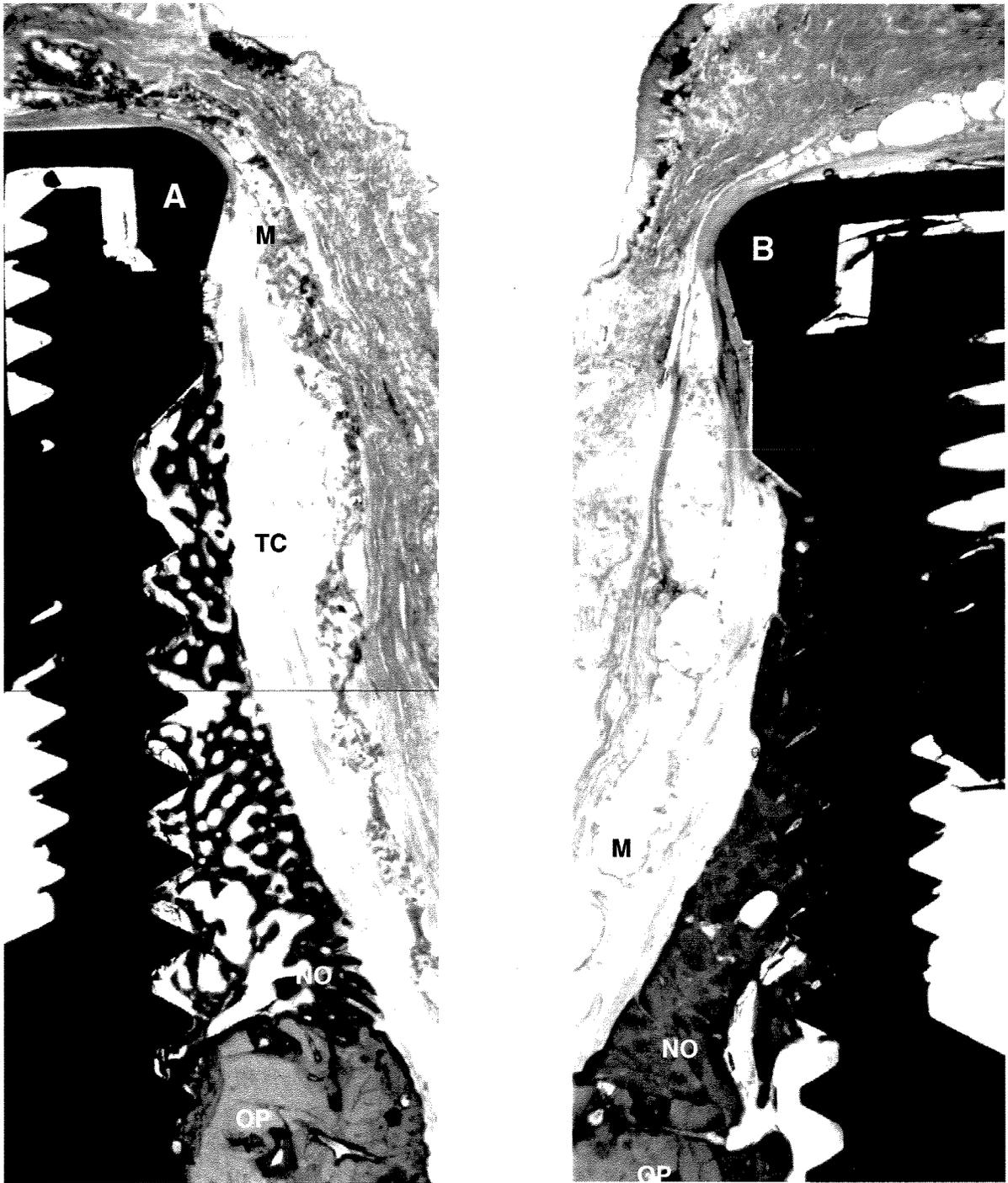


Figura 11 – Grupo ROG + PME - um mês (A) e três meses (B): Aspecto microscópico demonstrando novo osso (NO) com muitos espaços medulares e pouco contato direto com o implante com um mês de pós-operatório. Aos três meses, novo osso com aspecto semelhante aos osso pré-existente, com menor quantidade de espaços medulares (OP). Notar a presença da membrana (M) e do tecido conjuntivo (TC) entre esta e o novo osso. Azul de toluidina 1%. (25x a. o.).



Figura 12 – Grupo PME - um mês (A) e três meses (B): Aspecto microscópico demonstrando ausência de contato direto do novo osso (NO) com a superfície do implante com um mês de pós-operatório, com o tecido conjuntivo entre o novo osso e o implante. Aos três meses e com um mês, o osso pré-existente (OP) estava em contato direto com o implante. Azul de toluidina 1%. (25x a. o.)

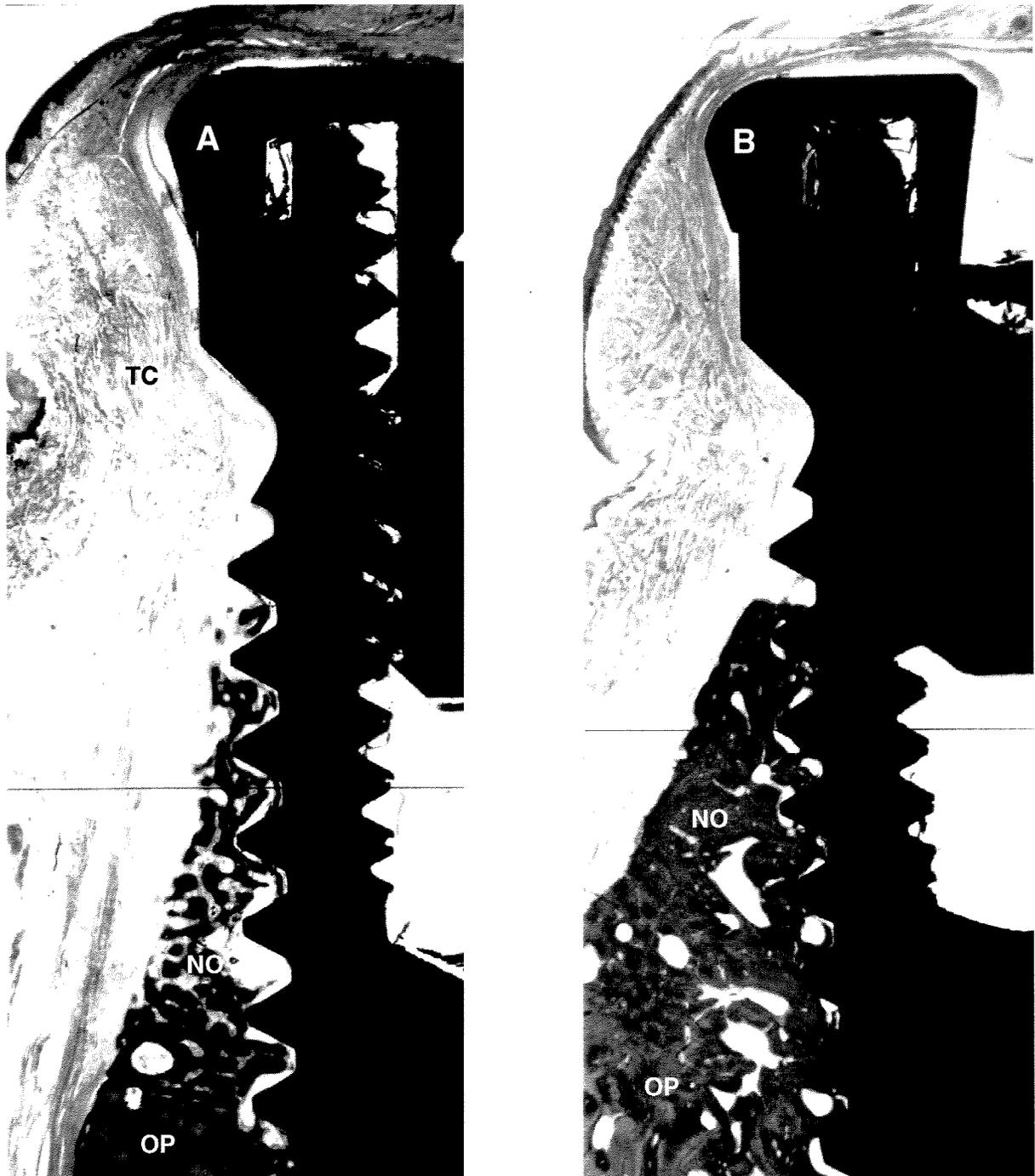


Figura 13 – Grupo Controle - um mês (A) e três meses (B): Aspecto microscópico demonstrando novo osso (NO) ainda imaturo, com muitos espaços medulares, em continuidade com o osso pré-existente (OP), com um mês de pós-operatório e aos três meses, novo osso apresentando menor quantidade de espaços medulares e uma maior quantidade de contato com o implante. Azul de toluidina 1%. (25x a. o.).

III – RESULTADOS HISTOMÉTRICOS

A avaliação histométrica não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no período de 1 mês de pós-operatório nos parâmetros histométricos avaliados (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Média, desvio padrão e posto médio da porcentagem de contato osso/implante, após um mês dos tratamentos ROG, PME, ROG + PME e controle.

	Controle	PME	ROG	ROG + PME
Média	3,88 ^a	15,03 ^a	12,87 ^a	8,52 ^a
Desvio padrão	5,70	23,76	9,35	6,89
Posto médio	1,33	2,66	3,33	2,66

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Friedman (p=0,055)

Tabela 2 - Média, desvio padrão e posto médio da porcentagem da área da rosca preenchida com novo osso, após um mês dos tratamentos ROG, PME, ROG + PME e controle.

	Controle	PME	ROG	ROG + PME
Média	34,07 ^a	41,82 ^a	42,89 ^a	34,43 ^a
Desvio padrão	22,08	22,03	18,08	15,75
Posto médio	2,16	2,5	3,0	2,33

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Friedman (p=0,7)

No período de 3 meses de pós-operatório, as avaliações histométricas não demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação à quantidade de contato osso/implante (tabela 3).

Tabela 3 - Média, desvio padrão e posto médio da porcentagem de contato osso/implante, após três meses dos tratamentos ROG, PME, ROG + PME e controle.

	Controle	PME	ROG	ROG + PME
Média	16,96 ^a	18,07 ^a	24,42 ^a	36,11 ^a
Desvio padrão	17,77	13,52	19,88	17,53
Posto médio	1,83	2,0	2,66	3,5

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Friedman ($p=0,1$)

Entretanto, o tratamento ROG + PME possibilitou um maior preenchimento ósseo das roscas dos implantes, quando comparado com o grupo controle, diferenças estatisticamente significantes - $p<0,05$ (tabela 4).

Tabela 4 - Média, desvio padrão e posto médio da porcentagem da área da rosca preenchida com novo osso, após três meses dos tratamentos ROG, PME, ROG + PME e controle.

	Controle	PME	ROG	ROG + PME
Média	36,95 ^b	55,55 ^{ab}	53,89 ^{ab}	62,15 ^a
Desvio padrão	25,10	11,81	16,35	18,47
Posto médio	1,33	2,33	2,66	3,66

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste de Friedman e pelo Teste Não Paramétrico de Comparações Múltiplas ($p<0,05$)

Os resultados das medidas histométricas realizadas, extensão da superfície óssea em contato direto com a superfície do implante e área de tecido ósseo presente em cada rosca do implante, relativas aos dois períodos do estudo, são demonstrados nos gráfico 1 e 2.

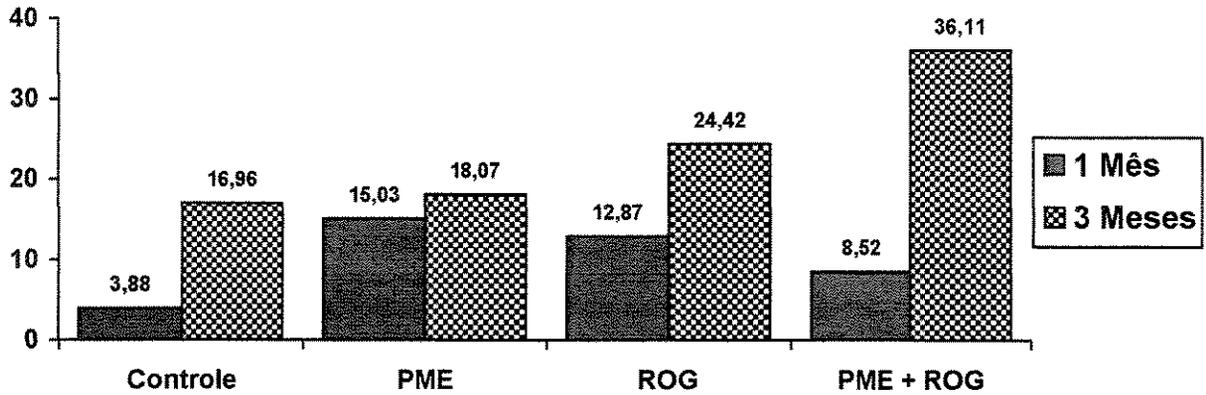


Gráfico 1 – Porcentagem média de contato osso/implante, após um e três meses dos tratamentos ROG, PME, ROG + PME e controle.

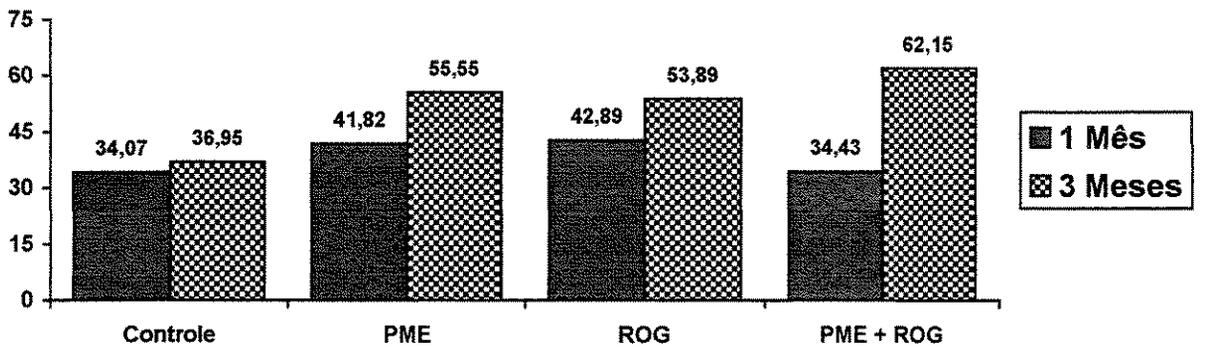


Gráfico 2 - Porcentagem média da área da rosca preenchida com novo osso, após um e três meses dos tratamentos ROG, PME, ROG + PME e controle.

DISCUSSÃO

Uma vez que os defeitos ósseos associados aos implantes dentais são um achado freqüente (MELLONIG & NEVINS, 1995) e estes defeitos podem levar ao comprometimento do implante (NEWMAN *et al.*, 1988), a proposta do presente estudo foi avaliar, histometricamente, o tratamento de defeitos ósseos peri-implantares do tipo deiscência, criados cirurgicamente em cães, através da utilização de proteínas derivadas da matriz do esmalte (PME) e da técnica de regeneração óssea guiada (ROG) com membranas reabsorvíveis.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, no período de um mês, entre os grupos tratados com ROG, PME, ROG + PME e o grupo controle, nos dois parâmetros avaliados - extensão da superfície óssea em contato direto com a superfície do implante e área de novo osso presente nas roscas do implante, a despeito da amplitude dos valores ser indicativa de uma maior quantidade de formação óssea e contato osso/implante nos grupos tratados com ROG, PME, ROG + PME.

No período de três meses, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo PME + ROG e o grupo controle ($p < 0,05$), em relação a área de novo tecido ósseo formado nas roscas do implante, relativas ao defeito ósseo criado. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao contato osso implante, a despeito da amplitude dos valores ser indicativa de uma maior quantidade de contato nos grupos ROG e PME + ROG.

Avaliações histológicas são necessárias uma vez que a impressão clínica de preenchimento ósseo não condiz com a presença histológica de novo osso (**PALMER et al., 1994**). Portanto, diante das dificuldades em se avaliar histologicamente em humanos o tipo de reparo conseguido após tratamento de defeitos ósseos padronizados com técnicas regenerativas, modelos animais são geralmente utilizados.

Os cães são freqüentemente utilizados como modelo para o estudo histológicos com implantes dentais, principalmente, devido ao tamanho e simplicidade da anatomia radicular. Porém, este modelo animal apresenta algumas desvantagens, como a grande variabilidade inter-animal e a rápida formação óssea associada a regeneração espontânea deste modelo (**WEINBERG & BRAL, 1999**). A metodologia utilizada no presente experimento – criação cirúrgica dos defeitos em cães – permitiu a obtenção de defeitos bilaterais semelhantes, caracterizando um estudo de boca dividida (“split-mouth”).

Diversas técnicas e materiais foram propostos para o tratamento dos defeitos ósseos, como a ROG e os enxertos ósseos e substitutos. **DAHLIN et al. (1989)** utilizaram membranas de PTFE-e em defeitos ósseos associados a implantes endósseos bilaterais em tíbias de coelhos. Em todos os defeitos tratados com membrana pode ser observada regeneração óssea. Demonstrando que a utilização de uma barreira física, que possua a propriedade de isolar da região do defeito ósseo células provenientes do tecido conjuntivo gengival, tem o potencial de promover a regeneração óssea daquele defeito (**BECKER et al., 1990; ZABLOTSKY et al., 1991**).

Entretanto o sucesso e a previsibilidade desta técnica podem ser influenciados por fatores como exposição da membrana e a dificuldade em se criar e manter espaço para a regeneração óssea pelo tempo necessário. **SIMION et al. (1994)** observaram grandes diferenças na quantidade de regeneração óssea obtida com a técnica de regeneração óssea guiada ao comparar membranas de PTFE-e com e sem exposição ao meio bucal (41,6% e 96,6%, respectivamente). Resultados semelhantes aos observados por **NOWZARI & SLOTS (1995)** que encontraram um defeito ósseo residual médio de 0,5mm nos implantes tratados com membranas não expostas ao meio bucal, e um defeito residual médio de 3,2mm, nos implantes tratados com membranas expostas ao meio bucal.

A criação e manutenção de espaço pelo tempo necessário para a regeneração óssea é outro fator importante para o sucesso e previsibilidade da técnica. **MELONIG et al. (1998)^a** ao tratar deiscências ósseas associadas a implantes dentais observaram uma média de contato ósseo no grupo tratado com membrana reabsorvível de 24,6% e no grupo controle 42,0%. Estes resultados foram decorrentes da incapacidade da membrana de criar e manter o espaço necessário para a regeneração e da sua rápida reabsorção.

No presente estudo todas as membranas permaneceram recobertas por tecido mole durante os três meses do estudo, sem a presença de exposição e contaminação. Além disso, demonstraram ser capazes de criar e manter o espaço necessário para a regeneração óssea, neste tipo de defeito utilizado. Estes fatores, provavelmente, influenciaram positivamente a reparação óssea dos grupos tratados com as

membranas, embora não se tenha encontrado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados somente com membrana e o grupo controle nos dois períodos do estudo.

MELLONIG et al. (1998), **HOCKERS et al. (1999)** e **KOHAL et al. (1999)** também não observaram nenhuma exposição das membranas usadas em seus estudos ao tratarem deiscências ósseas, em modelos experimentais semelhantes ao do presente estudo. Entretanto **ZABLOTSKY et al. (1991)**, **HAMMERLE et al. (1998)** e **SCHLIEPAHAKE et al. (2000)** encontraram exposição de membranas não reabsorvíveis, estando estas exposições associadas a uma menor quantidade de nova formação óssea.

Recentemente, um derivado de PME (EMDOGAIN®) foi sugerido como uma nova modalidade terapêutica regenerativa. Os princípios biológicos que suportam seu uso estão baseados na capacidade das PME em promover uma nova formação de cimento acelular. Existem evidências de que as PME estimulam a diferenciação de células mesenquimais em cementoblastos que produzem o cimento acelular de fibras extrínsecas (**HAMMARSTROM, 1997**)^b.

A ação das PME, todavia, não está limitada ao cimento. Estudos clínicos (**RASPERINI et al., 1999**), radiográficos (**HEIJL et al., 1997**), histológicos (**HEIJL, 1997**; **ARAÚJO & LINDHE, 1998**; **MELLONIG, 1999**; **SCULEAN et al., 2000**; **BOYAN et al., 2000**) e celulares (**SCHWARTS et al., 2000**; **HOANG et al., 2000**) demonstraram que as PME tem ação sobre o tecido ósseo. Portanto, o presente estudo se propôs a

estudar as PME como uma alternativa às membranas no tratamento de defeitos ósseos associados aos implantes dentais.

No presente estudo, o uso destas proteínas isoladamente não resultou em maior quantidade de contato osso/implante nem em maior quantidade de formação óssea, nos dois períodos avaliados, quando comparado com um grupo controle.

BOYAN et al. (2000) implantaram diferentes quantidades de PME isoladamente ou associadas a enxertos ósseos desmineralizados congelados e secos (DFDBA) ativos e inativos no tecido muscular de ratos. Os implantes que continham DFDBA inativo, 2mg e 4mg de PME isoladamente, 2mg e 4mg de PME + DFDBA inativo não induziram a formação de novo osso. Os grupos tratados DFDBA ativo isoladamente, 2mg e 4mg de PME + DFDBA ativo demonstraram potencial para indução óssea, entretanto o tratamento com 4mg de PME + DFDBA ativo resultou num aumento da indução óssea superior a todos os outros grupos. Estes resultados demonstraram que as PME não possuem características osteoindutoras, uma vez que usadas isoladamente não foram capazes de induzir formação óssea. Entretanto, quando usadas em conjunto com um material osteoindutor, as PME aumentaram a quantidade de nova formação óssea. Esta propriedade era dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração dessas proteínas maior era a indução óssea. Segundo os autores, pode haver um componente, diferente da amelogenina, presente nestas proteínas, responsável por esta característica osteocondutora.

Estes resultados podem justificar a presença de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com ROG + PME e a ausência de diferenças

entre os grupos tratados com as PME isoladamente. A associação destas proteínas com as membranas pode ter influenciado positivamente a osteopromoção decorrente da utilização da membrana; entretanto, no grupo tratado com as proteínas isoladamente, por estas não possuírem características osteoindutoras quando utilizadas isoladamente, diferenças estatisticamente significantes não foram observadas.

Uma vez que as proteínas, no grupo tratado com ROG + PME , eram aplicadas após a adaptação das membranas, imediatamente antes da sutura dos retalhos, a quantidade de PME obtida e mantida nos defeitos ósseos pode ter sido maior que no grupo tratado com as PME isoladamente, isto devido a presença da membrana, que provavelmente, foi responsável pela manutenção do gel na região do defeito sem permitir que o mesmo escoasse. Este fator, como demonstrado por **BOYAN et al. (2000)**, pode ter sido de fundamental importância para a resposta óssea observada.

Algumas hipóteses foram sugeridas para justificar a ação das proteínas derivadas do esmalte sobre o tecido ósseo. Segundo **SCHWARTS et al. (2000)**, as PME teriam uma característica osteocondutora, uma vez que, estas proteínas tem a capacidade de induzir a proliferação de pré-osteoblastos e osteoblastos maduros, além de estimular a atividade da fosfatase alcalina e produção de osteocalcina. Porém, não tem a capacidade de induzir a produção de proteínas ósseas colágenas e não colágenas.

Outra influência das proteínas derivadas da matriz do esmalte sobre a nova formação óssea foi observada por **VAN DER PAUW et al. (2000)** que observaram

aumento na liberação de fator de crescimento de transformação (TGF β) por 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 estimular a inserção e propagação destas células. Este aumento nos níveis de fator de crescimento de transformação (TGF- β 1) também foi encontrado no estudo de **SCHWARTS et al. (2000)** sendo este dose-dependente.

O TGF β é um fator de crescimento multifuncional, geralmente responsável pela produção de matriz, sendo um dos fatores de crescimento predominante na matriz óssea. O TGF β tem se demonstrado quimiotático para células ósseas, podendo estimular ou inibir sua proliferação dependendo do estado de diferenciação das células ósseas, condição da cultura e da concentração utilizada. Estudos *in vivo* demonstraram que se injetado próximo a tecido ósseo pode induzir formação óssea (**COCHRAN & WOZNEY, 1999**).

Em relação a quantidade de contato direto osso/implante em microscopia de luz, no presente estudo, foi observado aos três meses $16,96 \pm 17,77\%$ de contato no grupo controle, $18,07 \pm 13,52\%$ no grupo das proteínas derivadas da matriz do esmalte, $24,42 \pm 19,88\%$ no grupo com membrana reabsorvível e $36,11 \pm 17,53\%$ no grupo com a associação. Resultados semelhantes aos observados por **MELLONIG et al. (1998)** **HOCKRES et al. (1999)**, e **KOHAL et al. (1999)** ao utilizarem membranas reabsorvíveis.

MELLONIG et al. (1998) observaram uma porcentagem de contato osso/implante de $24,6 \pm 4,5\%$ no grupo tratado com membrana reabsorvível de

copolímero láctico e glicólico, e de $42 \pm 35,1\%$ no grupo controle; **HOCKRES et al. (1999)** uma porcentagem de $17,3 \pm 12\%$ no grupo tratado com membrana reabsorvível de colágeno e $12,4 \pm 7,8\%$ no grupo controle e **KOHAL et al. (1999)** encontraram $28,7 \pm 15,1\%$ no grupo tratado com membrana reabsorvível de copolímero láctico e glicólico e $31,6 \pm 5,3\%$ no grupo controle.

Ao avaliar os resultados obtidos nos estudos citados acima encontra-se uma superioridade dos grupos tratados com membrana não reabsorvível, em relação a porcentagem de contato osso/implante. **MELLONIG et al. (1998)** observaram uma porcentagem de contato osso/implante de $76,2 \pm 15,7\%$ no grupo tratado com membrana não reabsorvível de PTFE-e e **KOHAL et al. (1999)** encontraram $47,4 \pm 6,6\%$. Resultados semelhantes aos encontrados por **HÄMMERLE et al. (1998)** que observaram $64 \pm 25\%$ de contato osso/implante após utilização de uma de PTFE-e.

Estas diferenças podem ser decorrentes da rápida reabsorção destas membranas, da falta de estabilidade e da presença de reações inflamatórias durante a degradação das membranas reabsorvíveis (**SCHLIEPHAKE et al., 2000**). **MELLONIG et al. (1998)** e **KOHAL et al. (1999)**, utilizando uma membrana reabsorvível de um copolímero láctico e glicólico (RESOLUT[®]), semelhante a membrana utilizada no presente estudo, observaram que a degradação desta membrana iniciava-se após 4 a 6 semanas da sua colocação estando completamente reabsorvida após 8 semanas. Segundo os autores, tempo este insuficiente para que ocorra a completa regeneração óssea. No presente estudo, pode-se observar a presença da membrana em fase

adiantada de degradação, após três meses de sua colocação, e, com um mês de pós-operatório, a membrana já se apresentava em fase inicial de degradação.

Além do tempo o processo de degradação também pode influenciar na regeneração óssea obtida. Neste aspecto, as membranas não reabsorvíveis (PTFE-e) podem oferecer alguma vantagem, já que este material é tido como inerte, não exigindo resposta do organismo para sua reabsorção.

SCHLIEPHAKE et al. (2000) notaram um padrão de regeneração óssea semelhante entre membranas reabsorvíveis de ácido polilático e membranas de PTFE-e após três meses de cicatrização. Porém, aos 6 meses, a regeneração óssea obtida com as membranas reabsorvíveis não pode ser observada, provavelmente devido ao processo de degradação destas membranas. Embora os autores não tenham observado reação inflamatória visível próximo as membranas, com exceção da presença de poucas células multinucleadas, estes acreditam que o processo de degradação da membrana pode ter iniciado um processo de reabsorção devido a uma redução do pH logo abaixo da membrana.

Resposta semelhante foi observada por **WARRER et al. (1994)** ao compararem o uso de membranas reabsorvíveis (RESOLUT®) e não reabsorvíveis de PTFE-e em defeitos periodontais tipo deiscência em cães. A avaliação histológica, após um mês da colocação das membranas, revelou formação óssea significativamente menor (0,2mm) do que a observada aos três meses (1,8mm), nos defeitos tratados com as barreiras de PTFE-e, enquanto que nos defeitos que receberam as membranas reabsorvíveis, a formação óssea foi significativamente menor aos três meses (0,9mm) em comparação

ao que ocorreu após um mês (1,66mm). A possível reação inflamatória associada ao processo de reabsorção do material pode ter interferido na formação óssea aos três meses.

As membranas utilizadas no presente estudo também não provocaram reações inflamatórias visíveis e, provavelmente, o processo de reabsorção não influenciou negativamente a formação óssea, uma vez que aos três meses, a quantidade de novo osso observada foi maior que no primeiro mês. O processo de degradação destas membranas se dá através da hidrólise dos copolímeros láctico e glicólico em ácidos lácticos e glicólico, que estão presentes naturalmente no corpo humano e são eliminados através do ciclo de Krebs como dióxido de carbono e água (**MELLONIG et al. 1998**).

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação aos parâmetros avaliados entre os grupos estudados, no período de um mês de pós-operatório. Aos três meses de pós-operatório, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo tratado pela associação das membranas reabsorvíveis com as proteínas derivadas da matriz de esmalte e o grupo controle. Estes resultados indicam a necessidade de mais investigações, histológicas e clínicas, para confirmar a utilização das proteínas derivadas da matriz do esmalte associada ou não com membranas, como opção terapêutica no tratamento de defeitos ósseos associados a implantes dentais.

CONCLUSÃO

A avaliação histométrica do tratamento de defeitos ósseos peri-implantares, do tipo deiscência, através da utilização de matriz derivada do esmalte associada ou não à técnica de regeneração óssea guiada com membranas reabsorvíveis, permite afirmar que:

1. A associação das membranas reabsorvíveis com as proteínas derivadas da matriz do esmalte proporciona um maior preenchimento ósseo das roscas do implante, relativas ao defeito ósseo, quando comparada ao grupo controle, no período de 3 meses de pós-operatório. Entretanto, não proporciona uma maior quantidade de contato entre osso e implante.
2. A utilização isolada das proteínas derivadas da matriz do esmalte e das membranas reabsorvíveis, não proporcionam um maior preenchimento ósseo das roscas do implante e uma maior quantidade de contato entre osso e implante, após um e três meses de pós-operatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADELL, R. *et al.* A 15 year study of osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. **Int. J. oral Surg.**, Copenhagen, v.10, n. 6 , p.387-416, Jun. 1981.

BECKER, W. *et al.* A comparison of e-PTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor - 1 or demineralized freeze dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **J. Periodont.**, Chicago, v.63, n.11, p.929-940, Nov., 1992.

_____. *et al.* Bone formation at dehisced dental implants sites treated with implant augmentation material: a pilot study in dogs. **Int. J. periodont. restor. Dent.**, Carol Stream, v.10, n.2, p.93-101, Feb., 1990.

_____. *et al.* Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. **Int. J. oral maxillofac. Implants**, Lombard, v.10, n. 2, p.143-154, Feb., 1995.

BOYAN, B.D. *et al.* Porcine fetal enamel matrix derivative enhances bone formation induced by demineralized freeze dried bone allograft in vivo. **J.**

* De acordo com a NBR-6023/89, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviaturas de periódicos de conformidade com a "World List of Scientific Periodicals".

- Periodont.**, Chicago, v.71, n.8, p.1278-1286, Aug., 2000.
- BRANEMARK, P.I. *et al.* **Tissue integrated prosthesis** : osseointegration in clinical dentistry. Chicago : Quintessence, 1985. p.350.
- BUSER, D. *et al.* Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. **Periodont. 2000**, Copenhagen, v.19, p.151-163, 1999.
- _____. *et al.* Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane – protected defects: a histologic study in the canine mandible. **Int. J. oral maxillofac. Implants**, Lombard, v.10, n.6, p.666-681, Jun., 1995.
- COCHRAN, D.L. Implant therapy I. **Ann. Periodont.**, Chicago, v.1, n.1, p.707-709, 1996.
- _____., WOZNEY, J.M. Biological mediators for periodontal regeneration. **Periodont. 2000**, Copenhagen, v.19, p.40-58, 1999.
- DAHLIN, C. *et al.* Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. **Clin. oral Implants Res.**, Copenhagen, v.1, n.2, p.159-165, Feb., 1991.
- _____. *et al.* Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. **Int. J. oral maxillofac. Implants**, Lombard, v.4, n.1, p.19-25, Jan., 1989.
- _____. *et al.* Treatment of fenestration and dehiscence bone defects around

oral implants using the guided tissue regeneration technique: a prospective multicenter study. **Int. J. oral maxillofac. Implants**, Lombard, v.10, n.3, Mar., p.312-318, 1995.

DONATH, K., BREUNER, G.A. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. **J. oral Path.**, Copenhagen, v.11,n.4, p.318-326, Apr., 1982.

FONG, D.C., SLABY, I., HAMMARSTROM, L. Amelin: an enamel-related protein transcribed in the cells of the epithelial root sheath. **J. Bone Miner. Res.**, Cambridge, v.11, n.7, p.892-898, Jul., 1996.

GESTRELIUS, S. *Et al.* Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.24, n.9, p.678-684, Sept., 1997a.

_____. *et al.* *In vitro* studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.24, n.9, p.685-692, Sept. 1997b.

GOTFREDSEN, K. *et al.* Immediate implant placement using a biodegradable barrier, polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate reinforced with polyglactin 910. An experimental study in dogs. **Clin. oral Implants Res.**, Copenhagen, v.5, n. 2, p.83-91, May., 1994.

HAMMARSTROM, L. The role of enamel matrix in the development of cementum and periodontal tissues. *In*: CHADWICK, D., CARDEW, G. **Dental enamel.** Chichester : Wiley, 1997a. p.246-260.

_____. Enamel matrix, cementum development and regeneration. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.24, n.9, p.658-668, Sept. 1997b.

_____. *et al.* Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix protein. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.24, n.9, p.669-677, Sept., 1997.

HÄMMERLE, C.H.F., KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodont. 2000**, Copenhagen, v.17, p.151-175, 1998.

HEIJL, L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.24, n.9, p.693-696, Sept. , 1997.

_____. *et al.* Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.24, n.9,

p.705-714, Sept. , 1997.

HOANG, A.W. *et al.* In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative.

J. Periodont., Chicago, v.71, n. 8,p.1270-1277, Aug., 2000.

HOCKERS, T. *et al.* The combined use of bioresorbable membranes and

xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A

study in beagle dogs. **Clin. oral Implants Res.**, Copenhagen, v.10, n. 6 ,

p.487-498, Jun., 1999.

HÜRZELER, M.B. *et al.* Guided bone regeneration around dental implants in the

atrophic alveolar ridge using a bioresorbable barrier. An experimental study in

the monkey. **Clin. oral Implants Res.**, Copenhagen, v.8, n. 4, p.323-331,

Apr., 1997.

JOVANOVIC, S.A. Diagnosis and treatment of peri-implant disease. **Curr. Opin.**

Periodont., Chicago, p.194-204, 1994.

JOVANOVIC, S.A. *et al.* Bone regeneration around titanium dental implants in

dehisced defect sites: a clinical study. **Int. J. oral maxillofac. Implants**,

Lombard, v.7,n. 2 ,p.233-245, Feb., 1992.

JOVANOVIC, S.A. *et al.* Supracrestal bone formation around dental implants: an

experimental dog study. **Int. J. oral maxillofac. Implants**, Lombard, v.10, n.1,

p.23-30,Jan., 1995.

- KARRING, T. *et al.* Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.7, n.2, p.96-105, Feb., 1980.
- KOHAL, R.J. Comparison of a bioabsorbable and bioinert membranes for guided bone regeneration around non-submerged implants. An experimental study in the mongrel dog. **Clin. oral Implants Res.**, Copenhagen, v.10, n. 3, p.226-237, Mar., 1999.
- KOWASE, T. *et al.* Cytostatic action of enamel matrix derivative (Endogain®) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. **J. periodont. Res.**, Copenhagen, v.35, n. 5, p.291-300, May., 2000.
- LEKHOLM, U., ZARB, G.A. Patient selection and preparation. *In: BRANEMARK, P.I. et al. Tissue integrated prosthesis : osseointegration in clinical dentistry.* Chicago : Quintessence, 1985. p.199-209.
- LINDE, A. *et al.* Osteopromotion: a soft tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J. Periodont.**, Chicago, v.64, n.11, p.1116-1128, Nov., 1993.
- LINDQUIST, L.W., CARLSSON, G.E., JEMT, T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. **Clin. oral Implants Res.**, Copenhagen, v.7, n.4, p.329-336, Dec., 1996.

LINDSKOG, S. Formation of intermediate cementum I: early mineralization of aprismatic enamel and intermediate cementum. **J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.**, New York, v.2, n.2, p.147-160, Feb., 1982a.

_____. Formation of intermediate cementum II : a scanning electron microscopic study of the epithelial root sheath of Hertwig. **J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.** New York, v.2, n.2, p.161-169, Feb., 1982b.

_____, HAMMARSTROM, L. Formation of intermediate cementum III: ³H-proline and ³H-tryptophan uptake into the epithelial root sheath of Hertwig in vitro. **J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.**, New York, v.2, n.2, p.171-177, Feb., 1982.

LUNDGREN, D. *et al.* The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation. Case reports. **Clin. oral Implants Res.**, Copenhagen, v.5, n. 3 ,p.177-184, Mar., 1994.

MELCHER, A.H. On the repair potential of periodontal tissues. **J. Periodont.**, Chicago, v.47, n.5, p.256-260, May., 1976.

MELLONIG, J.T. Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery: technique and clinical and histologic case report. **Int. J. periodont. restor. Dent.**, Carol Stream, v.19, n.1, p.8-19, Jan., 1999.

_____, NEVINS, M. Guided bone regeneration of bone defects associated

with implants: an evidence – based outcome assessment. **Int. J. periodont. restor. Dent.**, Carol Stream, v.15, n.2, p.169-185, Feb., 1995.

_____. *et al.* Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part I. Material alone. **Int. J. periodont. restor. Dent.**, Carol Stream, v.18, n.2, p.129-137, Feb., 1998a.

MELLONIG, J.T. *et al.* Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part II. Material and bone replacement graft. **Int. J. periodont. restor. Dent.**, Carol Stream, v.18, n.2, p.139-149, Feb., 1998b.

NASR, H. F. *et al.* Bone and bone substitutes. **Periodont. 2000**, Copenhagen, v.19, p.74-86, 1999.

NEWMAN, M.G. *et al.* Periodontal considerations of implants and implant associated microbiota. **Int. J. oral Implantol.**, Carol Stream, v.5, n.1, p.65-70, Jan., 1988.

NOWZARI, H., SLOTS, J. Microbiologic and clinical study of polytetrafluoroethylene membranes for guided bone regeneration around implants. **Int. J. oral maxillofac. Implants**, Lombard, v.10, n.1, p.67-72, Jan., 1995.

NYMAN, S. Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.18, n. 6, p.494-498, 1991.

_____. *et al.* Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.7, n.5, p.394-401, Oct. 1980.

_____. *et al.* New attachment formation on the teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.12, n.1, p.51-60, Jan. 1985.

PALMER, R.M. *et al.* Healing of implant dehiscence defects with and without expanded polytetrafluoroethylene membranes: a controlled clinical and histological study. **Clin. oral Implants Res.**, Copenhagen, v.5, n.2, p.98-104, Feb., 1994.

PETINAKI, E. *et al.* Low stimulation of peripheral lymphocytes, following in vitro application of Endogain®. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.25, n.9, p.715-720, 1998.

RASPERINI, G., RICCI, G., SILVESTRI, M. Surgical technique for treatment of infrabony defects with enamel matrix derivative (Emdogain): 3 case reports. **Int. J. periodont. restor. Dent.**, Carol Stream, v.19, n.6, p.578-587, Dec. 1999.

SCHLIEPHAKE, H., KRACHT, D. Vertical ridge augmentation using polylactic membranes in conjunction with immediate implants in periodontally compromised extraction sites: an experimental study in dogs. **Int. J. oral maxillofac. Implants**, Lombard, v.12, n.3, p.325-334, Mar. 1997.

_____. *et al.* Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. **Clin. oral Implants Res.**, Copenhagen, v.11, n. 3 , p.230-241, Mar., 2000.

SCHWARTZ, Z. *et al.* Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cell, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NH0st cells. **J. Periodont.**, Chicago, v.71, n.3., p.1287-1296, Mar., 2000.

SCULEAN, A. *et al.* Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration. **J. Periodont.**, Chicago, v.34, n.6, p.310-322, Aug. 1999.

_____. *et al.* Treatment of intrabony defects with guided tissue regeneration and enamel–matrix-proteins. An experimental study in monkeys. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.27, n. 7 ,p.466-472, Jul., 2000.

SENNERBY, L. *et al.* A morphometric and biomechanics comparisons of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. **Int. J. oral**

maxillofac. Implants, Lombard, v.7,n. 1, p.62-71, Jan., 1992.

SIMION, M. *et al.* A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. **Int. J. periodont. restor. Dent.**, Carol Stream, v.14, n.2, p.167-180, Feb., 1994.

SLAVKIN, H.C. Towards a cellular and molecular understanding of periodontics: cementogenesis revisited. **J. Periodont.**, Chicago, v.47, n. 5, p.249-255, May., 1976.

_____, BOYDE, A. Cementum: an epithelial secretory product? **J. dent. Res.**, Washington, v.53, p.157, 1975. [Abstract, 409].

_____. *et al.* Hertwig's epithelial root sheat differentition and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically defined medium. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.24, n.1, p.28-40, Jan. 1989a.

_____. *et al.* Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.991, n.1, p.12-18, Apr. 1989b.

- VAN DER PAUW, M.T. *et al.* Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor β_1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. **J. Periodont.**, Chicago, v.71, n. 1, p.31-43, Jan., 2000.
- WARRER, K. *et al.* Guided tissue regeneration in recession type defects using a bioabsorbable resolut or no bioabsorbable Gore Tex periodontal material (GTPM) membrane. **J. dent. Res.**, Washington, v.73, p.380, 1994. [Abstract, 2225]
- WEINBERG, M.A., BRAL, M. Laboratory animal model in periodontology. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.26, p.335-340, 1999.
- ZABLOTSKY, M. *et al.* Histological and clinical comparisons of guided tissue regeneration on dehiscid hydroxylapatite-coated and titanium endosseous implant surfaces: a pilot study. **Int. J. oral maxillofac. Implants**, Lombard, v.6, n. 3 , p.294-303, Mar., 1991.
- ZARB, G.A., SCHMITT, A. The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants: the Toronto study. Part I: surgical results. **J. prosth. Dent.**, Saint Louis, v.63, n. 4, p.451-457, Apr., 1990.
- ZETTERSTRÖM, O. *et al.* Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects. **J. clin. Periodont.**,

Copenhagen, v.24, n.9, p.697-704, Sep., 1997.

ZITZMANN, N.U. *et al.* Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with bio-oss for guided bone regeneration. **Int. J. oral maxillofac. Implants**, Lombard, v.12, n.6, p.844-852, Jun., 1997.

ANEXOS

As tabelas abaixo demonstram as porcentagens médias de contato osso/implante e área de novo osso por rosca do implante, de cada lamina avaliada, representativas de cada animal e as médias e desvio padrão de cada grupo.

Tab. 1 – Grupo PME 1 MÊS

LAMINA	INTEGR.	ÁREA
1	0,96	32,44
3	12,85	52,32
4	0,77	13,74
5	62,28	79,00
6	11,33	38,51
7	1,99	34,91
MEDIA	15,03	41,82
D.P.	23,76	22,03

Tab. 2 – Grupo controle 1 MÊS

LAMINA	INTEGR.	ÁREA
8	0,00	34,20
10	2,87	37,47
11	0,00	2,22
12	14,69	66,93
13	5,36	19,14
14	0,38	44,46
MEDIA	3,88	34,07
D.P.	5,70	22,08

Tab. 3 – Grupo ROG 1 MÊS

LAMINA	INTEGR.	ÁREA
15	12,88	35,62
17	16,27	55,80
18	5,87	12,50
19	11,30	57,32
20	28,88	58,78
21	2,00	37,34
MEDIA	12,87	42,89
D.P.	9,35	18,08

Tab. 4 – Grupo PME + ROG 1 MÊS

LAMINA	INTEGR.	ÁREA
22	0,23	34,46
24	14,73	36,22
25	7,51	24,45
26	3,53	44,32
27	6,59	10,80
28	18,54	56,35
MEDIA	8,52	34,43
D.P.	6,89	15,75

Tab. 5 – Grupo PME + ROG 3 MESES

LAMINA	INTEGR.	ÁREA
29	35,46	63,84
31	50,99	71,07
32	6,63	27,44
33	51,70	82,26
34	46,01	65,83
35	25,88	62,45
MEDIA	36,11	62,15
D.P.	17,53	18,47

Tab. 6 – Grupo ROG 3 MESES

LAMINA	INTEGR.	ÁREA
36	10,97	29,79
38	55,91	67,31
39	13,25	72,41
40	39,86	63,11
41	23,04	46,26
42	3,48	44,46
MEDIA	24,42	53,89
D.P.	19,88	16,35

Tab. 5 – Grupo PME 3 MESES

LAMINA	INTEGR.	ÁREA
43	25,58	63,74
45	25,73	62,03
46	27,02	64,01
47	1,37	47,75
48	28,71	60,87
49	0,00	34,87
MEDIA	18,07	55,55
D.P.	13,52	11,81

Tab. 5 – Grupo controle 3 MESES

LAMINA	INTEGR.	ÁREA
50	31,81	58,83
52	44,11	66,82
53	0,00	0,00
54	6,51	39,09
55	17,33	40,04
56	2,00	16,93
MEDIA	16,96	36,95
D.P.	17,77	25,10

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE