

Isabel Cláudia Masson Poiares Baptista
Coimbra 2005

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA REGENERAÇÃO PERIODONTAL

A influência de um derivado das proteínas da matriz do esmalte no epitélio gengival - estudo *in vivo*

Dissertação de candidatura ao grau de doutor apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Orientadores:

Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita

Professor Doutor Gil Alves Pessanha Alcoforado

A elaboração deste trabalho decorreu no Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial, no Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e com o apoio do Laboratório de Investigação Experimental dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação.

À Patrícia

Ao Jorge

Aos meus pais
A todos os meus

Aos meus amigos

Aos Alunos e ao Corpo Docente do
Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-facial

Esta tese é o resultado de esforços de um grande grupo de pessoas de diferentes departamentos da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Eu gostaria de agradecer a todos eles e aos que não estão mencionados.

Eu estou particularmente grata aos meus orientadores.

Ao Professor Doutor António Silvério Cabrita o meu reconhecimento pela forma como soube transmitir a sua vasta experiência em investigação científica. Os primeiros passos dados no âmbito da experimentação animal, tiveram-no como mestre. A sua riqueza científica e técnica, os seus ensinamentos e disponibilidade permanente foram determinantes para a execução desta dissertação.

Ao Professor Doutor Gil Alcoforado reconheço com gratidão os conhecimentos científicos que me legou, a experiência e disponibilidade demonstradas e, talvez o mais importante de tudo, a amizade que se foi aprofundando durante todo este tempo.

Um agradecimento muito especial ao Professor Doutor João Luís Maló de Abreu que, desde sempre me incentivou e apoiou com vigor para progredir na carreira académica. Exemplo de empenho, esforço contínuo e vontade férrea de, com humildade, prosseguir a construção de um Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial, cuja afirmação como referência no âmbito do ensino e da investigação na área da Medicina Dentária, tem sido reconhecida por diversas instituições. Espero continuar a merecer a sua confiança.

Ao Professor Doutor João Patrício estou grata pelo apoio e facilidades concedidas na utilização do equipamento do Laboratório de Investigação Experimental dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

À Professora Doutora Helena Figueiredo, cujo entusiasmo e interesse me motivou e ajudou na interpretação histológica dos resultados.

Ao Professor Doutor Emanuel Ponciano, manifesto o meu sentido apreço pela importante colaboração no tratamento estatístico deste trabalho.

À Dr^a Beatriz França, D. Margarida Menezes e D. Elisa Patrício, funcionárias do Instituto de Patologia Experimental, pela ajuda na realização das técnicas de processamento das amostras.

Aos funcionários do Laboratório de Investigação Experimental dos Hospitais da Universidade de Coimbra o meu agradecimento pela colaboração técnica durante a fase experimental do trabalho.

Gostaria, igualmente, de expressar o meu profundo agradecimento a todos os meus colegas da Disciplina de Periodontologia, nomeadamente ao Dr. Francisco Marques, ao Dr. Tony Rolo, ao Dr. Jorge Ermida e ao Dr. Sérgio Matos, pelo seu constante apoio e por resolverem os problemas causados pela minha ausência durante o período de dispensa do serviço docente. Um agradecimento especial ao Higienista Oral Francisco Marques, pela disponibilidade e paciência com que colaborou na fase experimental deste trabalho.

À D. Maria José Bera e à D. Maria de Lurdes Mendes, funcionárias da Biblioteca do Departamento, pelo apoio prestado no trabalho de pesquisa bibliográfica e na requisição de artigos científicos a instituições nacionais e estrangeiras.

A todos os funcionários do Departamento agradeço a simpática disponibilidade para a resolução de questões inesperadas que surgiram ao longo da preparação deste trabalho.

Às Dr^{as}. Eugénia Rovira e Dr^a. Ana Carina Barros, minhas colegas, amigas e colaboradoras no consultório, não esquecerei a vossa disponibilidade para resolverem os problemas causados pela minha ausência da clínica, poupando-me de tantas preocupações que me permitiram concentrar no meu trabalho de investigação.

À Paula Santos pela iconografia criada e pelo trabalho desenvolvido na composição gráfica desta dissertação.

Agradeço a todos os meus amigos, cujo apoio e incentivo foi inestimável nos momentos difíceis.

Por último, mas sempre em primeiro, devo reconhecer o amor, o apoio e o incentivo que recebi da minha família.

- I - INTRODUÇÃO**

- II - TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO PERIODONTAL. Revisão da literatura.**
 - a.** Regeneração guiada de tecidos
 - b.** Enxertos ósseos e materiais de substituição
 - c.** Biomodificação da raiz
 - c.1.** Condicionamento ácido
 - c.2.** Mediadores biológicos
 - d.** Engenharia tecidual com células vivas
 - e.** Terapêutica genética

- III - DERIVADO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE**
 - a.** Racionalização – conceitos actuais de regeneração
 - b.** Princípio biológico
 - b.1.** Cementogénese
 - b.2.** Cimento radicular e sua importância na regeneração periodontal
 - c.** Proteínas da matriz do esmalte na regeneração periodontal
 - c.1.** Estudos *in vitro*
 - c.2.** Estudos *in vivo*
 - c.3.** Estudos pré-clínicos
 - c.4.** Estudos clínicos
 - c.5.** Estudos de avaliação histológica no homem
 - c.6.** Segurança e reacções adversas

- IV - O RATO COMO MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE**

V - TRABALHO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL

a. Periodontite experimental - Protocolo A

- a.1. Objectivo**
- a.2. Material e métodos**
- a.3. Resultados**
- a.4. Discussão**
- a.5. Conclusões**

b. A influência de um derivado das proteínas do esmalte no epitélio gengival - Protocolo B

- b.1. Objectivo**
- b.2. Material e métodos**
- b.3. Resultados**
- b.4. Discussão**
- b.5. Conclusões**

VI - RESUMO

VII - BIBLIOGRAFIA

VIII - ANEXOS

IX - ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

Periodontologia é a ciência que estuda os tecidos que envolvem os dentes e as alterações que os afectam.

O periodonto define-se, funcional e anatomicamente, como o sistema de diferentes tecidos que revestem e suportam o dente, compreendendo a gengiva, a mucosa alveolar, o ligamento periodontal, o cimento radicular e o osso alveolar.

Esta especialidade da Medicina Dentária, a Periodontologia, para além do diagnóstico e do tratamento das doenças do periodonto, abrange igualmente a manutenção da saúde, da função e da estética das estruturas periodontais, através da substituição dos dentes perdidos e suas estruturas de suporte, recorrendo à colocação de enxertos ou implantação de materiais naturais ou sintéticos. A prevenção da patologia periodontal assume hoje em dia uma relevância clínica inquestionável, tanto no âmbito da saúde oral como no da saúde pública em geral. A relação, cada vez mais fundamentada, entre a patologia periodontal e outras patologias como a doença coronária, a diabetes ou o nascimento de prematuros de baixo peso, reforça a importância da Periodontologia no âmbito da Medicina Dentária e da Medicina.

A doença periodontal tem como etiologia primária a acumulação de placa bacteriana na margem gengival que, com determinadas condições, passa a colonizar a superfície radicular. De acordo com o conceito mais actual de patogénese, a doença periodontal resulta de uma inter-relação complexa entre a infecção bacteriana e a resposta do hospedeiro, a qual é modificada por diversos factores de risco. Para além dos factores genéticos que alteram, de modo ainda não manipulável, a susceptibilidade à doença, destacamos o tabaco e a diabetes como factores de risco adquiridos (Page *et al.* 1997).

A definição e a classificação das doenças que afectam o periodonto têm sido

alvo da atenção de clínicos, investigadores, estatísticos e epidemiologistas. À medida que os conhecimentos sobre patogénese têm evoluído, as diferentes classificações da patologia periodontal foram-se revelando insuficientes e inadequadas. Com o objectivo de corrigir as classificações existentes e uniformizar os critérios de nomenclatura, realizou-se em 1999 o “*International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*”. Das suas conclusões, surgiu uma nova classificação, a qual apesar de ter algumas insuficiências, deverá ser considerada como a mais actualizada e internacionalmente aceite. Nesta classificação, as doenças que afectam o periodonto dividem-se em sete grupos gerais: gengivite, periodontite crónica, periodontite agressiva, periodontite como manifestação de doença sistémica, doença periodontal necrosante, abscesso periodontal e periodontite associada a lesão endodôntica (Armitage 1999). Contudo, numa abordagem mais geral, não clínica, poderemos dividir as doenças periodontais induzidas por placa bacteriana em dois grandes grupos: as gengivites e as periodontites.

A gengivite é uma entidade patológica na qual se verifica a presença de inflamação nas estruturas superficiais do periodonto, sem haver perda de tecido de suporte. Na maior parte dos casos, a lesão é reversível após o controlo dos agentes etiológicos. De facto, o tecido gengival possui a capacidade de regenerar a sua forma e função originais, depois de sofrer lesões inflamatórias ou traumáticas.

O termo periodontite designa as situações patológicas em que a inflamação se estende aos tecidos periodontais mais profundos, afectando o ligamento periodontal, o cemento radicular e o osso alveolar. Caracteriza-se pela formação de bolsas periodontais. Estas resultam da migração do epitélio juncional ao longo da raiz, da perda da inserção do ligamento periodontal e da reabsorção do osso alveolar. Ao contrário do que se verifica na gengivite, após a remoção dos agentes etiológicos, a regeneração *ad integrum* das estruturas periodontais afectadas não ocorre espontaneamente, nem de uma forma clinicamente previsível.

Os dados epidemiológicos existentes sobre as doenças periodontais, de um modo geral, estão desactualizados, são pouco rigorosos ou mesmo inexistentes. Uma das razões para tal situação, centra-se na falta de uniformização dos índices utilizados. Por outro lado, a existência, no passado, de várias classificações assim como a ausência de critérios precisos que definam as diferentes patologias periodontais, dificultam a análise e comparação dos diversos estudos.

A Academia Americana de Periodontologia (AAP) publicou em 1996 um "*Position Paper*" sobre a epidemiologia das doenças periodontais na população dos Estados Unidos da América. Segundo este documento, a gengivite é muito comum nas idades jovens, apresentando uma prevalência entre os 40% e os 60% na população escolar, diminuindo a sua frequência com a idade. As formas ligeira e moderada de periodontite afectam a maioria dos adultos, se bem que só 5% a 20% da população seja afectada por periodontite crónica grave generalizada. As formas mais graves de periodontite parecem ser mais frequentes nos adolescentes e nos adultos jovens, sendo rara nos idosos. Neste tipo de avaliação, os dados de prevalência devem sempre ser reportados a um grupo etário e acompanhados da definição da doença, para cada caso. Exemplificando: se a periodontite for definida como a perda de inserção clínica de 2 ou mais milímetros em pelo menos um local, aproximadamente 80% dos adultos estarão afectados, sendo a prevalência superior a 90% para o coorte de 55-64 anos. Se, ao alterarmos os critérios, e a periodontite for definida como a perda de inserção clínica de 7 ou mais milímetros, a prevalência desce abaixo dos 10% para o mesmo grupo etário.

Estudos efectuados noutras populações, tanto em países industrializados como em países menos desenvolvidos, obtiveram valores de prevalência da periodontite e da gengivite da mesma ordem de grandeza que os referentes à população americana (Løe *et al.* 1986, Burt 1991, Papapanou e Tonetti, 2000).

Como não existem dados disponíveis sobre a prevalência de doenças periodontais na população portuguesa, talvez possamos fazer uma transposição dos dados provenientes da população espanhola e ter uma ideia do que se passa em Portugal. De acordo com os dados da última “*Enquesta de Salud Oral en España*” realizada em 2000, a percentagem de indivíduos que não apresenta qualquer sinal de doença oral é de 55% para a coorte de 15 anos, de 19% para os adultos jovens (35-44 anos) e de 8,7% para a coorte de 65-74 anos. Relativamente à patologia periodontal, verifica-se que a percentagem de indivíduos com indicação para destartarização ou polimento é de 28,2% na coorte de 15 anos. No grupo de 35-44 anos, as bolsas periodontais (moderadas ou profundas) estão presentes em 25,6% dos indivíduos, enquanto que a prevalência da doença periodontal grave é de 4,2% (Bravo *et al.* 2003).

Podemos então, de um modo sumário, afirmar que as formas mais graves de doença periodontal são mais frequentes na idade adulta, embora afecte um número relativamente pequeno de indivíduos. Já as suas formas ligeiras, nomeadamente a gengivite, são mais frequentes nos indivíduos jovens.

O objectivo principal do tratamento da doença periodontal é cessar a perda do suporte dentário e sempre que possível, inverter o processo patológico, regenerando os tecidos destruídos. Tendo por base este objectivo, a terapia inicial consiste na redução ou eliminação da placa bacteriana, factor etiológico primário, e na prevenção do seu reaparecimento. A instrução de métodos de higiene oral e a motivação do doente são premissas fundamentais no sucesso do tratamento. A destartarização e o alisamento radicular removem, de modo não cirúrgico, a placa bacteriana e os cálculos dentários, localizados nas áreas supra e infragengivais. No entanto, quando a placa bacteriana se localiza em bolsas periodontais profundas, de complexa morfologia, com áreas infra-ósseas e envolvimento da furca de dentes multiradiculares, estes métodos revelam-

se insuficientes, mantendo-se alguns defeitos periodontais, sob a forma de bolsas periodontais residuais.

Quando as bolsas periodontais são pouco profundas, a sua presença não se traduz, de uma forma geral, na progressão da doença, principalmente se não forem acompanhadas por sinais inflamatórios evidentes. A profundidade reduzida das bolsas periodontais limita o risco de re-infecção local. Pelo contrário, a existência de bolsas profundas em pacientes tratados é um indicador de risco de progressão da doença (Armitage 1996, Renvert e Persson 2002). Deste modo, quando persistem bolsas profundas após a fase higiénica do tratamento, é necessário intervir cirurgicamente, quer para as eliminar ou para tentar recuperar o tecido de suporte perdido, e assim otimizar o prognóstico da situação clínica periodontal.

Há mais de um século que os tratamentos cirúrgicos têm sido utilizados na abordagem das bolsas periodontais profundas. De início, as técnicas de cirurgia periodontal eram essencialmente ressectivas (ex: gengivectomia/gengivoplastia, cirurgias de retalho mucogengivais, osteotomia/osteoplastia, amputação radicular, hemisecção dentária, odontoplastia), tendo por objectivo a eliminação das bolsas, através da remodelação das margens gengivais e ósseas (AAP, *Position paper* 2001b). Estas atitudes terapêuticas visavam a criação cirúrgica de uma nova arquitectura periodontal, permitindo um controlo eficaz da placa bacteriana, e assim suster a progressão da doença. Estudos clínicos a longo prazo demonstraram que o tratamento periodontal com cirurgia ressectiva, se associado a uma terapêutica de manutenção regular, mantinha a saúde periodontal dos doentes tratados durante um período de cinco ou mesmo catorze anos (Lindhe e Nyman 1984, Lindhe *et al.* 1984, Ramfjord *et al.* 1987). No entanto, estas técnicas ressectivas contradizem o objectivo final de qualquer terapêutica moderna: a reposição completa dos tecidos perdidos durante o processo patológico.

A avaliação histológica dos tratamentos periodontais, cirúrgicos ou não, tanto

no modelo animal (Caton e Nyman 1980, Caton *et al.* 1980), como no humano (Caton e Zander 1976, Listgarten e Rosenberg 1979, Steiner *et al.* 1981, Bowers *et al.* 1989a), demonstrou que os tecidos periodontais mais profundos não têm grande capacidade regenerativa, uma vez que a cicatrização era predominantemente reparativa. A maior parte da superfície radicular tratada apresentava-se colonizada por células epiteliais, apesar de, em alguns casos e numa extensão limitada da zona mais profunda da lesão, se verificar a formação de novo cemento radicular, de novas fibras do ligamento periodontal e de novo osso alveolar. Esta forma de cicatrização deve-se ao facto da taxa de proliferação dos tecidos epitelial e conjuntivo gengivais ser muito superior à do ligamento periodontal e do osso alveolar. Acresce-se ainda o facto do epitélio oral nos mamíferos adultos não promover a formação de cemento, nem de ligamento periodontal, como acontece com o epitélio odontogénico durante o desenvolvimento do periodonto.

Por definição, a regeneração é a reconstituição ou reprodução de uma parte perdida ou lesada de um tecido ou órgão, restaurando por completo a sua forma e função. Geralmente, no periodonto, a cicatrização de uma lesão que envolve uma perda substancial de tecido faz-se por reparação e não por regeneração. O sistema de suporte dos dentes engloba diversos tipos de tecidos, com origem embrionária diferente. A sua regeneração é particularmente complexa uma vez que esses tecidos têm que ser integrados conjuntamente numa unidade funcional (Oringer, 2002). De acordo com o glossário de termos periodontais, publicado pela Academia Americana de Periodontologia em 2001, a **regeneração periodontal** define-se histologicamente como a formação de novo cemento, ligamento periodontal, osso alveolar e gengiva, numa superfície radicular previamente exposta a placa bacteriana. Este conceito tem sido muitas vezes confundido com “nova adesão” (*new-attachment*) que, segundo o glossário referido, se define como uma adesão epitelial e/ou adaptação ou

adesão de tecido conjuntivo com a superfície radicular, a qual foi privada do seu sistema de suporte, podendo ou não incluir novo cimento e novo osso. Como se depreende, a nova adesão tanto pode ser regenerativa como pode ser reparativa. Um outro conceito igualmente confundido com regeneração periodontal é a “re-inserção” (*reattachment*). Este último define-se como a reunião dos tecidos epitelial e conjuntivo com a superfície radicular, a qual apresenta fibras do ligamento periodontal ainda preservadas, pelo que não abrange a cicatrização que acontece na superfície radicular afectada directamente por placa bacteriana.

Para além destes termos, a cicatrização periodontal já tem sido descrita como “adesão de colagénio” (Stahl *et al.* 1972), “nova adesão” (Crigger *et al.* 1978) e “reparação de tecido conjuntivo” (Wikesjö e Nilvéus 1991). Caton e Greenstein (1993) referem ainda o termo de “regeneração parcial” quando só parte dos tecidos foi regenerado durante o processo cicatricial: formação de novo cimento com novas fibras de adesão à superfície radicular, mas sem formação de novo osso alveolar, ou então o preenchimento de uma lesão infra-óssea por novo osso mas sem restabelecimento das fibras de Sharpey, por interposição de um epitélio juncional longo. Mais recentemente, alguns autores (Heijl 1997) utilizaram a designação de “verdadeira regeneração periodontal”, definindo-a como a cicatrização após tratamento periodontal que resulta na regeneração dos tecidos de suporte perdidos, incluindo novo epitélio juncional, novo cimento acelular aderido à superfície radicular, novo ligamento periodontal com fibras de colagénio funcionais, correctamente orientadas e inseridas tanto no novo cimento como no novo osso alveolar, o que corresponde aos critérios necessários para a *restitutio ad integrum* do periodonto.

As diferentes designações reflectem as adaptações que se tornaram necessárias, à medida que os critérios de regeneração periodontal foram evoluindo. Inicialmente, os critérios tinham um carácter essencialmente clínico, mas, actualmente, a avaliação histológica é fundamental (Garrett 1996).

Nos estudos clínicos de regeneração periodontal, entre outros, a avaliação dos resultados baseia-se em parâmetros clínicos de referência: o nível de inserção clínica (em terminologia anglo-saxónica, *clinical attachment level* - CAL), a profundidade de sondagem (*probing depth* - PD), a recessão gengival (*gingival recession* - RE) e a imagem radiológica dos espaços interproximais. Com base nesses parâmetros, conclui-se que ocorreu regeneração periodontal quando se verifica pelo menos duas das seguintes situações: a) aumento de inserção clínica; b) diminuição da profundidade de sondagem, associada a uma maior ou menor recessão gengival, e c) redução da radiotransparência na área da lesão. No entanto, temos de ter em conta as limitações inerentes a estes parâmetros.

A diminuição da profundidade de sondagem (PD) nem sempre é sinónimo de regeneração periodontal. Tal diminuição pode resultar da maior dificuldade da sonda periodontal em penetrar na bolsa periodontal por ter havido uma melhoria substancial do estado inflamatório dos tecidos, e/ou por se ter colocado um material de substituição óssea no defeito, e/ou por se ter formado novo osso alveolar, muito embora possa ter havido interposição de tecido epitelial entre este e a superfície radicular.

O nível de inserção clínica (CAL), usando um ponto de referência fixo, como por exemplo a junção amelo-cementária, é unanimemente aceite como o principal parâmetro clínico para avaliar o sucesso da cirurgia regenerativa. No entanto, este parâmetro pode não medir rigorosamente o nível da inserção coronal do novo tecido conjuntivo, uma vez que, como para a profundidade de sondagem, depende da introdução da sonda periodontal no sulco gengival.

Alterações na altura e na densidade ósseas são geralmente avaliadas por comparação de radiografias pré e pós-operatórias, quando estas são obtidas por métodos estandardizados e reprodutíveis. Recentemente, recorrendo à radiografia digital directa, é possível quantificar tais alterações de modo mais preciso utilizando técnicas de subtracção de imagens sobreponíveis. No

entanto, o aumento de radiopacidade na imagem radiológica pós-operatória não é, por si só, sinónimo de regeneração, pois pode traduzir exclusivamente a radiopacidade do material de substituição óssea utilizado ou, então, reflectir a regeneração de um único componente periodontal, o osso alveolar.

Alguns estudos de investigação avaliam o preenchimento ósseo recorrendo à observação directa do tecido regenerado através de uma cirurgia de re-entrada, efectuada pelo menos seis meses após a cirurgia regenerativa. Esta atitude implica um segundo procedimento cirúrgico sobre a mesma área, contribuindo para a diminuição dos parâmetros clínicos obtidos previamente. Para além do mais, a visualização clínica do tecido ósseo regenerado, embora permita uma boa avaliação da remodelação óssea, não permite a identificação de outros tecidos presentes, nomeadamente o ligamento periodontal e o cimento radicular.

De facto, a análise histológica é o único método fiável de avaliação dos tecidos presentes após a cicatrização. Através de biópsias, pode-se classificar objectivamente os tecidos periodontais regenerados, permitindo concluir se os parâmetros clínicos traduzem ou não regeneração. A biópsia deve demonstrar que a técnica regenerativa em estudo resultou na formação de novo cimento, de novo osso e de novo ligamento periodontal, coronalmente ao entalhe radicular efectuado no ponto mais apical dos cálculos infragengivais (AAP, *Consensus Report* 1996). No entanto, por razões éticas e deontológicas, a análise histológica não pode ser generalizada a todos os estudos clínicos em humanos, uma vez que obriga à remoção em bloco dos tecidos regenerados. Por outro lado, a transposição para o homem dos resultados histológicos de modelos animais, tanto em primatas não humanos como em cães, não pode ser efectuada directamente, na medida em que há uma série de factores que são exclusivos ao homem, nomeadamente o tempo de cicatrização.

Actualmente, e segundo os princípios da medicina baseada na evidência, a avaliação da capacidade de regeneração periodontal de uma determinada técnica, para além da análise histológica de biópsias humanas dos tecidos

regenerados, deve ter em conta os resultados de estudos clínicos aleatórios controlados. Estes estudos clínicos deverão ter objectivos bem definidos e metodologia adequada, para avaliar com rigor os benefícios e os riscos da técnica em estudo. Deste modo, será possível a sua inclusão nas revisões sistemáticas da literatura efectuadas sobre essa técnica e assim determinar a sua relevância e previsibilidade clínicas.

O melhor conhecimento da etiologia e da patogénese das doenças periodontais e da resposta dos tecidos aos procedimentos cirúrgicos, conduziu a grandes progressos na terapêutica periodontal, particularmente no campo da regeneração periodontal. Baseadas nos diferentes aspectos do processo de cicatrização periodontal, têm sido desenvolvidas várias técnicas cirúrgicas cujo objectivo é reconstruir as estruturas periodontais perdidas durante o processo patológico.

De um modo geral, as técnicas regenerativas utilizadas actualmente podem ser incluídas em dois grupos: - técnicas de fundamento mecânico, como a aplicação de membranas semi-permeáveis ou o preenchimento da lesão por enxertos, geralmente de tecido ósseo ou seu derivado; - técnicas de fundamento biológico, como a aplicação de factores de crescimento, de proteínas de adesão, de proteínas da matriz extracelular, de células vivas e a terapia genética.

Todas estas técnicas, utilizadas isoladamente ou em combinação baseiam-se num conceito biologicamente aceite. Contudo, nem todas preenchem os requisitos acima referidos (AAP, *Consensus Report* 1996), nomeadamente a comprovação por estudos clínicos controlados aleatórios e estudos com avaliação histológica, preferencialmente de humanos. Apesar de algumas técnicas terem demonstrado capacidade regenerativa, esta é geralmente parcial. Actualmente, ainda não foi possível obter, de um modo constante e previsível, a regeneração clínica *ad integrum* dos tecidos periodontais.

Estamos convictos que, no futuro, recorrendo às técnicas mais recentes de

engenharia tecidual e tendo por base a biomimética, ciência de reconstrução de tecidos ou órgãos por imitação dos processos naturais, na expectativa de regeneração (Lynch *et al.* 1999), a terapêutica periodontal verá os seus objectivos mais exigentes plenamente concretizados.

O trabalho por nós efectuado é composto por três partes:

- A primeira parte (Capítulo II) tem por objectivo fazer um ponto da situação sobre as diferentes técnicas de regeneração periodontal, referindo os mais relevantes trabalhos publicados sobre cada uma delas e as respectivas revisões sistemáticas da literatura, quando existentes.
- Na segunda parte (Capítulo III), revemos com particular pormenor a regeneração periodontal com um derivado das proteínas da matriz do esmalte, focando tanto os estudos experimentais como os estudos clínicos.
- Na terceira parte, depois de uma revisão sobre a utilização do rato como modelo experimental em Periodontologia (Capítulo IV), apresentamos um trabalho experimental em modelo animal, composto por dois estudos realizados no rato (Capítulo V). O primeiro caracteriza a lesão periodontal desenvolvida segundo dois procedimentos de colocação do fio de sutura em torno do colo dos dentes molares. o segundo estuda a influência de um derivado das proteínas da matriz do esmalte na cicatrização do epitélio gengival, de uma lesão periodontal criada de acordo com os resultados do primeiro estudo. Deste modo, damos o nosso contributo pessoal para o melhor conhecimento dos processos cicatriciais subjacentes à regeneração periodontal.

TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO PERIODONTAL

II. TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO PERIODONTAL. Revisão da literatura

Após a longa introdução e para melhor compreensão do assunto desta dissertação, entendemos dever proceder à revisão das diferentes técnicas de regeneração periodontal, referindo os mais relevantes trabalhos publicados sobre cada uma delas e, quando existentes, às respectivas revisões sistemáticas da literatura. Desenvolveremos em seguida a regeneração guiada de tecidos, os enxertos ósseos e materiais de substituição, a biomodificação da raiz, a engenharia tecidual com células vivas e, por último, a terapêutica genética.

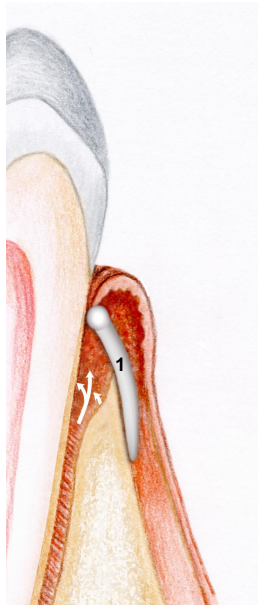
a. REGENERAÇÃO GUIADA DE TECIDOS

A regeneração guiada dos tecidos periodontais continua a ser um tema actual em Periodontologia, embora tenha sido introduzido pela primeira vez na literatura há cerca de 30 anos por Melcher (1976), ao sugerir que, após a cirurgia periodontal, é o tipo de células que recoloniza a superfície radicular que determina a natureza da adesão periodontal resultante. Esta ideia estimulou inúmeros investigadores a desenvolverem uma série de estudos em animais, procurando identificar as células periodontais com potencial regenerativo.

O estudo realizado por Karring e colaboradores (1980) mostrou que o osso alveolar não tinha capacidade para formar nova adesão conjuntiva sobre uma superfície radicular sem ligamento periodontal. As áreas radiculares previamente expostas a doença periodontal e sujeitas a raspagem e alisamento radicular, quando reimplantadas no osso alveolar, sofreram anquilose e reabsorção radicular. Pelo contrário, na superfície radicular mais apical, com o ligamento periodontal parcialmente preservado, restabeleceu-se um novo ligamento periodontal com as paredes ósseas do alvéolo criado cirurgicamente.

Um outro estudo (Nyman *et al.* 1980) pôs em evidência que o tecido conjuntivo gengival também não tinha a capacidade de produzir uma nova adesão conjuntiva: após a implantação sob o retalho mucoperióstico, a superfície radicular em contacto com o tecido conjuntivo gengival demonstrou a formação de um tecido conjuntivo com fibras paralelas à superfície, sem inserção na raiz, para além de áreas extensas de reabsorção radicular. Um segundo estudo de Karring e colaboradores (1985) evidenciou que o ligamento periodontal tinha a capacidade de formar uma nova adesão conjuntiva, mas que a proliferação epitelial sobre a superfície radicular impedia tal formação, reiterando as observações do estudo de Caton e colaboradores (1980). A confirmação da existência no ligamento periodontal de células com capacidade de formar uma nova adesão foi obtida alguns anos mais tarde, com a introdução dos implantes dentários (Buser *et al.* 1990, Warrer *et al.* 1993).

Baseada nas teorias biológicas dos domínios celulares e na recolonização do coágulo por células específicas, desenvolveu-se uma nova estratégia de regeneração periodontal: a regeneração guiada de tecidos (*guided tissues regeneration* - GTR).



A colocação de uma barreira física entre o tecido conjuntivo do retalho periodontal e a superfície radicular afectada impediria a migração apical das células do epitélio gengival e do tecido conjuntivo ao longo da superfície radicular, facilitando a recolonização do local pelas células ósseas e do ligamento periodontal, estas últimas com maior capacidade de regenerar os tecidos periodontais (Fig. 2.1). Os estudos em animais, realizados por Nyman e colaboradores (1982a) e por Gottlow e colaboradores

Figura 2.1 – Regeneração guiada de tecidos (GTR).

(1) membrana semi-permeável

(1984), confirmaram ser o ligamento periodontal o tecido que contém as células progenitoras necessárias para a formação de osso, cemento e ligamento periodontal. Neste último estudo, uma lesão periodontal crónica, criada experimentalmente num primata não humano, foi tratada através da raspagem e alisamento radicular, ressecção da coroa e colocação de uma membrana totalmente submersa sob o retalho. Ao fim de três meses, nas superfícies teste, tinha-se formado uma nova adesão conjuntiva, algumas delas apresentando o recobrimento total da superfície radicular por novo cemento radicular com fibras colagénicas nele inseridas. A formação de novo osso alveolar não era muito significativa, mas estava presente em quase todas as superfícies teste, não havendo contudo uma relação com a quantidade de novo cemento. Como não foi observada nem reabsorção externa radicular nem anquilose, apesar do tecido de granulação proveniente do osso entrar em contacto com a superfície radicular, os autores sugeriram que a velocidade de migração das células do ligamento periodontal era pelo menos igual ou mesmo superior às do osso alveolar. Concluíram então, que a colocação de uma barreira física semi-permeável entre o retalho mucoperióstico e a superfície radicular favorecia a colonização da superfície radicular adjacente por células provenientes do ligamento periodontal e do osso alveolar.

Estes resultados foram posteriormente confirmados em inúmeros estudos em animais que abordavam os vários tipos de lesões periodontais: supra-alveolares (Aukhil *et al.* 1986, Caffesse *et al.* 1988b, Claffey *et al.* 1989), de furca (Caffesse *et al.* 1990a, Pontoriero *et al.* 1992) e recessões (Gottlow *et al.* 1990). A posição de colocação da membrana parecia determinar a quantidade de tecido regenerado, já que o ligamento periodontal regenerado nunca excedia o nível coronal da membrana. Recorrendo a um modelo experimental, Haney e colaboradores (1993) definiram as bases biológicas para a cirurgia reconstructiva com membranas: - a reparação conjuntiva depende da estabilidade da ferida; - a regeneração óssea depende do espaço

disponibilizado; - a exclusão do tecido conjuntivo gengival da superfície radicular impede a reabsorção radicular; - a regeneração guiada dos tecidos pode não envolver a regeneração do cimento; - o recobrimento completo e duradouro da membrana é essencial para a completa regeneração dos tecidos periodontais.

A primeira aplicação de GTR em humanos foi publicada por Nyman e colaboradores (1982b), tendo sido seguida por uma série de outras publicações (Gottlow *et al.* 1986, Becker *et al.* 1988, Caffesse *et al.* 1990b, Handelsman *et al.* 1991) em que o sucesso da regeneração foi avaliado clinicamente através do aumento do nível de inserção clínica (CAL), da diminuição da profundidade de sondagem (PD) e do aumento do nível ósseo. Para além do tratamento de defeitos infra-ósseos, esta técnica regenerativa mostrou ser uma alternativa interessante na recuperação de lesões de furca, as quais, na terapêutica periodontal convencional, envolviam procedimentos complicados como tratamentos endodônticos, separação ou amputação radicular e restaurações protéticas (Pontoriero *et al.* 1988, Pontoriero *et al.* 1989). Foram igualmente realizados estudos a longo prazo, provando que os tecido regenerados segundo esta técnica podiam ser mantidos durante alguns anos (Gottlow *et al.* 1992, Machtei *et al.* 1996), demonstrando uma susceptibilidade à progressão da doença periodontal comparável aos locais tratados por raspagem e alisamento radicular (Cortellini *et al.* 1996).

Diversos estudos apresentaram imagens histológicas que comprovavam a regeneração dos diferentes tecidos periodontais após a utilização de GTR em diversos tipos de lesões periodontais (Nyman *et al.* 1982b, Gottlow *et al.* 1986, Becker *et al.* 1987, Stahl *et al.* 1990, Cortellini *et al.* 1993).

Após o entusiasmo inicial, verificou-se que os bons resultados obtidos nos estudos de referência, eram muito variáveis e dificilmente reproduzíveis na prática clínica diária (Pontoriero e Lindhe 1995, Bratthall *et al.* 1998). Esta variabilidade depende de vários factores, quer associados ao paciente,

designadamente o tabaco, a higiene oral e a infecção periodontal residual, quer associados à anatomia dos defeitos periodontais, nomeadamente a profundidade do componente intra-ósseo, a angulação e o número de paredes ósseas, quer associados à técnica cirúrgica utilizada (Cortellini e Tonetti 2000). De facto, uma das complicações clínicas mais frequentes da técnica de GTR é a exposição e consequente infecção da membrana. Comprovadamente, tais factos limitam o sucesso da terapêutica, tanto no ganho de inserção, como na redução da profundidade de sondagem (De Sanctis *et al.* 1996a, b). Para obviar estas ocorrências, foram desenvolvidas algumas técnicas cirúrgicas com o objectivo de facilitar o encerramento primário do retalho sem tensão, diminuindo o risco de exposição da membrana: a técnica de manutenção tecidular interproximal apresentada por Murphy em 1996; a técnica de preservação de papilas (Takei *et al.* 1985) e as suas variantes modificada e simplificada apresentadas por Cortellini e colaboradores (1995; 1999; 2001). Este último grupo de autores recomendam a utilização do microscópio cirúrgico durante a execução da técnica de GTR, tendo verificado que a ampliação e melhor iluminação do campo cirúrgico permitiam uma manipulação mais precisa e menos traumática dos tecidos interproximais, melhorando o seu encerramento primário, aumentando assim os resultados de ganho de inserção clínica (Cortellini e Tonetti 2001).

Perante o grande número de estudos clínicos referentes ao tratamento dos defeitos periodontais infra-ósseos e de furca, optamos por fazer uma breve apresentação, para cada lesão, dos artigos de revisão publicados mais recentemente. Deste modo, pensamos estabelecer linhas de orientação que ajudem a decidir entre as várias técnicas de regeneração periodontal.

a.1. Tratamento de defeitos infra-ósseos

Cortellini e Tonetti (2000) efectuaram uma revisão da literatura sobre o tratamento de defeitos infra-ósseos por regeneração guiada de tecidos, publicada até 1998. Referem 35 estudos clínicos com o tratamento de 943 defeitos, quer com membranas não-reabsorvíveis (politetrafluoroetileno expandido - e-PTFE), quer com membranas reabsorvíveis (colagénio, copolímero de ácido poliláctico (PLA) e de ácido poliglicólico (APG)). A média ponderada ao fim de um ano dos resultados de todos os estudos clínicos indicou um ganho de nível de inserção clínica de $3,86 \pm 1,69$ mm e uma profundidade de sondagem residual de $3,35 \pm 1,19$ mm. O ganho de inserção clínica foi muito semelhante entre as membranas não-reabsorvíveis (351 defeitos em 20 estudos) e as membranas reabsorvíveis (592 defeitos em 17 estudos): $3,7 \pm 1,8$ mm e $3,6 \pm 1,5$ mm, respectivamente. Onze estudos clínicos eram aleatórios controlados (*randomized controlled trials* - RCT) e comparavam a GTR (e-PTFE, colagénio e copolímero) à cirurgia de retalho (*open flap debridement* - OFD). À excepção de um, todos os estudos demonstravam que a GTR resultava num ganho estatisticamente significativo de inserção clínica comparativamente à cirurgia de retalho (Quadro 2.1).

11 RCTs	GTR	OFD
Nº defeitos	243	213
Ganho de CAL mm	$3,4 \pm 1,8$	$1,8 \pm 1,4$

Quadro 2.1 - Ganho no nível de inserção clínica (CAL) em mm (média \pm desvio padrão), em defeitos infra-ósseos tratados por GTR e por cirurgia de retalho (OFD) em 11 estudos clínicos aleatórios e controlados (RCT).

Adaptado de Cortellini e Tonetti, 2000.

Estes resultados clínicos indicam claramente que há um benefício acrescido na colocação de uma membrana sobre um defeito infraósseo, durante a cirurgia

periodontal. Para além da eficácia, também a previsibilidade da GTR foi analisada com base em 17 estudos dos analisados inicialmente. Os autores verificaram que só 2,7% dos 651 casos tratados perderam inserção ao fim de 12 meses; 11% dos casos obtiveram um ganho de inserção clínica inferior a 2 mm. De facto a maioria dos casos resultaram num ganho significativo de inserção clínica: 24,8% obtiveram um ganho entre 2 e 3 mm; 41,3% entre 4 e 5 mm e 21,2% acima de 5 mm (Cortellini e Tonetti 2000). Estes dados asseguram a previsibilidade da GTR no tratamento de defeitos infra-ósseos.

A primeira revisão sistemática da literatura sobre a utilização da regeneração guiada de tecidos nos defeitos infra-ósseos foi efectuada por Murphy e Gunsolley (2003). Dos artigos publicados até Janeiro de 2002, foram avaliados 44 estudos, dos quais 40 se referiam a ensaios clínicos aleatórios e controlados (RCT). Alguns desses RCT comparavam a GTR, com membranas não-reabsorvíveis e reabsorvíveis, à cirurgia de retalho (OFD), enquanto outros comparavam a GTR isoladamente à sua associação a materiais de preenchimento ósseo, e outros ainda comparavam as membranas não-reabsorvíveis às membranas reabsorvíveis.

No tratamento de defeitos infra-ósseos, a regeneração guiada de tecidos apresentou ganho de inserção clínica (CAL) e redução da profundidade de sondagem (PD) significativamente superiores à cirurgia de retalho. Não foram encontradas diferenças significativas entre os diversos tipos de membranas avaliadas (não reabsorvíveis - e-PTFE; reabsorvíveis - colagénio e derivadas do ácido láctico) (Quadro 2.2), embora os estudos que comparavam directamente as membranas e-PTFE com as reabsorvíveis tivessem demonstrado melhores resultados no ganho de CAL para as não reabsorvíveis. Estas conclusões confirmam os resultados da revisão efectuada por Cortellini e Tonetti (2000).

Membranas	Colagénio	Polímero	e-PTFE
CAL	n 3 0,95 ± 0,47	n 12 0,92 ± 0,18	n 9 1,61 ± 0,25
PD	n 3 1,06 ± 0,37	n 11 0,89 ± 0,14	n 9 1,41 ± 0,20

Quadro 2.2 - Diferenças em mm (média ± desvio padrão), para o ganho de CAL e a redução de PD, entre os diferentes tipos de membranas e a cirurgia de retalho, no tratamento de defeitos infra-ósseos.

Abreviações: CAL = nível de inserção clínico; PD = profundidade de sondagem; n = número de estudos.

Adaptado de Murphy e Gunsolley, 2003.

A recessão gengival pós-operatória, apesar de resultar ligeiramente superior na GTR, não foi significativamente diferente entre a GTR e a OFD. Alguns estudos utilizaram técnicas diferenciadas de retalho na GTR, apresentando uma diminuição da recessão gengival pós-operatória, quando comparada com o controlo OFD; no entanto, a amostra era pouco significativa. Tanto as membranas de e-PTFE como as reabsorvíveis resultaram em recessões gengivais ligeiras, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois tipos de membranas (Murphy e Gunsolley 2003).

Ainda segundo esta revisão sistemática, a meta-análise dos estudos seleccionados para a comparação de membranas associadas a um material de preenchimento (5 estudos com alo-enxerto desmineralizado (DFDBA), 1 estudo com xeno-enxerto (BPBM) e 1 estudo com hidroxiapatite (HA)) com GTR isoladamente, no tratamento de defeitos infra-ósseos, não revelou qualquer diferença no ganho de inserção clínica (7 estudos) e na redução da profundidade de sondagem (6 estudos). A análise dos subgrupos de membranas, reabsorvíveis ou não, não mostrou diferenças significativas (Murphy e Gunsolley, 2003).

a.2. Tratamento de lesões de furca

O tratamento do envolvimento de furca por regeneração guiada de tecidos foi objecto de vários estudos de revisão.

A revisão efectuada por Sanz e Giovannoli (2000) focou o tratamento de lesões de furca com GTR, de acordo com o tipo de furca e o tipo de membranas utilizadas. Na avaliação do tratamento de furca de molares mandibulares de classe II com membranas não reabsorvíveis, foram incluídos 4 estudos RCT, que relatavam o tratamento de 52 defeitos. Os autores destacaram o estudo de Pontoriero e colaboradores (1988) pelos resultados obtidos serem bastante superiores aos outros três, nomeadamente um ganho clínico de inserção horizontal de 4,1 mm com GTR versus 1,9 mm no grupo de controlo (OFD), um ganho clínico de inserção vertical de 4,1 mm com GTR versus 1,5 mm com OFD e uma redução da profundidade de sondagem de 4,5 mm com GTR versus 2,8 mm com OFD. Os restantes estudos mostraram resultados muito menos significativos. Quando o tratamento tinha como objectivo o encerramento completo da furca, os resultados foram muito limitados: em menos de metade dos casos descritos este objectivo foi alcançado. De igual modo, a excepção referiu-se ao estudo de Pontoriero e colaboradores (1988) que apresentou 67% de encerramento das furcas com GTR, enquanto que no grupo de controlo só 9% das furcas resultaram no seu completo encerramento. Quando o objectivo secundário era a transformação de uma furca de classe II em classe I, a GTR com membranas não reabsorvíveis mostrou-se pouco previsível, com resultados variando desde menos de 50% a quase 100% dos casos tratados (Sanz e Giovannoli 2000).

Na revisão de Sanz e Giovannoli (2000), também foram avaliados os estudos que abordavam o tratamento de lesões de furca mandibulares de classe II mas com membranas reabsorvíveis (colagénio e polímeros), comparativamente à cirurgia de retalho (OFD). Os autores verificaram que os resultados clínicos eram igualmente pouco significativos, embora as membranas de copolímero

de ácido láctico tenham apresentado resultados ligeiramente superiores: ganho clínico de inserção horizontal de 2,5 a 3,3 mm. Não houve nenhum caso de encerramento completo da furca e 50% a 75% das lesões passaram de classe II para classe I.

No tratamento de furcas maxilares de classe II com membranas não reabsorvíveis, os 5 estudos analisados (relatando o tratamento de 54 defeitos), demonstraram resultados clínicos ainda menos significativos: ganho de inserção clínica, tanto vertical como horizontal, de cerca de 1 mm e ausência de encerramento completo da furca, não havendo diferenças significativas com o grupo de controlo.

Estes autores (Sanz e Giovannoli 2000) concluíram que a eficácia do tratamento de furcas por GTR demonstrou ser muito variável e imprevisível. Contudo, nas furcas de classe II mandibulares, especialmente quando há um componente vertical importante com manutenção dos níveis ósseos interproximais, a GTR demonstrou ganhos significativos na inserção clínica, tanto vertical como horizontal. A variabilidade nos resultados dos diferentes estudos analisados pode reflectir a influência de diversos factores inerentes à lesão. No que se refere ao tratamento das furcas maxilares de classe II e das furcas de classe III, a regeneração tecidual guiada não demonstrou ser um tratamento de escolha uma vez que raramente é obtido o encerramento ou a redução da amplitude do defeito.

A primeira revisão sistemática da literatura sobre a utilização da regeneração guiada de tecidos nas lesões de furca foi efectuada por Jepsen e colaboradores (2002). Foram analisados 16 ensaios clínicos aleatórios e controlados (RCT), publicados até Maio de 2001, em que foram utilizadas membranas não-reabsorvíveis e reabsorvíveis, comparativamente à cirurgia de retalho (OFD). Desses estudos, 14 referiam-se a furcas de classe II (5 só mandibulares; 3 só maxilares; 6 mandibulares e maxilares) e dois estudos a furcas de classe III (1 maxilar e 1 mandibular). Devido ao número limitado de estudos envolvidos

na análise de cada parâmetro clínico, os autores não efectuaram os testes convencionais para correcção dos desvios em cada publicação. Por outro lado, devido à escassez e heterogeneidade do dados fornecidos nos estudos, não foi possível efectuar uma meta-análise que avaliaria se o encerramento da furca resultava do tratamento.

FURCA classe II		Mand	Max	Mand + Max
PDh	N	4	4	4
	WMD mm 95% CI	1,51* 0,39 - 2,62	1,05* 0,46 - 1,64	0,87 -0,08 - 1,82
CAL	N	6	2	5
	WMD mm 95% CI	1,77* 0,63 - 2,91	0,82* 0,47 - 1,18	0,62* 0,30 - 0,94
PDv	N	4	2	5
	WMD mm 95% CI	1,16* -0,20 - 2,52	0,79* 0,44 - 1,15	0,92* 0,45 - 1,38
ENCERRAMENTO COMPLETO		1 em 11	Vest. 2 em 10 Mesial 1 em 10 Distal 0 em 10	0 em 19 0 em 8

Quadro 2.3 - Diferenças na redução da profundidade horizontal da furca, no ganho do nível de inserção clínica medido verticalmente e na redução de profundidade de sondagem vertical, entre a GTR e a cirurgia de retalho, no tratamento de furcas de classe II. Número de furcas em que foi obtido o encerramento completo, comparado ao número total de furcas em cada estudo.

Abreviações: PDh = profundidade de sondagem horizontal na furca, medida na re-entrada; CAL = nível de inserção clínica; PDv = profundidade de sondagem vertical; n = número de estudos; WMD = diferenças na média ponderada (*weighted mean differences*); CI = Intervalo de confiança (*confidence interval*); * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Adaptado de Jepsen e colaboradores, 2002.

Desta revisão sistemática, destacamos as conclusões com implicação na prática clínica do tratamento de furcas de classe II (Quadro 2.3):

- o tratamento por GTR de furcas de classe II, tanto maxilares como mandibulares, melhora significativamente alguns dos parâmetros clínicos analisados: reduzem

- a profundidade de sondagem, vertical (PDv) e horizontal (PDh) e aumenta o nível de inserção clínica, medido vertical e horizontalmente;
- a cirurgia de retalho, pelo contrário, não apresenta alterações ou melhorias nesses parâmetros;
- O encerramento completo das furcas de classe II após a colocação de uma membrana é muito imprevisível: 0 a 66% com GTR (*versus* 0 a 10% com OFD).

Quanto ao tratamento de furcas de classe III, os dados revelaram-se tão escassos, insuficientes e heterogêneos que não possibilitaram a realização de qualquer tipo de análise (Jepsen *et al.* 2002).

Uma outra revisão sistemática da literatura foi publicada mais recentemente por Murphy e Gunsolley (2003): foram incluídos 26 estudos (24 estudos referiam-se ao tratamento de furca de classe II e 2 estudos ao tratamento de furca de classe III), dos quais 25 eram RCT, publicados até Janeiro de 2002. Como já referido, para além da comparação da GTR à OFD, esta revisão incluiu estudos que comparavam a GTR isoladamente com a GTR associada a materiais de preenchimento ósseo e estudos comparativos entre membranas não-reabsorvíveis e membranas reabsorvíveis.

Segundo esta revisão sistemática, o tratamento de furca de classe II com regeneração guiada de tecidos resulta num ganho de inserção clínica, quer vertical (CALv) quer horizontal (CALh), e numa redução da profundidade de sondagem vertical (PDv) significativamente superiores à cirurgia de retalho (Quadro 2.4), confirmando as conclusões da revisão sistemática apresentada por Jepsen e colaboradores (2002).

Ainda de acordo com esta revisão (Murphy e Gunsolley 2003), o tipo de membrana demonstrou influência nos resultados: só as membranas de e-PTFE e poliméricas aumentaram significativamente o ganho de inserção clínica vertical (Quadro 2.4).

Membranas	Colagénio	Polímero	e-PTFE
CALv	n 2 0,10 ± 0,60	n 1 2,50 ± 0,85	n 11 1,39 ± 0,36
PDv	n 1 - 0,04 ± 0,52	n 1 2,30 ± 0,74	n 11 1,01 ± 0,31
CALh	n 1 0,96 ± 0,91	dados insuficientes	n 7 0,99 ± 0,31

Quadro 2.4- Diferenças nas médias ponderadas (média ± desvio padrão), em mm, entre os diferentes tipos de membranas e a cirurgia de retalho, no tratamento de furcas.

Abreviações: CALv = nível de inserção clínica, medido verticalmente; PDv = profundidade de sondagem vertical; CALh = nível de inserção clínica, medido horizontalmente na re-entrada; n = número de estudos.

Adaptado de Murphy e Gunsolley, 2003.

Ao contrário do que foi verificado no tratamento dos defeitos infra-ósseos, a associação de uma membrana a um material de preenchimento ósseo revelou vantagens nos parâmetros clínicos analisados (CALv e PDv) comparativamente à utilização de uma membrana isoladamente. Estes resultados contrariam as conclusões de Sanz e Giovannoli (2000): com base nos ensaios clínicos controlados disponíveis (5 estudos), estes autores verificaram que a maior parte deles não demonstrava um benefício clínico significativo na associação de materiais de enxerto ósseo à GTR frente à GTR isoladamente, e para além disso, os resultados revelavam-se pouco previsíveis.

A análise dos subgrupos de membranas, demonstrou resultados mais significativos para as membranas não-reabsorvíveis (Murphy e Gunsolley 2003). De igual modo, também estes resultados contrariam as conclusões da revisão de Sanz e Giovannoli (2000) uma vez que, embora a diferença não fosse muito significativa, as membranas reabsorvíveis apresentavam resultados clínicos ligeiramente superiores.

Quanto aos resultados a longo prazo, a revisão sistemática de Murphy e Gunsolley (2003) não encontrou estudos que cumprissem os critérios de inclusão pré-definidos, de avaliação dos parâmetros clínicos 5 anos após o tratamento, pelo que os autores não puderam concluir se de facto a utilização de membranas aumentava o tempo de sobrevivência dos dentes tratados.

Concluimos assim que a regeneração guiada de tecidos é uma técnica regenerativa bem documentada, tanto em estudos experimentais em animais como em estudos clínicos e biópsias humanas, preenchendo os critérios propostos pela Academia Americana de Periodontologia (*Consensus Report* 1996) para que um tratamento possa ser considerado como regenerativo. Podemos afirmar que é uma técnica eficaz e previsível no tratamento de defeitos infra-ósseos e lesões de furca mandibulares de classe II. Quanto ao tratamento de furcas maxilares de classe II, os resultados com a GTR revelam-se variáveis e o tratamento de furcas de classe III é imprevisível.

b. ENXERTOS ÓSSEOS E MATERIAIS DE SUBSTITUIÇÃO

Uma outra abordagem na recuperação do suporte periodontal é representada pela regeneração do tecido ósseo alveolar a partir da colocação de vários tipos de enxertos ósseos nos defeitos infra-ósseos e de furca, durante a cirurgia periodontal. A utilização destes enxertos baseia-se no princípio de que a estimulação da regeneração óssea induz igualmente a formação de novo cemento radicular com fibras colagénicas nele inseridas (Fig. 2.2).

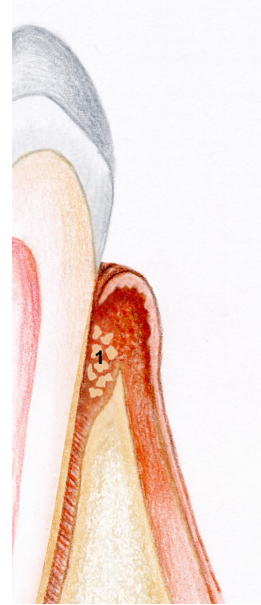
Os enxertos ósseos ou seus substitutos utilizados na regeneração óssea podem ser subdivididos em quatro categorias.

Os **enxertos de osso autógeno (auto-enxertos)** representados por fragmentos de tecido ósseo provenientes do mesmo indivíduo. Não apresentam

Figura 2.2 – Enxerto ósseo ou de materiais de substituição (1).

pois problemas de histocompatibilidade nem riscos de transmissão de doenças. São constituídos geralmente por osso cortical ou medular, com um número variável de células osteogénicas vivas que promovem a cicatrização óssea por osteogénese e/ou osteocondução. Na regeneração periodontal, dado que o volume necessário é mínimo, praticamente só são utilizados os enxertos autógenos de origem intra-oral, nomeadamente de cristas edêntulas, de alvéolos pós-extracção, da tuberosidade maxilar, do mento e da área mandibular retromolar. Os enxertos autógenos de origem extra-oral, particularmente de crista ilíaca, apesar de poderem fornecer volumes ósseos muito significativos, apresentam um período pós-operatório de maior morbidade, para além de se terem verificado alguns casos de reabsorção radicular após o enxerto (Rosen *et al.* 2000, Karring *et al.* 2003).

Na tentativa de eliminar o segundo local cirúrgico dos enxertos autógenos, desenvolveram-se os **enxertos de osso homólogo (alo-enxertos)**. Estes provêm de um dador da mesma espécie mas geneticamente diferente. Apresentam-se sob a forma de tecido ósseo não vivo, liofilizado ou congelado. O risco de rejeição do enxerto, assim como o de transmissão de doenças, ditaram o abandono dos alo-enxertos congelados. De igual modo, os alo-enxertos liofilizados, tanto os mineralizados (*mineralized freeze-dried bone allograft* - FDBA) como os desmineralizados (*demineralized freeze-dried bone allograft* - DFDBA), encerram em si o risco de poderem transmitir doenças, como a SIDA, a hepatite B, a hepatite C e a doença de Creutzfeldt-Jacob.



Contudo, este risco, apesar de real, é muito baixo, já que as normas actuais relativas à colheita, esterilização, e armazenamento deste tipo de enxertos são extremamente rigorosas (AAP, *Position paper* 2001c).

Os **enxertos de osso heterólogo (xeno-enxerto)** englobam os casos em que o receptor e o dador são de espécies diferentes, sendo na maioria das vezes de origem bovina (*bovine porous bone mineral* - BPBM; *anorganic bovine bone matrix* - ABM), embora tenham também já sido utilizados enxertos de origem porcina e coralina. Actualmente, novos métodos de processamento e purificação permitem a remoção de todo o componente orgânico do osso bovino, deixando a matriz óssea inorgânica inalterada. No entanto, os diversos enxertos comercializados, por diferenças no seu processamento, têm propriedades químicas diferentes e possivelmente diferentes comportamentos biológicos. Também os xeno-enxertos contêm o risco de poderem transmitir ao homem doenças de animais como, por exemplo, a encefalopatia espongiforme bovina. Como dissemos acima, este risco tem uma expressão muito diminuta já que os diversos fabricantes são, do mesmo modo que os bancos de tecido ósseo, obrigados a cumprir normas extremamente rígidas quanto à produção, esterilização e comercialização de tais enxertos. A utilização do esqueleto de coral como enxerto ósseo teve alguma expressão na década de oitenta. De acordo com o procedimento de preparação, o coral transforma-se numa hidroxiapatite porosa não reabsorvível ou num esqueleto de carbonato de cálcio, reabsorvível. Os **materiais aloplásticos** representam uma categoria heterogénea de materiais sintéticos, inorgânicos, biocompatíveis e/ou bioactivos, constituindo uma alternativa aos enxertos de origem animal. Na regeneração periodontal, são quatro os tipos de materiais aloplásticos mais utilizados: a hidroxiapatite particulada (cerâmica não reabsorvível ou não cerâmica reabsorvível), o beta fosfato tricálcico, dois polímeros (hidróxido de cálcio revestido por um copolímero de polimetilmetacrilato e polihidroxietilmetacrilato, não reabsorvível e polímero de ácido poliláctico, reabsorvível) e os biovidros particulados

(teoricamente reabsorvíveis) (Rosen *et al.* 2000, Karring *et al.* 2003).

Os diversos tipos de enxertos deverão apresentar pelo menos uma das três propriedades seguintes: osteogénica, osteoindutora e osteocondutiva.

A capacidade osteogénica caracteriza-se pela formação óssea a partir de células presentes no enxerto, as quais têm capacidade para se diferenciarem em osteoblastos. Estas células mesenquimatosas indiferenciadas encontram-se, para além de outras localizações, no tecido ósseo, na medula óssea e no perióstio. Esta característica é exclusiva dos enxertos autógenos (Rosen *et al.* 2000, Karring *et al.* 2003).

A capacidade osteoindutora caracteriza-se pela formação de tecido ósseo no tecido conjuntivo adjacente ao enxerto, através da acção de factores de diferenciação, as proteínas morfogenéticas ósseas, presentes na porção desmineralizada da matriz óssea. Estas proteínas possuem propriedades quimiotáticas e de diferenciação sobre as células mesenquimatosas. Esta é uma característica dos auto-enxertos e dos alo-enxertos, mais especificamente do DFDBA, estando ausente nos outros tipos de enxertos ósseos e materiais aloplásticos (Rosen *et al.* 2000, Karring *et al.* 2003).

A capacidade osteocondutora caracteriza-se pela possibilidade do enxerto se comportar como uma matriz de suporte para as células osteogénicas do hospedeiro, não contribuindo para a formação óssea de *per se*. Esta é a única propriedade comum a todos os materiais de enxerto (Karring *et al.* 2003).

Como estes enxertos e materiais de substituição óssea têm uma consistência sólida, possuem, para além das acções já inumeradas, uma acção mecânica de preenchimento de espaço. Na regeneração periodontal, esta característica é muito importante uma vez que previne o colapso do retalho, ajudando-o a manter-se longe da superfície radicular criando o espaço necessário para a colonização do coágulo por células provenientes do ligamento periodontal e do osso (Wikesjö *et al.* 1992).

A colocação de um material de preenchimento num defeito periodontal, não é

contudo sinónimo de regeneração periodontal. A completa regeneração dos tecidos periodontais significaria que as células do tecido ósseo tinham a capacidade de formar numa superfície radicular previamente afectada por doença periodontal, novo cemento radicular com novas fibras periodontais nele inseridas, para além de novo tecido ósseo. De facto este conceito não está de acordo com os conhecimentos actuais de cicatrização periodontal, segundo os quais só as células do ligamento periodontal têm a capacidade de formar um novo suporte periodontal. Para além disso, e para cumprir os pré-requisitos necessários para ser considerada uma técnica regenerativa, os estudos histológicos, tanto em humanos como em animais, deveriam demonstrar inequivocamente a formação do novo suporte periodontal. Os inúmeros estudos já publicados apresentam resultados contraditórios para alguns tipos de enxertos, enquanto que outros não comprovam a formação dos três tipos de tecidos envolvidos na regeneração periodontal. Alguns estudos demonstraram histologicamente a formação de novo cemento, novo ligamento periodontal e novo osso após o tratamento de uma lesão infra-óssea com enxertos autógenos (Hiatt *et al.* 1978, Stahl *et al.* 1983), alógenos (Bowers *et al.* 1989b,c, Reynolds e Bowers, 1996) e xenógenos (Camelo *et al.* 1998, Nevins *et al.* 2003b, Hartman *et al.* 2004); ao contrário outros demonstraram a formação de um epitélio juncional longo apesar da formação de novo osso ser variável, após a colocação quer de enxertos autólogos (Listgarten e Rosenberg 1979, Moskow *et al.* 1979, Caton *et al.* 1980), de enxertos alógenos (Dragoo e Kaldahl 1983, Stahl *et al.* 1983, Froum 1996) e de enxertos xenógenos (Carranza *et al.* 1987, Stahl e Froum 1987, Hartman *et al.* 2004). Os estudos que se referem a materiais aloplásticos são praticamente unânimes na ausência de regeneração periodontal, encontrando--se geralmente o material encapsulado num tecido conjuntivo denso (Listgarten e Rosenberg 1979, Caton *et al.* 1980, Stahl *et al.* 1983, Froum e Stahl 1987, Stahl e Froum 1987, Froum 1996, Nevins *et al.* 2000, 2003b).

Num artigo de revisão publicado recentemente (Reynolds *et al.* 2003), foram analisados 42 estudos que apresentavam dados histológicos sobre os tecidos regenerados após a aplicação de materiais de substituição óssea. Em estudos controlados, tanto os enxertos autógenos como o DFDBA (alo-enxerto) demonstraram evidência de regeneração de todos os tecidos periodontais. Uma matriz inorgânica óssea mineralizada (xeno-enxerto) demonstrou promover regeneração periodontal em algumas séries de casos clínicos. Pelo contrário, todos os materiais aloplásticos demonstraram uma cicatrização por reparação periodontal.

As vantagens clínicas da utilização destes materiais na regeneração periodontal foi essencialmente documentada em relatos de casos clínicos e em alguns estudos controlados. A avaliação da regeneração baseou-se na alteração do nível de inserção clínica, da profundidade de sondagem, de radiografias pós-operatórias e, em alguns casos, na observação directa do tecido regenerado durante a cirurgia de re-entrada (Hiatt *et al.* 1978, Altieri *et al.* 1979, Moskow *et al.* 1979, Meadows *et al.* 1993, Richardson *et al.* 1999, Nevins *et al.* 2000). De acordo com as conclusões do “2nd European Workshop on Periodontology” (Ouhayoun 1997), os enxertos ósseos, quer autólogos quer homólogos, tanto intra-orais como extra-orais, podem resultar na regeneração do suporte periodontal, mas tal só acontece nos casos de sucesso, cuja percentagem não pode, contudo, ser determinada pelos estudos publicados dada a pouca previsibilidade. Ainda segundo as mesmas conclusões, o auto-enxerto ósseo intra-oral, apesar de necessitar de um segundo local cirúrgico, representa um procedimento seguro e clinicamente aplicável, sendo a quantidade de osso disponível para colheita a sua única limitação.

São escassos os estudos que avaliam a longo prazo o tratamento de defeitos periodontais com a utilização destas técnicas. O tratamento de defeitos infra-ósseos com enxerto alógeno (DFDBA), demonstrou manutenção do ganho do nível de inserção clínica aos 36 meses (Flemmig *et al.* 1998) e aos 2 e 5

anos (Rosen *et al.* 1996). Ao fim de cinco anos, 86% dos defeitos infra-ósseos tratados com o enxerto aloplástico (hidroxiapatite cerâmica) mantiveram ou melhoraram o nível de inserção clínica, comparativamente a 62% dos defeitos tratados por cirurgia de retalho (Yukna *et al.* 1989). No tratamento de furca, a combinação de enxertos alógenos com GTR e condicionamento da raiz com ácido cítrico demonstrou estabilidade dos parâmetros clínicos ao fim de 5 anos (McClain e Schallhorn, 1993).

b.1. Tratamento de defeitos infra-ósseos

Trombelli e colaboradores (2002b) efectuaram a primeira revisão sistemática da literatura publicada até Junho de 2001, sobre a utilização de materiais de enxerto (auto-enxertos, alo-enxertos, xeno-enxertos, materiais aloplásticos e substâncias biomiméticas/factores de crescimento) no tratamento das lesões infra-ósseas. Só foram incluídos os estudos em que a unidade estatística se referia ao paciente e não ao defeito. Foram analisados 21 RCT, com pelo menos 6 meses de duração, nos quais se avaliavam auto-enxertos (1 estudo), alo-enxertos (7 estudos) e alguns materiais aloplásticos (carbonato de cálcio coralino - 4 estudos; biovidro - 4 estudos; hidroxiapatite - 5 estudos; copolímero de polimetilmetacrilato e polihidroxil-etilmetacrilato - 2 estudos; grânulos de ácido poliláctico - 1 estudo), comparativamente à cirurgia de retalho (OFD). É de destacar que não foi incluído nenhum estudo relativo à utilização de xeno-enxerto, nomeadamente a matriz inorgânica óssea mineralizada de origem bovina. Para além disso, esta revisão não teve por objectivo a comparação entre os diferentes tipos de materiais nem a avaliação histológica da sua capacidade regenerativa.

O único RCT que avaliou o osso autólogo comparativamente à OFD, indica um ganho de CAL superior para o enxerto, mas não é estatisticamente significativo. No que se refere ao ganho de CAL, verifica-se que com osso alógeno há um aumento ligeiro, mas não estatisticamente significativo. Com coral e com os

biovidros há um ganho de CAL estatisticamente significativo. As diversas formas de hidroxiapatite resultam num ganho de CAL significativamente superior à OFD, mas no entanto evidenciou-se uma grande heterogeneidade entre os estudos, questionando um benefício clínico previsível (Quadro 2.5).

Materiais de substituição óssea		Osso alógeno	Coral	Biovidro	Hidroxiapatite
CAL	N	6	4	4	4
	WMD mm 95% CI	0,36 -0,16 - 0,87	0,90* 0,53 - 1,27	1,04* 0,31 - 1,76	1,40* 0,64 - 2,16
PD	N	6	4	4	5
	WMD mm 95% CI	0,41* 0,16 - 0,66	0,04 -1,78 - 1,87	0,60* 0,20 - 1,00	0,98* 0,67 - 1,29

Quadro 2.5 - Diferenças no ganho de CAL e na redução de PD, entre os diferentes tipos de materiais de enxerto e a cirurgia de retalho, no tratamento de defeitos infra-ósseos.

Abreviações: CAL = nível de inserção clínica; PD = profundidade de sondagem; n = número de estudos; WMD = diferenças na média ponderada (*weighted mean differences*); CI = Intervalo de confiança (*confidence interval*); * diferença estatisticamente significativa.

Adaptado de Trombelli e colaboradores, 2002.

As meta-análises efectuadas para avaliação da redução da profundidade de sondagem, demonstram que tanto o osso alógeno, como os biovidros e as hidroxiapatites resultam em reduções significativas da PD quando comparadas com a OFD. Pelo contrário, o coral não produziu melhorias na profundidade de sondagem (Quadro 2.5).

O mesmo estudo sugere um benefício adicional no ganho de CAL e na redução da PD quando são utilizados os enxertos avaliados, à excepção dos grânulos de ácido poliláctico. Nesta revisão, foi notória a heterogeneidade dos resultados entre os estudos com coral e com hidroxiapatites, a qual pode derivar das diferenças no desenho dos estudos. No entanto, outros factores como a morfologia dos defeitos, factores técnicos e factores relacionados com os doentes podem afectar a variabilidade dos resultados clínicos.

Uma outra revisão sistemática da literatura, publicada posteriormente por Reynolds e colaboradores (2003), incluiu 66 estudos RCT, publicados até Outubro de 2002. Esses estudos referem-se ao tratamento de defeitos periodontais (infra-ósseos e furcas) com diversos materiais de substituição óssea comparativamente à cirurgia de retalho (OFD) ou a outras técnicas cirúrgicas como a GTR e ainda a comparação entre diferentes materiais de preenchimento ósseo.

No tratamento de defeitos infra-ósseos, foram seleccionados 30 RCT que avaliam diversos tipos de enxertos (auto-enxertos - 2 estudos; alo-enxertos - 12 estudos; fosfato de cálcio cerâmico - 5 estudos; biovidros - 4 estudos; carbonato de cálcio coralino - 3 estudos; ácido poliláctico - 1 estudo; polímero de polimetilmetacrilato e polihidroxil-etilmetacrilato - 1 estudo; cimento de hidroxiapatite - 1 estudo e glicosaminoglicano-HA - 1 estudo) comparando-os à OFD. Os resultados finais da meta-análise efectuada, permitem concluir que (Quadro 2.6):

- todos os materiais de substituição óssea avaliados, aumentam significativamente os níveis de inserção clínica;
- os materiais de substituição óssea avaliados reduzem significativamente a profundidade de sondagem, nomeadamente os alo-enxertos, os cerâmicos e os biovidros. Os dados relativos aos auto-enxertos reportam-se a um único estudo e o grupo dos coralinos não apresenta valores estatisticamente significativos;
- todos os materiais de substituição óssea avaliados reduzem a reabsorção da crista comparativamente à OFD, apesar de, tanto os enxertos autógenos, como os cerâmicos e os biovidros, não apresentarem valores estatisticamente significativos. No grupo dos alógenos, o DFDBA e o osso congelado fresco apresentam melhores resultados, o FDBA não está associado a melhorias no nível da crista óssea;
- todos os materiais de substituição óssea avaliados, à excepção dos biovidros, aumentam o preenchimento ósseo do defeito;

- a recessão gengival pós-operatória é semelhante para os dois procedimentos (enxerto e OFD).

Materiais de substituição óssea	autógeno	alógeno	cerâmicos	coralinos	biovidros
CAL	n 3 (51) 0,72 ± 1,82*	n 12 (136) 0,44 ± 2,25*	n 6 (58) 1,20 ± 2,22*	n 4 (60) 0,91 ± 1,94*	n 4 (78) 1,05 ± 1,89*
PD	n 1 (19) 0,60 ± 1,35	n 10 (127) 0,43 ± 2,25*	n 7 (90) 0,74 ± 2,12*	n 4 (60) 0,09 ± 2,16	n 4 (88) 0,71 ± 2,22*
Reabsorção crista	n 1 (28) -0,32 ± 1,38	n 11 (134) -0,43 ± 1,38*	n 5 (74) -0,19 ± 0,98	n 2 (30) 0,30 ± 0,62*	n 2 (30) -0,13 ± 0,94
Preenchimento ósseo	n 2 (47) 1,62 ± 1,53	n 13 (154) 1,06 ± 1,97	n 6 (82) 1,58 ± 1,77	n 3 (48) 2,21 ± 1,82	n 4 (74) 1,61 ± 1,47
Recessão gengival	Sem dados	n 7 (84) -0,01 ± 1,65	n 2 (46) -0,16 ± 1,34	n 3 (48) -0,25 ± 1,34	n 3 (68) -0,28 ± 1,81

Quadro 2.6 - Diferenças em mm (média ± desvio padrão), entre o ganho de CAL, a redução de PD, a redução de recessão, a redução da reabsorção da crista e o preenchimento ósseo, entre os diferentes tipos de materiais de substituição óssea e a cirurgia de retalho, no tratamento de defeitos infra-ósseos.

Abreviações: CAL = nível de inserção clínica; PD = profundidade de sondagem; n = número de estudos; (n) = números de indivíduos; * diferença estatisticamente significativa.

Adaptado de Reynolds e colaboradores, 2003.

A análise de 4 estudos que comparavam alo-enxertos particulados (DFDBA, FDBA) e hidroxiapatite particulada, permitiu concluir que não há diferenças nos parâmetros clínicos avaliados. A heterogeneidade dos resultados não foi significativa.

Com base na avaliação de outros 4 estudos comparativos, os mesmos autores concluíram que a associação da GTR aos enxertos ósseos aumenta o nível

de inserção clínica e diminui a profundidade de sondagem, de modo significativo e consistente, comparativamente aos enxertos isolados; quanto à recessão gengival, não havia diferenças significativas; quanto ao preenchimento ósseo do defeito, verificaram uma tendência para a obtenção de melhores resultados na terapêutica combinada, não sendo no entanto significativa.

De um modo geral, os resultados finais das meta-análises efectuadas na revisão de Reynolds e colaboradores (2003) corroboram e amplificam os resultados da revisão sistemática publicada por Trombelli e colaboradores (2002). Os critérios de inclusão destas duas revisões foram diferentes. Na revisão de Trombelli e colaboradores (2002) só foram incluídos RCT em que a unidade de medida era o doente e não o defeito periodontal, enquanto que na revisão de Reynolds e colaboradores (2003) foram incluídos ensaios controlados que apresentavam médias e estimativas de variância como resultados, independentemente da unidade de análise. Tal abordagem permitiu a inclusão de maior número de estudos, tornando a revisão de Reynolds e colaboradores (2003) mais equilibrada.

De um modo global, ao calcular a estimativa da quantificação do resultado, os enxertos resultaram no aumento do preenchimento ósseo, em média, de 1 a 2 mm superior à OFD. Já o ganho de CAL e a redução da PD situaram-se geralmente 0,5 a 1 mm acima dos valores obtidos na OFD. Estes valores são ligeiramente inferiores aos apresentados por outras estimativas do preenchimento ósseo do defeito que apresentaram valores entre os 2,3 a 3 mm (Brunsvold e Mellonig 1993). No artigo de revisão de Laurell e colaboradores (1998), o tratamento de defeitos infra-ósseos por diferentes técnicas, nomeadamente cirurgia de retalho, enxertos ósseos (autólogo, DFDBA e FDBA) e GTR, resultou em valores de preenchimento do defeito significativamente diferentes: 1,1 mm (OFD), 2,2 mm (enxertos ósseos) e 3,2 mm (GTR). No entanto, verifica-se que as diferenças entre a profundidade de sondagem inicial nos diferentes grupos são semelhantes às diferenças detectadas nos resultados, dificultando

a interpretação do valor real de preenchimento dos defeitos após cada terapêutica.

b.2. Tratamento de lesões de furca

No que se refere ao tratamento de furca, a única revisão sistemática publicada até à data foi a de Reynolds e colaboradores (2003), já referenciada no tratamento de defeitos infra-ósseos. Dos 15 estudos RCT, apenas 7 comparavam diferentes materiais de substituição óssea à cirurgia de retalho (OFD), reportando-se os restantes oito, à comparação entre diferentes materiais, entre materiais de preenchimento e GTR, isoladamente ou em associação com materiais de enxerto. Os materiais utilizados nestes estudos incluíram osso autólogo, osso alógeno, e materiais aloplásticos (hidroxiapatite, biovidro, polímero de polimetilmetacrilato e polihidroxietilmetacrilato e fosfato β -tricálcio). A frequência e distribuição dos materiais assim como os tipos de lesões de furca não permitiram a execução de uma meta-análise. Por outro lado, também não foi possível a formação de grupos de estudos que permitissem a comparação entre diferentes enxertos ou a comparação entre os enxertos e outras intervenções.

Apesar da insuficiência dos dados nos 7 estudos que comparavam os diferentes materiais de enxerto à OFD, foi possível demonstrar que a utilização de enxertos ósseos no tratamento de furca (classes II e III) resulta numa tendência ligeiramente positiva dos parâmetros clínicos do nível de inserção, da profundidade de sondagem e do preenchimento horizontal do defeito (Quadro 2.7); não há diferenças significativas para a recessão gengival pós-operatória e para a reabsorção da crista; no que se refere ao preenchimento horizontal do defeito, as diferenças são um pouco mais significativas, obtendo-se melhores resultados no tratamento com enxerto das furcas de classe II do que com OFD; no tratamento de furcas de classe III só foi analisado um estudo.

7 RCTs		Materiais de substituição óssea	OFD
CAL	F II mand	1,6 - 1,9	-0,04 - 1,5
	F III mand	2,2 - 2,6	0,43 - 1,5
PD	F II	1,9 - 2,31	0 - 1,8
	F III	0,7 - 2,43	-1,0 - 2,6
RE	F II e F III	0,2 - 1,7	0,70 - 1,7
Reabsorção da crista	F II e F III	0,4 - 1,7	0,3 - 1,4
Preenchimento horizontal do defeito	F II	1,6 - 3,4	-0,3 - 1,24
	F III	3,33	-0,16

Quadro 2.7 - Resultados em mm de cinco parâmetros clínicos, após o tratamento de furcas com materiais de substituição óssea e cirurgia de retalho (OFD), de acordo com avaliação de 7 estudos clínicos controlados e aleatórios (RCT).

Abreviações: CAL = nível de inserção clínica; PD = profundidade de sondagem; F II = envolvimento de furca de classe II; F III = envolvimento de furca de classe III.

Adaptado de Reynolds e colaboradores, 2003.

Nesta revisão sistemática (Reynolds *et al.* 2003), foram igualmente analisados 4 estudos que comparam os enxertos à terapia combinada com GTR (e-PTFE), no tratamento de furcas mandibulares. As médias dos preenchimentos vertical e horizontal dos defeitos são semelhantes para as duas modalidades de tratamento; no entanto, o maior ganho de preenchimento horizontal verifica-se com a terapia combinada. O impacto da terapêutica combinada demonstrou ser mais aparente no encerramento de furcas, especialmente nas de classe III. O encerramento completo das furcas de classe II revelou ser um resultado possível mas pouco previsível.

Ainda nesta revisão sistemática (Reynolds *et al.* 2003), foram analisados dois estudos que comparam o tratamento de furca com enxertos aloplásticos

(biovidro, polímero de polimetilmetacrilato e polihidroxietilmetacrilato) à GTR (e-PTFE). Os resultados não demonstram diferenças significativas entre os materiais, mas o número reduzido de estudos limita as conclusões.

De acordo com os estudos referenciados, a utilização de enxertos ósseos é uma técnica eficaz e previsível no tratamento de defeitos infra-ósseos e lesões de furca de classe II. Actualmente, são preferidos os xeno-enxertos, particularmente a matriz inorgânica óssea mineralizada, simples ou em associação com alguns mediadores biológicos, que focaremos posteriormente.

b.3. Peptídeo sintético P-15

Recentemente, baseando-se na biomimética, Bhatnagar e colaboradores (1999) desenvolveram, por engenharia genética, um peptídeo sintético, composto por uma sequência definida de 15 aminoácidos, em tudo semelhante a um potente domínio de ligação celular da cadeia alfa 1(I) do colagénio tipo I. A adição deste peptídeo, denominado P-15, a partículas de hidroxiapatite de origem bovina (ABM) estimulou a adesão de fibroblastos da derme humana, os quais formaram colónias tridimensionais, estabelecendo pontes entre as partículas adjacentes que se agregaram de um modo muito semelhante à estrutura do tecido ósseo (Qian e Bhatnagar 1996). A mesma organização espacial foi observada quando fibroblastos do ligamento periodontal foram cultivados em partículas de ABM/P-15, tendo igualmente sido observada a formação de matriz extracelular colagénica bem organizada, com focos de mineralização, significando que as células do ligamento periodontal tiveram uma matriz propícia à sua diferenciação e morfogénese. A associação ABM/P-15 poderia funcionar como uma matriz bioactiva, com características haptotáticas, na substituição dos enxertos ósseos (Bhatnagar *et al.* 1999, Lallier *et al.* 2001). Muito recentemente, Carinci e colaboradores (2004) obtiveram a primeira descrição genética dos efeitos do P-15 sobre uma linha celular

osteoblástica. Especificamente, o P-15 consegue modular a regulação do ciclo celular, a apoptose e a formação de proteínas estruturais.

Estudos pré-clínicos comprovaram que quando o ABM/P-15 era aplicado, quer em defeitos alveolares crônicos em cães (Barboza *et al.* 2002), quer em defeitos corticais da tíbia (Scarano *et al.* 2003) ou do crânio (Guerra, 2003) do coelho, havia uma formação activa de osso em todos os locais de teste. Os escassos estudos clínicos não controlados, confirmaram clínica e histologicamente que a associação de ABM/P-15 potenciava a formação óssea, tanto após a elevação cirúrgica do seio maxilar (Krauser *et al.* 2000) como em alvéolos pós-extracção (Hahn *et al.* 2003).

A utilização do ABM/P-15 na regeneração periodontal foi estudada pelo grupo de Yukna e colaboradores (1998; 2000; 2002b). Através de um estudo multicêntrico aleatório e controlado, compararam o ABM/P-15 com o DFDBA, com ABM e com OFD, no tratamento de defeitos infra-ósseos. Na re-entrada aos seis meses, o ABM/P-15 mostrou os valores mais elevados de preenchimento ósseo dos defeitos (73%), seguindo-se o ABM (51%), o DFDBA (51%) e por último a cirurgia de retalho (40%). Só foram apresentados os parâmetros clínicos de regeneração para o ABM/P-15, tendo sido feita a avaliação no momento da cirurgia, na re-entrada aos 6 meses e aos 3 anos. As diferenças revelaram-se significativas ($p < 0,05$) para todos os parâmetros entre a cirurgia e os 6 meses, e entre a cirurgia e os 3 anos, mas não foram significativas entre os 6 meses e os três anos, demonstrando uma boa estabilidade dos resultados a longo prazo.

Um caso clínico (Yukna *et al.* 2002b) mostrou histologicamente a formação de novo cimento, novo osso e novo ligamento periodontal sobre a superfície radicular exposta à doença periodontal após a aplicação de ABM/P-15. Contudo, a regeneração observada foi muito reduzida, estando limitada à área do entalhe efectuado na superfície radicular, não se observando tecido regenerado acima desta marca. Para além disso, antes da aplicação de ABM/

P-15, a superfície radicular foi condicionada com ácido cítrico, o que altera a atribuição do potencial regenerador exclusivamente ao ABM/P-15.

São necessários mais estudos, quer clínicos quer histológicos, de modo a certificar a capacidade de regeneração periodontal do peptídeo sintético P-15.

c. BIOMODIFICAÇÃO DA RAIZ

A periodontite produz importantes alterações na superfície radicular que ficou exposta na bolsa periodontal. A inflamação induzida pela placa bacteriana destrói as fibras de colagénio do ligamento periodontal, tornando a superfície radicular hipermineralizada. Algumas bactérias e suas endotoxinas, outros produtos orgânicos de origem exógena e produtos inflamatórios podem impregnar-se no cimento e/ou na dentina. Podem igualmente ocorrer descalcificações e cáries radiculares. A presença de material residual antigénico pode desencadear um recrutamento excessivo de neutrófilos, com a libertação exagerada de enzimas proteolíticas que assim vão retardar a formação da matriz de fibrina-fibrinogénio, logo na primeira fase de cicatrização (Wikesjö *et al.* 1992). Estas alterações da superfície radicular são incompatíveis com a regeneração periodontal.

Ao considerarmos a superfície radicular como uma das margens da lesão que queremos regenerar, um passo fundamental da terapêutica consiste na alteração dessa superfície exposta ao processo patológico, de modo a torná-la apropriada à adsorção das proteínas plasmáticas e subsequente adesão da fibrina e fibronectina, e posterior migração, adesão, colonização e proliferação das células progenitoras do tecido conjuntivo periodontal.

A raspagem e alisamento radicular constitui um método de tratamento mecânico da superfície radicular afectada pela doença periodontal e tem como objectivo a desintegração da placa bacteriana infragengival e a remoção de cálculos

radiculares e de cimento impregnados pelos produtos exógenos referidos anteriormente. Este tratamento mecânico é o procedimento basilar do plano de tratamento das periodontites.

Para além do tratamento mecânico, alguns autores preconizam o tratamento químico da superfície radicular para otimizar as condições de cicatrização, designando-o por biomodificação radicular.

Passamos então a descrever os compostos mais utilizados no tratamento químico da superfície radicular.

c.1. Condicionamento ácido da superfície radicular

O condicionamento ácido da superfície radicular consiste na aplicação tópica de soluções aquosas de alguns ácidos, entre os quais figuram o ácido cítrico, o ácido fosfórico, o ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) e o cloridrato de tetraciclina (TTC). Geralmente, a solução é aplicada durante a cirurgia periodontal, sobre a superfície radicular afectada, após a raspagem e alisamento. O tratamento com soluções ácidas remove a *smear layer* criada durante a raspagem e desmineraliza a superfície, expondo as fibras intrínsecas da matriz do cimento ou da dentina. Estas facilitam a adesão do coágulo à superfície radicular, potenciando a migração e a adesão de células com capacidade de regeneração, prevenindo a proliferação apical das células epiteliais (Vanheusden *et al.* 1999). Por outro lado, a exposição das fibras colagénicas parece aumentar a retenção de moléculas bioactivas e induzir a diferenciação de células mesenquimatosas em cementoblastos. O cloridrato de tetraciclina, para além da sua acção desmineralizadora (Trombelli *et al.* 1994, 1995), parece ter uma acção antimicrobiana local (Stabholz *et al.* 1993) assim como uma acção anti-colagenase (Golub *et al.* 1984).

A modificação da superfície radicular por acção de ácidos representa o tratamento mais antigo e frequentemente utilizado na regeneração periodontal. Contudo, actualmente, a sua aplicação clínica não é consensual.

Estudos *in vitro* demonstraram que a descalcificação da superfície radicular criava condições mais favoráveis à adesão e migração de células dos tecidos conjuntivos gengivais (Pitaru e Melcher 1987, Fardal e Lowenberg 1990, Bergenholtz e Babay 1998). Vários estudos em animais demonstraram que a aplicação de ácido cítrico (Register e Burdick 1975, Crigger *et al.* 1978, Ririe *et al.* 1980), de cloridrato de tetraciclina (Wikesjö *et al.* 1988) ou de EDTA (Blomlöf e Lindskog 1995b, Blomlöf *et al.* 1996) beneficiava a cicatrização das lesões experimentais no sentido da regeneração. No entanto, frequentemente foram observados fenómenos de anquilose (Bogle *et al.* 1981, Wikesjö *et al.* 1988), de reabsorção radicular (Magnusson *et al.* 1985, Wikesjö *et al.* 1988) e de recessão gengival (Nyman *et al.* 1981, Isidor *et al.* 1985, Wikesjö *et al.* 1991). Para além destes efeitos secundários, verificou-se que o pH ácido de alguns desses agentes condicionantes pode causar a necrose dos tecidos periodontais não calcificados (Blomlöf *et al.* 1995, Blomlöf e Lindskog 1995a). A sua utilização em humanos está publicada em inúmeros casos clínicos, isoladamente ou em associação com GTR e/ou com enxertos ósseos, com resultados pouco esclarecedores (Cole *et al.* 1980, 1981, Stahl *et al.* 1983, Lowenguth e Blieden 1993). Os escassos estudos clínicos controlados não são consensuais (Smith *et al.* 1986, Moore *et al.* 1987, Alger *et al.* 1990, Fuentes *et al.* 1993, Mayfield *et al.* 1998).

Segundo as conclusões do “*2nd European Workshop on Periodontology*” (Klinge 1997), o condicionamento radicular com ácido cítrico potencia a formação de uma nova adesão periodontal em animais, assim como em algumas biópsias humanas. Porém, os resultados dos estudos clínicos não evidenciam benefícios da sua utilização.

Na revisão sistemática da literatura publicada recentemente por Mariotti (2003), que incluiu 34 estudos (26 - ácido cítrico, 5 - tetraciclina, 3 - EDTA), verifica-se haver evidência histológica de regeneração em 4 de 8 estudos com ácido cítrico, em 1 estudo com tetraciclina e em nenhum dos 3 estudos com EDTA.

A meta-análise dos 28 estudos clínicos revistos, nenhum dos quais considerado como aleatório, não mostrou efeitos significativos no ganho de inserção clínica nem na redução da profundidade de sondagem, após o tratamento das superfícies radiculares com os três ácidos testados.

Apesar destes resultados, alguns autores continuam a defender a aplicação de condicionadores ácidos conjuntamente com outras técnicas regenerativas, nomeadamente na GTR associada a enxertos ósseos (McClain e Schallhorn 2000), previamente à aplicação de factores de crescimento (Nevins *et al.* 2003a) ou do derivado das proteínas da matriz do esmalte (Heijl *et al.* 1997).

c.2. Mediadores biológicos na regeneração periodontal

A cicatrização periodontal envolve uma sequência complexa de acontecimentos, que pode ser pontualmente estimulada através da aplicação de factores de crescimento ou de diferenciação, de proteínas de adesão e de proteínas da matriz extracelular. O efeito destes mediadores biológicos é transitório, mas desencadeia uma cascata de eventos celulares, como por exemplo a quimiotaxia, a proliferação, a diferenciação ou a angiogénese, o que conduz à formação dos novos tecidos. Apesar de, teoricamente, se justificar a utilização de mediadores biológicos nas terapêuticas regenerativas periodontais, só um pequeno número está a ser estudado, entre os quais destacamos alguns factores de crescimento e outras proteínas extracelulares.

c.2.1. Factores de crescimento

Os factores de crescimento têm um papel importante na regulação da migração, proliferação e diferenciação celulares podendo influenciar o metabolismo celular de várias formas. Alguns actuam como factores competentes (*competency*) estimulando as células a iniciar mitose (fase G0 do ciclo celular), enquanto que outros actuam como factores de progressão (*progression*) que estimulam a síntese de DNA e completam o ciclo celular (fase G1 à S) (Cochran e Wozney,

1999). Os factores de crescimento têm diversos aspectos em comum: são hormonas polipeptídicas; exercem a sua actividade ligando-se a receptores específicos na membrana celular; na sua maioria actuam localmente (autócrinos ou parácrinos); são produzidos por vários tipos de células (plaquetas, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais, monócitos, macrófagos, etc.); e são multifuncionais, podendo estimular uma grande variedade de actividades celulares (Graves *et al.* 1994).

A aplicação exógena de factores de crescimento no tratamento periodontal, tem por objectivo potenciar a acção dos factores que geralmente são produzidos durante a cicatrização periodontal, regenerando de um modo completo e previsível os tecidos periodontais perdidos. Em alguns modelos pré-clínicos, factores como os derivados das plaquetas (*platelet-derived growth factors* - PDGF), os *insulin-like* (*insulin-like growth factors* - IGF), os fibroblásticos (ácido e básico) (*fibroblast growth factors* - FGF), os de transformação beta (*transforming growth factors beta* - TGF- β) e as proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic proteins* - BMP), estimularam a migração e proliferação de fibroblastos periodontais e osteoblastos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Tanto o PDGF, isoladamente ou em associação com o IGF, como algumas BMP parecem ser os factores com resultados mais promissores na regeneração periodontal (Callens 1997).

c.2.1.1. Factores de Crescimento Derivados das Plaquetas

A principal fonte de PDGF são os grânulos das plaquetas, mas podem ser produzidos por outras células. O PDGF é um dos principais factores da cicatrização. É uma molécula dimérica que pode existir como um heterodímero (PDGF-AB) ou homodímero (PDGF-AA, PDGF-BB), dependendo dos genes presentes (PDGFA, PDGFB). Este factor é caracterizado como um factor competente porque torna as células aptas para a divisão celular. Para induzir a mitose, é necessária a presença de um factor de progressão como o IGF.

Estudos *in vitro* evidenciaram a capacidade da associação PDGF/IGF em estimular a mitose e a quimiotaxia de fibroblastos do ligamento periodontal, de cementoblastos e de osteoblastos (Giannobile 1999). Estudos pré-clínicos, demonstraram que a aplicação de PDGF, isoladamente ou em associação com IGF, potencia a regeneração periodontal, tanto no modelo canino (Lynch *et al.* 1991, Giannobile *et al.* 1994, Wang *et al.* 1994) como em primatas não humanos (Rutherford *et al.* 1992, 1993, Giannobile *et al.* 1994, 1996). Dois trabalhos recentes, relatam casos clínicos em que a aplicação do recombinante humano do factor de crescimento derivado das plaquetas (rhPDGF-BB) promoveu a regeneração periodontal, comprovada por histologia, tanto em defeitos infra-ósseos interproximais como em furcas de classe II (Camelo *et al.* 2003, Nevins *et al.* 2003a). Até ao momento, só foi publicado um estudo clínico controlado randomizado que avaliou a combinação de rhPDGF-BB com a recombinante humana do factor de crescimento *insulin-like* (rhIGF-I) em defeitos periodontais. Os autores concluíram que a dose testada mais elevada (150 µg/ml) resultou numa significativa regeneração óssea, mais marcada nos defeitos de furca do que nos defeitos infra-ósseos; no entanto, não se procedeu à análise histológica dos tecidos regenerados (Howell *et al.* 1997).

Os estudos *in vivo* evidenciaram algumas dificuldades na utilização destes factores, designadamente a determinação da concentração mais adequada, o sistema de libertação, a associação de vários factores ou a combinação com outras técnicas regenerativas. Os factores de crescimento aplicáveis à regeneração periodontal apresentam ainda algumas limitações como o reduzido conhecimento da sequência de diferenciação das células periodontais, as células alvo que devem ser moduladas por estes factores e a estabilidade dos tecidos formados sob a influência destes factores (Bartold *et al.* 2000).

Giannobile e Somerman (2003) efectuaram uma revisão sistemática da literatura publicada até Abril de 2002, sobre a utilização de factores de crescimento (PDGF e BMP) no tratamento de defeitos periodontais. Foram

escrutinados 23 estudos, dos quais 21 se referem a estudos pré-clínicos aleatórios e controlados, enquanto que só 2 se reportam a estudos em humanos. Destes últimos, só o estudo de Howell e colaboradores (1997), já descrito anteriormente, se refere ao tratamento de lesões periodontais com factores de crescimento; o outro estudo refere-se ao tratamento com BMP (Bowers *et al.* 1991). Tal escassez de dados, impossibilitou a realização de qualquer meta-análise dos resultados.

A utilização do plasma rico em plaquetas representa um modo alternativo de aplicação de factores de crescimento. O PRP é desenvolvido a partir de sangue autólogo que, depois de centrifugado por gradientes de densidade, é dividido em três componentes: o plasma pobre em plaquetas, o plasma rico em plaquetas (*platelet-rich plasma* - PRP) e as células vermelhas. O PRP representa uma concentração de 338% de plaquetas, tendo sido identificados os factores de crescimento PDGF e TGF- β , também eles muito concentrados: 440,6% e 346,6% respectivamente (Marx *et al.* 1998, Okuda *et al.* 2003). A adição de cálcio e trombina activa a libertação destes factores e inicia a formação de um coágulo de fibrina. Este potencia as propriedades osteocondutoras do PRP e melhora a qualidade de manuseio do material. Esta terapêutica tem sido essencialmente utilizada na regeneração óssea. O PRP pode ser aplicado isoladamente ou em combinação com enxertos ósseos, mais frequentemente osso autólogo e xeno-enxertos. Os resultados de alguns estudos clínicos publicados parecem demonstrar uma aceleração da formação do osso (Marx *et al.* 1998). No entanto, são necessários mais estudos *in vitro* para determinar se outros factores de crescimento contribuem para a eficácia desta técnica (Oringer 2002). A eficácia do PRP na regeneração óssea está limitada à publicação de casos clínicos (Keith 2004) e de alguns estudos não controlados (Anitua 1999, Mazor *et al.* 2004), pelo que são necessários estudos clínicos controlados e aleatórios. Na recente revisão sistemática da literatura

sobre o efeito das técnicas de elevação do seio maxilar na longevidade dos implantes endo-ósseos, Wallace e Froum (2003) concluíram que não havia dados suficientes para recomendar o uso do PRP numa cirurgia de enxerto do seio maxilar.

Estudos *in vitro* demonstraram que o PRP estimulou a síntese de ADN por células osteoblásticas, por fibroblastos gengivais e por células do ligamento periodontal, mas no entanto inibiu a divisão de células epiteliais, sugerindo uma modulação da proliferação celular de um modo específico para cada tipo celular (Okuda *et al.* 2003). Para além dessa acção celular, o coágulo de fibrina que se formou logo após a aplicação do PRP no meio de cultura, estimulou a síntese de colagénio na matriz extracelular (Kawase *et al.* 2003). Estas acções, demonstradas *in vitro*, sugerem um potencial efeito na cicatrização periodontal no sentido da regeneração.

A utilização do PRP na regeneração periodontal tem sido relatado em algumas séries de casos clínicos, mas sempre em associação com outras técnicas como a GTR, os enxertos ósseos e os enxertos conjuntivos (de Obarrio *et al.* 2000, Petrungraro 2001). O tratamento combinado triplo (PRP/xeno-enxerto/GTR) de defeitos infra-ósseos, resultou no ganho de inserção clínica, na redução da profundidade de sondagem e no maior preenchimento do defeito, comparativamente à GTR isoladamente, sendo as diferenças estatisticamente significativas (Camargo *et al.* 2002). No entanto, comparativamente ao tratamento combinado de PRP/xeno-enxerto, as diferenças não foram estatisticamente significativas (Lekovic *et al.* 2002). Da conjugação dos resultados destes estudos, os autores sugeriram que a combinação com GTR não trazia nenhum benefício clínico à terapêutica. Recentemente, Lekovic e colaboradores (2003) compararam o mesmo tipo de abordagem tripla à OFD, mas no tratamento de envoltimentos de furca mandibulares de classe II. Os resultados clínicos favoreceram claramente a combinação de PRP/xeno-enxerto/GTR. No entanto, devido ao protocolo utilizado, não foi possível identificar qual

dos três componentes do tratamento foi o responsável pelos resultados. Para além dos escassos estudos clínicos existentes sobre a regeneração periodontal com PRP, não foi ainda publicada qualquer avaliação histológica de biópsias humanas, que confirme o tipo de cicatrização periodontal, se por reparação se por regeneração periodontal. Por todos estes factos, esta técnica ainda não preencheu a totalidade dos pré-requisitos necessários para, segundo a Academia Americana de Periodontologia, ser considerada uma técnica regenerativa periodontal.

c.2.1.2. Proteínas morfogenéticas ósseas

As proteínas morfogenéticas ósseas (*Bone Morphogenetic Proteins* - BMP) são factores reguladores que pertencem à grande família dos factores de crescimento de transformação beta (TGF- β). As BMP são um grupo particular de factores de crescimento constituído por polipeptídeos de baixo peso molecular, cuja função mais importante é a regulação da formação óssea e cartilaginosa durante o desenvolvimento embrionário e, na vida pós-natal, da regeneração desses tecidos. Inúmeros estudos pré-clínicos, *in vivo*, demonstraram a capacidade de as BMPs induzirem a formação de osso numa grande variedade de localizações anatómicas, algumas delas ectópicas (Cochran e Wozney 1999). As BMPs podem ser produzidas por osteoblastos e são armazenadas na matriz óssea, ligando-se ao colagénio tipo IV.

Diversos estudos pré-clínicos avaliaram o potencial biológico das formas recombinadas das BMPs, especialmente da recombinante humana da proteína morfogenética óssea-2 (rhBMP-2) (Ripamonti e Reddi 1994, Sigurdsson *et al.* 1995, 1996, Kinoshita *et al.* 1997, Wikesjö *et al.* 1999, Selvig *et al.* 2002) e da recombinante humana da proteína morfogenética óssea-7 (rhOP-1/BMP-7) (Ripamonti *et al.* 1996, Giannobile *et al.* 1998, Ripamonti *et al.* 2001). Os resultados obtidos, embora contraditórios, demonstraram que a utilização das BMPs em alguns casos aumentava a formação de novo osso, novo cimento e

novo ligamento periodontal em defeitos críticos, apesar de os tecidos regenerados não apresentarem uma distribuição e localização fisiológica. Reabsorções radiculares e anquilose foram observações frequentes (Wikessjö *et al.* 1999, Selvig *et al.* 2002).

A primeira utilização em humanos de BMP foi publicada por Bowers e colaboradores (1991). A aplicação de DFDBA com um extracto parcialmente purificado de osteogenina (BPM-3) resultou na regeneração periodontal de defeitos infra-ósseos, mais significativa nas raízes mantidas submersas por um retalho gengival, do que nas transgengivais. No entanto, foram observados pequenos pontos de anquilose nas raízes submersas. Este foi, aliás, o único estudo em humanos referenciado na revisão sistemática da literatura realizada por Giannobile e Somerman (2003), à qual já nos referimos.

Dos estudos, quer experimentais, quer clínicos, publicados até à data podemos concluir que a aplicação de BMPs pode promover uma regeneração substancial do osso alveolar e a formação de novo cimento e de novo ligamento periodontal. No entanto, a anquilose foi uma observação muito frequente, o que compromete a regeneração periodontal desejada.

As BMPs têm sido associadas a enxertos ósseos, com o objectivo de adicionar o poder osteoindutor das proteínas ao poder osteocondutor do enxerto. Esta associação tem sido utilizada essencialmente na regeneração óssea, designadamente em defeitos peri-implantares experimentais (Cochran *et al.* 1999, Sigurdsson *et al.* 2001, Sykaras *et al.* 2001), na elevação do pavimento do seio maxilar (Boyne *et al.* 1997, Van den Bergh *et al.* 2000) e nos procedimentos de preservação ou de aumento da crista alveolar (Cochran *et al.* 2000, Fiorellini e Nevins 2003). Apesar dos bons resultados clínicos obtidos por alguns autores, esta técnica de regeneração óssea tem-se revelado pouco previsível. Até à data, não há evidência científica suficiente que ateste a eficácia superior desta opção terapêutica.

c.2.2. Proteínas de adesão

A fibronectina é uma glicoproteína presente no soro e é produzida por uma grande variedade de células. A sua principal função é promover a adesão das células à matriz extracelular, pelo que tem um papel importante na cicatrização. Na regeneração periodontal, a fibronectina tem sido utilizada após o condicionamento ácido da superfície radicular, com o objectivo de facilitar a adesão do tecido conjuntivo. Estudos *in vitro*, demonstraram que a fibronectina aumentava a adesão e a proliferação de fibroblastos sobre discos de dentina, enquanto que decrescia a adesão das células epiteliais (Terranova *et al.* 1986). Nos estudos *in vivo*, pré-clínicos, os resultados obtidos foram contraditórios. A sua utilização isolada, sobre superfícies radiculares não desmineralizadas, não provocou qualquer alteração da reparação conjuntiva, enquanto que a aplicação após o condicionamento com ácido cítrico aumentava a adesão conjuntiva (Caffesse *et al.* 1985). Pelo contrário, Wikesjö e colaboradores (1988) demonstraram que o mesmo tratamento combinado não desencadeou qualquer efeito sobre a reparação conjuntiva. Nos escassos estudos clínicos já publicados, os resultados foram igualmente contraditórios (Caffesse *et al.* 1988a, Alger *et al.* 1990). Com base nos conceitos actuais, a sua utilização como técnica regenerativa periodontal não se justifica (Callens 1997, Cochran e Wozney 1999).

Em resumo, apesar dos estudos *in vitro* demonstrarem a eficácia de alguns mediadores biológicos na regeneração dos tecidos periodontais, são muitos os testes pré-clínicos com resultados negativos ou demonstrativos de uma capacidade regenerativa muito limitada. Os estudos clínicos publicados demonstram que esses mediadores biológicos têm, de um modo geral, uma capacidade regenerativa limitada e pouco previsível.

Este é actualmente um campo de grande investigação. São inúmeras as questões por esclarecer quanto à sua utilização na regeneração periodontal,

designadamente: quais os factores de crescimento e de diferenciação mais importantes? Qual a sua sequência temporal de administração? Qual a dose mínima eficaz para cada um deles? Qual o sistema de libertação mais adequado aos diferentes defeitos periodontais?

Certamente que teremos de aguardar ainda alguns anos, para que os mediadores biológicos constituam uma alternativa terapêutica segura, eficaz e previsível na regeneração periodontal.

c.2.3. Proteínas da matriz extracelular

A ideia de que o fenómeno da diferenciação cementoblástica é estimulado por proteínas da matriz do esmalte produzidas pela bainha epitelial de Hertwig foi apresentada pela primeira vez por Slavkin (1976) e confirmada por estudos subsequentes (Hammarström 1997). Estas proteínas da matriz extracelular do esmalte estão igualmente envolvidas na formação do ligamento periodontal e do osso alveolar na fase embrionária do folículo dentário (Gestrelius *et al.* 1997b). Assim, a aplicação de proteínas da matriz do esmalte sobre a superfície radicular exposta à doença periodontal representa actualmente uma terapêutica alternativa de regeneração periodontal, baseada nos princípios da biomimética. Esta terapêutica irá ser desenvolvida pormenorizadamente no terceiro capítulo deste trabalho.

d. ENGENHARIA TECIDULAR COM CÉLULAS VIVAS

A engenharia de tecidos é um novo campo de investigação que tem por objectivo a criação de tecidos para substituir tecidos danificados ou doentes. Esta área integra a pesquisa de materiais biocompatíveis que sirvam de “andaime” (*scaffold*), de culturas de células específicas e de moléculas de

sinalização (Fig. 2.3). Esta estratégia é extremamente atractiva quando não são conhecidos os factores de crescimento de um determinado tecido ou ainda quando é necessária uma grande quantidade de tecido ou de órgãos, ou quando a substituição do tecido tem que ser imediata. A criação por engenharia de tecidos de um equivalente de derme é um exemplo de sucesso clínico no tratamento de queimados. Recorrendo a esta nova estratégia já foram regenerados outros tecidos, como osso, cartilagem e músculo (Bartold *et al.* 2000, Baum e Mooney, 2000).

Na Medicina Dentária e especificamente em Periodontologia, esta nova área tem um significativo potencial clínico, tanto na regeneração periodontal como na regeneração óssea.

Das muitas estratégias desenvolvidas para criar novos tecidos e órgãos, a maioria delas associam um material de enxerto a mediadores biológicos ou a células cultivadas em laboratório. Os mediadores biológicos periodontais já foram por nós referidos anteriormente, podendo-se incluir os diversos factores de crescimento e algumas proteínas extracelulares. As células cultivadas em laboratório a partir de uma pequena biópsia, depois de expandidas, são perfundidas directamente na lesão ou, em alternativa, vão colonizar um estrutura biodegradável que então é implantada no local a reparar. As células deverão ser autólogas ou compatíveis de modo a não serem rejeitadas por processos imunológicos. Esta técnica permite igualmente a manipulação das células, antes da sua implantação.

Pini Prato e colaboradores (2000) apresentaram um caso clínico de aumento da gengiva queratinizada, através do enxerto de uma membrana de ácido hialurónico tridimensional sobre a qual foram cultivados fibroblastos gengivais, previamente obtidos por uma pequena biópsia gengival. Mais recentemente, num estudo experimental em ratos, foram implantadas subcutaneamente matrizes tridimensionais previamente semeadas com cementoblastos, fibroblastos do ligamento periodontal e células do folículo dentário. Passadas

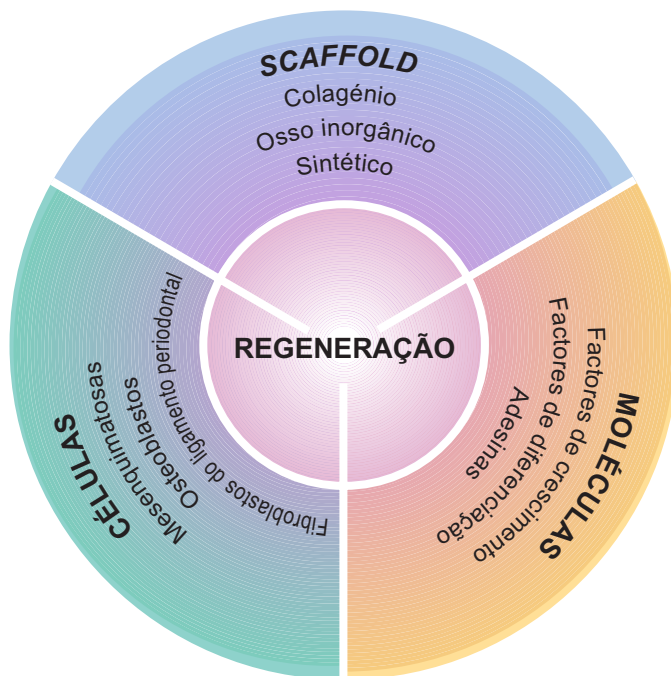


Figura 2.3 - Factores envolvidos na regeneração periodontal por engenharia tecidual.

Adaptado de Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics. Quintessence Publishing Co, Inc. Chicago, 1999.

seis semanas, foram detectados focos de mineralização nos implantes portadores de cementoblastos e em todos os implantes foi detectado colagénio do tipo I e XII, osteocalcina e sialoproteína óssea, sugerindo que este meio de aplicação de células através de uma matriz pode promover a regeneração periodontal (Jin *et al.* 2003b). Esta é de facto uma área de investigação muito promissora para a regeneração periodontal.

e. TERAPÊUTICA GENÉTICA

A terapêutica genética não é geralmente considerada um exemplo de engenharia de tecidos. Contudo, a transferência de genes para células bem diferenciadas pode representar uma técnica alternativa para a regeneração de um tecido (Baum e Mooney 2000). Apesar dos inúmeros protocolos em investigação por todo o mundo, a aplicação clínica desta nova modalidade terapêutica ainda está numa fase muito incipiente, tendo sido especialmente desenvolvidos estudos na área da terapêutica oncológica.

Também na regeneração periodontal, a terapêutica genética é uma área de investigação activa, tentando, através da transferência de genes para células periodontais, modular a sua actividade e capacidade regenerativa. Nos defeitos periodontais, a terapêutica genética proporciona um método prolongado de libertação de factores de crescimento, alternativo à sua administração directa, a qual se caracteriza por uma semivida extremamente curta. Recorrendo à integração de um transgene de PDGF num vector viral transitório (adenovírus), foi possível modular a actividade de cementoblastos (Giannobile *et al.* 2001) e de outras células do periodonto (Zhu *et al.* 2001). Recentemente, Jin e colaboradores (2003a) demonstraram pela primeira vez, em modelo animal, que a transferência *ex vivo* de genes de BMP-7 resultava na regeneração óssea de defeitos experimentais.

Será possível prever, num futuro próximo, a aplicação da engenharia de todos os tecidos periodontais, através de complexos híbridos aloplásticos biomiméticos resultantes da combinação de materiais biocompatíveis com tecidos vivos. Esta nova abordagem alenta grandes expectativas na regeneração periodontal *ad integrum* dos tecidos perdidos durante o processo patológico.

DERIVADO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE

III- DERIVADO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE

Como escrevemos anteriormente (c.2.3.) a aplicação de um derivado das proteínas da matriz do esmalte sobre a superfície radicular exposta à doença periodontal representa actualmente uma terapêutica alternativa de regeneração periodontal.

Assim, no presente capítulo procuraremos expor em pormenor os seus princípios biológicos e rever os múltiplos estudos experimentais e clínicos sobre a sua utilização.

a. RACIONALIZAÇÃO - CONCEITOS ACTUAIS DE REGENERAÇÃO

De acordo com Bartold e colaboradores (2000), os procedimentos regenerativos utilizados no passado, assim como os utilizados actualmente, demonstram resultados muito limitados por uma série de razões, nomeadamente:

- incapacidade de controlar a formação de um epitélio juncional longo,
- incapacidade de selar adequadamente o local de cicatrização do meio oral externo, de modo a prevenir infecções pós-operatórias da membrana ou do material regenerativo utilizado,
- restrição da regeneração ao tecido ósseo, ignorando os processos regenerativos no tecido conjuntivo e no cimento,
- incapacidade de definir com precisão os factores de crescimento e de diferenciação necessários à regeneração,
- a possibilidade dos factores de crescimento poderem não ser suficientemente discriminativos na sua capacidade de induzir regeneração, e assim será necessário prever a indução de factores de transcrição previamente à estimulação celular.

Durante um qualquer processo cicatricial, é necessária a participação de várias moléculas reguladoras e tipos celulares, em etapas subsequentes: inflamação, granulação, formação de tecidos e remodelação tecidual. A forma pela qual os tecidos cicatrizam, quer por regeneração quer por reparação, é determinada pelo menos por três factores que não se excluem entre si, designadamente: a disponibilidade das células apropriadas, os mediadores da função celular que activam essas células e o desenvolvimento de uma matriz extracelular.

Para que ocorra regeneração periodontal é fundamental que o local de cicatrização esteja isolado e protegido do ambiente oral. Essa selagem pode ser obtida pela adesão das células epiteliais à superfície radicular. Mas é fundamental impedir a proliferação dessas mesmas células ao longo da raiz, excluindo-as do local de cicatrização, já que elas não têm potencial regenerativo.

Os fenómenos relacionados com a regeneração periodontal são extraordinariamente complexos e requerem, para além do componente inflamatório inicial, a participação de todos os tipos celulares do periodonto. A regeneração periodontal tem a particularidade de coordenar e integrar componentes dos tecidos moles e dos tecidos calcificados, de modo a que as novas fibras do ligamento periodontal se insiram no novo cimento e no novo osso. Assim, estão envolvidas células progenitoras de fibroblastos periodontais, de cementoblastos, de osteoblastos e células endoteliais. É indispensável o recrutamento do número adequado de cada tipo celular, no local indicado e com a conveniente sequência temporal de modo a que, da sua proliferação, diferenciação e síntese da matriz, resulte uma inserção periodontal igual à que foi destruída durante o processo patológico (Pitaru *et al.* 1994, Lekic e McCulloch 1996).

Todas as células envolvidas interagem através de uma variedade de mediadores solúveis, sendo a sequência dos processos ditada por uma combinação de interações molécula-célula, célula-matriz e célula-célula. De

entre os mediadores mais importantes destacam-se os factores de crescimento (FGF, IGF, PDGF, BMP), as proteínas de adesão (fibronectina, laminina, osteopontina, proteína de adesão do cimento) e as citocinas (interleucina 1 (IL-1), factor de necrose tumoral alfa (TNF- α)). Estes factores solúveis actuam ao nível de receptores celulares específicos. A ligação aos receptores celulares activa uma série de mecanismos e moléculas intracelulares que, por seu turno, originam respostas como a migração celular, a síntese de macromoléculas da matriz extracelular e a expressão de moléculas na superfície celular como as integrinas. Estas respostas, por seu lado, afectam as interacções célula-matriz e célula-célula. Embora a activação de muitas destas moléculas já tenha sido estudada *in vitro* e em modelos experimentais de cicatrização, a sua acção no contexto da regeneração periodontal é ainda muito pouco conhecida (Bartold *et al.* 2000).

A matriz extracelular, apesar de não promover directamente a regeneração periodontal, tem um papel importante na sua regulação. Durante a reparação ou regeneração, a sequência espacial e temporal da síntese das macromoléculas da matriz extracelular é igualmente coordenada por uma série de mediadores solúveis. A matriz extracelular dos vários compartimentos periodontais contem os mediadores necessários ao seu normal funcionamento. Algumas proteínas estruturais como o colagénio, a osteocalcina e as proteínas da matriz do esmalte, entre outras, são reguladoras da função celular e exercem um papel fundamental na regeneração periodontal (Slavkin *et al.* 1988, Schroeder 1992, Ripamonti *et al.* 1996, Bartold *et al.* 2000).

b. PRINCÍPIO BIOLÓGICO

b.1. Cementogênese

Após a formação da coroa dentária, a extensão apical das células do epitélio interno e externo do órgão do esmalte continua a proliferar a partir da área cervical da coroa, iniciando a formação da raiz. Esta extensão epitelial, designada por bainha epitelial de Hertwig, interpõe-se entre as células mesenquimatosas da papila dentária e do folículo dentário. A camada interna da bainha epitelial de Hertwig induz as células adjacentes da papila dentária a diferenciarem-se em pré-odontoblastos que, vão iniciar a síntese de pré-dentina radicular. Esta camada interna da bainha, composta por células análogas a pré-ameloblastos, segrega algumas proteínas sobre a pré-dentina recém formada, nomeadamente proteínas semelhantes às da matriz do esmalte, sialoproteína óssea, osteopontina, laminina e colagénio tipo IV (Hammarström 1997, Saygin *et al.* 2000) (Fig. 3.1).

À medida que as proteínas se precipitam sobre a pré-dentina, induzem a apoptose das células da bainha epitelial de Hertwig, que se fragmenta e desintegra. A solução de continuidade da bainha permite que as células mesenquimatosas do folículo dentário contactem com a fina camada de proteínas existentes sobre a pré-dentina radicular. Inicia-se a formação do cimento radicular. Os tipos celulares e os factores responsáveis pela sua formação são ainda fonte de controvérsia. Segundo vários autores, as células do folículo dentário são induzidas, por influência das proteínas da matriz do esmalte, a diferenciar-se em cementoblastos, iniciando a formação de cimento acelular (Cho e Garant 1988, Slavkin *et al.* 1988, Hammarström 1997, Spahr e Hammarström 1999, Hakkı *et al.* 2001). Outros autores defendem que algumas células da bainha epitelial alteram a expressão do seu fenótipo epitelial para mesenquimatoso e convertem-se em cementoblastos (Saygin *et al.* 2000, Bosshardt e Nanci 2004).

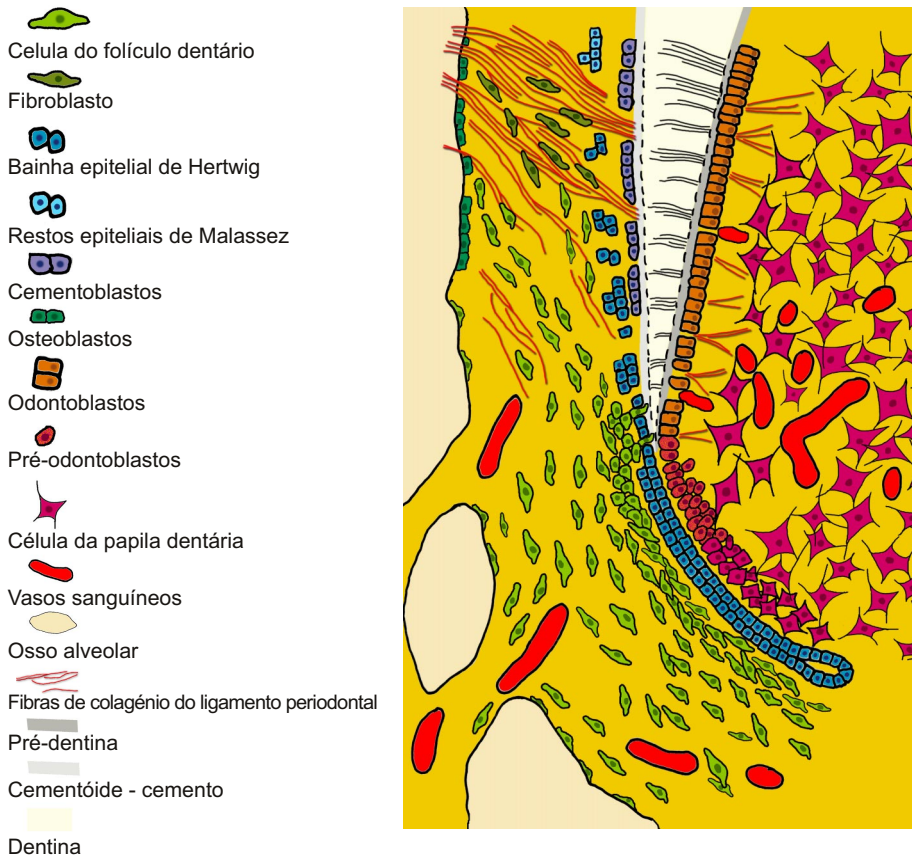


Figura 3.1 – Desenvolvimento dos tecidos periodontais. As células do folículo dentário diferenciam-se em osteoblastos, fibroblastos e cementoblastos. A bainha epitelial de Hertwig produz as proteínas da matriz do esmalte. Algumas das suas células diferenciam-se em cementoblastos, alterando a sua expressão fenotípica, enquanto que outras mantêm-na formando os restos epiteliais de Malassez.

Adaptado de Nanci A & Somerman MJ: Periodontium. In: Nanci A (eds). Ten Cate's Oral histology. Development, Structure, and function. Mosby 2003 (6ª ed).

Algumas células da bainha de Hertwig persistem no ligamento periodontal, mantendo o fenótipo epitelial. Apresentam-se como pequenos grupos celulares rodeados por uma membrana basal e designam-se por restos epiteliais de Malassez. Desconhece-se se têm alguma função na manutenção e na regeneração dos tecidos periodontais (Cho e Garant 2000, Nanci 2003).

Terminada a formação da raiz, durante o tempo de função de um dente, o cemento radicular forma-se por acção de cementoblastos, de cementócitos ou de um tipo específico de fibroblastos do ligamento periodontal, embora a forma como estes actuam não seja ainda totalmente conhecida. Foram identificadas células mesenquimatosas no ligamento periodontal que possuem a capacidade de se diferenciarem ou em fibroblastos do ligamento periodontal ou em cementoblastos, dependendo da sua localização ou da exposição a agentes indutivos específicos (Bartold e Narayanan 1998, Cho e Garant 2000).

b.2. Cimento radicular e sua importância na regeneração periodontal

O cemento é um tecido mineralizado que recobre a superfície radicular, formando a interface entre a dentina radicular e o ligamento periodontal. O cemento proporciona a ancoragem das fibras do ligamento periodontal na superfície radicular. Para além disso, o recobrimento da dentina radicular porosa por cemento protege a polpa de estímulos externos. Este tecido calcificado apresenta algumas semelhanças com o tecido ósseo, mas, ao contrário deste, não é enervado nem vascularizado e possui pouca ou nenhuma capacidade de remodelação. O cemento radicular é constituído por 45% a 50% de hidroxiapatite e por 50% de proteínas colagénicas e não colagénicas. O colagénio tipo I é predominante e representa cerca de 90% do componente orgânico; também o colagénio tipo III e tipo XII estão presentes. As proteínas não colagénicas, idênticas ao osso, incluem a fosfatase alcalina, a sialoproteína óssea, a osteopontina, a osteocalcina, a osteonectina, a vitronectina, a fibronectina, proteoglicanos, proteolípidos e alguns factores de crescimento (Saygin *et al.* 2000, Nanci 2003).

Histologicamente, o cemento é classificado de acordo com a inclusão ou não de células na matriz (celular ou acelular) e com a origem das fibras colagénicas

da matriz: intrínseco se as fibras são formadas pelos cementoblastos; extrínseco quando são formadas por fibroblastos. Da combinação destas características estão descritos quatro tipos de cimento.

O **cimento acelular extrínseco** contém fibras colagénicas que se projectam perpendicularmente desde a matriz do cimento para o ligamento periodontal e não contem células. No homem, este tipo de cimento recobre os dois terços coronais da superfície radicular constituindo a principal ancoragem do ligamento periodontal à raiz. É formado pelos primeiros cementoblastos que, durante a cementogénese radicular, se alinham sobre a superfície de dentina recém formada mas ainda não mineralizada (Nanci 2003).

Quando o dente entra em oclusão, do terço médio ao ápex radicular, forma-se o **cimento celular intrínseco**. Este caracteriza-se pela existência de cementócitos e de fibras colagénicas intrínsecas numa matriz extracelular, orientadas maioritariamente de forma paralela e circular à superfície radicular. Este tipo de cimento pode igualmente ser identificado em lacunas de reabsorção radicular e em locais de fractura radicular, demonstrando ter funções reparativas (Cho e Garant 2000, Nanci 2003).

Quando as fibras do ligamento periodontal se organizam em feixes, o cimento celular continua a ser depositado em torno desses feixes, incorporando-os ao cimento e constitui-se o **cimento estratificado misto**. Este é composto por camadas alternadas de cimento acelular extrínseco e cimento intrínseco, tanto celular como acelular, é recoberto por uma fina camada de cimento acelular extrínseco. Localizado no ápex e na furca, este tipo de cimento relaciona-se com os movimentos, fisiológicos ou não, do dente no alvéolo (Nanci 2003).

O **cimento acelular afibrilhar** é constituído por uma matriz mineralizada sem células nem fibras e localiza-se sobre o esmalte e a dentina na proximidade da junção amelo-cementária. A sua função é desconhecida uma vez que não está envolvido na ancoragem do dente. Desconhece-se igualmente quais as

células responsáveis pela sua formação. Segundo alguns autores este tipo de cemento representa uma anomalia no processo da cementogénese: após a desagregação do epitélio reduzido do esmalte algumas células do folículo dentário entram em contacto com a matriz do esmalte, resultando a formação de cemento sobre o esmalte (Bartold e Narayanan 1998, Nanci 2003).

Um aspecto controverso refere-se à classificação do cemento acelular e celular como tecidos fenotipicamente distintos. No rato, a participação da fosfatase alcalina parece ser essencial na formação do cemento acelular, mas não influencia a formação de cemento celular (Beertsen *et al.* 1999), o que sugere a existência de diferenças nos tipos celulares ou nos factores que controlam o seu desenvolvimento. Pelo contrário, no homem, na hipofosfatásia (caracterizada por baixos níveis de fosfatase alcalina) a ausência de formação de cemento não é exclusiva do tipo acelular, indicando que não há diferenças, para além das morfológicas, entre o cemento celular e acelular.

A formação de cemento divide-se em duas fases. A fase pré-funcional que ocorre durante o desenvolvimento da raiz, seguindo-se a fase funcional que se inicia quando o dente entra em oclusão. Durante a fase pré-funcional forma-se o cemento acelular (extrínseco e afibrilhar), enquanto que na fase funcional forma-se o cemento celular (intrínseco e estratificado misto) (Nanci 2003).

A regeneração periodontal, ao tentar restabelecer a ancoragem das fibras periodontais, requiere a formação de novo cemento para substituir o que foi removido durante o tratamento periodontal, de modo a que nele se possam inserir as novas fibras colagénicas (Schroeder 1992, Bosshardt e Schroeder 1996). Assim e mais especificamente, o objectivo da regeneração periodontal é induzir a produção de cemento acelular extrínseco ou cemento estratificado misto. Só estes dois tipos de cemento apresentam a inserção das fibras do ligamento periodontal no cemento recém formado. Os vários procedimentos regenerativos, descritos anteriormente, resultam na formação de cemento

radicular. No entanto, a maioria dos estudos histológicos em humanos evidenciaram a formação de cemento celular intrínseco, com menor significado funcional por não fornecer ancoragem a fibras extrínsecas (Bowers *et al.* 1989c).

c. PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE NA REGENERAÇÃO PERIODONTAL

Tendo por fundamento o importante papel na cementogênese e no desenvolvimento da inserção periodontal, as proteínas da matriz do esmalte foram aplicadas sobre uma superfície radicular, com o objectivo de regenerar os tecidos periodontais ausentes, tentando reproduzir os fenómenos do desenvolvimento embrionário, de acordo com os princípios da biomimética (Heijl, 1997) (Fig. 2.2).

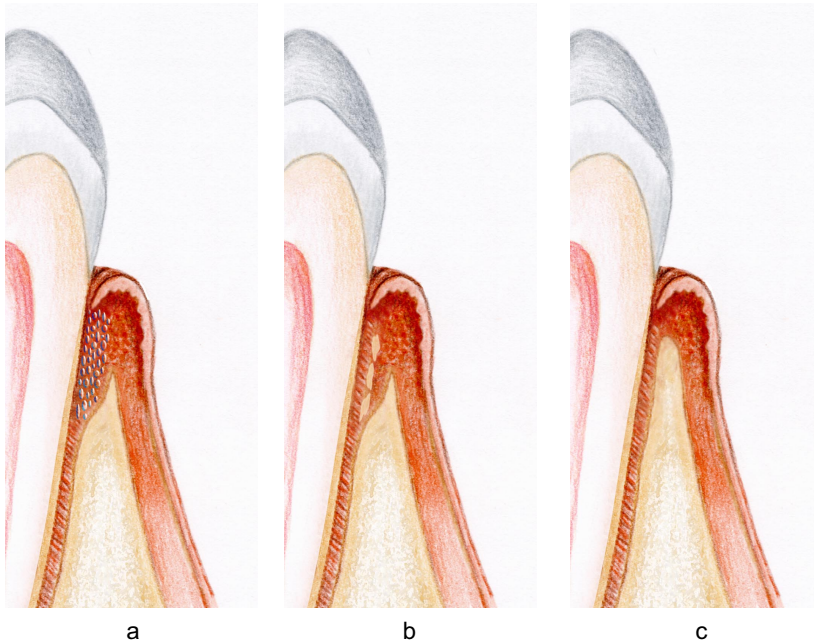


Figura 3.2 – Derivado das proteínas da matriz do esmalte. Após a colocação do gel no defeito periodontal (a), as proteínas precipitam-se sobre a superfície radicular e iniciam um processo biomimético (b) resultando na regeneração periodontal (c).

A matriz do esmalte é composta por um conjunto de proteínas: as amelogeninas, a amelina (também designada por ameloblastina ou “*sheathelin*”), a enamulina, uma proteína sulfatada e a tuftelina (Nanci 2003). As amelogeninas, um grupo heterogénio de diversas proteínas de baixo peso molecular, constituem o componente mais importante da fracção orgânica da matriz do esmalte, representando cerca de 90% (Hammarström 1997).

As amelogeninas existem há pelo menos 350 milhões de anos. A sua estrutura foi bem conservada ao longo da evolução dos vertebrados, desempenhando um papel fundamental na biomineralização dos tecidos dentários. Nas diferentes espécies de vertebrados estudadas, as amelogeninas apresentam uma homogeneidade de mais de 80% na sequência de aminoácidos. Esta semelhança permite a utilização desta proteína no homem, mesmo se de origem xenógena, sem desencadear respostas alérgicas ou outras do foro imunológico (Zetterström *et al.* 1997, Heard *et al.* 2000).

Com a finalidade de ser utilizada na regeneração periodontal, a matriz do esmalte é colhida em gergens dentários de porco, sendo posteriormente purificada. O seu extracto ácido, contendo um conjunto de amelogeninas hidrófobas, designa-se por derivado das proteínas da matriz do esmalte (*enamel matrix derivative* - EMD). O EMD estabilizado e desidratado por congelação é comercializado sob a designação de Emdogain® (Institut Straumann AG, Waldenburg, Switzerland; anteriormente Biora AB, Malmö, Sweden).

Embora as amelogeninas sejam insolúveis num pH fisiológico, dissolvem-se quando o pH aumenta ou diminui. A sua solubilidade também depende da temperatura: sendo hidrófobas, as amelogeninas têm uma maior solubilidade a baixa temperatura.

A solução aquosa do éster de propilenoglicol do ácido algínico (*propylene glycol alginate* - PGA) demonstrou ser o veículo com melhores propriedades físicas (Gestrelus *et al.* 1997a, Hammarström *et al.* 1997), permitindo a aplicação do EMD sob a forma de um gel nos defeitos periodontais com o

recurso a uma seringa. Em meio ácido e a temperaturas baixas, a viscosidade do PGA é elevada. À medida que a acidez é neutralizada e a temperatura aumenta, a sua viscosidade diminui, aproximando-se à da água.

Inicialmente, o Emdogain® foi apresentado sob a forma de dois componentes: um frasco de EMD em pó, desidratado por congelação, e um frasco com a solução aquosa de PGA, com pH de 5,5 (Fig. 3.3). Da mistura dos dois componentes, efectuada 15 minutos antes da aplicação, resultava um gel. Actualmente, o EMD é comercializado sob a forma de um gel “*ready-to-use*” (Emdogain®Gel) (Fig. 3.4). Nesta nova apresentação, a proteína foi estabilizada por tratamento térmico antes da sua incorporação no veículo. Ambas as apresentações comprovaram ser igualmente eficazes num estudo clínico multicêntrico (Bratthall *et al.* 2001). Mais recentemente, um estudo *in vitro* demonstrou que o gel era mais bioactivo que a forma de apresentação inicial (Nagano *et al.* 2004). As embalagens devem ser conservadas a baixa temperatura (2-8 °C), de modo a manter as suas propriedades físicas, químicas



Figura 3.3 – Primeira apresentação comercial de Emdogain®.



Figura 3.4 – Emdogain® Gel (EMD já incorporado no veículo PGA) e PrefGel™ (EDTA a 24%).

e biológicas durante o prazo de validade relativamente curto (24 meses).

O EMD deve ser aplicado sobre a superfície radicular na fase final da cirurgia periodontal, após a remoção da placa bacteriana, dos cálculos dentários e do tecido de granulação existentes na lesão. Previamente à aplicação de EMD, é aconselhado proceder ao condicionamento ácido da superfície radicular (EDTA a 24%, durante dois minutos), de modo a remover a *smear layer* e expor algumas fibras de colagénio. Após a remoção do agente condicionador com soro, aplica-se o EMD, evitando qualquer contaminação da superfície radicular por sangue ou saliva. O retalho é suturado ou, caso as suturas tenham sido colocadas previamente, são apertadas. Qualquer manobra que interfira directamente sobre o local de cicatrização, nomeadamente a colocação de um cimento cirúrgico ou a escovagem, deve ser evitada durante um período de seis semanas.

O processo cicatricial inicia-se logo que o retalho é suturado. À medida que o pH do defeito volta aos valores fisiológicos e que a temperatura sobe até à temperatura corporal, as proteínas da matriz do esmalte vão-se tornando insolúveis e precipitam-se sobre a superfície radicular. De igual modo, devido às alterações de pH e de temperatura, a viscosidade do PGA diminui e o veículo difunde-se na ferida cirúrgica, sem interferir com a formação do coágulo, não actuando como uma barreira nem como um mantenedor de espaço.

Ao fim de dois dias, após a reimplantação de molares no rato não foi detectado PGA no local cirúrgico, enquanto que o EMD ainda permanecia na superfície radicular ao fim de duas semanas, o mesmo se verificando após a sua aplicação numa deiscência no porco (Gestrelus *et al.* 1997a). Quatro semanas após a transplantação de um dente com EMD para a parede abdominal num rato, foi detectada a sua presença na superfície radicular (Hamamoto *et al.* 2002). Igualmente, num estudo experimental em humanos, o EMD foi detectado por imunohistoquímica, na superfície radicular, quatro semanas após a sua aplicação (Sculean *et al.* 2002c).

Em 1996, o Emdogain® obteve a aprovação pela “*Food and Drugs Administration*” (FDA) (P30021)¹, com a indicação específica de aplicação tópica em superfícies radiculares, como auxiliar da cirurgia periodontal, no tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos não envolvendo furcas, resultantes da perda de suporte periodontal por periodontite moderada ou severa. Mais recentemente, para além da nova forma de apresentação (Emdogain®Gel), foram adicionadas indicações suplementares, nomeadamente como auxiliar de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas em zonas estéticas no tratamento de defeitos infra-ósseos, como auxiliar no tratamento cirúrgico de furcas mandibulares de classe II com perda óssea mínima interproximal e ainda como auxiliar da cirurgia de retalho de reposicionamento coronal no tratamento de recessões gengivais.

Com o objectivo de esclarecermos o modo pelo qual o derivado das proteínas da matriz do esmalte pode regenerar os tecidos periodontais, vamos fazer uma revisão da literatura publicada referindo-nos aos estudos *in vitro*, *in vivo* e pré-clínicos.

c.1. Estudos *in vitro*

As proteínas da matriz do esmalte têm funções moleculares e celulares que fundamentam a sua utilização na regeneração periodontal. Apesar dos inúmeros estudos levados a cabo, *in vitro* e *in vivo*, ainda não é possível descrever o seu mecanismo exacto.

Citemos alguns dos estudos *in vitro* que ajudam a interpretar o modo pelo qual o EMD influencia a biologia celular dos diferentes tipos de células presentes na cicatrização periodontal.

Neste momento é importante salientar que, segundo a imunoanálise do EMD

¹ <http://www.fda.gov/cdrh/pmasep96.html>

realizada por Gestrelus e colaboradores (1997b), não foi identificada a presença de factores de crescimento (EGF, FGF, PDGF, TGF- β , IGF-I e -II), nem de citocinas (IL-1 β , -2, -3 e -6), nem de proteínas de adesão (fibronectina). Porém, Kawase e colaboradores (2001; 2002) detectaram doses diminutas de TGF- β . Acrescente-se ainda o facto de Hoang e colaboradores (2002) terem demonstrado que a amelogenina é uma proteína de adesão celular, com capacidade de aderir à hidroxiapatite, mas não ao colagéneo nem à heparina, sob condições fisiológicas.

Nos estudos com culturas celulares, a discrepância dos resultados pode dever-se a inúmeras variações metodológicas, designadamente os tipos celulares testados, as técnicas de cultura, os métodos analíticos, o tempo de adição do EMD à cultura e talvez a outros factores ainda desconhecidos.

De acordo com estudos *in vitro*, as células do folículo dentário de murino (células SVF) demonstraram capacidade de induzir mineralização e expressaram marcadores genéticos associados com o fenótipo de cementoblastos e de osteoblastos. Esta diferenciação foi regulada pelo EMD: este promoveu a proliferação das células foliculares, mas impediu a formação de nódulos mineralizados. Foram também observadas alterações na expressão de algumas proteínas, nomeadamente o aumento da osteopontina (*osteopontin* - OPN) e a diminuição da osteocalcina (*osteocalcin* - OCN) e a sialoproteína óssea (*bone sialoprotein* - BSP) (Hakki *et al.* 2001).

Recorrendo à detecção de marcadores específicos como a fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase* - ALP), com um papel importante na diferenciação celular de tecidos calcificados, a OCN e o colagéneo tipo X, ficou demonstrado que o EMD bloqueava a diferenciação de células mesenquimatosas pluripotenciais (células C2C12) em mioblastos e em adipócitos mas estimulava a sua diferenciação em osteoblastos e em condroblastos (Ohyama *et al.* 2002).

Devido à importância das células do ligamento periodontal no processo de

regeneração, são inúmeros os estudos que avaliaram o comportamento destas células na presença do EMD. Assim, ficou demonstrado que o EMD promove a sua adesão e proliferação de um modo dependente tanto do tempo como da dosagem (Gestrelus *et al.* 1997a, Kawase *et al.* 2000, Lyngstadaas *et al.* 2001, Davenport *et al.* 2003, Okubo *et al.* 2003, Rincon *et al.* 2003). Na presença de EMD, células humanas do ligamento periodontal aumentam a produção total de proteínas e promovem a formação de nódulos mineralizados (Gestrelus *et al.* 1997b).

Estudos imunológicos mostram que a presença de EMD induz o aumento do nível intracelular de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e de ALP pelas células do ligamento periodontal. De igual modo, demonstrou-se o aumento da secreção de alguns factores de crescimento como o TGF- β 1, o PDGF-AB e o IGF-I, de citocinas como a interleucina-6 (IL-6), embora outras citocinas como as IL-1 e -2 não tenham sido detectadas (Van der Pauw *et al.* 2000, Lyngstadaas *et al.* 2001, Okubo *et al.* 2003). O EMD também aumenta a síntese de percursores da matriz (hialuronos, proteoglicanos, *versican*, *biglican* e *decorin*) (Haase e Bartold 2001). Recorrendo a cDNA *microarrays*, foram estudadas as alterações na expressão genómica após a exposição de fibroblastos do ligamento periodontal ao EMD. Destacamos a *upregulation* rápida e persistente de vários genes da matriz extracelular (metaloproteinases da matriz - MMP1, 3, 11 e 14) e de receptores de superfície, para além dos genes de fibronectina, de colagénio tipo VI e XVI, de tenascina, de integrina β 8 e de proteoglicanos ósseos, todos eles envolvidos na regeneração dos tecidos periodontais (Brett *et al.* 2002). Recentemente, o mesmo grupo de investigação estudou o efeito do EMD na síntese de factores de crescimento, de citocinas e seus receptores pelos fibroblastos do ligamento periodontal, usando cDNA *microarrays* mais específicos, agrupando 268 genes de particular relevância no processo de cicatrização (Parkar e Tonetti 2004). Só se manifestaram 125 genes, dos quais 38 alteraram a sua expressão na presença

de EMD. Entre os doze genes que se apresentavam *downregulated* incluem-se citocinas inflamatórias como IL-4, IL-6, IL-13 e IFN- γ e outros como o factor de crescimento dos queratinócitos (*Keratinocyte Growth Factor* - KGF). Entre os genes que se apresentavam *upregulated* incluem-se diversos factores de crescimento e seus receptores, nomeadamente PDGF-A, TGF- β , BMP-1, BMP-4 e PDGF-R α . Estes resultados ajudam a explicar a observação clínica subjectiva descrita por alguns autores, segundo a qual a aplicação de EMD resulta numa cicatrização mais rápida e com reduzidos sinais inflamatórios. Os fibroblastos gengivais na presença de EMD parecem comportar-se distintamente dos fibroblastos do ligamento periodontal: evidenciam uma menor capacidade de adesão e de migração quando comparados aos fibroblastos do ligamento periodontal. A actividade da ALP e a produção de TGF- β 1 aumentaram nos dois tipos celulares, embora menos significativamente nos fibroblastos gengivais (Van der Pauw *et al.* 2000). Na síntese de glicosaminoglicanos e de hialuronos da matriz são os fibroblastos gengivais os mais reactivos (Haase e Bartold 2001). No estudo de Kawase e colaboradores (2001), o EMD promoveu a proliferação de fibroblastos gengivais (Gin-1) mas não aumentou a sua produção de cAMP nem a mobilização intracelular de Ca²⁺. A utilização de modelos de cicatrização *in vitro* permite estudar o comportamento de cada tipo celular nos processos cicatriciais. Neste tipo de modelos, é criado um espaço vazio na cultura celular, simulando uma ferida, o qual vai sendo ocupado de acordo com a capacidade de proliferação e de migração do tipo celular em estudo. O tipo de ferida criada, a composição do meio de cultura e o tipo de células presentes são factores determinantes do resultado final. No entanto, estes modelos têm como limitações a ausência de interacção entre diferentes tipos celulares, assim como a inexistência de contacto intercelular tridimensional. Hoang e colaboradores (2000) investigaram a influência de EMD em células do ligamento periodontal, fibroblastos gengivais e células ósseas, num modelo *in*

vitro de cicatrização constituído por uma incisão com 3 mm de largura na placa de cultura celular. Quando não foi utilizado qualquer aditivo ao meio de cultura, os fibroblastos gengivais e as células ósseas foram mais rápidos na colonização da ferida do que os fibroblastos do ligamento periodontal. Porém, a adição de EMD promoveu o preenchimento da ferida pelos três tipos celulares, preenchimento esse mais rápido pelos fibroblastos do ligamento periodontal. Quando comparados à adição de PDGF-BB ao meio de cultura, os resultados com o EMD foram significativamente superiores, para os dois tipos de fibroblastos. Na utilização de um modelo de cicatrização diferente, descrito como uma circunferência de 8 mm de diâmetro, tanto os fibroblastos gengivais como os do ligamento periodontal, na presença de EMD, preencheram a ferida, mas os fibroblastos gengivais foram mais rápidos na colonização da ferida experimental (Rincon *et al.* 2003).

O estudo da acção do EMD no metabolismo das células ósseas demonstrou que o derivado das proteínas do esmalte influencia de modo distinto essas células, consoante a sua fase de maturação.

O EMD promoveu a proliferação de osteoblastos primários do crânio do rato, mantendo a sua morfologia característica, alterando contudo a sua expressão genética: aumentou o mRNA de colagénio $\alpha 1$, de IL-6 e de prostaglandina G/H sintetase 2, mas não aumentou o mRNA da osteocalcina nem do IGF-1, sugerindo que o EMD não promove a diferenciação desses osteoblastos (Jiang *et al.* 2001a, b). No entanto, o EMD não estimulou a proliferação de osteoblastos humanos, apesar de ter potenciado a sua adesão (Zhu *et al.* 1999).

Schwartz e colaboradores (2000) estudaram a influência do EMD na proliferação, na diferenciação e na produção de factores locais, sobre osteoblastos em três fases de maturação osteogénica (pré-osteoblastos (2T9), células derivadas de osteossarcoma humano (MG63) e células osteoblásticas normais (NH0st)). O EMD regulou a proliferação e a diferenciação dos

osteoblastos, mas de um modo específico para cada tipo celular e promoveu a proliferação de pré-osteoblastos, mas não afectou a sua diferenciação. Nas células derivadas de osteossarcoma, representando uma fase relativamente imatura, o EMD inibiu a sua proliferação e estimulou a sua diferenciação, estimulou a produção de OCN, diminuiu a síntese de matriz, não afectou a produção de PgE2 e aumentou o TGF- β 1 do meio. Nos osteoblastos mais maduros, o EMD induziu a sua proliferação e diferenciação.

Num outro estudo (Tokiyasu *et al.* 2000), o EMD promoveu a proliferação de cementoblastos (OC-CM) e de duas linhas celulares pré-osteoblásticas (OCT-1 e MC3T3-E1). Para além disso, o EMD alterou de um modo específico a expressão genética dos tipos celulares estudados: diminuiu drasticamente a expressão de OCN tanto nos cementoblastos como nos pré-osteoblastos MC3T3-E1; aumentou ligeiramente a expressão genética da BSP nos cementoblastos, mas não alterou essa expressão nos pré-osteoblastos MC3T3-E1; tanto os cementoblastos como os pré-osteoblastos MC3T3-E1, quando expostos ao EMD, demonstraram um aumento dos níveis de mRNA de OPN; o EMD inibiu a formação de nódulos mineralizados na cultura de cementoblastos.

Num estudo recente, He e colaboradores (2004) verificaram que o EMD promovia a proliferação de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e que, às três semanas de tempo de cultura, aumentava a expressão dos mRNA do colagénio α 1, da BSP e da OCN, marcadores da diferenciação osteoblástica, e igualmente de IGF-I. Neste estudo também se verificou que o EMD aumentava a produção de osteoprotegerina, uma citoquina que inibe a génese e a função dos osteoclastos, actuando como um regulador negativo da reabsorção óssea.

Yoneda e colaboradores (2003) testaram a especificidade da acção do EMD sobre outras células imaturas da linha osteoblástica. Num dos tipos celulares utilizados (ST2, células derivadas da medula óssea do rato que se podem diferenciar em adipócitos e em osteoblastos, dependendo das condições da cultura), o EMD não estimulou a sua proliferação mas estimulou a sua

diferenciação. Num outro tipo celular (KUSA/A1, células igualmente derivadas da medula óssea do rato, com capacidade de formar tecido ósseo *in vitro* e *in vivo*), pelo contrário, o EMD estimulou a sua proliferação, acompanhada pela formação de nódulos mineralizados. Neste último tipo celular, o EMD estimulou a expressão dos mRNA de colagénio tipo I, de OPN, de TGF- β 1 e de OCN, tendo-se detectado igualmente um aumento da produção de algumas metaloproteinases da matriz.

Tal como acontece para os osteoblastos, o EMD parece ter efeitos distintos consoante a fase de maturação dos condroblastos. As células da zona mais imatura da formação endocondral, aumentaram a proliferação e diminuíram a diferenciação sob o efeito de EMD. Este estimulou a produção de prostaglandina E2 mas não afectou a produção de colagénio nem de TGF- β 1. Na zona mais madura, os condroblastos responderam ao EMD igualmente com um aumento da proliferação, mas não alteraram a sua taxa de diferenciação, tendo sido observado um ligeiro aumento na produção de prostaglandina E2 e uma diminuição na síntese de colagénio e de TGF- β 1 (Dean *et al.* 2002).

A maioria dos estudos efectuados com células epiteliais (células da língua do rato, com expressão de queratina (HT1080); células derivadas do carcinoma espinhocelular da língua humana (SCC25); células Hela) demonstraram que o EMD não estimulava a sua proliferação, ao contrário do observado com os fibroblastos e osteoblastos (Gestrelus *et al.* 1997b, Kawase *et al.* 2000, Lyngstadaas *et al.* 2001). Kawase e colaboradores (2000) demonstraram que o EMD, dependendo da dosagem, exercia um efeito citostático sobre células epiteliais orais, mantendo-as na fase G1, sem contudo ter um efeito citotóxico, uma vez que não aumentou o número de células em apoptose. Num outro estudo, a presença de EMD estimulou a polimerização do citoesqueleto de actina, mas não aumentou a produção intracelular de cAMP nem a mobilização intracelular

de Ca²⁺ por parte das mesmas células epiteliais (SCC25) (Kawase *et al.* 2001). As células epiteliais humanas na presença do EMD, aumentaram a produção de cAMP e de PDGF-AB, mas não influenciaram a produção de IL-1 α ou β , nem de IL-2, nem de PDGF-AA ou BB (Lyngstadaas *et al.* 2001).

Deste modo e resumindo, os inúmeros estudos *in vitro* demonstram que o EMD influencia de forma distinta os vários tipos celulares periodontais: promove a proliferação de fibroblastos, principalmente dos fibroblastos do ligamento periodontal, e estimula a produção de proteínas específicas. Sobre as células da linha osteoblástica, estimula a proliferação de células mais imaturas, enquanto que nas células mais diferenciadas estimula essencialmente a sua diferenciação. Para além disso, o EMD promove a osteogénese, através da estimulação quer dos factores de diferenciação osteoblástica, quer de factores que inibem a reabsorção óssea. Sobre as células epiteliais, o EMD exerce um efeito citostático.

c.2. Estudos *in vivo*

Após a transplantação de dentes molares de rato para a parede abdominal, Hamamoto e colaboradores (2002) verificaram que se formava osso alveolar separado da raiz por um espaço periodontal, apesar de alguns sinais de necrose do ligamento periodontal envolvente e algumas lacunas de reabsorção radicular. Contudo, quando o EMD era colocado sobre os dentes antes da sua transplantação, formava-se uma camada adicional de cemento acelular, que frequentemente preenchia as raras lacunas de reabsorção, e observava-se uma estimulação da regeneração do ligamento periodontal e do osso alveolar. O EMD foi detectado na superfície radicular, por imunohistomorfometria, durante as 4 semanas de duração do estudo, tendo-se verificado uma redistribuição do material imunoreactivo, com transferência gradual da coroa para a raiz, sugerindo a existência de receptores específicos para a amelogenina na superfície radicular (Hamamoto *et al.* 2002).

Contrariando estes resultados, Chano e colaboradores (2003) recorrendo a um modelo de ferida periodontal no rato, sem formação de biofilme nem colonização epitelial, demonstraram que o EMD não afectava a diferenciação de células osteogénicas, cementogénicas e/ou fibrogénicas, assim como não influenciava a formação de novo osso e de novo cimento.

Estudos controlados avaliaram a formação de novo osso em defeitos criados experimentalmente no osso parietal (Sawae *et al.* 2001, Yoneda *et al.* 2003) e no fémur (Kawana *et al.* 2001) de ratos, após a aplicação de EMD. A cicatrização dos defeitos ósseos, tanto em osso membranoso como em osso endocondral, ocorreu com a formação de novo osso, parecendo que o EMD acelerava essa cicatrização.

Boyan e colaboradores (2000) estudaram o poder osteoindutor, osteocondutor e osteopromotor do EMD, através da sua implantação ectópica no músculo da perna de ratos. Quando o EMD (2 ou 4 mg) foi implantado isoladamente não se formou novo osso. No entanto, quando o EMD (2 mg) foi implantado em associação com DFDBA activo verificaram formação de osso comparável à utilização de DFDBA activo isolado; contudo, o aumento da dosagem (4 mg) na mesma associação resultou no aumento significativo da formação de osso, a qual foi 1,4 vezes superior à observada aquando da utilização de DFDBA activo isolado, tendo os valores sido confirmados por histomorfometria.

Noutros estudos, a implantação ectópica de EMD isoladamente num tecido muscular não resultou na formação de nódulos de calcificação (Tokiyasu *et al.* 2000, Yoneda *et al.* 2003). Contudo, resultados contrários foram obtidos por Tominaga e colaboradores (2001) após a injeção subcutânea de EMD em ratos: verificaram a formação de tecido mineralizado quando eram administradas doses mais elevadas (30 mg/ml).

Casati e colaboradores (2002) estudaram a formação de osso na ausência de ligamento periodontal após a colocação de EMD em defeitos experimentais

de peri-implantite em maxilares de cães. Aos 3 meses de cicatrização, a área percentual de novo osso no grupo do EMD era de 55,5% comparada com 53,8% no grupo da regeneração óssea guiada com membrana reabsorvível. Ambos os resultados foram superiores ao controlo (36,9%), mas as diferenças não foram estatisticamente significativas. Quando o EMD foi combinado com a membrana, formou-se 62,1% de novo osso, obtendo-se uma diferença estatisticamente significativa comparativamente ao controlo. Estes resultados corroboram os resultados obtidos por Boyan e colaboradores (2000). O estudo de Stenport e Johansson (2003) não demonstrou qualquer vantagem na regeneração óssea após a aplicação de EMD em leitos implantares experimentais, localizados em fémures e tíbias de coelhos.

Estes estudos demonstram que o EMD tem um efeito osteopromotor quando é usado em associação com outras técnicas regenerativas. No entanto, quando aplicado isoladamente, não mostrou grandes vantagens frente a outras técnicas regenerativas na formação de novo osso, contrariando os resultados de alguns estudos *in vitro* já anteriormente referenciados.

Sendo a neovascularização do local cirúrgico determinante na cicatrização, Yuan e colaboradores (2003) realizaram uma série de ensaios *in vitro* e *in vivo* para estudar o efeito angiogénico do EMD. Os ensaios *in vitro* demonstraram que o EMD tem um efeito quimiotáctico mas não proliferativo sobre as células endoteliais. Na cultura de fragmentos de artéria, o EMD promoveu o crescimento de novos vasos. No entanto, os autores sugeriram que tal facto poderia dever-se a uma contaminação do preparado por peptídeos angiogénicos, como por exemplo a sialoproteína óssea ou o TGF- β , ou por um efeito indirecto do EMD, nomeadamente o aumento da expressão de TGF- β pelos fibroblastos (Van der Pauw *et al.* 2000), o qual é um factor reconhecidamente angiogénico (Kawase *et al.* 2001, 2002). No ensaio *in vivo*, o EMD demonstrou maior efeito angiogénico do que o controlo. De igual modo,

este resultado poderia dever-se à presença da sialoproteína óssea e/ou indirectamente ao aumento e activação dos linfócitos T e de outras células (Yuan *et al.* 2003).

Com base nos estudos *in vitro* e *in vivo* apresentados, poderemos esquematizar do seguinte modo o mecanismo de acção do EMD.

A precipitação do EMD na superfície radicular facilita a adesão e a proliferação das células com capacidade para se diferenciarem e formarem novo cemento e novo osso alveolar, nomeadamente os fibroblastos do ligamento periodontal e as células imaturas da linha osteoblástica. Por outro lado, o EMD tem um efeito restritivo na proliferação das células epiteliais, prevenindo a sua proliferação ao longo da superfície radicular nas fases iniciais do processo cicatricial. Talvez as diferentes respostas celulares estejam relacionadas com a expressão de distintas integrinas (receptores de adesão da membrana celular) pelos diversos tipos celulares. As integrinas podem reconhecer sequências específicas das moléculas da matriz extracelular, como a sequência arginina-glicina-ácido aspártico (RDG). Tanto os fibroblastos do ligamento periodontal como os gengivais exprimiram a integrina $\alpha 5 \beta 3$ e as sub-unidades $\beta 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 5$, na ausência e na presença de EMD (Van der Pauw *et al.* 2002). No entanto, as proteínas presentes no EMD não têm a sequência RDG, pelo que parece haver uma molécula intermediária entre as integrinas dos fibroblastos e a adesão ao EMD. De facto, Suzuki e colaboradores (2001) identificaram uma molécula semelhante à sialoproteína que se comportaria como mediador da adesão da integrina $\alpha 5 \beta 3$ da membrana dos fibroblastos e o EMD. No entanto, Van der Pauw e colaboradores (2002) sugeriram outras hipóteses: ou os fibroblastos podem produzir proteínas que contêm RDG (por ex. fibronectina), que subsequentemente interagem ou se ligam ao EMD; ou o EMD contém proteínas com RDG, como a laminina, presentes na membrana basal dos ameloblastos, as quais ainda não foram identificadas no derivado da matriz de esmalte.

Para além de aumentar o número de células presentes sobre a superfície radicular, o EMD também activa os sinais intracelulares de regulação do crescimento e da diferenciação. As integrinas têm um importante papel na sinalização de processos celulares. De facto, parece que é através da ligação a um receptor extracelular específico para o EMD que se desencadeia o efeito mitogénico dos fibroblastos (Matsuda *et al.* 2002). Os fibroblastos periodontais demonstraram um aumento da secreção autócrina de alguns factores de crescimento como o TGF- β 1, o PDGF e o IGF-1, assim como de algumas citocinas como a IL-6, amplificando a acção inicial do EMD (Van der Pauw *et al.* 2000, Lyngstadaas *et al.* 2001, Okubo *et al.* 2003). Igualmente, o EMD pode ajustar a síntese dos diversos componentes da matriz, influenciando os acontecimentos mais precoces da regeneração periodontal.

O efeito angiogénico do EMD é outro factor determinante da cicatrização inicial. Por outro lado, o EMD também estimula a diferenciação celular, criando o potencial regenerativo dos diferentes tipos de tecidos periodontais numa fase um pouco mais tardia da cicatrização. O EMD parece potenciar a regeneração do osso alveolar quer através da proliferação de células indiferenciadas com potencial osteoblástico, quer através da diferenciação dos osteoblastos maduros e igualmente através da inibição da reabsorção óssea por parte dos osteoclastos. A formação de novo osso parece iniciar-se em pequenos focos isolados, no seio da área cicatricial. Posteriormente, esses focos coalescem e unem-se ao osso pré-existente, sugerindo a forma como se forma o osso alveolar durante a embriogénese.

c.3. Estudos pré-clínicos

Os primeiros estudos em animais que avaliaram a capacidade do EMD estimular a formação de cimento radicular, foram realizados num modelo de reimplantação dentária em primatas não humanos (Hammarström 1997). Após a extracção de incisivos laterais, foi realizada uma cavidade radicular. Antes

da sua reimplantação, essa cavidade foi preenchida com matriz de esmalte removida mecanicamente de germens de dentes de porco. Os dentes de controlo foram reimplantados sem qualquer tipo de material na cavidade talhada. Após 8 semanas de cicatrização, as cavidades de controlo apresentavam-se preenchidas por um tecido calcificado, com algumas células e pouco aderente à dentina subjacente, semelhante a tecido ósseo imaturo. Nas cavidades de teste, a superfície radicular apresentava uma camada de tecido mineralizado, acelular, com fibras extrínsecas, com as características histológicas de cemento radicular, bem aderente à dentina subjacente. Ficou assim demonstrado que a aplicação de matriz de esmalte exógena induziu, no macaco, a formação de um tecido histologicamente semelhante a cemento acelular.

Com o objectivo de avaliar se o EMD, para além de cemento radicular, também induzia a formação de novo ligamento periodontal e de novo osso alveolar, Hammarström e colaboradores (1997) utilizaram, no primata não humano, o modelo agudo de deiscência. Após a elevação bilateral de um retalho mucoperióstico vestibular do canino ao primeiro molar, criaram experimentalmente uma lesão periodontal na superfície radicular dos pré-molares e da raiz mesial do primeiro molar, removendo o osso alveolar, o ligamento periodontal e o cemento. Realizaram um entalhe na superfície radicular na porção mais apical do defeito, previamente ao condicionamento ácido (ácido cítrico ou ácido ortofosfórico a 37%). No lado de teste, aplicaram quatro diferentes preparações de matriz de esmalte: uma homogeneizada, um extracto ácido contendo essencialmente amelogeninas, um extracto tamponado contendo essencialmente enamelinas (proteínas da matriz do esmalte de maior peso molecular) e um extracto ácido purificado constituído essencialmente por amelogeninas (EMD), com ou sem veículos (PGA, celulose e dextrano). No lado de controlo, após o ataque ácido e antes de reposicionar o retalho, ou não efectuaram qualquer tratamento adicional (controlo negativo) ou aplicaram os três diferentes veículos, sem proteínas. Decorridas 8 semanas,

realizaram a avaliação histológica da cicatrização. Os melhores resultados verificaram-se nos locais de teste onde tinham sido aplicados o EMD, o extracto ácido e a matriz de esmalte homogeneizada. Observaram uma quase completa (60% a 80%) regeneração de cemento acelular firmemente aderente à superfície dentinária e fibras colagénicas regeneradas que se estendiam do cemento até ao osso alveolar regenerado. A recessão gengival era mínima. A extensão apical do epitélio juncional terminava ao nível da porção mais coronal do novo cemento. Pelo contrário, nos locais onde tinha sido aplicado o extracto tamponado (não amelogeninas), a formação de cemento era muito limitada, não havia formação de novo osso, a recessão gengival era pronunciada e observava-se um epitélio juncional longo que, por vezes, se prolongava até ao entalhe radicular. Estes resultados foram muito semelhantes aos obtidos no grupo de controlo negativo. Dos três veículos testados só o PGA com EMD obteve resultados muito semelhantes ao EMD. De acordo com as observações, só a aplicação das várias preparações de matriz de esmalte que continham amelogeninas resultou na regeneração de todos os tecidos periodontais, demonstrando assim que as propriedades regenerativas estavam associadas à fracção das amelogeninas presentes na matriz do esmalte. Este estudo experimental demonstrou igualmente que as células epiteliais não colonizavam a superfície radicular na presença de amelogeninas, confirmando os resultados de diversos estudos *in vitro* (Gestrelius *et al.* 1997b, Kawase *et al.* 2000, Lyngstadaas *et al.* 2001). Acrescentando o facto de novo osso se ter formado quase até ao nível coronal do novo cemento, sem no entanto se ter mantido um “espaço periodontal”, permitiu concluir, segundo os autores, que houve uma repetição do desenvolvimento normal dos tecidos periodontais.

No entanto, devemos ter em atenção o facto destas lesões experimentais não reproduzirem os defeitos periodontais, visto que, sendo do tipo agudo, não sofreram colonização bacteriana das superfícies radiculares. Em 1994, Caton e colaboradores chamaram a atenção para o facto das lesões experimentais

agudas em primatas não humanos regenerarem espontaneamente em 50% a 70% da sua extensão. Esta situação deve ser tida em conta a quando da interpretação dos resultados obtidos na utilização deste modelo experimental. Mas, por outro lado, este tipo de defeitos agudos possibilitam a comparação morfométrica entre os resultados de diferentes preparações e veículos, por serem defeitos homogêneos e reprodutíveis.

Tendo por base estes pressupostos, Sculean e colaboradores (2000b) compararam o tratamento de fenestrações experimentais, em primatas não humanos, com GTR e com EMD. Aos cinco meses, só o GTR resultou no encerramento completo de todos os defeitos (quatro), com a formação de novo cemento, novo ligamento periodontal e novo osso. Os resultados obtidos após o tratamento com EMD assemelharam-se aos do grupo de controlo (condicionamento com EDTA e cirurgia de reposicionamento coronário), sendo que só em dois dos quatro defeitos se observou o seu encerramento completo, apesar da formação de novo cemento, novo ligamento periodontal e novo osso. Segundo os autores, os resultados menos significativos obtidos com EMD comparativamente à GTR, podem ter ficado a dever-se ao colapso do retalho sobre o defeito, facto esse que não se verificou aquando da colocação da membrana reabsorvível. O novo cemento era do tipo misto celular e acelular, não diferindo consoante o tratamento aplicado.

Com o objectivo de investigar as potencialidades de uma nova terapêutica regenerativa, é imprescindível recorrer a modelos agudos/crónicos, uma vez que estes são os mais aproximados às lesões periodontais clínicas.

Sculean e colaboradores (1998) realizaram um estudo experimental em primatas não humanos, com defeitos infra-ósseos de uma parede e defeitos de furca classe III, sobre os quais foi permitida a acumulação de placa bacteriana durante seis semanas. Os defeitos foram tratados por GTR com membranas reabsorvíveis, EMD, EMD e GTR, sendo o controlo constituído unicamente pelo reposicionamento coronal do retalho. Após 5 meses,

realizaram a avaliação histológica dos tecidos cicatrizados. No grupo de controlo, a cicatrização resultou na formação de um epitélio juncional longo, com formação de novo cimento e novo osso só na porção mais apical do defeito. O tratamento combinado de GTR e EMD resultou no encerramento dos defeitos por regeneração dos três componentes tecidulares. Este estudo focou essencialmente a regeneração das fibras oxitalânicas existentes no ligamento periodontal, não sendo fornecidos dados morfométricos dos valores de regeneração dos diferentes tecidos periodontais de acordo com o tipo de tratamento. À excepção do controlo, todos os tratamentos resultaram na regeneração periodontal com extensões variáveis de acordo com os defeitos. Os mesmos autores (Sculean *et al.* 2000c), recorrendo ao mesmo protocolo experimental, efectuaram a avaliação histométrica do tratamento de defeitos infra-ósseos agudos/crónicos. Dos seis defeitos tratados por GTR, houve exposição da membrana em três deles. Nesses defeitos, a cicatrização revelou a formação de um epitélio juncional longo e uma área mínima de regeneração periodontal na porção mais apical do defeito. Nos defeitos em que não houve exposição da membrana, observou-se regeneração periodontal, tanto de nova adesão (novo ligamento periodontal e novo cimento com fibras colagénicas nele inseridas) como de novo osso. O novo cimento era predominantemente do tipo celular. Nos seis defeitos tratados com EMD não se registaram reacções adversas no pós-operatório. Todos os defeitos resultaram em regeneração periodontal, mas com uma extensão muito variável (nova adesão entre 0,40 mm e 3,85 mm e novo osso entre 0,58 mm e 2,88 mm). Na porção mais apical dos defeitos, o novo cimento era do tipo acelular, enquanto que nas porções mais coronais observaram cimento do tipo celular. Nos seis defeitos tratados com a combinação de GTR e EMD, houve exposição da membrana em três deles, os quais, contudo, demonstraram alguma regeneração. Nos defeitos tratados pela combinação e em que não houve exposição da membrana, a regeneração periodontal foi mais significativa, mas, no entanto, não foi muito

superior ao grupo em que só se usou GTR e não houve exposição ou ao grupo em que o EMD foi usado isoladamente. O novo cemento, localizado mais apicalmente, era essencialmente do tipo acelular, enquanto que mais coronalmente se observava cemento celular. Devido ao escasso número de animais utilizados (três) e ao reduzido número de defeitos tratados em cada grupo (seis), não foi possível estabelecer diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tipos de tratamento. Os autores concluíram que todos os tratamentos, à exceção do controlo, resultaram em regeneração periodontal. Contudo, o tratamento com GTR, isolado ou em combinação, não teria vantagens comparativamente ao EMD, devido ao risco de exposição da membrana. Quanto à presença de cemento celular observada após o tratamento com EMD, contrariando o observado noutros estudos (Hammarström 1997, Hammarström *et al.* 1997), os autores justificaram que tal se devesse ao facto de, neste estudo, se ter utilizado defeitos agudos/crónicos, nos quais a regeneração espontânea ocorre numa percentagem mínima do defeito.

Um outro estudo (Sallum *et al.* 2004), em que o mesmo tipo de defeitos (deiscências crónicas) foram criados em cães, demonstrou que o tratamento com EMD, isoladamente ou em combinação com GTR, resultou na formação de mais cemento radicular comparativamente à cirurgia de retalho. Para além disso, esse novo cemento era do tipo misto celular e acelular, enquanto que nos defeitos tratados com GTR era predominantemente do tipo celular. Esta observação corrobora os resultados do estudo apresentado previamente (Sculean *et al.* 2000c), apesar de no presente estudo não se ter observado o mesmo padrão de localização ápico-coronal do novo cemento. Relativamente à formação de novo osso não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, embora o EMD tenha resultado em valores superiores. A avaliação histométrica do epitélio juncional também não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos,

no entanto a extensão do epitélio no grupo de combinação do EMD com GTR era metade da verificada na cirurgia de retalho, sugerindo que o epitélio era mantido consistentemente numa posição mais coronal nesse grupo. Com base nestes resultados, os autores concluíram que a combinação das duas terapêuticas regenerativas (EMD e GTR) não proporcionava benefícios adicionais comparativamente à monoterapia, confirmando o estudo anteriormente referenciado.

Um outro grupo de investigadores estudou, em primatas não-humanos, a influência do tamanho dos defeitos infra-ósseos na capacidade de regeneração do EMD (Cochran *et al.* 2003b). Foram criados defeitos infra-ósseos de uma parede, inicialmente com diferentes larguras (1, 2, 4 e 6 mm), nos quais foi permitida a acumulação de placa bacteriana durante 2 meses. Num dos lados da mandíbula, os defeitos foram tratados com EDTA e EMD, sendo o lado contra-lateral o lado controlo, no qual só efectuaram o condicionamento ácido (EDTA) da superfície radicular. Após 5 meses, a avaliação histológica demonstrou regeneração periodontal em todos os defeitos tratados. De um modo geral, o EMD resultou numa maior percentagem de tecidos regenerados comparativamente ao EDTA, especialmente nos defeitos mais pequenos (1 e 2 mm) quando comparados aos maiores (4 e 6 mm).

Num estudo similar (Cochran *et al.* 2003a), recorrendo ao mesmo protocolo, o EMD foi aplicado em combinação com osso autólogo, de modo a esclarecer se o preenchimento do espaço favoreceria a regeneração periodontal. Os resultados foram muito semelhantes aos obtidos no estudo anterior: nos defeitos mais pequenos (1 e 2 mm) o novo cemento e o novo osso eram significativamente superiores no grupo teste comparativamente ao controlo; nos defeitos maiores (4 e 6 mm) não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, tanto para o novo cemento como para o novo osso, entre a associação de osso autólogo com EMD e o controlo. No entanto, os autores alertaram para o facto de nos defeitos maiores ter ocorrido uma maior

reabsorção da crista óssea entre a criação do defeito e o seu tratamento, o que diminuiu o potencial regenerativo.

Em ambos os estudos apresentados anteriormente (Cochran *et al.* 2003a, b), a descrição histológica dos tecidos regenerados não faz qualquer alusão ao tipo de cimento presente. No entanto, nas fotografias histológicas publicadas, o novo cimento parece ser do tipo celular, tanto no tratamento por EMD e por EMD com osso autólogo, como no controlo (EDTA). A comparação entre os grupos teste dos dois estudos, respectivamente EMD e EMD associado a enxerto de osso autólogo, sugere que a combinação com osso autólogo não potencia de modo significativo a regeneração de cimento do EMD, tanto nos defeitos maiores como nos mais pequenos. Contudo, a regeneração de novo osso parece ser potenciada pela adição de osso autólogo, em ambos os tipos de defeitos.

O tratamento do envolvimento de furca de classe III com EMD, também foi estudado em modelos agudo/crónicos. Donos e colaboradores (2003), avaliaram o tratamento com GTR, com EMD, com GTR e EMD e por cirurgia de reposicionamento coronal do retalho (controlo), em primatas não humanos. Aos cinco meses, nas furcas onde tinham colocado EMD, observaram a formação de novo osso, novo ligamento periodontal e novo cimento. Contudo, o encerramento completo da furca só se verificou em um dos três defeitos. Nas furcas tratadas por GTR, a regeneração foi muito limitada nos casos de exposição da membrana (2 de 3 defeitos). No caso em que a membrana se manteve recoberta, houve preenchimento quase total da furca pelos tecidos regenerados. Nas furcas em que foi utilizada a combinação do EMD e da GTR, a exposição da membrana num defeito limitou a regeneração. Nos outros dois defeitos observaram um preenchimento quase completo da furca. No grupo de controlo, a regeneração limitou-se à área do entalhe radicular efectuado antes do tratamento. No que se refere ao tipo de cimento presente após o

tratamento, só observaram cemento acelular nas porções mais apicais dos defeitos tratados com EMD, quer em monoterapia quer em associação com GTR. Em todos os outros defeitos, o cemento regenerado era do tipo celular, corroborando os resultados de estudos já referenciados (Sculean *et al.* 2000c, Sallum *et al.* 2004).

Araújo e Lindhe (1998) avaliaram o mesmo tipo de defeitos mas criados em cães. O tratamento com EMD e GTR foi comparado ao tratamento com GTR isoladamente. Aos 4 meses de cicatrização, as furcas encontravam-se preenchidas na sua totalidade por tecidos regenerados (osso, ligamento periodontal e cemento), não havendo diferenças significativas entre os dois tratamentos. Numa análise mais detalhada dos tecidos regenerados, verificaram que só no grupo em que foi utilizado EMD e na porção mais apical da superfície radicular, o cemento regenerado era do tipo acelular, enquanto que nas restantes áreas era do tipo celular. Estas últimas observações são sobreponíveis às obtidas após o tratamento de defeitos infra-ósseos (Sculean *et al.* 2000c) e de furca (Sculean *et al.* 1998, Donos *et al.* 2003), em primatas não humanos.

Tendo por base os estudos pré-clínicos apresentados, o EMD demonstra ter capacidade de regenerar os tecidos periodontais em superfícies radiculares previamente afectadas por doença periodontal. Acrescente-se ainda que, nos modelos animais estudados, o EMD parece favorecer a formação de cemento acelular em relação à GTR, embora não de uma forma significativa.

c. 4. Estudos clínicos

c. 4. 1. Tratamento de defeitos infra-ósseos

Os estudos clínicos que avaliam a eficácia do EMD no tratamento de defeitos infra-ósseos periodontais distribuíem-se por todos os graus da “pirâmide da evidência”², desde simples relatos de casos clínicos isolados (Mellonig 1999, Rasperini *et al.* 1999, Silvestri *et al.* 1999, Sculean *et al.* 2000a), passando por estudos não controlados de séries de casos clínicos, até aos ensaios clínicos controlados, alguns deles aleatórios, multicêntricos e duplamente cegos, com elevada relevância clínica. De acordo com o tipo de estudos, vamos em seguida rever alguns dos artigos publicados.

c. 4.1.1. Estudos de séries de casos clínicos

Dos estudos que relatam séries de casos clínicos (Tabela 3.1), os que se referem a um maior número de defeitos foram os dois estudos publicados por Heden e colaboradores (1999) e Heden (2000).

Heden e colaboradores (1999) avaliaram o tratamento com EMD de 145 defeitos infra-ósseos (94% de 1 e de 2 paredes), presentes em 108 doentes, 31 dos quais eram fumadores. Aos 12 meses, verificaram um ganho médio de inserção clínica de 4,6 mm, uma redução média da profundidade de sondagem de 5,2 mm e um aumento médio de recessão gengival de 0,6 mm, todos valores estatisticamente significativos (Quadro 1 - Anexo II). Um único defeito apresentou diminuição do nível de inserção clínica.

² <http://servers.medlib.hscbklyn.edu/edu/ebm/2100.htm>

Tabela 3.1 - Estudos de **séries de casos clínicos** no tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD

Estudos	Nº defeitos	Tipo de defeitos	Tempo	Diminuição PD mm	Ganho CAL mm	Aumento RE mm	Preenchimento ósseo mm (%)
Heden <i>et al.</i> 1999	145	1 w (18) 1+2 w (31) 2 w (87) 2+3 w (7) 3 w (2)	12 M	5,2	4,6	0,6	2,9 (69)
Heden 2000	72	1 w (22) 2 w (50)	12 M	4,7	4,2	NA	3,1 (70)
Sculean <i>et al.</i> 1999c	32	2 w (28) 3 w (3)	8 M	4,4	3,0	1,5	NA
Parashis <i>et al.</i> 2000	25	2 w (3) 2+3 w (22)	12 M	4,4	3,6	0,8	(61)
Parodi <i>et al.</i> 2000	21	1 w (8) 2 w (13)	12 M	4,9	3,4	1,5	0
Parodi <i>et al.</i> 2004	16	1 w (7) 2 w (9)	36 M	4,9	4,2	0,7	0
Cardaropoli <i>et al.</i> 2002	10	1 w (2) 1+2 w (3) 2 w (5)	12 M	7,2	6,5	0,5	4,7 (77)
Trombelli <i>et al.</i> 2002a	35	NA	12 M	5,4	4,7	0,7	3,9 (65)
Sculean <i>et al.</i> 2003a	46	1 w (2) 1+2 w (5) 2 w (35) 3 w (4)	12 M 48 M	4,3 4,1	3,0 3,2	1,3 0,9	NA NA
Harrel <i>et al.</i> 2005	160	NA	11 M	3,56	3,57	0,01	NA

Abreviaturas: PD - profundidade de sondagem; CAL - nível de inserção clínica; RE - recessão gengival; w - parede óssea.

A avaliação radiológica mostrou uma redução média da profundidade do defeito ósseo de 2,9 mm e da largura do defeito de 1,3 mm. Esta redução do defeito ósseo corresponde a uma média de preenchimento do defeito ósseo de 69%, sendo que 43% dos defeitos apresentaram um preenchimento igual ou superior

a 80%. De modo a caracterizar a variação do ganho de inserção clínica, os resultados foram estratificados em quatro grupos. Tal procedimento permitiu verificar que o ganho de CAL foi superior nos defeitos inicialmente mais profundos e que a maioria dos defeitos (68%) obtiveram um ganho de CAL igual ou superior a 4 mm, enquanto que só 6% dos defeitos tiveram um ganho clínico de inserção inferior a 2 mm.

Neste estudo, o ganho médio de inserção clínica foi ligeiramente superior aos obtidos nos estudos de Heijl e colaboradores (1997), de Pontoriero e colaboradores (1999) e de Sculean e colaboradores (1999b). De notar que no estudo de Heden (1999), os valores pré-operatórios de PD eram superiores, o que pode explicar a obtenção de melhores resultados.

Foram efectuados múltiplos testes de regressão de modo a investigar a importância dos factores relacionados com o doente e com o defeito no ganho de CAL. Dos factores estudados, a recessão gengival e a PD inicial relacionaram-se positivamente com o ganho de CAL, enquanto que a hemorragia à sondagem e o tabaco se relacionaram negativamente. De facto, neste estudo (Heden *et al.* 1999) o aumento médio de recessão gengival foi muito diminuto quando comparado com outros estudos, como por exemplo o de Pontoriero e colaboradores (1999) em que esse parâmetro esteve na ordem de 1,7 mm. De acordo com os autores, um valor mínimo de recessão gengival pode favorecer o ganho de adesão.

Em outra publicação, Heden (2000) avaliou o tratamento com EMD de 72 defeitos infra-ósseos (22 de 1 parede e 50 de 2 paredes), presentes em 61 doentes, dos quais um terço eram fumadores. Aos 12 meses, verificou um ganho médio de inserção clínica de 4,2 mm e uma redução média da profundidade de sondagem de 4,7 mm, todos valores estatisticamente significativos (Quadro 2 - Anexo II). Todos os defeitos aumentaram o nível de inserção clínica. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados a um ano entre os defeitos de uma parede e de duas paredes. A

média de ganho ósseo radiográfico foi de 3,1 mm, ou seja 70% de preenchimento ósseo do defeito.

Da análise entre os doentes fumadores e os não fumadores, verificou que os resultados eram inferiores nos fumadores, sendo a diferença estatisticamente significativa na redução da profundidade sondagem e no preenchimento ósseo do defeito. A mesma tendência foi observada entre os doentes que apresentavam hemorragia à sondagem ao ano e os que não apresentavam. A diminuição dos resultados finais em fumadores vem de encontro às conclusões de outros estudos efectuados sobre regeneração com GTR (Tonetti *et al.* 1995) e com DFDBA (Rosen *et al.* 1996).

No estudo de Sculean e colaboradores (1999c) foram seleccionados 28 doentes que apresentavam 32 defeitos infra-ósseos (28 defeitos de 2 paredes e 3 de 3 paredes). Aos 8 meses após a cirurgia periodontal com EMD, houve uma melhoria estatisticamente significativa dos parâmetros clínicos avaliados: diminuição da profundidade de sondagem de 4,4 mm e ganho médio de inserção clínica de 3,0 mm (Quadro 3 - Anexo II). Radiograficamente, 26 dos 32 defeitos apresentavam uma neoformação de tecidos duros, a qual não foi quantificada.

No estudo de Parashis e Tsihlakis (2000) foram seleccionados 15 doentes, 3 dos quais eram fumadores, que apresentavam 25 defeitos infra-ósseos (3 defeitos de 2 paredes e 22 combinados de 2 e 3 paredes). Aos 12 meses após a cirurgia periodontal com EMD, houve uma melhoria clínica significativa dos parâmetros avaliados: diminuição média da PD de 4,4 mm, ganho médio de CAL de 3,6 mm e aumento da recessão gengival de 0,8 mm (Quadro 4 - Anexo II). Catorze defeitos demonstraram um ganho CAL entre 2 e 3 mm; 9 defeitos demonstraram um ganho entre 4 e 5 mm; 2 defeitos um ganho de 6 mm. Radiograficamente, verificaram um preenchimento ósseo médio dos defeitos de 61%.

Estes dois estudos (Sculean *et al.* 1999c, Parashis e Tsihlakis 2000) apresentam valores muito semelhantes tanto para o ganho de CAL como para a diminuição de PD. Tal facto pode dever-se ao facto de se tratar do mesmo tipo de defeitos

(2 e de 3 paredes), para além da sua profundidade média inicial ser praticamente sobreponível em ambos os estudos. Ao compararmos com os resultados obtidos no estudo de Heijl e colaboradores (1997), verificamos que nestes dois estudos o ganho médio de inserção clínica é ligeiramente superior. Tal facto pode dever-se à diferente morfologia dos defeitos e à sua maior profundidade de sondagem inicial, o que favorece a regeneração.

Parodi e colaboradores (2000) avaliaram o tratamento com EMD de 21 defeitos infra-ósseos (8 de 1 parede e 13 de 2 paredes), presentes em 21 doentes, 7 dos quais eram fumadores. Aos 12 meses, verificaram um ganho médio de inserção clínica de 3,4 mm, uma redução média da profundidade de sondagem de 4,9 mm e um aumento médio de recessão gengival de 1,5 mm, todos valores estatisticamente significativos (Quadro 5 - Anexo II).

Os defeitos foram subdivididos em subgrupos de modo a testar se outros factores como o tabaco, a morfologia e a profundidade inicial do defeito, afectavam o resultado final. Não houve diferença estatisticamente significativa no ganho de CAL entre fumadores e não fumadores (3,5 mm *versus* 3,3 mm), contrariando a influência deste factor identificada no estudo de Heden (2000), assim como nas conclusões de outros estudos já citados. Verificou-se uma pequena diferença, não significativa, entre os defeitos de uma parede e os de duas paredes quanto ao ganho de CAL (2,6 mm *versus* 3,3 mm). Pelo contrário, houve uma diferença significativa dos resultados finais quando foi analisada a profundidade inicial dos defeitos: nos defeitos menos profundos (5 a 8 mm) tanto o ganho de CAL como a redução de PD foram inferiores aos obtidos nos defeitos muito profundos (CAL: 2,6 mm *versus* 4,6 mm; PD: 3,4 mm *versus* 6,9 mm). Como já foi evidenciado noutros estudos (Cortellini *et al.* 1998), parece confirmar-se que também no caso do EMD, a profundidade inicial do defeito é um dos factores que influencia a amplitude do ganho de inserção clínica final. Neste estudo, a média do aumento da recessão gengival, semelhante ao obtido no estudo de Pontoriero (1999), foi muito significativo (1,48 mm) tendo em

conta que foi utilizada uma técnica de preservação da papila e que todos os defeitos se situavam no sector anterior, representando assim um mau resultado estético. Numa avaliação mais pormenorizada, a recessão foi muito superior nos defeitos de uma parede (2 mm) do que nos defeitos de duas paredes (1,1 mm). Este facto pode ter ficado a dever-se ao colapso do retalho uma vez que os defeitos eram bastante profundos.

Os bons resultados clínicos não foram confirmados pela avaliação radiográfica. De facto não houve diferenças significativas no perfil e na densidade do osso interproximal, o que contraria o verificado noutros estudos (Heijl *et al.* 1997, Zetterström *et al.* 1997). No entanto, aquando da re-entrada efectuada em 13 doentes, verificou-se o preenchimento dos defeitos com um tecido de consistência elástica, que não permitiu a sondagem. Nestes casos, o ganho do nível ósseo foi em média de 2,54 mm.

Ao estudar o tratamento com EMD em defeitos muito profundos (PD pré-operatória superior a 7 mm e um componente intra-ósseo do defeito superior a 5 mm), Cardaropoli e Leonhardt (2002) obtiveram um ganho de CAL bastante significativo (Quadro 6 - Anexo II), superior aos estudos já referenciados. De facto estes autores obtiveram uma média de ganho de CAL de 6,5 mm em 10 defeitos profundos, de 1 e de 2 paredes. O único estudo que tratou defeitos com características semelhantes foi o de Parodi e colaboradores (2000), no subgrupo de defeitos muito profundos, tendo apresentado, no entanto, um ganho de CAL inferior (4,6 mm).

A média de recessão gengival foi muito pequena (0,5 mm) quando comparada com outros estudos já referenciados. O único estudo que obteve valores semelhantes foi o estudo de Heden e colaboradores (1999), estabelecendo a mesma relação entre um maior ganho de CAL nos casos em que a recessão era mais diminuta.

O ganho de osso avaliado radiologicamente foi de 4,7 mm ($p < 0,001$), correspondendo a 77% de preenchimento do defeito inicial. Também neste

parâmetro o estudo de Cardaropoli e Leonhardt (2002) revelou valores superiores a outros estudos.

Uma vez que a técnica cirúrgica de manuseamento do retalho parece afectar o ganho de CAL e o preenchimento ósseo do defeito dos procedimentos regenerativos (Kornman e Robertson 2000), Trombelli e colaboradores (2002a) estudaram a influência de diferentes técnicas de preservação da papila interdentária no tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD. Os 35 defeitos tratados resultaram num ganho médio de CAL de 4,7 mm e numa diminuição média da profundidade óssea de 3,9 mm (Quadro 7 - Anexo II). Estes resultados comparam-se aos obtidos nos estudos de Heden e colaboradores (2000; 1999), mas diferem consideravelmente de outros (Heijl *et al.* 1997, Pontoriero *et al.* 1999, Parashis e Tsiklakis 2000). As diferenças entre os estudos podem, pelo menos em parte, explicar-se pelas características dos doentes e do defeito, pela fase manutenção e pela técnica cirúrgica.

Objectivamente neste estudo, as técnicas cirúrgicas utilizadas (técnica de preservação da papila e variantes simplificada e modificada) tiveram por objectivo obter o encerramento primário da papila interdentária, evitar o seu colapso sobre o defeito, optimizando o espaço disponível para a regeneração. De facto, uma análise de regressão mostrou uma relação positiva entre o ganho de CAL, como variável dependente, a PD pré-operatória e a quantidade de tecido gengival supracrestal. Esta relação foi estatisticamente significativa. Neste estudo, a recessão pós-operatória foi muito diminuta, havendo o registo de 16 casos em que a margem gengival se situou 1 mm acima do nível pré-operatório. Tal resultado pode ter ficado a dever-se às técnicas cirúrgicas utilizadas. No entanto, devido ao pequeno tamanho da amostra, não foi possível obter conclusões estatisticamente válidas quanto ao tipo de retalho utilizado. Este valor de recessão foi igualmente obtido nos estudos de Heden (1999) e de Parashis e Tsiklakis (2000), mas nestes últimos não foi especificada a técnica cirúrgica utilizada.

A comparação entre fumadores (11) e não fumadores (24), no que respeita a diminuição de PD, diminuição da profundidade óssea e o ganho de CAL, mostrou uma tendência para um efeito negativo do tabaco, mas sem significado estatístico. Muito recentemente uma série de casos clínicos (160 defeitos presentes em 16 doentes), recorrendo a cirurgia minimamente invasiva associada ao EMD (Harrel *et al.* 2005), apresentou resultados superiores aos estudos anteriormente referenciados. Destes resultados, destacam-se particularmente os relacionados com a recessão gengival que não sofreu alterações. Um dos factores que certamente contribuiu para este facto foi a abordagem microcirúrgica efectuada, corroborando os resultados de outros estudos controlados que utilizaram o mesmo tipo de abordagem (Cortellini e Tonetti 2001, Wachtel *et al.* 2003).

c. 4.1.2. Estudos comparativos entre o EMD e a cirurgia de retalho

São alguns os estudos comparativos do EMD com a cirurgia de retalho, com ou sem placebo (Tabela 3.2).

Heijl e colaboradores (1997) apresentaram o primeiro ensaio clínico que testou a eficácia do tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD comparativamente a um placebo (PGA). O ensaio clínico multicêntrico, aleatório, em “boca partida”, envolveu 33 indivíduos com 34 pares de defeitos infra-ósseos, predominantemente de 1 e de 2 paredes ósseas, monitorizados durante 36 meses. O tratamento com EMD resultou num ganho estatisticamente significativo de inserção clínica e de osso quando comparado com o controlo. A diminuição da PD média foi significativamente superior no grupo EMD comparativamente ao controlo, em todos os tempos de avaliação (8, 16 e 36 meses) (Quadro 8 - Anexo II). Aos 36 meses, o valor médio de ganho de CAL no teste e no controlo foi de 2,2 mm e 1,7 mm, respectivamente ($p < 0,01$). Esta diferença foi inicialmente detectada aos 8 meses e foi-se acentuando ao longo da duração do estudo.

Tabela 3.2 - Estudos comparativos entre o EMD e a **cirurgia de retalho** no tratamento de defeitos infra-ósseos.

Estudos	Nº defeitos / Técnica	Tipo de defeitos	Tempo	Diminuição PD mm (%)	Ganho CAL mm (%)	Aumento RE mm	Preenchimento ósseo mm (%)
Heijl <i>et al.</i> 1997	34 EMD 34 PGA	1w, 2w 1w, 2w(+)	8 M	3,3 2,6	2,1 1,5	NA	0,9
	31 EMD 31 PGA		16 M	3,3 2,6	2,3 1,7		2,2
	27 EMD 27 PGA		36 M	3,1 2,3	2,2 1,7		2,7 (66) 0
Zetterström <i>et al.</i> 1997	45 EMD 21 OFD	NA	8 M	4,3 3,8	3,3 2,9	NA	1,2 0,3
	45 EMD 21 OFD		36 M	3,8 3,2	2,9 2,2		2,4 (70) 0
Pontoriero <i>et al.</i> 1999	10 EMD 10 PGA	NA	12 M	4,4 (55) 3,5	3,0 (33) 1,8	1,7 1,7	NA
	30 GTR 30 OFD			4,5 3,4	3,1 1,8	1,4 1,6	
Okuda <i>et al.</i> 2000	18 EMD 18 PGA	1w(10) 2w(10) 3w(16)	12 M	3,0 (46) 2,2	1,7 (27) 0,8	1,2 1,2	RBD 20,2% RBD -3,9%
Froum <i>et al.</i> 2001	53 EMD 31 OFD	NA	12 M	4,94 (61) 2,24	4,26 2,75	0,61 1,29	3,83 (74) 1,47 (23)
Tonetti <i>et al.</i> 2002	83 EMD 83 OFD	1w, 2w(+), 3w 1w, 2w(+), 3w	12 M	3,9 (49) 3,3	3,1 (33) 2,5	0,8 0,8	NA
Wachtel <i>et al.</i> 2003	26 EMD 26 OFD	NA	12 M	3,9 2,1	3,6 1,7	0,3 0,4	NA
Francetti <i>et al.</i> 2004	12 EMD 12 OFD	NA	12 M	4,71 (59) 2,57 (40)	4,14 (44) 2,29 (29)	NA	2,96 (49) 1,44 (30)
	11 EMD 11 OFD		24 M	4,86 (60) 3,00 (46)	4,29 (45) 2,71 (34)		3,44 (57) 1,84 (38)
Vandana <i>et al.</i> 2004	8 EMD 8 OFD	NA	9 M	3,13 3,50	3,37 3,38	NA (25)	(42)

Abreviaturas: EMD - Emdogain®; PGA - propilenoglicol de alginato; OFD - cirurgia de retalho (Widman modificado, preservação da papila); PD - profundidade de sondagem; CAL - nível de inserção clínica; RE - recessão gengival; W - parede; NA - não avaliado; RBD - densidade óssea radiográfica.

No grupo teste, o nível ósseo radiográfico foi aumentando ao longo dos 36 meses (aos 8 meses foi de 0,9 mm (13% da perda inicial), aos 16 meses foi de 2,2 mm (31 %) e aos 36 meses foi de 2,6 mm (36%)), correspondendo a um resultado final de 66% de preenchimento do defeito, contrastando com o grupo de controlo que não apresentou qualquer ganho ósseo. Além do mais, houve um ganho de osso de pelo menos 20% do defeito inicial, em 74% dos defeitos tratados com EMD, enquanto que nenhum dos defeitos controlo ganhou 20% de osso do defeito inicial.

Resumidamente, neste estudo, o EMD aos 36 meses, aumentou o ganho de CAL em 30% e o ganho ósseo radiográfico em 36%, ou seja melhorou os resultados da cirurgia com PGA em um terço, o que constitui um resultado com relevância clínica.

Estes resultados adquirem um relevo especial se atendermos a dois factos relativos à população do estudo. O primeiro refere-se ao facto de metade dos indivíduos serem fumadores. Apesar de não ser apresentada a sua distribuição entre o grupo teste e o controlo, os autores referem que os resultados aos 16 meses foram mais favoráveis nos não fumadores. No entanto, os resultados do grupo EMD, quando calculados segundo a diferença entre o teste e o controlo no mesmo paciente, não dependeram dos hábitos tabágicos deste. O segundo refere-se ao facto de os doentes incluídos no estudo já terem uma longa história de tratamentos periodontais, que incluiu, em alguns casos, cirurgia periodontal prévia nos locais experimentais. Os autores caracterizaram-nos como “doentes que não respondem ao tratamento periodontal conservador”. Geralmente este tipo de doentes não são incluídos nos estudos de regeneração periodontal.

Um outro ensaio multicêntrico (Zetterström *et al.* 1997) em que o controlo não foi efectuado no mesmo paciente como no estudo anterior, mas em pacientes diferentes, apresentou resultados muito semelhantes: obtiveram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo teste (EMD) e o grupo de controlo

(cirurgia de retalho com aplicação de ácido fosfórico) na redução de PD, no ganho de CAL e no ganho de osso avaliado radiograficamente, tanto aos 8 como aos 36 meses (Quadro 9 - Anexo II). A diferença média de ganho de CAL, comparado com os valores pré-operatórios, foi 3,3 mm (8 meses) e 2,9 mm (36 meses) no grupo EMD, comparadas com 2,6 mm (8 meses) e 2,2 mm (36 meses) no grupo de controlo.

A análise múltipla regressiva demonstrou que, no grupo teste, quanto maior fosse a profundidade de sondagem inicial, maior seria a diminuição da profundidade. A média de ganho ósseo radiográfico no grupo EMD foi de 1,2 mm após oito meses e 2,5 mm após três anos, enquanto que o grupo controlo teve um aumento de 0,3 mm aos oito meses e não mostrou alterações do nível inicial após três anos. Estes resultados demonstram a eficácia do tratamento com EMD comparativamente à cirurgia de retalho com condicionamento ácido.

Pontoriero e colaboradores (1999) publicaram um ensaio clínico controlado que comparou diversas técnicas regenerativas. Os doentes seleccionados apresentavam pelo menos dois defeitos infra-ósseos contralaterais semelhantes ($PD \geq 6$ mm; $CAL \geq 7$ mm; defeito infra-ósseo na radiografia ≥ 3 mm). Os 40 doentes foram subdivididos aleatoriamente em quatro grupos de 10 doentes cada: 3 grupos em que o teste consistiu na aplicação de membranas de GTR (2 reabsorvíveis e 1 não reabsorvível) e o controlo numa cirurgia de retalho; 1 grupo em que o teste consistiu na aplicação de EMD e o controlo na aplicação de um placebo (PGA). No que diz respeito aos resultados deste último grupo, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os valores iniciais e os do décimo segundo mês de PD, de CAL e de recessão gengival (RE), tanto para o teste como para o controlo. Da comparação entre o teste e o controlo, resultou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para a diminuição de PD e o ganho de CAL, em favor do EMD; a recessão gengival não apresentou diferenças.

Neste estudo, o ganho de CAL foi relativamente superior ao obtido nos ensaios apresentados anteriormente (Heijl *et al.* 1997, Zetterström *et al.* 1997). Uma vez que a profundidade média de sondagem pré-operatória foi muito semelhante entre os estudos, talvez o tipo de morfologia do defeito tenha ditado tal diferença, mas no estudo de Pontoriero e colaboradores (1999) não é feita qualquer referência ao tipo de defeito tratado, especialmente ao número de paredes ósseas envolvidas.

Da comparação dos grupos teste de GTR e de EMD, tanto a redução de PD, como o ganho de CAL não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, e a recessão foi ligeiramente superior no EMD.

Da análise da influência da profundidade de sondagem pré-operatória do defeito no resultado final, verificaram que os resultados clínicos foram mais significativos em defeitos mais profundos do que em defeitos mais superficiais, aliás de acordo com outros estudos já referenciados anteriormente (Cortellini *et al.* 1998).

Okuda e colaboradores (2000) realizaram um ensaio clínico aleatório, duplamente cego, controlado por placebo e em “boca partida” (RCT) comparando, aos 12 meses, a cicatrização clínica e radiográfica de defeitos infra-ósseos tratados por EMD e por PGA (placebo). Os 16 doentes seleccionados apresentavam pelo menos um par de defeitos infra-ósseos contralaterais semelhantes ($PD \geq 6$ mm; $CAL \geq 6$ mm; defeito infra-ósseo na radiografia ≥ 4 mm). A cada um dos defeitos dos 18 pares, foi aleatoriamente atribuído o tratamento com EMD ou com placebo. Tanto o tratamento com EMD como com PGA resultaram na melhoria significativa do PD e do CAL aos 12 meses (Quadro 10 - Anexo II). No entanto, houve uma diminuição significativa do PD no grupo do EMD ($3,00 \pm 0,97$ mm) quando comparada com o controlo ($2,22 \pm 0,81$ mm) ($p < 0,05$); de igual modo, houve um ganho de CAL mais significativo no grupo EMD ($1,72 \pm 1,07$ mm) do que no grupo controlo ($0,83 \pm 0,86$ mm) ($p < 0,05$). Em ambos os grupos, a recessão gengival aumentou

significativamente quando comparada com os valores iniciais, mas a diferença entre os grupos não foi significativa.

Comparativamente aos estudos em “boca partida” já referenciados (Heijl *et al.* 1997, Pontoriero *et al.* 1999), o ganho médio de CAL neste estudo revelou-se inferior. Talvez um dos factores que influenciou este resultado seja o valor médio de PD pré-operatório (6,3 mm), tendo este estudo apresentado o valor mais baixo. A morfologia dos defeitos pode igualmente ter influenciado os resultados. No entanto, neste estudo não foi apresentada a distribuição do tipo de defeito pelos grupos.

Da avaliação da densidade óssea da área do defeito, realizada por técnicas de radiografia digital, resultou que no grupo EMD, aos 12 meses, $20,2 \pm 16,6\%$ da área inicial do defeito mostrou um aumento da densidade óssea, enquanto que no grupo de controlo houve uma diminuição dessa densidade ($-3,94 \pm 23,3\%$). Além do mais, 44 % dos defeitos com EMD ganharam mais de 20% de osso, enquanto que só 5% dos defeitos tratados por PGA obtiveram um ganho de mais de 20%. Estes resultados sobrepõem-se aos obtidos por Heijl e colaboradores (1997), já analisados anteriormente.

Um outro ensaio clínico aleatório, duplamente cego, controlado e em “boca partida” foi publicado por Froum e colaboradores (2001). Os 23 doentes seleccionados apresentavam pelo menos dois defeitos infra-ósseos semelhantes. Cinquenta e três defeitos foram tratados com EMD e trinta e um defeitos foram tratados unicamente por cirurgia de retalho, recorrendo a técnicas de preservação de papila. Nos três doentes fumadores foram tratados seis defeitos com EMD e três por cirurgia. Uma vez que um paciente podia participar com um número variável de defeitos, quer no teste quer no controlo, foram utilizadas médias ajustadas. Aos 12 meses, o tratamento com EMD foi superior ao controlo. De uma forma resumida, a média da redução de PD no tratamento com EMD foi 2,7 mm superior; a média do ganho de CAL nos defeitos tratados com EMD foi 1,5 mm superior e a média de preenchimento ósseo dos defeitos tratados com EMD foi 2,4 mm

superior. A média da percentagem de preenchimento ósseo do defeito, depois de efectuados os ajustamentos por perda de crista óssea, foi três vezes superior nos defeitos tratados com EMD comparados com os defeitos sem EMD (74% e 23% respectivamente).

De uma forma geral estes resultados clínicos são da mesma ordem de grandeza que os obtidos noutros estudos já referenciados. No entanto, os resultados referentes ao preenchimento ósseo são um pouco superiores. Uma das variáveis que pode ter influenciado estes resultados, poderá ter sido a profundidade inicial dos defeitos infra-ósseos que, neste estudo, era significativamente superior no grupo teste do que no grupo de controlo. Por outro lado, todas as medições ósseas aos 12 meses foram efectuadas durante uma cirurgia de re-entrada, enquanto que nos outros estudos, as avaliações foram efectuadas em radiografias.

No trabalho de Toneti e colaboradores (2002), multicêntrico, aleatório, paralelo e controlado, foram utilizadas técnicas de preservação de papila (simplificada e modificada) na abordagem cirúrgica do defeitos infra-ósseos, tratados com ou sem EMD. Aos 12 meses, os defeitos teste resultaram, em média, num ganho de CAL de 3,1 mm e numa diminuição de PD de 3,9 mm, valores significativamente diferentes dos obtidos no controlo. O aumento de recessão gengival foi muito semelhante entre os dois grupos (0,8 mm). O tratamento com EMD revelou ser clinicamente significativo, uma vez que duas vezes mais casos teste resultaram no ganho de 4 ou mais mm de CAL, comparativamente ao controlo. Por outro lado, os defeitos com um ganho de CAL muito pequeno (0 e 1 mm) foram duas vezes mais frequentes no controlo do que no EMD. No entanto, metade dos doentes obtiveram ganhos de CAL entre 2 e 3 mm após ambos os tratamentos. Entre as variáveis medidas, o tabaco, a profundidade de sondagem pré-operatória e a corticalização do defeito estavam associados com um ganho inferior de CAL, enquanto que o índice de placa, o índice de hemorragia à sondagem e o componente infra-ósseo do defeito não foram significativos na

variabilidade do ganho de CAL. Este estudo avaliou pela primeira vez a influência da corticalização do defeito no resultado da cicatrização. Tanto os defeitos com uma cortical densa como os que apresentavam uma parede esponjosa hemorrágica obtiveram menor ganho de CAL, comparativamente aos defeitos com uma parede óssea cribiforme. De acordo com estas observações, parece que a qualidade do osso presente no defeito afecta o ganho de CAL. Os doentes fumadores demonstraram ter menor probabilidade (26%) do que os não fumadores, em obter um ganho de CAL igual ou superior a 3mm. Os defeitos de 3 paredes demonstraram ter muito maior probabilidade que os de uma parede, de resultar num ganho de CAL clinicamente significativo (3 ou mais mm).

Um outro ensaio clínico aleatório controlado em “boca partida” (RCT), avaliou o tratamento de defeitos infra-ósseos com e sem EMD, recorrendo à microcirurgia para realizar a técnica modificada de preservação de papila (Wachtel *et al.* 2003). Comparativamente com os valores pré-operatórios, tanto o grupo teste como o controlo resultaram na redução da PD e no ganho de CAL, ambos estatisticamente significativos, tanto aos 6 como aos 12 meses. A diferença entre a redução de PD aos 6 e aos 12 meses foi estatisticamente significativa no grupo teste, mas tal não se verificou no grupo controlo. A redução de PD no grupo EMD foi significativamente superior ao grupo controlo nos dois tempos de observação. No que se refere ao ganho de CAL, o grupo teste resultou num ganho adicional aos 12 meses comparativamente ao verificado aos 6 meses, estatisticamente significativo. No grupo de controlo, parte do ganho de CAL obtido aos 6 meses foi perdido após os 12 meses. Aos 12 meses, 85% dos defeitos tratados com EMD resultaram num ganho de CAL superior a 2 mm, enquanto que tal só se verificou em 27% dos defeitos tratados cirurgicamente sem EMD.

Quanto à recessão gengival, os resultados foram muito favoráveis no sentido da preservação dos tecidos periodontais uma vez que ambos os grupos

obtiveram uma recessão gengival mínima, não sendo estatisticamente significativa a diferença entre o grupo de teste e controlo aos 12 meses. Uma explicação para este facto pode residir na abordagem microcirúrgica utilizada, a qual evidenciou uma cicatrização precoce de ótimas características, de acordo com um índice de cicatrização desenvolvido pelos autores, tanto no grupo teste como no de controlo. De facto a abordagem microcirúrgica favorece o manuseamento dos tecidos periodontais no sentido da sua maior preservação, assim como potencia a obtenção de um encerramento primário, factores associados com o sucesso das técnicas regenerativas.

Um ensaio prospectivo a 24 meses foi recentemente publicado por Francetti e colaboradores (2004). Neste ensaio aleatório e paralelo, foram tratados 24 defeitos infra-ósseos, recorrendo à técnica simplificada de retalho de preservação da papila, com EMD (teste) ou sem EMD (controlo). Em ambos os grupos, os parâmetros clínicos (PD e CAL) e radiográficos melhoraram aos 12 meses e aos 24 meses quando comparados com o início do estudo. Individualmente, a diminuição de PD em relação ao pré-operatório foi estatisticamente significativa entre os dois grupos aos 12 meses, com melhores resultados no grupo EMD; no entanto, aos 24 meses não se registaram diferenças estatisticamente significativas. No que se refere ao ganho de CAL, os resultados do grupo EMD foram significativamente melhores do que no grupo controlo, tanto aos 12 como aos 24 meses. De igual modo, a diminuição da profundidade óssea do defeito foi significativamente superior no grupo EMD do que no controlo, tanto aos 12 como aos 24 meses.

De um modo geral, os resultados dos parâmetros clínicos são superiores aos obtidos por Heijl e colaboradores (1997) aos 36 meses. Tal facto pode ficar a dever-se ao facto de no estudo de Heijl e colaboradores (1997) tenha sido utilizada uma técnica cirúrgica não especificamente direccionada para a preservação das estruturas periodontais (técnica de retalho modificado de Widman), enquanto que neste estudo foi utilizada uma técnica otimizada de

preservação dos tecidos periodontais. Por outro lado, neste estudo, a média pré-operatória de PD dos defeitos tratados com EMD era cerca de 1 mm superior à media do grupo controlo, o que logo à partida condicionou a obtenção de melhores resultados no ganho de CAL no grupo teste.

Quanto ao preenchimento ósseo do defeito, e tendo em conta as diferenças nos métodos de avaliação e nos parâmetros radiológicos utilizados nos estudos, de um modo geral poderemos dizer que, como no estudo de Heijl e colaboradores (1997), a cicatrização óssea do defeito faz-se a longo prazo, obtendo-se melhores resultados aos 24 meses do que aos 12 meses.

Embora neste estudo tenham sido incluídos doentes fumadores (3 no grupo controlo e 5 no grupo teste), a pequena dimensão da amostra não permitiu fazer uma avaliação, com valor estatístico, da influência desse factor na eficácia do tratamento.

Recentemente, Vandana e colaboradores (2004) publicaram um estudo que englobava oito doentes, quatro dos quais com periodontite agressiva. Ao contrário do verificado na maioria dos estudos já referenciados, neste não se verificou uma diferença significativa no ganho de CAL, na diminuição da PD e no preenchimento ósseo dos defeitos entre o tratamento com EMD e a cirurgia de retalho. A comparação entre os doentes com periodontite crónica e os com periodontite agressiva não é conclusiva, uma vez que a amostra era reduzida e verificou-se uma grande variabilidade dos resultados.

A média de ganho de CAL com EMD observada nos estudos aleatórios controlados é significativamente inferior à obtida nos estudos de séries de casos. Este facto não é estranho uma vez que é unanimemente aceite que nos estudos abertos não controlados há uma participação importante do operador/avaliador que, de modo subjectivo, influencia positivamente os resultados clínicos.

c. 4.1.3. Estudos comparativos entre o EMD e a GTR

São numerosos os estudos controlados que compararam o tratamento com EMD com a técnica de regeneração guiada de tecidos (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Estudos comparativos entre o EMD e a GTR no tratamento de defeitos infra-ósseos.

Estudo	Nº defeito / Técnicas	Tipo de defeitos	Tempo	Diminuição PD mm (%)	Ganho CAL mm (%)	Aumento RE mm	Preenchimento ósseo mm (%)	
Sculean <i>et al.</i> 1999a	16 EMD	1w(2), 2w(12), 3w(3)	8 M	3,8 (46,9)	3,1 (30,1)	0,8	NA	
	16 GTR	1w(1), 2w(12), 3w(3)		4,0 (48,2)	2,9 (29,7)			1,1
Sculean <i>et al.</i> 2001c	12 EMD	1w(1), 2w(9), 3w(2)	12 M	4,3 (53,1)	3,4 (34,7)	0,9	NA	
	12 GTR			1w(1), 2w(8), 3w(3)	4,5 (55,5)			3,2 (32,7)
	12 EMD	1w(1), 2w(8), 3w(3)	48 M	3,4 (42,0)	3,0 (30,6)	0,4	NA	
	12 GTR			3,4 (42,0)	2,9 (29,6)			0,5
Sculean <i>et al.</i> 2001d	14 EMD	1-2w(4), 2w(6), 3w(4)	12 M	4,1 (48,8)	3,4 (32,1)	0,7	NA	
	14 GTR			1-2w(5), 2w(6), 3w(3)	4,2 (50,0)			3,1 (31,1)
	14 EMD + GTR	1-2w(3), 2w(8), 3w(3)	12 M	4,3 (50,0)	3,4 (34,0)	1,1	NA	
	14 OFD			1-2w(4), 2w(5), 3w(5)	3,7 (43,0)			1,7 (16,8)
Silvestri <i>et al.</i> 2000	10 EMD	NA	12 M	4,5 (63,6)	4,8 (49,5)	0,5	NA	
	10 GTR			5,9	4,8			0,7
	10 OFD			1,4	1,2			0,2
Silvestri <i>et al.</i> 2003	49 EMD	1-2w(28), 3w(21)	12 M	5,3	4,1 (41)	NA	NA	
	49 GTR			1-2w(25), 3w(24)	5,6			4,3 (48)
Zuccheli <i>et al.</i> 2002	30 EMD	NA	12 M	5,1	4,2	1,0	NA	
	30 GTR			6,5	4,9			1,6
	30 OFD			4,5	2,6			1,9
Minabe <i>et al.</i> 2002	22 EMD	1w(4), 2w (7), 3w(11)	12 M	3,8 (63)	2,6 (32)	1,2	(40)	
	23 GTR			1w(1), 2w (14), 3w (8)	3,7 (57)		2,8 (38)	0,9
	24 EMD + GTR	1w(3), 2w (10), 3w(11)	4,3	3,0	1,2	(49)		

Sanz <i>et al.</i> 2004	32	EMD	1w, 2w, 3w(+)	12 M	3,8	3,1	0,6	NA
	35	GTR	1w, 2w, 3w(+)		3,3	2,5	0,7	
Sculean <i>et al.</i> 2004	11	EMD	1-2w(3), 2w(7), 3w(1)	12 M	4,6	3,4	1,3	NA
	11	GTR	1-2w(3), 2w(6), 3w(2)		4,4	3,0	1,5	
	10	EMD + GTR	1-2w(2), 2w(7), 3w(1)		4,4	3,0	1,5	
	10	OFD	1-2w(3), 2w(5), 3w(2)		3,3	1,6	1,7	
	11	EMD	1-2w(3), 2w(7), 3w(1)	60 M	4,3	2,9	1,3	
	11	GTR	1-2w(3), 2w(6), 3w(2)		3,9	2,7	1,2	
	10	EMD + GTR	1-2w(2), 2w(7), 3w(1)		4,0	2,6	1,5	
	10	OFD	1-2w(3), 2w(5), 3w(2)		2,7	1,3	1,7	

Abreviaturas: EMD - Emdogain®; GTR - regeneração guiada de tecidos; OFD - cirurgia de retalho (Widman modificado, preservação da papila); PD - profundidade de sondagem; CAL - nível de inserção clínica; RE - recessão gengival; W - parede; NA - não avaliado.

Sculean e colaboradores publicaram diversos estudos comparativos entre o EMD e GTR no tratamento de defeitos infragengivais (1999a, 2001c, d, 2004). Um estudo controlado e aleatório, publicado em 1999, comparou o tratamento com EMD *versus* GTR em 32 defeitos contralaterais, maioritariamente de duas paredes. Aos 8 meses, ambos os tratamentos resultaram numa redução da PD e num ganho significativo de CAL. No entanto, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros clínicos avaliados (Quadro 11 - Anexo II).

Em ambos os grupos, a inflamação gengival e o nível de higiene oral melhoraram significativamente, mas aos 8 meses não havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os valores iniciais de PD, CAL e RE não foram significativamente diferentes entre os dois grupos. A PD diminuiu significativamente nos dois grupos comparativamente aos valores iniciais ($p < 0,001$), mas não houve diferença significativa aos 8 meses. De igual modo, o ganho de CAL aumentou

significativamente nos dois grupos, mas aos 8 meses a diferença entre o grupo EMD e GTR não era significativa. O mesmo se passou com a recessão gengival. É de salientar que, no grupo de GTR, verificou-se a exposição da membrana em 7 dos 16 defeitos tratados, o que certamente afectou negativamente os resultados clínicos, problema esse inexistente na técnica com EMD.

Doze dos dezasseis doentes avaliados no estudo anteriormente descrito foram seguidos ao longo de 4 anos (Sculean *et al.* 2001c). Aos 4 anos, observou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da PD em ambos os grupos comparativamente com valores obtidos aos 12 meses, e os valores mantinham-se muito significativos comparativamente aos valores iniciais ($p < 0,001$). De igual modo, aos 4 anos, o ganho de CAL de ambos os grupos era estatisticamente significativo comparativamente aos valores iniciais ($p < 0,001$), mas não havia diferença significativa ao fim de 12 meses. Quanto à recessão gengival, não houve diferenças significativas aos 12 meses e aos 4 anos. Aos 4 anos, os valores de recessão gengival diminuíram em ambos os grupos comparativamente aos 12 meses, mas a diferença só foi significativa no grupo de GTR ($p < 0,05$) (Quadro 12 - Anexo II).

Os resultados deste estudo demonstraram que a diminuição de PD e o ganho de CAL podem ser mantidos durante 4 anos, tanto após o tratamento com GTR como com EMD. A semelhança entre os resultados obtidos ao fim de um ano, manteve-se durante mais três anos. No entanto, em ambos os grupos houve uma ligeira perda de CAL, que os autores justificam pelo ligeiro aumento de PD, acompanhado de um aumento do índice de placa para valores superiores aos observados no início do estudo.

Neste estudo o ganho médio de CAL aos 4 anos (3,0 mm) foi superior ao obtido aos 36 meses (2,2 mm) no estudo de Heijl e colaboradores (1997), mas tal pode ter ficado a dever-se ao facto de, no presente estudo, os defeitos serem maioritariamente de duas paredes, enquanto que no estudo de Heijl e colaboradores (1997) eram de uma parede. Para além disso, a profundidade

de sondagem média inicial no estudo de Sculean e colaboradores (2001c) foi ligeiramente superior à de Heijl e colaboradores (1997) que, como já vimos anteriormente, pode ser um factor importante no resultado final, i.e., quanto mais profunda a bolsa no início do tratamento, maior probabilidade existirá para uma maior regeneração.

O grupo de investigação de Sculean e colaboradores (2001d) publicou um outro ensaio comparativo mais completo em que, para além do tratamento com EMD e GTR, também testaram a associação do EMD com GTR, comparativamente à cirurgia de retalho. Seleccionaram 56 doentes, distribuídos aleatoriamente por quatro grupos de tratamento, com 14 defeitos cada. Aos 12 meses, a PD diminuiu significativamente nos quatro grupos ($p < 0,001$). No entanto, entre os grupos não houve diferenças estatisticamente significativas. O CAL aumentou significativamente em todos os grupos ($p < 0,001$). Entre os três grupos de teste (EMD, GTR e GTR com EMD) não houve diferenças significativas, mas os valores relativos ao controlo foram estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) (Quadro 13 - Anexo II). Embora houvesse fumadores em todos os grupos, o seu reduzido número não possibilitou a análise dos seus possíveis efeitos nos resultados clínicos.

Os resultados deste estudo permitiram verificar que o tratamento combinado EMD e GTR não aumentou a capacidade regenerativa de ambas as técnicas quando usadas conjuntamente, confirmando aliás resultados obtidos em estudos animais (Sculean *et al.* 2000c). Estes resultados podem traduzir as diferenças nos modos de cicatrização entre as duas técnicas. Para além disso, houve exposição da membrana tanto no grupo GTR (6 casos) como na combinação EMD+GTR (5 casos), o que pode ter influenciado negativamente os resultados. A aplicação do EMD não parece ter impedido o aparecimento desta complicação pós-operatória. Assim, parece não se justificar a aplicação clínica da combinação destas duas técnicas regenerativas.

Um primeiro estudo de Silvestri e colaboradores (2000) comparou a eficácia

de três procedimentos cirúrgicos no tratamento de defeitos infra-ósseos: GTR, EMD e cirurgia de retalho (Widman modificado). A eficácia de cada tratamento foi investigada através de uma análise regressiva. Trinta doentes apresentando um defeito infra-ósseo foram aleatoriamente distribuídos por um dos três grupos de tratamento. Um ano após o tratamento, o EMD e GTR demonstraram melhores resultados comparativamente à cirurgia, cujo procedimento não obteve alterações significativas no ganho de CAL e na redução da PD. Por outro lado, não houve diferenças significativas no ganho de CAL entre o EMD e a GTR. No entanto, os resultados da análise demonstraram uma relação significativa entre o sucesso do resultado e os valores iniciais de CAL. A GTR pareceu obter melhores resultados que o EMD em termos de percentagem de ganho de CAL em doentes com um nível de inserção clínica inicial superior ou igual a 9 mm. Por outro lado, em doentes com um nível de inserção clínica inferior a 9 mm, o EMD pareceu obter melhores resultados que a GTR em termos de percentagem de ganho de CAL.

Os mesmos autores efectuaram um novo estudo (Silvestri *et al.* 2003), multicêntrico, envolvendo 98 doentes, distribuídos por dois grupos (EMD e GTR), uma vez que o estudo referido anteriormente, tinha demonstrado a ineficácia da técnica de retalho modificado de Widman na regeneração periodontal. Os resultados deste novo estudo confirmaram a inexistência de uma diferença estatisticamente significativa em termos de ganho de CAL e de redução de PD, entre o EMD e a GTR.

À semelhança do resultado da análise regressiva do primeiro estudo de Silvestri e colaboradores (2000), a GTR demonstrou melhor ganho de CAL que o EMD, nos casos em que o CAL inicial era superior a 8 mm, embora essa variação fosse muito reduzida (0,3 mm) e sem grande importância clínica. De acordo com os autores, isto pode ter ficado a dever-se à frequência de exposição da membrana nas primeiras semanas pós-operatórias (70% no estudo piloto e 48% no estudo multicêntrico) e ao facto da membrana utilizada não ser

reabsorvível e ser necessário uma segunda fase cirúrgica para a remover. Uma outra análise regressiva efectuada demonstrou uma correlação estatisticamente significativa entre a percentagem de ganho de CAL e a hemorragia gengival, para ambos os tratamentos, indicando melhores resultados clínicos para os casos em que a hemorragia gengival era menor. Uma outra correlação foi igualmente estabelecida entre os componentes da parede dos defeitos e o ganho de CAL. O grupo dos defeitos de 3 paredes obtiveram um ganho de CAL significativo comparativamente aos outros dois grupos, de duas e uma paredes, respectivamente, não sendo notórias as diferenças entre estes dois últimos grupos. Estes resultados confirmam a tendência já analisada para a GTR por outros autores (Tonetti *et al.* 1996). Um estudo clínico controlado, aleatório (RCT) e paralelo (Zucchelli *et al.* 2002) comparou o tratamento com EMD, com GTR (membrana não reabsorvível reforçada com titânio) e com cirurgia de retalho pela técnica simplificada de preservação da papila, tendo sido esta a técnica cirúrgica nos outros grupos. Em todos os grupos procedeu-se ao tratamento da raiz com EDTA. Aos 12 meses, houve um aumento estatístico e clinicamente significativo de ganho de CAL e de redução de PD nos pacientes tratados com EMD e com GTR, comparativamente aos tratados com cirurgia. Da análise de variáveis múltiplas (causas de variabilidade como as modalidades de tratamento, características do defeito e do doente) que afectaram os resultados, o tipo de tratamento foi a variável mais significativa para o ganho de CAL, a diminuição de PD e o aumento da recessão gengival. De igual modo, a PD inicial (característica do defeito) demonstrou uma correlação significativa com os três parâmetros avaliados. Entre as características relativas ao doente, o tabaco demonstrou ter uma influência negativa no ganho de CAL para ambos os procedimentos regenerativos. No grupo de GTR, a exposição da membrana que ocorreu em 33% dos casos, indicou um menor ganho de CAL e um maior aumento de recessão gengival, ambos estatisticamente significativos.

Apesar do tratamento por GTR ter resultado um ganho superior de CAL (estatisticamente significativo) comparativamente ao EMD, os dois tratamentos demonstraram ser similares em termos de eficácia clínica, uma vez que uma elevada percentagem de defeitos obteve um ganho de CAL igual ou superior a 4 mm (76.6% no EMD e 83,3% no GTR). Para além disso, verificaram que a técnica de aplicação do EMD revelou ser de execução mais simples, apresentou menos riscos e foi menos invasiva que a GTR.

No que se refere à diminuição da PD, o GTR resultou numa redução superior, estatisticamente significativa, em comparação com o EMD. Clinicamente, esta diferença é igualmente significativa uma vez que a grande maioria dos defeitos (87%) tratados por GTR apresentavam uma PD igual ou inferior a 3 mm e não havia bolsas residuais. Por outro lado, só 20% dos defeitos tratados por EMD não apresentavam bolsa (PD igual ou inferior a 3 mm) e 7% apresentavam bolsas residuais.

Neste estudo (Zucchelli *et al.* 2002), o GTR esteve associado com um maior aumento de recessão gengival comparativamente ao EMD. Do ponto de vista clínico, é ainda mais significativo uma vez que a grande maioria (87%) dos defeitos tratados por EMD apresentaram uma recessão gengival diminuta (igual ou inferior a 1 mm) enquanto que metade dos defeitos tratados por GTR apresentavam um aumento da recessão gengival igual ou superior a 2 mm.

De acordo com estas observações, os autores sugeriram diferentes abordagens regenerativas de acordo com os objectivos. Assim, a GTR estaria mais indicada quando o principal objectivo fosse a obtenção de uma bolsa residual pouco profunda. Por outro lado, o EMD seria o tratamento de escolha quando o objectivo fosse a obtenção de uma recessão gengival mínima, como seria o caso de defeitos infra-ósseos situados em zonas estéticas anteriores.

Minabe e colaboradores (2002) compararam o tratamento combinado (EMD com GTR reabsorvível) com as técnicas regenerativas isoladas (EMD e GTR), em 69 defeitos infra-ósseos de 61 doentes. Ao fim de um ano, verificaram que não

houve diferenças significativas na diminuição da PD, no ganho de CAL, no aumento da recessão gengival e no preenchimento ósseo dos defeitos entre os três tratamentos. Em 70 a 80% dos casos verificaram um ganho de CAL de 1 a 3 mm. Da associação das duas técnicas regenerativas não resultou uma potenciação da sua capacidade regenerativa, a qual foi similar nas duas monoterapias, aliás, como já outros estudos tinham concluído (Sculean *et al.* 2000c, 2001d). Porém, neste estudo não se verificou qualquer relação entre o tamanho dos defeitos e o ganho de CAL para qualquer dos tratamentos.

Um estudo multicêntrico, paralelo (Sanz *et al.* 2004), envolvendo 67 doentes com defeitos periodontais infra-ósseos tratados por EMD ou por GTR, utilizando a técnica simplificada de preservação de papila, não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros clínicos aos 12 meses. A análise de variáveis múltiplas demonstrou que o centro onde tida sido efectuado o tratamento representava a variável com maior influência nas diferenças observadas no ganho de CAL. Por outro lado, a PD inicial correlacionou-se positivamente com o ganho de CAL. Outras variáveis como o tabaco, a profundidade do defeito e o componente intra-ósseo não influenciavam significativamente o ganho de CAL. Um factor que pode ter influenciado negativamente os resultados obtidos no tratamento com GTR, pode ter sido a grande incidência (100%) de complicações pós-operatórias, uma vez que nos casos tratados com EMD essa incidência só foi de 6%. Por outro lado, a frequência de distribuição de ganho de CAL demonstrou que houve perda de CAL em 6% dos defeitos tratados por GTR, enquanto que em nenhum dos casos tratados por EMD isso se verificou.

Recentemente, foi publicado um estudo a longo prazo (Sculean *et al.* 2004) referente a quarenta e dois doentes participantes num estudo publicado anteriormente (Sculean *et al.* 2001d), pelo que faremos a sua avaliação posterior, conjuntamente com outros estudos referentes a resultados a longo prazo.

c. 4.1.4. Estudos comparativos entre o EMD e os substituintes ósseos

Uma das possíveis limitações na utilização do derivado da matriz do esmalte será a sua consistência semi-fluida. O efeito de manutenção de espaço atribuído aos materiais de substituição óssea sólidos, representa uma característica física desejável do material regenerativo quando a formação de osso é um dos objectivos do tratamento. A hipótese que a combinação do EMD com esses materiais sólidos (osso alógeno, osso xenógeno e biovidro) aumentaria os resultados clínicos do EMD foi testada em diversos estudos (Tabela 3.4). Entre os materiais avaliados, o xeno-enxerto de origem bovina (BPBM) foi o mais utilizado.

Dos estudos apresentados, só três (Lekovic *et al.* 2000, Velasquez-Plata *et al.* 2002, Zucchelli *et al.* 2003) permitem avaliar o aumento da capacidade regenerativa do EMD quando combinado ao BPBM.

No estudo de Lekovic e colaboradores (2000), aleatório e cego (RCT), o tratamento combinado obteve resultados significativamente superiores, tanto estatística como clinicamente. Só a recessão gengival não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos. Porém, um outro estudo RCT (Velasquez-Plata *et al.* 2002), também com avaliação aos 6 meses, verificou que as diferenças entre os dois tipos de tratamento (combinado e isolado) só eram significativas na menor recessão gengival pós-operatória e no maior preenchimento ósseo, favorecendo o tratamento combinado. Todos os defeitos tratados pela associação ganharam mais de 75% de preenchimento ósseo, enquanto que tal só se verificou em 85% dos tratados com EMD. A redução da PD, o ganho de CAL não foram significativamente diferentes entre os dois grupos.

Tabela 3.4 - Estudos comparativos entre o **EMD e materiais de substituição óssea** no tratamento de defeitos infra-ósseos.

Estudo	Nº defeitos/tratamento	Tipo de defeitos	Tempo	Diminuição PDmm (%)	Ganho CAL mm (%)	Aumento REmm	Preenchimento ósseo mm (%)
Lekovic <i>et al.</i> 2000	21 EMD + BPBM	2w(14), 3w(7)	6 M	3,4 (49,5)	3,1	1,3	3,8 (81,3)
	21 EMD	2w(15), 3w(6)		1,9 (26,0)	1,7	1,3	1,3 (28,9)
Velasquez-Plata <i>et al.</i> 2002	16 EMD + BPBM	2-3w(9), 3w(7)	6-8 M	4,0	3,4	0,3	4,0 (76,9)
	16 EMD	2-3w(10), 3w(6)		3,8 (57,6)	2,9	0,8	3,1 (64,9)
Zucchelli <i>et al.</i> 2003	30 EMD + BPBM	NA	12 M	6,2	5,8	0,4	5,3
	30 EMD			5,8	4,9	0,9	4,3
Scheyer <i>et al.</i> 2002	17 EMD + BPBM	2-3w(14), 3w(3)	6 M	4,2	3,8	0,4	3,2 (63,3)
	17 BPBM	2-3w(13), 3w(4)		3,9	3,7	0,2	3,0 (67,0)
Sculean <i>et al.</i> 2002b	12 EMD + BPBM	1w(2), 2w(6), 3w(4)	12 M	5,7	4,7	0,8	NA
	12 BPBM	1w(2), 2w(5), 3w(5)		6,5	4,9	1,5	
Camargo <i>et al.</i> 2001	24 EMD + BPBM	2w(17), 3w(7)	6 M	3,9	3,4	1,2	3,8
	24 OFD	2w(18), 3w(6)		1,6	1,4	1,2	1,0
Lekovic <i>et al.</i> 2001a	18 EMD + BPBM + GTR	2w(13), 3w(5)	6 M	4,8	3,8	1,4	4,8
	18 OFD	2w(12), 3w(6)		2,9	1,5	1,5	1,7
Pietruska 2001	12 EMD	2w(9), 3w(3)	12 M	4,0 (50,0)	3,0 (30,6)	1,4	2,6 (50,0)
	12 GTR + BPBM	2w(9), 3w(3)		4,4 (56,4)	3,5 (37,6)	1,3	3,5 (39,7)
Lekovic <i>et al.</i> 2001b	23 EMD + BPBM	2w(16), 3w(7)	6 M	3,0	2,9	0,6	2,8
	23 AFFS + BPBM	2w(15), 3w(8)		2,7	2,8	0,5	2,8

Rosen e Reynolds 2002	10 EMD + DFDBA + GTR	1w,1-2w,2w	6 M	5,4 (64,2)	4,5 (49,1)	NA	NA
	12 EMD + FDBA + GTR	1w,1-2w,2w		5,8 (64,4)	5,3 (57,3)		
Gurinsky et al. 2004	33 EMD + DFDBA	1w(1),1-2w(9),2w(11), 2-3w(2),3w(8),1-2-3w(2)	6 M	3,6	3,0	0,5	3,7 (74,9)
	34 EMD	1w(2),1-2w(7),2w(8), 2-3w(3),3w(10), 1-2-3w(4)		4,0	3,2		0,7
Sculean et al. 2002a	14 EMD + BG	1-2w(3), 2w(9) 3w(2)	12 M	4,1	3,2	1,0	NA
	14 BG	1-2w(4), 2w(8) 3w(2)		4,2	3,1		
Sculean et al. 2005	15 EMD + BG	1-2w(6), 2w(7) 3w(2)	12 M	4,2	3,2	1,1	NA
	15 EMD	1-2w(7), 2w(6) 3w(2)		4,5	3,9		

Abreviaturas: EMD - Emdogain®; GTR - regeneração guiada de tecidos; BPBM - xeno-enxerto de origem bovina; AFFS - selante de fibrina autóloga; DFDBA - alo-enxerto desmineralizado; FDBA - alo-enxerto mineralizado; BG - biovidro; OFD - cirurgia de retalho; PD - profundidade de sondagem; CAL - nível de inserção clínica; RE - recessão gengival; W - parede; NA - não avaliado.

O único estudo RCT com avaliação de 12 meses (Zucchelli *et al.* 2003) indica a utilização do tratamento combinado, apresentando resultados mais significativos no ganho de CAL, no preenchimento ósseo e de menor recessão gengival pós-operatória. A diferença na redução da PD não foi significativa entre os tipos de tratamento. No tratamento combinado, 47% dos defeitos ganharam mais de 5 mm de CAL, comparativamente aos 27% dos tratados com EMD isoladamente. Acrescente-se ainda que todos os defeitos tratados pela associação obtiveram um ganho ósseo de pelo menos 4 mm, enquanto que só 64% dos tratados por EMD obtiveram esse resultado.

A técnica cirúrgica utilizada neste último estudo baseou-se na preservação

dos tecidos interdentários (retalho simplificado de preservação de papila). Esta abordagem cirúrgica pode justificar o superior ganho de CAL verificado comparativamente aos estudos anteriores, corroborando os resultados de outros (Trombelli *et al.* 2002a, Zucchelli *et al.* 2002). Para além disso, uma análise aprofundada das variáveis indicou haver uma correlação positiva entre o ganho de CAL, o preenchimento ósseo e a menor recessão gengival pós-operatória e a quantidade de tecido supracrestal interdentário. Do mesmo modo, a componente infra-óssea dos defeitos correlacionou-se positivamente com o ganho de CAL e com a menor recessão gengival pós-operatória. Por outro lado, o tabaco relacionou-se negativamente com o ganho de CAL e com a recessão pós-operatória: doentes fumadores obtiveram menor ganho de CAL e maior recessão gengival. Curioso, foi o facto da variável ângulo do defeito ter demonstrado só ser influente no ganho de CAL do tratamento com EMD e não no tratamento combinado. No tratamento com EMD foram obtidos melhores resultados no ganho de CAL em defeitos infra-ósseos verticais com um menor ângulo. Aliás, o estudo de Tsitoura e colaboradores (2004) confirmou esse facto. Com base nas radiografias de um estudo já referenciado (Tonetti *et al.* 2002), concluiu-se que a probabilidade de obter um ganho de CAL superior a três milímetros é 2,5 vezes mais alta quando o ângulo do defeito é igual ou inferior a 22°, do que quando é superior ou igual a 36°.

Da comparação entre o tratamento combinado de BPBM com EMD e a utilização de BPBM isoladamente, não se verificaram diferenças significativas nos parâmetros clínicos referentes aos tecidos moles assim como ao tecido ósseo (Scheyer *et al.* 2002, Sculean *et al.* 2002b). É importante salientar que a reduzida dimensão das amostras destes estudos pode ser responsável pela ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos testados. Segundo Gunsolley e colaboradores (1998), nos estudos clínicos de regeneração periodontal, seria necessária uma amostra de 67 a 137 defeitos por grupo de tratamento, para que diferenças significativas fossem detectadas.

Da análise destes estudos, poderemos concluir que, no tratamento de defeitos infra-ósseos, a combinação do EMD com BPBM resulta na melhoria dos parâmetros clínicos e radiológicos, embora pouco significativa quando comparado com as monoterapias (EMD ou BPBM). Esta melhoria pode ser atribuída à propriedade osteocondutora do material de enxerto, à melhor estabilização do coágulo ou simplesmente ao efeito de preenchimento do espaço fornecido pelo enxerto, o que preveniu o colapso do retalho. Aliás, ao fim de um ano, ainda foram observadas partículas de enxerto, que não tinham sido reabsorvidas (Sculean *et al.* 2002b, Zucchelli *et al.* 2003). Acrescente-se ainda que, nas áreas tratadas com BPBM, a consistência dos tecidos gengivais está aumentada, o que pode oferecer maior resistência à progressão da sonda periodontal no defeito, resultando assim em melhores valores clínicos de PD. Para além dos resultados clínicos favoráveis à combinação do EMD com BPBM, a avaliação histológica é fundamental para caracterizar o tipo de cicatrização. Apesar de confirmada, radiologicamente ou na re-entrada, a existência de novo osso, este pode estar separado da superfície radicular por um ligamento periodontal ou por um epitélio juncional longo. Nos dois casos apresentados por Sculean e colaboradores (2003a), a cicatrização caracterizou-se pela formação de cimento, essencialmente de tipo celular, com fibras colagénicas inseridas. As partículas de BPBM estavam rodeadas por tecido pseudo-ósseo nas áreas dos defeitos onde havia novo ligamento periodontal e novo osso, não havendo contacto com a superfície radicular. O epitélio juncional estendia-se até ao limite coronal do novo cimento, e nessas áreas as partículas de BPBM estavam rodeadas por um tecido conjuntivo. Nesse artigo (Sculean *et al.* 2003a) é também apresentado um caso clínico em que só foi utilizado o xeno-enxerto, o qual apresentou uma cicatrização muito semelhante à combinação com EMD.

Uma série de estudos comparam a associação do EMD a xeno-enxertos com outras técnicas. A combinação do EMD com BPBM demonstrou resultados,

estatística e clinicamente significativos, mais favoráveis que a cirurgia de retalho (OFD), para os parâmetros clínicos e radiológicos, à exceção da recessão gengival (Camargo *et al.* 2001). A associação de uma membrana reabsorvível à combinação de um xeno-enxerto com EMD, melhorou os resultados clínicos comparativamente à cirurgia de retalho (Lekovic *et al.* 2001a). A comparação do EMD, usado isoladamente, com a associação de BPBM e GTR, demonstrou reduções significativas dos parâmetros clínicos e radiológicos para ambos os tratamentos, mas sem diferenças significativas entre eles (Pietruska 2001). A combinação de BPBM com EMD ou com um selante de fibrina autóloga (AFFS), não resultou em diferenças significativas nos parâmetros clínicos e radiológicos entre os dois tratamentos (Lekovic *et al.* 2001b). Devido à heterogeneidade dos grupos experimentais e à dimensão da amostras, estes estudos não permitem concluir quanto às potencialidades acrescidas da combinação do EMD com xeno-enxertos.

Foram publicados poucos artigos sobre a associação do EMD aos enxertos alógenos. Um estudo (Rosen e Reynolds 2002) reporta uma série de 22 casos clínicos de defeitos infra-ósseos extensos, em que foram conjugadas diversas técnicas regenerativas: condicionamento da superfície com ácido cítrico, recobrimento da raiz com EMD, preenchimento do defeito com alo-enxertos ósseos (DFDBA ou FDBA) e GTR, mediante a colocação de uma membrana reabsorvível de polímero de ácido láctico. Os resultados percentuais de ganho de CAL de 49% para o DFDBA e de 57% para o FDBA foram bastante significativos, tendo em conta a morfologia dos defeitos. O preenchimento ósseo dos defeitos não foi avaliado, apesar de se referir a re-entrada cirúrgica de alguns casos. De qualquer modo, os resultados, para além de corresponderem a uma série de casos clínicos, correspondem à combinação das cinco técnicas regenerativas utilizadas, pelo que não se podem tirar conclusões sobre um possível efeito potenciador regenerativo do EMD.

Mais recentemente, um estudo controlado, paralelo e aleatório comparou a associação do EMD com DFDBA ao EMD (Gurinsky *et al.* 2004). Aos seis meses, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois tratamentos no que diz respeito aos tecidos moles (PD, CAL e RE). Contudo, com base nas medições efectuadas na re-entrada, o tratamento combinado obteve resultados significativamente superiores no preenchimento ósseo dos defeitos (maior número de defeitos que ganharam mais de 50% e de 90%) e menor reabsorção da crista alveolar. A percentagem de resolução do defeito foi igualmente superior no tratamento combinado, sem contudo ser estatisticamente significativo. Apesar do período de observação deste estudo ser relativamente curto (6 meses), os resultados obtidos parecem confirmar a potenciação da osteoindução entre o DFDBA activo e o EMD verificada num estudo pré-clínico (Boyan *et al.* 2000).

A associação do EMD com um biovidro não mostrou diferenças significativas dos parâmetros clínicos com as monoterapias (EMD (Sculean *et al.* 2002a) e biovidro (Sculean *et al.* 2005)). Alguns estudos clínicos demonstraram melhores resultados após a utilização de biovidros comparativamente à cirurgia de retalho, no tratamento de defeitos infra-ósseos (Zamet *et al.* 1997, Froum *et al.* 1998). Contudo, a capacidade regenerativa dos biovidros é muito controversa. A avaliação histológica em humanos mostrou ausência de regeneração dos tecidos periodontais após a utilização de um biovidro (Nevins *et al.* 2000). Com base nestes dados, pensamos não haver razão para utilizar essa combinação (Emdogain® Gel TS) no tratamento de defeitos infra-ósseos.

c. 4.1.5. Resultados a médio e longo prazo

Um ensaio prospectivo a 24 meses foi publicado por Francetti e colaboradores (2004) (Tabela 3.2). Os parâmetros clínicos referentes aos tecidos moles mantiveram-se estatisticamente superiores aos valores pré-operatórios, não

havendo diferenças significativas quando comparados com os resultados aos 12 meses. No que diz respeito ao tecido ósseo, verificou-se um aumento do preenchimento ósseo do defeito ao longo dos últimos 12 meses.

Num ensaio clínico multicêntrico (Heijl *et al.* 1997) (Tabela 3.2), o valor médio de ganho de CAL manteve-se ao longo de 36 meses, apesar de se terem verificado pequenas oscilações entre os tempos avaliados (8, 16 e 36 meses) (Quadro 8 - Anexo II). Observou-se igualmente um ligeiro aumento da PD, particularmente entre o décimo sexto mês e o final da avaliação. No que se refere ao nível ósseo radiográfico, verificou-se um aumento ao longo dos 36 meses, correspondendo a um resultado final de 66% de preenchimento do defeito.

Num outro estudo multicêntrico (Zetterström *et al.* 1997) (Tabela 3.2), aos 36 meses verificou-se um aumento da PD, uma diminuição do ganho de CAL e um aumento do ganho ósseo.

Recentemente, foram publicados (Parodi *et al.* 2004) (Tabela 3.1) os dados referentes aos 36 meses de evolução de 16 dos 21 doentes participantes no estudo publicado em 2000 confirmando os resultados obtidos aos 12 meses. Decorridos mais dois anos, os valores a diminuição da PD mantiveram-se, mas verificou-se um acréscimo no ganho de CAL e na diminuição da recessão gengival, embora não estatisticamente significativos. Apesar dos bons resultados verificados nos parâmetros clínicos dos tecidos moles, manteve-se a ausência de preenchimento ósseo dos defeitos, contrariando os resultados dos estudos acima referidos.

O grupo de Sculean e colaboradores publicou estudos a quatro anos (2003a - Tabela 3.1, 2001c - Tabela 3.3) e a cinco anos (2004 - Tabela 3.3). No estudo publicado em 2003, apesar da PD ter aumentado ligeiramente entre os 12 e os 48 meses, o ganho de CAL acentuou-se um pouco mais e a recessão gengival diminuiu significativamente. No estudo publicado em 2001 observou-se igualmente um aumento da PD comparativamente aos 12 meses. No entanto, nesse período de tempo verificou-se uma ligeira perda de CAL, que

os autores justificaram pelo aumento de PD e do índice de placa, tendo registado estes últimos valores superiores aos observados no início do estudo. Apesar disso, aos 48 meses, os valores de recessão gengival diminuíram comparativamente aos 12 meses (Quadro 12 - Anexo II).

Recentemente, foram publicados os resultados de quarenta e dois doentes incluídos no estudo de Sculean e colaboradores (2001d), agora avaliados ao fim de cinco anos (Sculean *et al.* 2004) (Tabela 3.3). Na avaliação a longo prazo, verificou-se que os parâmetros se mantinham estatisticamente significativos em relação aos valores iniciais. No entanto, verificou-se que, entre as avaliações aos 12 meses e aos 5 anos, houve uma ligeira redução (estatisticamente não significativa) da média de CAL devida, provavelmente, ao aumento (estatisticamente não significativo) da média de PD. Este aumento pode ter resultado do aumento (estatisticamente não significativo) dos índices de placa, gengival e de hemorragia à sondagem ao longo do tempo de observação. A recessão gengival não mostrou alterações.

Da avaliação global destes estudos, podemos concluir que, após a aplicação de EMD em defeitos infra-ósseos, os resultados alcançados aos doze meses são estáveis a longo prazo (cinco anos), apesar de se verificar uma ligeira tendência para o aumento da profundidade de sondagem e redução do nível clínico de inserção obtido após o tratamento. Alguns destes estudos demonstram ainda que o crescimento ósseo se faz mais tardiamente em relação à regeneração da inserção conjuntiva, podendo ser interpretado como um indicador de regeneração periodontal verdadeira.

c. 4.1.6. Revisões sistemáticas da literatura

Os estudos controlados sobre regeneração periodontal incluem, geralmente, um reduzido número de defeitos em cada grupo de tratamento, pelo que a comparação entre os tratamentos testados não tem poder estatístico suficiente

para demonstrar uma superioridade ou equivalência (Gunsolley *et al.* 1998). Ao efectuar revisões sistemáticas da literatura publicada, com meta-análises dos dados apresentados, é possível aumentar a amostra através do agrupamento dos resultados obtidos nos estudos, individualmente, e assim obter conclusões com valor estatístico significativo.

Relativamente ao tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD, foram publicados diversos artigos com revisões sistemáticas da literatura.

Kalpidis e Ruben (2002) publicaram uma revisão exaustiva da literatura, na qual efectuaram uma meta-análise incluindo 12 estudos controlados, paralelos ou em “boca partida” (Heijl *et al.* 1997, Pontoriero *et al.* 1999, Sculean *et al.* 1999a, Lekovic *et al.* 2000, Okuda *et al.* 2000, Silvestri *et al.* 2000, Froum *et al.* 2001, Pietruska 2001, Sculean *et al.* 2001d, Tonetti *et al.* 2002, Velasquez-Plata *et al.* 2002, Zucchelli *et al.* 2002).

Cada parâmetro (ganho de CAL, redução de PD e aumento da recessão gengival) foi avaliado de acordo com o número de defeitos tratados (média ponderada). Apesar da eficácia demonstrada pelo tratamento com EMD, verificou-se uma variação significativa dos resultados entre os estudos. Na maioria deles o ganho percentual de CAL variou entre 24% e 33%, verificando-se, no entanto, que dois estudos (Silvestri *et al.* 2000, Zucchelli *et al.* 2002) relatavam um ganho de mais de 40% do CAL inicial. A média de ganho de CAL variava entre 1,7 e 4,5 mm. O mesmo se verificou para a redução de PD (1,9 e 5,1 mm; 26% e 64%).

Da avaliação de 317 defeitos (284 doentes) tratados com EMD resultou uma redução de PD de $4,0 \pm 0,9$ mm ($50,4 \pm 9,9\%$) e um ganho de CAL de $3,2 \pm 0,9$ mm ($32,7 \pm 7,6\%$). Da avaliação da margem gengival de 283 defeitos resultou um aumento de recessão gengival de $0,9 \pm 0,4$ mm (Quadro 3.1).

	EMD	GTR	OFD
Nº estudos	12	6	8
Redução PD	4,0 ± 0,9 (317)	5,1 ± 0,9 (112)	3,1 ± 1,0 (260)
mm %	50,4 ± 9,9 (317)	60,9 ± 9,7 (112)	40,1 ± 9,9 (260)
Ganho CAL	3,2 ± 0,9 (317)	3,8 ± 0,8 (112)	2,1 ± 0,7 (260)
mm %	32,7 ± 7,6 (227)	38,7 ± 7,9 (112)	22,4 ± 5,5 (229)
Aumento RE			
mm	0,9 ± 0,4 (283)		

Quadro 3.1 - Diferenças entre o ganho de inserção clínica (CAL) e a redução de profundidade de sondagem (PD), (média ponderada ± desvio padrão (nº de defeitos)), em defeitos infra-ósseos tratados por derivado da matriz do esmalte (EMD), regeneração guiada de tecidos (GTR) e por cirurgia de retalho (OFD) em 12 estudos clínicos aleatórios e controlados. Adaptado de Kalpidis e Ruben, 2002.

Comparativamente ao tratamento com GTR, o tratamento com EMD obteve resultados menos favoráveis, com um menor ganho de CAL (0,6 mm, 18%) e menor redução de PD (1,1 mm). No entanto, os autores salientam que esta diferença, apesar de se situar no limite de equivalência/superioridade dos estudos clínicos comparativos (Gunsolley *et al.* 1998), pode não ser significativa clinicamente, uma vez que a técnica de GTR é uma técnica sensível, com frequentes complicações pós-operatórias. Entre os doze estudos incluídos nesta meta-análise, só um (Zucchelli *et al.* 2002) apresentava resultados estatisticamente superiores para a GTR (membrana não reabsorvível reforçada com titânio). Todos os outros estudos apresentavam resultados similares. No que se refere aos resultados da GTR e da OFD, esta revisão confirma os valores apresentados noutras revisões. Na revisão de Laurell e colaboradores (1998) o tratamento de 545 defeitos por GTR resultou num ganho de CAL de 4,2 mm, enquanto que na revisão de Cortellini e Tonetti (2000) a GTR em 943 defeitos resultou num ganho de CAL de 3,86 mm.

Nesta revisão (Kalpidis e Ruben, 2002) não foi efectuada a meta-análise dos dados radiográficos relativos ao ganho ósseo porque a maioria dos estudos que avaliaram esse parâmetro referiam-se a séries de casos clínicos, não tendo sido utilizadas radiografias estandardizadas e cuja avaliação não foi efectuada de modo cego.

Uma revisão sistemática da literatura sobre materiais de substituição óssea e agentes biológicos no tratamento de defeitos infra-ósseos foi publicada por Trombelli e colaboradores (2002b). A metodologia utilizada nesta revisão não permitiu a comparação dos resultados clínicos e histológicos entre os diferentes materiais. No que se refere à utilização de EMD, cinco estudos clínicos controlados cumpriram os critérios de inclusão: ensaios clínicos aleatórios cujo controlo fosse a cirurgia de retalho (OFD), cuja unidade estatística se referia ao doente e não ao defeito e cuja publicação fosse anterior a Julho de 2001 (Pontoriero *et al.* 1999, Okuda *et al.* 2000, Silvestri *et al.* 2000, Froum *et al.* 2001, Tonetti *et al.* 2002). A análise destes cinco estudos demonstrou um benefício adicional na utilização de EMD. Após a aplicação de EMD, a estimativa do ganho de CAL foi 1,33 mm (95% CI: 0,78-1,88) superior à cirurgia de retalho, havendo no entanto uma heterogeneidade estatisticamente significativa nos resultados dos diversos estudos. Como Kalpidis e Ruben (2002) tinham verificado, o estudo de Silvestri e colaboradores (2000) desvia-se marcadamente dessa estimativa. A meta-análise demonstrou igualmente que o EMD resultava numa redução significativa da PD (1,60 mm (95% CI: 0,59-2,62)) quando comparado com OFD, tendo sido verificada igualmente uma heterogeneidade significativa entre os estudos.

Ao compararmos os resultados desta meta-análise com os obtidos na meta-análise sobre GTR (Needleman *et al.* 2002), verifica-se que a diferença média do ganho de CAL e da redução de PD é superior para o EMD.

Mais recentemente, uma nova revisão sistemática da literatura incidiu sobre alguns factores de crescimento e o EMD na cicatrização periodontal (Giannobile e Somerman, 2003), tendo incluído 30 artigos referentes ao EMD. Porém, só oito apresentavam dados suficientes para serem avaliados pela meta-análise proposta: sete ensaios clínicos aleatórios e controlados (Heijl *et al.* 1997, Pontoriero *et al.* 1999, Okuda *et al.* 2000, Silvestri *et al.* 2000, Froum *et al.* 2001, Sculean *et al.* 2001d, Tonetti *et al.* 2002) e um estudo “quasi-experimental” (Zetterström *et al.* 1997), representando uma população geral de 511 doentes. A meta-análise efectuada ao ganho de CAL e à redução de PD resultou muito significativa em favor do EMD comparativamente à OFD. Embora a heterogeneidade entre os estudos fosse estatisticamente significativa, todos eram favoráveis ao EMD, seis dos quais eram estatisticamente significativos. Desta revisão sistemática resultou igualmente um nível de evidência moderado referente à regeneração óssea, demonstrado por um estudo com re-entrada (Froum *et al.* 2001) e por um outro estudo multicêntrico com avaliação radiológica (Tonetti *et al.* 2002). Quanto à comparação entre o EMD e a GTR, concluiu-se que não há diferenças nos resultados clínicos, embora a evidência fosse limitada, baseada em apenas três estudos (Pontoriero *et al.* 1999, Silvestri *et al.* 2000, Sculean *et al.* 2001d).

Uma outra revisão sistemática da literatura testou a eficácia do EMD comparativamente à cirurgia de retalho, à GTR e aos substituintes ósseos, no tratamento de defeitos infra-ósseos (Esposito *et al.* 2003). Dez estudos clínicos aleatórios (RCT), paralelos ou em “boca partida”, foram incluídos nesta revisão, representando 577 doentes.

Dos oito estudos avaliados na comparação entre o EMD e a OFD (Heijl *et al.* 1997, Pontoriero *et al.* 1999, Okuda *et al.* 2000, Silvestri *et al.* 2000, Sculean *et al.* 2001d, Tonetti *et al.* 2002, Zucchelli *et al.* 2002, Francetti *et al.* 2004), verificou-se um ganho médio de CAL significativo em favor do EMD, sendo a

diferença média ponderada de 1,31 mm (95% CI: 0,84 - 1,78), assim como uma redução significativa de PD com uma diferença média ponderada de 0,96 mm (95% CI: 0,50 - 1,41). No que se referiu à recessão gengival não houve diferenças estatisticamente significativas entre o EMD e a OFD nos seis estudos avaliados. No entanto, os autores sublinharam a grande heterogeneidade entre os resultados dos estudos incluídos, a qual não pôde ser justificada pelas suas diferentes características, pelo uso de antibióticos, as diferentes técnicas cirúrgicas empregues, o uso de placebo nos controlos, a profundidade inicial do defeito intra-ósseo ou o local de realização do estudo. A única excepção foi o financiamento pelo fabricante, uma vez que os estudos financiados apresentaram menor recessão gengival.

A meta-análise dos seis RCT que comparavam o EMD com a GTR (Pontoriero *et al.* 1999, Silvestri *et al.* 2000, Sculean *et al.* 2001c, d, Zucchelli *et al.* 2002, Silvestri *et al.* 2003) demonstrou que a GTR resultava numa redução significativa da PD (0,56 mm (95% CI: 0,08 - 1,07)) a qual se devia a um aumento significativo da recessão gengival (0,47 mm (95% CI: 0,17 - 0,76)). Não se verificaram diferenças significativas no CAL. Os autores afirmaram que esta diferença estatisticamente significativa poderá não ter significado clínico uma vez que, ao contrário da GTR, o EMD não apresentou qualquer infecção pós-operatória, não justifica a prescrição de antibióticos e é mais fácil de manipular.

No que se refere à comparação entre o EMD e os substituintes ósseos não foi identificado qualquer estudo que cumprisse os critérios de inclusão.

A avaliação global destas revisões sistemáticas demonstra que o tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD resulta num ganho de CAL e de redução de PD comparativamente à cirurgia de retalho (Tabela 3.5), justificando a sua aplicação clínica. No entanto, a generalização destes resultados tem que ter em conta que os tratamentos efectuados nos estudos analisados foram realizados por profissionais muito experientes, foram instituídos tratamentos

de manutenção periodontal intensivos e em alguns desses estudos foram excluídos os doentes fumadores. Estas condições nem sempre são as verificadas na prática clínica diária. Acrescente-se ainda a grande heterogeneidade verificada entre os resultados mesmo quando os tratamentos foram realizados em condições “ideiais”.

Tabela 3.5 - Resultados das **meta-análises** comparativas entre o EMD e a cirurgia de retalho ou a GTR, no tratamento de defeitos infra-ósseos.

	REVISÕES	EMD <i>versus</i> OFD	EMD <i>versus</i> GTR
CAL mm	Kalpidis e Ruben 2002		- 0,6
	Trombelli <i>et al.</i> 2002b	1,31 (5)	
	Esposito <i>et al.</i> 2003	1,31 (8)	- 0,30 NS (6)
PD mm	Kalpidis e Ruben 2002		- 1,1
	Trombelli <i>et al.</i> 2002b	1,60 (5)	
	Esposito <i>et al.</i> 2003	0,96 (8)	- 0,58 (6)
RE mm	Kalpidis e Ruben 2002		
	Trombelli <i>et al.</i> 2002b		
	Esposito <i>et al.</i> 2003		- 0,47 (5)

Abreviaturas: EMD - Emdogain®; OFD - cirurgia de retalho; GTR - regeneração guiada de tecidos; CAL - nível de inserção clínica; PD - profundidade de sondagem; RE - recessão gengival; NS - não significativo; (n) - número de RCTs.

A comparação entre o EMD e a GTR demonstra que apesar da GTR obter resultados ligeiramente superiores (Tabela 3.5), clinicamente as diferenças não parecem ser significativas, sendo o EMD mais fácil de aplicar e apresentando menos complicações pós-operatórias.

c. 4.1.6.1. Influência de factores modificadores

A variabilidade dos resultados obtidos após o tratamento com EMD, assim como acontece com a GTR, pode ter como causa a influência de diversos factores modificadores, entre os quais se incluem aqueles relacionados com a morfologia do defeito, com o doente e com a técnica cirúrgica (Garrett 1996, Mellonig 1999). A identificação desses factores ajuda a aumentar a previsibilidade dos resultados da técnica regenerativa com EMD.

Morfologia do defeito. De acordo com a revisão de Kalpidis e Ruben (2002), a percentagem de aumento de inserção clínica relacionava-se significativamente com a extensão vertical intra-óssea do defeito. Em alguns estudos, os resultados do EMD estão correlacionados positivamente com a profundidade inicial do defeito ósseo (Pontoriero *et al.* 1999, Parodi *et al.* 2000, Bratthall *et al.* 2001, Kalpidis e Ruben 2002). No entanto, algumas análises regressivas demonstraram que esse parâmetro não influenciava significativamente o ganho de CAL (Heden *et al.* 1999, Tonetti *et al.* 2002, Trombelli *et al.* 2002, Zucchelli *et al.* 2002).

Na revisão sistemática de Trombelli e colaboradores (2002b), a análise regressiva efectuada demonstrou que a PD inicial não influenciava a diferença na redução de PD entre o teste e o controlo. A falta de correlação significativa pode ser explicada parcialmente pela pequena variabilidade da média da profundidade do defeito, uma vez que este parâmetro constituía um dos critérios de inclusão nos diferentes estudos.

Quanto à possível influência do número de paredes ósseas do defeito, os resultados clínicos são contraditórios (Kalpidis e Ruben, 2002). A maioria dos estudos demonstraram que o número de paredes afectava significativamente os resultados clínicos. Contudo, outros estudos demonstraram resultados semelhantes entre defeitos com uma e duas paredes (Heden 2000, Parodi *et al.* 2000) e ainda um outro estudo (Bratthall *et al.* 2001), incluindo igual número

de defeitos com 1-2 paredes e 3 paredes, concluiu que o número de paredes não afectava os resultados clínicos e radiológicos.

Tabaco. A influência do tabaco nos resultados clínicos após GTR está demonstrada (Tonetti *et al.* 1995). Grande parte dos estudos com EMD incluíram fumadores, mas a sua percentagem relativa era muito baixa pelo que a avaliação da influência do tabaco raras vezes pôde ser efectuada. Em vários trabalhos, os resultados clínicos nos fumadores, apesar de clinicamente significativos, foram inferiores aos obtidos na população não fumadora (Heijl *et al.* 1997, Heden *et al.* 1999, Heard *et al.* 2000, Heden 2000, Bratthall *et al.* 2001, Tonetti *et al.* 2002, Zucchelli *et al.* 2002). Contudo, o estudo de Parodi e colaboradores (2000) não detectou qualquer relação entre o tabaco e o ganho de CAL.

Acumulação de placa bacteriana supragengival. Um dos factores mais importantes no resultado clínico de qualquer intervenção cirúrgica periodontal é o grau de higiene oral. Em todos os estudos envolvendo o EMD foram impostas medidas de higiene oral meticulosas, quer pré quer pós-operatórias, com frequentes consultas de manutenção durante o tempo de observação. A importância dessas medidas nos resultados clínicos é um pouco especulativa, apesar de alguns estudos relacionarem a acumulação de placa bacteriana nas fases iniciais da cicatrização com resultados clínicos e radiológicos mais fracos (Heden *et al.* 1999, Heden 2000, Bratthall *et al.* 2001, Zucchelli *et al.* 2002). Em estudos a longo prazo, alguns autores relacionaram o aumento da profundidade de sondagem da avaliação final com índices mais elevados de placa bacteriana, gengivais e de hemorragia à sondagem (Sculean *et al.* 2001c, 2004).

É de salientar ainda, que, em todos os estudos, os pacientes seleccionados eram saudáveis e apresentavam níveis baixos de placa bacteriana. Por outro lado, previamente à fase cirúrgica, todos os pacientes passaram pela fase higiénica periodontal, pelo que a carga microbiana existente no seio das bolsas, na altura da cirurgia, deveria, certamente, ser reduzida. Estudos *in vitro* demonstraram que o EMD tem propriedades antimicrobianas dado que reduziu

a vitalidade do biofilme da placa bacteriana supragengival *ex vivo* (Sculean *et al.* 2001a) e inibiu selectivamente o crescimento de alguns agentes patogénicos periodontais Gram negativos, não afectando, contudo, as bactérias Gram positivas (Spahr *et al.* 2002). Esse efeito parece dever-se ao propilenoglicol de alginato (Sculean *et al.* 2001a, Newman *et al.* 2003), porém desconhece-se qual a relevância clínica desta propriedade.

Como medidas pós-operatórias, na maioria dos estudos foi administrado um antibiótico sistémico durante a primeira semana (doxiciclina, amoxicilina, amoxicilina e ácido clavulâmico ou a combinação de amoxicilina e metronidazol). Esta medida pós-operatória foi questionada por vários autores que demonstraram resultados clínicos equivalentes na ausência de qualquer cobertura antibiótica (Heden *et al.* 1999, Bratthall *et al.* 2001, Sculean *et al.* 2001b, Tonetti *et al.* 2002). Um dos aspectos que poderá pôr em causa a prescrição de um antibiótico sistémico é o baixo risco de infecção e de complicações pós-operatórias do EMD, comparativamente à GTR ou à utilização de materiais de substituição óssea.

Técnica cirúrgica. A importância da preservação dos tecidos moles supra-ósseos interdentários nos procedimentos regenerativos com membranas foi demonstrada em alguns estudos (Cortellini *et al.* 1995, 1999, 2001). A presença de um tecido interdentário espesso e largo facilita o manuseamento do retalho e a sutura, aumenta a possibilidade de obter o encerramento primário e reduz o risco de colapso do retalho no defeito ósseo, otimizando o espaço disponível para regeneração. A maioria dos estudos com EMD recorreu a técnicas cirúrgicas convencionais no acesso às lesões (técnica de retalho de Widman modificada). No entanto, em alguns dos estudos em que foram utilizadas técnicas de preservação de papilas, foram obtidos ganhos de CAL relativamente superiores (Trombelli *et al.* 2002, Zucchelli *et al.* 2002, 2003, Silvestri *et al.* 2003, Wachtel *et al.* 2003). Porém, no estudo multicêntrico publicado recentemente (Sanz *et al.* 2004), apesar de ter sido utilizada a técnica

simplificada de preservação de papila, o ganho de CAL enquadrou-se nos valores obtidos na meta-análise publicada por Kalpidis e Ruben(2002). A análise regressiva entre o ganho de CAL e a quantidade de tecido interdentário supracrestal demonstrou a existência de uma correlação positiva entre estes dois factores (Trombelli *et al.* 2002, Zucchelli *et al.* 2003).

As técnicas de preservação de papilas têm igualmente por objectivo reduzir a recessão gengival decorrente da abordagem cirúrgica. Com o intuito de otimizar esse parâmetro clínico, o tratamento regenerativo com EMD tem sido associado a técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, combinando a abordagem microcirúrgica às técnicas de preservação de papilas (Wachtel *et al.* 2003, Harrel *et al.* 2005). Nos escassos estudos publicados verifica-se que esta técnica possibilita uma melhor cicatrização primária, o que estará relacionado com a menor recessão gengival demonstrada.

Apesar da técnica de aplicação do EMD ser aparentemente mais fácil que a aplicação de uma membrana, é de salientar que a experiência do operador foi referida em alguns estudos como um dos factores que poderia afectar os resultados clínicos (Heden *et al.* 1999). A influência deste factor pôde ser demonstrada em estudos multicêntricos (Heijl *et al.* 1997, Zetterström *et al.* 1997, Tonetti *et al.* 2002, Silvestri *et al.* 2003). Saliente-se que, no estudo de Sanz e colaboradores (2004), a análise dos diversos factores que influenciaram a variabilidade no ganho de CAL demonstrou o centro de tratamento como o mais significativo, tendo sido demonstradas diferenças de 2,6 mm entre os diferentes centros.

c.5. Estudos de avaliação histológica no homem

O teste definitivo na certificação da capacidade regenerativa de um determinado material é a existência de imagens histológicas que comprovem tal potencial. Alguns estudos histológicos no ser humano, referentes ao EMD, demonstraram esse potencial.

Um primeiro estudo foi apresentado por Heijl (1997). O exame histológico foi efectuado quatro meses após a criação experimental de um defeito de deiscência na face vestibular de um incisivo inferior, programado para extracção num plano de tratamento ortodôntico. O exame histológico revelou a formação de novo cemento radicular do tipo acelular extrínseco que estava firmemente aderente à superfície dentinária subjacente. Também se observou a formação de um novo ligamento periodontal, cujas fibras se inseriam no novo cemento assim como no novo osso alveolar. A avaliação morfométrica demonstrou a recessão apical dos tecidos gengivais em 15% da extensão inicial do defeito, expondo a superfície radicular mais coronal. O novo cemento cobria 73% da superfície do defeito inicial e o epitélio juncional proliferou apicalmente, ocupando uma extensão correspondente a 12% do defeito. O novo osso representava 65% da altura óssea pré-operatória. De facto, a cicatrização deste defeito experimental, após a aplicação de EMD, resultou na regeneração dos tecidos removidos, confirmando o seu potencial regenerativo nos humanos, já demonstrado em estudos animais (Hammarström *et al.* 1997, Sculean *et al.* 1998).

Ao analisarmos os resultados deste estudo, temos de ter em conta que este se reporta a um caso de defeito experimental agudo, não decorrente de doença periodontal. Isto é, a superfície radicular sobre a qual foi aplicado EMD não sofreu contaminação por placa bacteriana. Assim, a cicatrização deste defeito, embora com regeneração dos tecidos periodontais, deve ser designada por re-inserção e não por regeneração periodontal, de acordo com as definições propostas pela Academia Americana de Periodontologia (2001a).

A primeira descrição histológica do tratamento de um defeito infra-ósseo não experimental com EMD, foi publicado por Mellonig (1999). Tratou-se de um defeito de três paredes, com uma componente intra-óssea de 5 mm de profundidade, localizado num dente que iria ser extraído por razões protéticas. Aos seis meses, clinicamente, verificou-se uma redução da PD de 5 mm e um ganho de CAL de 4 mm, embora radiologicamente o preenchimento ósseo

fosse limitado. O exame histológico demonstrou a formação de novo cimento, novo ligamento periodontal e novo osso, coronalmente ao entalhe efectuado no nível mais apical dos cálculos existentes na superfície radicular. Uma fina camada de cimento acelular tinha-se formado sobre o cimento pré-existente. O osso formado de novo apresentava-se maturo em algumas áreas e imaturo noutras. As fibras do novo ligamento periodontal tinham uma disposição paralela à superfície radicular. Nesta avaliação não é feita qualquer referência aos tecidos periodontais mais superficiais.

Num estudo mais alargado, Yukna e Mellonig (2000) apresentaram o exame histológico de 10 casos clínicos. Os dentes apresentavam doença periodontal avançada e, de acordo com um plano de tratamento de reabilitação oral, tinham a indicação para serem extraídos. No entanto, os investigadores procuraram certificar-se do potencial regenerativo dos defeitos periodontais em causa. Aos 6 meses, a avaliação clínica demonstrou uma redução da PD entre 1 a 6 mm, as alterações do CAL situaram-se entre um ganho de 6 mm e a perda de 2 mm e a recessão gengival variou de 0 a 5 mm. O exame histológico dos 10 defeitos demonstrou uma cicatrização muito variável, mas, de um modo geral, foi considerada como favorável. Em três casos houve regeneração periodontal, evidenciada pela formação de novo cimento e novo ligamento periodontal, com fibras inseridas no cimento e no novo osso. O novo cimento, dos tipos acelular e celular, recobria o cimento pré-existente e a dentina exposta, mas não se estendia muito para coronal do entalhe efectuado na superfície radicular ao nível mais apical dos cálculos. Em três outros casos formou-se uma nova adesão conjuntiva, sem formação de cimento nem de osso. Nos restantes quatro casos formou-se um epitélio juncional longo até ao entalhe radicular. Os autores verificaram que não houve uma relação directa entre os parâmetros clínicos de PD e da morfologia do defeito e a avaliação histológica: tanto os defeitos mais profundos como os mais superficiais resultaram na formação de um epitélio juncional longo; defeitos de 2 e 3 paredes tanto cicatrizaram com

regeneração como com um epitélio juncional longo. Só a recessão gengival parece ter reflectido a cicatrização: os casos com grande aumento da recessão gengival (>3 mm) estavam associados a uma proliferação do epitélio juncional ao longo da raiz.

No artigo de Parodi e colaboradores (2000), para além da série de casos avaliados clinicamente, foram apresentados dois estudos histológicos. Os dentes extraídos apresentavam, no diagnóstico pré-operatório, defeitos infra-ósseos de uma e duas paredes com uma inserção periodontal menor do que 15%, o que determinou a sua extracção, seis meses após a aplicação do EMD. Os dois casos não demonstraram regeneração de cimento nem de ligamento periodontal. Apenas na área mais apical do entalhe radicular, efectuado ao nível da crista óssea, foi observada uma pequena zona de novo osso. Estas observações parecem pois contrariar o potencial regenerativo do EMD demonstrado noutros estudos histológicos. Segundo os autores, o periodonto limitado destes dentes influenciou negativamente o processo regenerativo. Uma vez que estes casos não foram incluídos nos testes clínicos, não são apresentados os parâmetros clínicos correspondentes à sua avaliação pré e pós-operatória, o que poderia ajudar a esclarecer o insucesso observado. Sculean e colaboradores (2000a) apresentaram dois casos histológicos decorrentes de extracções por razões protéticas. Os dois defeitos infra-ósseos combinados de 1 e 2 paredes, apresentavam, no pré-operatório, uma PD de 11 e 12 mm, um CAL de 12 e 14 mm, com uma recessão gengival de 1 e 2 mm, respectivamente. Seis meses após a cirurgia regenerativa com EMD, a PD diminuiu 6 e 7 mm, o CAL aumentou 3 e 5 mm e a recessão gengival aumentou 3 e 1 mm, respectivamente para cada um dos casos. Radiologicamente não foi observada formação de tecidos calcificados. O exame histológico de um dos casos revelou a formação de novo cimento (4,82 mm) com fibras colagénicas nele inseridas, sendo dos tipos celular e acelular, mas sem formação de osso. No outro caso houve formação de novo cimento

(1,88 mm), de tipo celular e acelular, depositado sobre o cimento mais antigo; foi observada a formação de osso (1,77 mm) e novo ligamento periodontal funcional, com fibras inseridas tanto no novo cimento como no novo osso. Enquanto que no primeiro caso se formou uma nova adesão conjuntiva, o segundo cicatrizou com regeneração periodontal de todos os tecidos periodontais. No exame histológico de ambos os casos, não há qualquer referência aos tecidos periodontais gengivais.

Um segundo estudo de Sculean e colaboradores (1999b), comparou a cicatrização com EMD e com GTR no tratamento de defeitos infra-ósseos em dentes programados para extracção por razões periodontais e/ou protéticas. Os sete defeitos tratados com EMD demonstraram, aos seis meses, um ganho médio de CAL de 3,2 mm. A sua avaliação histológica revelou a formação de cimento radicular em todos os defeitos excepto num, o qual apresentou a formação de um epitélio juncional longo que se estendia até à parte mais apical do defeito. Em média, formou-se $2,6 \pm 1,0$ mm de novo cimento com fibras inseridas e $0,9 \pm 1,0$ mm de novo osso. O novo cimento era do tipo celular, excepto no caso de um defeito em que na porção mais apical do defeito apresentava cimento do tipo acelular. As fibras colagénicas demonstravam inserção no novo cimento. Em quatro dos seis defeitos que demonstravam novo cimento, era visível a formação de novo osso. Os sete defeitos tratados por GTR com uma membrana reabsorvível demonstraram um ganho médio de CAL de 3,6 mm. Histologicamente houve uma média de novo cimento na extensão de $2,4 \pm 1,0$ mm e de novo osso de $2,1 \pm 1,0$ mm. Em todos os casos, o novo cimento era do tipo celular. As fibras colagénicas, igualmente presentes na totalidade dos casos, apresentavam-se inseridas no novo cimento e no novo osso.

Um estudo de Windisch e colaboradores (2002) comparou os parâmetros clínicos e radiológicos com a avaliação histológica da cicatrização após a utilização de EMD e de GTR. Em dentes programados para extracção por doença periodontal avançada, foram realizados tratamentos regenerativos com

EMD (6 casos) ou GTR (8 casos), os quais foram avaliados clínica e radiologicamente aos 6 meses, antes da biópsia. Alguns dos casos incluídos neste estudo referem-se aos relatos dos estudos de Sculean e colaboradores (1999b, 2000a). Os parâmetros clínicos e radiográficos não diferiram significativamente entre os dois grupos. Ambos os grupos demonstraram um ganho de CAL e uma redução de PD. Radiograficamente, ambos os grupos demonstraram ganho ósseo na porção mais apical do defeito. A avaliação histométrica demonstrou a formação, em quantidades significativas, de novo cemento em ambos os tratamentos. Só o grupo de GTR demonstrou quantidades significativas de novo osso. A formação de novo osso no grupo EMD foi menos pronunciada, embora presente. A comparação entre as alterações dos parâmetros clínicos e a histomorfometria mostrou não haver diferenças significativas entre os dois grupos excepto para o novo osso, em que o grupo GTR obteve melhores resultados. No entanto, o ganho ósseo radiológico e histológico em ambos os grupos não teve valores coincidentes. No grupo GTR a histometria revelou maior preenchimento ósseo (1,93 mm) do que a análise da radiografia (0,47 mm), enquanto que no grupo EMD os resultados histométricos e radiológicos foram mais aproximados (0,78 mm e 1,05 mm, respectivamente). De facto, esta discrepância pode advir do facto de se estar a comparar avaliações tecnicamente muito diferentes cuja sobreposição raramente é conseguida. A imagem radiológica pode não corresponder à área histológica examinada. Por essa razão, a comparação entre valores histológicos e radiológicos não tem grande significado.

Tabela 3.6 - Avaliação histológica da cicatrização periodontal de defeitos infra-ósseos com EMD no homem.

Estudos	nº defeitos	Tempo	Novo cimento*	Novo osso*	Tipo de cimento	Ligamento periodontal**	Tipo cicatrização
Mellonig 1999	1	6 M	presente	presente	acelular	paralelo	regeneração
Yukna e Mellonig 2000	10	6 M	presente (3)	presente (3) ausente (6)	acelular celular	paralelo	regeneração (3) adesão conj (3) ep junc longo (4)
Parodi <i>et al.</i> 2000	2	6 M	ausente	presente (limitado)	ausente	ausente	reparação
Sculean <i>et al.</i> 2000a	2	6 M	3,3 ± 2,1	0,9±1,3	acelular celular	perpendicular	regeneração (1) adesão conj (1)
Sculean <i>et al.</i> 1999b	7	6 M	2,6 ± 1,0	0,9±1,0	acelular (1) celular (7)	perpendicular (6) ausente (1)	regeneração (4) adesão conj (2) ep junc longo (1)

*em mm, média±desvio padrão; ** orientação predominantes das fibras colagénicas.

Da avaliação global destes trabalhos (Tabela 3.6), constatamos que foram raros os casos em que houve regeneração periodontal verdadeira, isto é, formação de novo cimento radicular, de um ligamento periodontal funcional e de novo osso. Por outro lado, em nenhum dos casos foram observadas reabsorções radiculares, anquilose ou reacções inflamatórias dos tecidos circundantes.

Quanto ao tipo de cimento, verifica-se que, em muitos casos, formou-se um cimento radicular de tipo acelular na porção mais apical dos defeitos, enquanto que na parte mais coronal o cimento era do tipo celular. De facto, nos estudos histológicos referentes a outras técnicas regenerativas, a regeneração do cimento foi exclusivamente do tipo celular (Nyman *et al.* 1982a, Gottlow *et al.* 1986, Bowers *et al.* 1989c, Sculean *et al.* 1999b). Assim, o EMD parece favorecer a regeneração de cimento acelular mas, em condições clínicas, de modo limitado e pouco previsível.

Outro facto frequentemente observado refere-se à existência de um espaço vazio entre o cimento recém formado e a superfície radicular, geralmente referido como “artefacto” (Sculean *et al.* 1999b). Este espaço pode resultar ou do processo de descalcificação durante a técnica de preparação histológica, ou traduzir uma adesão pouco consolidada entre as duas estruturas. A importância clínica destes “artefactos” histológicos é discutível. Eles foram relatados na regeneração periodontal, quer após a utilização de EMD quer de GTR ou de outras técnicas regenerativas.

Baseando-nos nos dados disponíveis, apesar de muito limitados, e segundo as condições clínicas de aplicação do EMD, parece que a regeneração do cimento não é sempre e exclusivamente do tipo acelular e nem sempre está firmemente aderente à superfície radicular.

Quanto à regeneração do ligamento periodontal, verificamos que raramente as suas fibras se apresentam com uma orientação perpendicular à superfície radicular, o que pode representar uma limitação funcional.

Quanto à formação de novo osso, ela também parece ser limitada e pouco previsível. No entanto temos de atender ao facto destas biópsias terem sido obtidas aos 6 meses, tempo relativamente curto para a regeneração do osso após aplicação de EMD, como foi demonstrado em diversos estudos clínicos (Heijl *et al.* 1997, Heden *et al.* 1999, Francetti *et al.* 2004). Por outro lado, estas observações confirmam a ideia de que a formação de uma nova adesão conjuntiva e a regeneração óssea são processos independentes, questionando o valor da cirurgia de re-entrada na avaliação do tratamento regenerativo.

Temos de ter em conta que, por razões éticas, a maioria dos casos histológicos em humanos se referem a dentes com um periodonto muito reduzido, geralmente com mobilidade, com um prognóstico reservado, e que por essas mesmas razões têm indicação de extracção. Se, mesmo sob essas condições, há regeneração periodontal, então teremos fortes razões para pensar que em situações clínicas menos graves, os resultados serão mais encorajadores.

c.6. Segurança e reacções adversas

Como o EMD é de origem porcina, deve ser considerado como um enxerto xenógeno. Embora o seu principal componente, a amelogenina, tenha uma estrutura molecular muito similar nas diversas espécies de mamíferos, há sempre um risco potencial de desenvolver reacções imunitárias quando aplicado no homem. Alguns ensaios, tanto *in vitro* como *in vivo*, procuraram avaliar a possibilidade do EMD desenvolver respostas imunitárias, locais e sistémicas.

No estudo multicêntrico controlado com 107 doentes (Zetterström *et al.* 1997) foram efectuadas no mesmo doente duas aplicações de EMD, em dois defeitos diferentes, com um intervalo de 2 a 6 semanas. O grupo de controlo foi constituído por 33 doentes tratados por cirurgia periodontal sem EMD. No grupo teste, foram determinados os níveis circulantes de anticorpos, totais (IgE e IgG) e específicos para o EMD (IgE, IgG, IgM e IgA), comparando as colheitas efectuadas antes e depois do tratamento (10 doentes), depois do 1º tratamento (56 doentes) e depois do 2º tratamento (63 doentes). Em nenhuma das colheitas, nem mesmo nas de doentes com antecedentes alérgicos, foram detectadas alterações significativas. Também não foram identificados níveis mais elevados de IgG nem de IgE específicas. Neste estudo, foram igualmente incluídos testes cutâneos aos trabalhos envolvidos na produção do EMD, já previamente expostos ao antigéneo: todas as respostas foram negativas.

O estudo *in vitro* de Petinaki e colaboradores (1998), confirmou estes resultados. Linfócitos circulantes de dez indivíduos saudáveis foram cultivados em diferentes concentrações de EMD, durante três dias. O EMD mostrou um ligeiro aumento da proliferação dos linfócitos, limitada à fracção CD25 (CD4 activados) dos linfócitos T e uma diminuição dos linfócitos B CD19 positivos. Outras fracções celulares dos linfócitos T, como os CD8 e CD4 positivos, assim como dos linfócitos B e das células *natural killer* (CD16) não foram afectadas. A produção de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) e de citocinas (IL-2 e -6) não

foi alterada, mesmo em concentrações de EMD muito superiores às utilizadas na prática clínica. Poderemos concluir que o potencial imunogénico do EMD é extremamente baixo quando aplicado na cirurgia periodontal.

No que se refere aos efeitos adversos, vários estudos referem a sua baixa frequência. Zetterström e colaboradores (1997) apresentaram uma incidência de 7% de sensibilidade dentinária grave e 10% de casos de edema grave, para além das queixas mais frequentes após uma cirurgia periodontal. O ensaio clínico efectuado por Heard e colaboradores (2000), cujo objectivo primário foi a avaliação da cicatrização periodontal após uma ou várias aplicações de EMD, confirmou a inexistência de qualquer reacção alérgica ao EMD. Também não foram registados quaisquer efeitos adversos graves, como inflamações, abscessos ou infecções. Nos 32 doentes que participaram no estudo, o edema foi o sintoma mais frequente (85%) seguindo-se as dores dentárias (63%), mas ambos de intensidade ligeira. A maioria dos doentes não referiu prurido (89%) e um pouco menos de metade registou cefaleias e sensibilidade dentinária. Num outro ensaio clínico (Heijl *et al.* 1997), envolvendo 33 doentes, foram apenas registadas 4 reacções adversas classificadas como “não graves” ao longo de 36 meses.

Igualmente, em todos os estudos por nós revistos, não foram registadas quaisquer complicações pós-operatórias graves, para além dos sintomas habitualmente registados após qualquer cirurgia periodontal tal como edema, dor, prurido e hipersensibilidade radicular, geralmente caracterizados como localizados e ligeiros (Sculean *et al.* 1999a, b, Heden 2000, Okuda *et al.* 2000, Parashis e Tsiklakis 2000, Parodi *et al.* 2000, Trombelli *et al.* 2002, Froum *et al.* 2004). Mais recentemente foi publicado um estudo que avalia os sintomas pós-operatórios, comparando a aplicação de EMD com a cirurgia de retalho (Hagenaars *et al.* 2004). Para ambos os procedimentos, a avaliação referente aos sintomas dolorosos, ao uso de analgésicos, ao edema e alteração da coloração da face e ao edema e hemorragia da área gengival foi, de um modo

geral, ligeira a moderada e não demonstrou diferenças significativas entre os dois tratamentos. Aliás, estes resultados corroboram os resultados do estudo de Zetterström e colaboradores (1997) que igualmente não encontraram diferenças entre os sintomas pós-operatórios da cirurgia periodontal com ou sem a aplicação de EMD.

Tonetti e colaboradores (2004) publicaram um artigo no qual, pela primeira vez, foi avaliada a vivência do doente durante a cirurgia periodontal, referindo as suas queixas no pós-operatório, os benefícios e as desvantagens sentidas, para além das complicações pós-operatórias e cicatrização dos tecidos observadas pelos profissionais. Estes dados eram referentes ao estudo clínico controlado, aleatório e multicêntrico publicado em 2002 (Tonetti *et al.*), ao qual já nos referimos anteriormente. A avaliação dos 166 doentes permitiu concluir que não são previsíveis complicações adicionais pela aplicação de EMD, comparativamente à cirurgia de retalho. Metade dos doentes referiram uma dor ligeira pós-operatória, a qual durou cerca de trinta horas. Uma minoria de doentes referiu alguma morbidade pós-operatória (interferência com a actividade diária), a qual se prolongou por três a quatro dias. O efeito adverso mais frequente (45%) foi a hipersensibilidade radicular que foi mais intensa às três semanas, regredindo totalmente passadas seis semanas. Ao fim de um ano, o nível de satisfação geral dos doentes era elevado, traduzido pela presença de “gengivas saudáveis”, pela preservação do dente/dentição e pela manutenção/melhoria da função mastigatória. 40 a 45% dos doentes não apontaram qualquer desvantagem na realização da cirurgia regenerativa, enquanto que outros referiram-se ao custo e à necessidade de consultas de manutenção frequentes.

Ainda neste estudo, os profissionais detectaram raros casos de edema e de hematomas, os quais só eram visíveis intra-oralmente. Alguns casos de deiscência localizada à incisão na papila foram classificados como pouco extensos e não comprometeram o resultado final da cirurgia.

Além da ausência de efeitos adversos, alguns estudos referem subjectivamente uma cicatrização mais acelerada com a utilização do EMD (Heden *et al.* 1999, Pontoriero *et al.* 1999, Sculean *et al.* 1999b). Num ensaio clínico aleatório, controlado, em “boca partida” e duplamente cego (Wennström e Lindhe 2002) o EMD aplicado topicamente em bolsas periodontais sujeitas a raspagem e alisamento radicular, melhorou a cicatrização precoce da ferida periodontal criada, tendo os doentes registado menos desconforto pós-operatório nesses locais. Após 1 e 2 semanas, houve uma maior percentagem de locais teste sem sinais clínicos de inflamação gengival e de hemorragia à sondagem, comparando com os locais de aplicação do placebo (PGA). À terceira semana não houve diferenças entre as bolsas teste e de controlo. É de salientar que, de facto, o objectivo deste estudo foi a avaliação dos sinais clínicos de cicatrização precoce, pelo que o EMD não foi aplicado durante uma cirurgia de retalho mas sim no final de uma sessão de raspagem e alisamento radicular, em bolsas que previamente apresentavam hemorragia à sondagem e uma PD que variava de 5 a 8 mm. Apesar dos bons resultados no que respeita a inflamação e a hemorragia gengival, a aplicação de EMD não resultou numa redução adicional da PD, comparativamente ao controlo. Contudo este estudo só teve a duração de três semanas. Num estudo clínico aleatório e controlado (Gutierrez *et al.* 2003), de maior duração (3 meses), verificou-se igualmente que o EMD não apresentou qualquer vantagem no tratamento não cirúrgico de bolsas periodontais. Um estudo com avaliação histológica (Sculean *et al.* 2003b) demonstrou que a cicatrização de bolsas profundas após a raspagem e alisamento radiculares e aplicação de EMD resultava, em todos os casos, na formação de um epitélio juncional longo, sem sinais de regeneração periodontal. Aliás, estes resultados, não são diferentes dos obtidos sem a colocação de EMD.

Recentemente, a cicatrização precoce dos tecidos moles gengivais foi avaliada através de um sistema computadorizado de análise de imagem, recorrendo a

radiografias de baixa exposição (Tonetti *et al.* 2004). Após a segunda semana, nos casos tratados com EMD, a densidade tecidual era mais elevada do que nas imagens pré-operatórias, sendo significativamente superior à cirurgia de retalho durante as seis semanas iniciais. Estes dados confirmam as observações clínicas de carácter subjectivo, as quais referem uma cicatrização mais rápida e com menor inflamação.

Os bons resultados na cicatrização precoce obtidos após utilização de EMD podem dever-se a diversos factores. Um deles pode ser a capacidade que o EMD tem de estimular os fibroblastos gengivais e aumentar a sua taxa de migração (Hoang *et al.* 2000, Van der Pauw *et al.* 2000) já referido anteriormente. Outros estudos referem ainda que os fibroblastos do ligamento periodontal, quando expostos ao EMD, exprimem menos genes associados à inflamação e mais genes associados aos factores de crescimento (Brett *et al.* 2002, Parkar e Tonetti 2004).

Outro factor que poderá favorecer a cicatrização precoce após a aplicação do EMD estará relacionado com a redução estatisticamente significativa dos níveis de metaloproteinases (MMP-1 e MMP-8) presentes no líquido sulcular dos defeitos tratados com EMD, comparativamente ao placebo, nas fases iniciais da cicatrização (4 semanas) (Okuda *et al.* 2001).

A melhor cicatrização pode igualmente estar relacionada com o efeito antibacteriano que o EMD demonstrou *in vitro*. Com efeito, Sculean e colaboradores (2001a) demonstraram que tanto o EMD, o PGA, como uma solução de clorhexidina a 0,2%, causam uma redução da vitalidade da placa *ex vivo* supragengival, significativamente mais efectiva que o derivado da matriz do esmalte dissolvido em água. A redução dessa vitalidade era mais significativa para o EMD (21,4%) e para o PGA (19,6%) do que para a clorhexidina (32,3%). Verificaram, contudo, que o efeito antimicrobiano do EMD era essencialmente devido ao seu veículo (PGA) e não à componente proteica. Esse facto foi igualmente verificado no estudo *in vitro* de Newman e colaboradores (2003),

em que o PGA foi responsável pelo efeito antibacteriano sobre *Porphyromonas gingivalis*, enquanto que a porção proteica da matriz de esmalte demonstrou estimular a proliferação do mesmo agente patogénico periodontal. Já no estudo de Spahr e colaboradores (2002), o efeito na redução da proliferação sobre *P. gingivalis* e *P. intermedia* foi atribuído à fracção proteica, enquanto que a inibição da proliferação do *A. actinomycetemcomitans* foi atribuída ao PGA. Neste último estudo, também verificaram que tanto o EMD como o PGA não influenciavam o crescimento de alguns microrganismos Gram positivos (*Streptococcus mutans*, *S. intermedius*, *S. sanguis*), assim como o de *Candida albicans*. De facto, o poder antimicrobiano do PGA, é já conhecido há alguns anos, sendo o principal componente de aerosóis desinfectantes. No entanto, pouco se sabe sobre o seu mecanismo de acção. Poderá estar relacionado com o facto de, sendo um álcool, o propilenoglicol poderá desidratar a membrana celular bacteriana. Por outro lado poderá exercer a sua acção através da sua acidez. Contudo, em condições clínicas, este poder antibacteriano deve ser algo limitado, já que o PGA só estará presente no local de aplicação durante 24 horas (Gestrelius *et al.* 1997a). No entanto, num estudo clínico, a aplicação de EMD, assim como de PGA, resultou na redução significativa da vitalidade do biofilme supragengival comparativamente ao soro e ao EDTA, sem contudo alcançar os resultados da aplicação de clorhexidina (Arweiler *et al.* 2002). É de salientar que os resultados obtidos com o EMD e o PGA são clinicamente relevantes uma vez que são semelhantes aos obtidos por agentes reconhecidamente antibacterianos, como o fluoreto de amina, o fluoreto de estanho e o triclosan.

Em conclusão, o EMD pode ter um efeito antibacteriano na fase inicial da cicatrização, tanto pela acção específica sobre alguns agentes patogénicos periodontais, como pela sua precipitação na superfície radicular, formando um agregado proteico hidrofóbico insolúvel, pouco favorável à colonização bacteriana. Tal facto tem uma importância acrescida devido ao facto de ser o

primeiro material regenerador com acção antibacteriana de *per si*. Esta técnica parece trazer grandes vantagens sobre outras técnicas regenerativas, nomeadamente a GTR na qual a exposição e consequente infecção da membrana é uma das complicações mais frequentes, comprometendo a sua capacidade regenerativa (Selvig *et al.* 1992, De Sanctis *et al.* 1996a).

Em conclusão, o EMD é um produto bem tolerado, clinicamente seguro e com raras complicações pós-operatórias.

O RATO COMO MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE

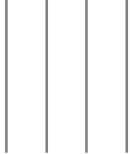
IV. O RATO COMO MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE

A utilização de modelos animais em Periodontologia iniciou-se nos anos 60 e dominou a investigação periodontal durante mais de uma década. Esses modelos permitiram caracterizar histopatologicamente as lesões periodontais e esclarecer os seus mecanismos patogénicos, passando nos anos 70, os estudos a incidir na pesquisa celular, na cultura de tecidos, utilizando os sistemas *in vitro*. Nos finais dos anos 80, os resultados obtidos através da utilização dos diversos modelos experimentais, permitiram a sua aplicação directa no diagnóstico e no tratamento da patologia periodontal o qual passou a ter por objectivo a regeneração dos tecidos periodontais destruídos durante o processo patológico. De modo a testar a validade destas novas abordagens terapêuticas, retornou-se à utilização preferencial dos modelos animais, sublinhando o seu papel na investigação periodontal (Page 1994).

O uso de um determinado modelo experimental pressupõe o conhecimento das características gerais comuns à espécie animal em causa, como o tamanho, a taxa de crescimento, o período de vida médio e hábitos, assim como as suas características anatómicas e fisiológicas, e, neste caso em particular, da patologia periodontal desenvolvida.

Na procura de um modelo experimental ideal para o estudo da patogenia e tratamento da periodontite humana, têm sido estudadas inúmeras espécies de mamíferos. Estas, apesar de apresentarem uma anatomia dentária e relações oclusais com características particulares, têm uma estrutura e organização dos tecidos periodontais relativamente semelhantes.

Entre os mamíferos de pequeno porte, alguns roedores como o murganho, o rato e o hamster, têm sido muito utilizados em estudos ultra-estruturais e da patogénese periodontal, devido à facilidade de obtenção, de manuseamento



e ao seu baixo custo. Já nos estudos prévios aos ensaios clínicos recorre-se a animais de maior porte, como o cão e a ovelha, e primatas não humanos como o babuíno, o macaco, o chimpanzé e o gorila. Estes últimos, pela sua localização na escala filogenética, representam o modelo experimental de eleição. No entanto a sua utilização é muito dispendiosa.

Na escolha do modelo experimental, o tamanho da espécie é um factor determinante, não só, como já referimos no que diz respeito ao custo da sua aquisição e manutenção, assim como na elaboração do protocolo experimental, no processamento das amostras e na interpretação dos resultados experimentais. Os roedores apresentam uma anatomia craniana e fórmula dentária muito diferentes das do homem, mas, também como já referimos os tecidos periodontais são semelhantes, embora de tamanho reduzido. Por exemplo, o espaço interdentário entre os molares dos roedores, embora com a mesma organização estrutural do homem, corresponde a uma fracção de milímetro. Para além deste facto, os roedores apresentam características específicas da fisiologia dentária, como a erupção contínua e a atrição rápida e constante que, ao longo da vida, alteram a relação entre as diferentes estruturas periodontais.

Comparativamente a outros modelos experimentais, os roedores têm uma esperança de vida curta, pelo que o processo patológico tem de decorrer de um modo relativamente rápido. O que no homem pode levar meses ou anos a desenvolver-se, no rato poderá ocorrer em somente algumas semanas ou poucos meses.

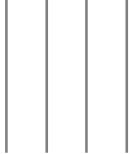
Como o rato tem sido um modelo experimental muito utilizado em periodontologia, as características do periodonto normal estão particularmente bem estudadas e documentadas, especialmente a área dento-gengival e as suas alterações fisiológicas relacionadas com a idade.

Os ratos têm uma fórmula dentária caracterizada pela existência de um incisivo e três molares por quadrante. Os dentes incisivos, para além de apresentarem

uma anatomia substancialmente diferente do incisivo humano, caracterizam-se por ter um crescimento contínuo muito rápido, renovando-se em 40 a 50 dias (Navia 1977). Este facto impede o desenvolvimento de doença periodontal nestes dentes, não podendo, por esse motivo, ser utilizados como modelo de periodontite (Page e Schroeder 1982).

Os molares são dentes multiradiculares (o primeiro molar tem três raízes; o segundo e o terceiro molar têm duas raízes) que iniciam a erupção entre o 15º e o 40º dia de vida consoante as espécies, completando-a por volta das cinco semanas (Navia 1977, Crawford *et al.* 1978). A anatomia é semelhante à dos dentes molares do homem, apesar de apresentarem, desde a sua erupção, ausência de esmalte no topo das cúspides. As suas coroas sofrem uma atrição constante, embora a um ritmo mais lento que os dentes incisivos. Os contactos oclusais mantêm-se devido à erupção passiva que é acompanhada pela aposição contínua de cemento radicular e pela remodelação do osso alveolar a nível apical. Aliás, a formação de cemento celular é tão pronunciada que, nos dentes maduros, há uma hipercementose em cada ápice radicular (Page e Schroeder 1982).

Nestes animais, ao longo da vida, os dentes molares alteram a sua posição relativa nos maxilares: erupcionam numa direcção ocluso-vestibular e migram, simultaneamente, para distal (Amstad-Jossi e Schroeder 1978, Page e Schroeder 1982, Roux *et al.* 1993). O osso alveolar acompanha esse movimento, apresentando uma remodelação contínua que se faz a um ritmo muito mais acelerado do que no homem. Assim, na face vestibular, o osso alveolar sofre reabsorção na superfície periodontal e aposição na superfície jugal. Na face lingual ou palatina, o osso alveolar sofre aposição ao longo da superfície periodontal. Para além disso, há também aposição óssea nas cristas alveolares, vestibulares e linguais, assim como na área apical (Vignery e Baron 1980). Da alteração da posição dos dentes molares, resulta a diminuição do espaço interdentário supra-alveolar, da distância entre a junção amelo-cementária



(JAC) de dois dentes adjacentes e do septo ósseo interdentário, com aproximação das raízes de dentes contíguos (Page e Schroeder 1982).

Resultando da conjugação da atrição, da erupção contínua e da migração dentária, a distância da JAC à crista alveolar aumenta ao longo da vida, aumentado igualmente a recessão gengival e a profundidade do sulco gengival (Crawford *et al.* 1978, Heijl *et al.* 1980, Kindlova *et al.* 1981).

Os fenómenos atrás descritos têm uma grande influência na patogénese da doença periodontal induzida nos ratos e igualmente na interpretação dos resultados experimentais. Em alguns estudos, o aumento da distância da JAC à crista óssea foi incorrectamente tomado como evidência de patologia periodontal (Crawford *et al.* 1978). Se o tempo experimental for longo, este aumento pode não significar unicamente o agravamento da patologia periodontal, mas também traduzir a alteração fisiológica atrás descrita, característica inerente a este modelo experimental (Kindlova *et al.* 1981). De modo a não confundir os resultados experimentais com esta remodelação fisiológica, é importante que todos os animais de um estudo experimental tenham a mesma idade.

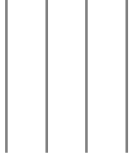
Como já dissemos, a estrutura e organização dos tecidos periodontais dos molares do rato são muito similares às estruturas correspondentes no homem. A área dento-gengival inclui um epitélio juncional que adere à superfície dentária, um sulco gengival muito diminuto e uma margem gengival revestida por epitélio queratinizado. No entanto, há algumas diferenças que importa destacar.

O revestimento epitelial da margem gengival é constituído por um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, tanto na vertente gengival (epitélio oral da gengiva - OGE) como na vertente interna do sulco gengival (epitélio sulcular - OSE). Ao contrário do que acontece no homem, no rato o epitélio

sulcular é queratinizado: possui um estrato córneo bem definido e um estrato granuloso com numerosos grânulos de queratohialina. Apesar do seu elevado grau de queratinização, as células do epitélio sulcular possuem desmosomas com as células do epitélio juncional (Listgarten 1975). Teoricamente, o facto do epitélio sulcular ser queratinizado poderia interferir com a passagem de toxinas bacterianas para o tecido conjuntivo gengival, impedindo ou retardando o início do processo inflamatório (Navia 1977). De facto, enzimas colocadas na margem gengival, penetram rapidamente no tecido conjuntivo através do epitélio juncional, mas não através do epitélio sulcular nem do epitélio oral da gengiva (Romanowski *et al.* 1988, Takata *et al.* 1997). Por esse motivo, parece não haver razão para pensar que a barreira gengival funcione de modo diferente no rato, comparativamente ao homem, embora a extensão da área afectada seja muito menor.

A queratinização do epitélio sulcular também poderia afectar a adesão de determinadas bactérias ao epitélio. No entanto, diversos agentes patogénicos periodontais demonstraram ter capacidade de colonizar a área dento-gengival do rato (Isogai *et al.* 1986). Assim, e de acordo com a opinião de Eggert e colaboradores (1980) e de Klausen (1991), parece incorrecto prescindir do rato como modelo experimental de periodontite, tendo por base o facto do epitélio sulcular ser queratinizado.

Tal como no homem, no rato o epitélio juncional não é queratinizado e apresenta grande permeabilidade, permitindo a entrada de substâncias exógenas e a migração de células inflamatórias (Listgarten 1975, Amstad-Jossi e Schroeder 1978, Romanowski *et al.* 1988, Heymann *et al.* 2001). O epitélio juncional localiza-se entre a superfície do esmalte e o epitélio sulcular, havendo uma sobreposição relativamente extensa entre os dois epitélios. Devido a este facto, o sulco gengival é praticamente inexistente (Yamasaki *et al.* 1979, Eggert *et al.* 1980). Em alguns cortes histológicos, principalmente nos descalcificados, é frequente observar-se uma separação entre o epitélio juncional e o epitélio



queratinizado devido à ausência do esmalte. Tal separação é um artefacto decorrente da preparação e montagem em parafina, não sendo observado em cortes não descalcificados montados em resina (Listgarten 1975, Eggert *et al.* 1980).

O compartimento proliferativo do epitélio juncional está localizado no estrato basal, adjacente ao tecido conjuntivo gengival, embora haja células aderentes ao esmalte que possuem algumas características das células basais (Takata *et al.* 1997, Watanabe *et al.* 2004).

Em condições normais, a taxa de remodelação óssea nos maxilares é muito elevada quando comparada com outros pontos do esqueleto ou mesmo com outras espécies. No osso alveolar do rato adulto foram detectados seis osteoclastos por milímetro quadrado de superfície óssea, e a duração de cada ciclo de remodelação foi de seis dias, enquanto que no osso trabéculas do homem adulto há 0,1 osteoclastos por milímetro quadrado e o ciclo tem uma duração média de sessenta a cento e vinte dias (Vignery e Baron 1980). Esta elevada actividade óssea tem grande interesse no estudo da dinâmica da remodelação óssea e dos efeitos de diferentes drogas e hormonas sobre o metabolismo ósseo (Vignery e Baron 1980, Page e Schroeder 1982, Dumitrescu *et al.* 2004).

Assim como no homem, a periodontite nos ratos é um processo infeccioso. Contudo, os ratos são relativamente resistentes à doença periodontal (Garant e Cho 1979a, Ryder 1980a), pelo que, quando utilizados como modelos experimentais, as lesões são geralmente induzidas de modo a progredirem mais rapidamente. Os ratos convencionais apresentam lesões de periodontite, geralmente localizada nos espaços interdentários, mas só a partir dos dois anos de idade (Garant *et al.* 1983).

A doença periodontal pode ser induzida quer por manipulação da dieta (Garant e Cho 1979a, Ryder 1980a, b, c, Robinson *et al.* 1991), quer através da inoculação

de bactérias patogénicas periodontais (Fiehn *et al.* 1992), quer através da colocação de uma ligadura em torno do colo dos dentes (Sallay *et al.* 1982, Klausen 1991) quer por infiltração de toxinas bacterianas (Klausen 1991, Llavaneras *et al.* 2001, Dumitrescu *et al.* 2004), quer ainda por combinação destes métodos (Abiko e Shimono 1989, Breivik *et al.* 2005).

Têm sido descritas diversas formas de manipular a dieta de modo a induzir o aparecimento de doença periodontal. O método mais utilizado consiste no aumento da percentagem de sacarose que, em algumas formulações, chega a representar 56% da dieta (Navia 1977, Garant e Cho 1979a, b, Heijl *et al.* 1980, Ryder 1980a, Hemmerle e Frank 1991). Quando ratos convencionais são alimentados com uma dieta rica em sacarose, desenvolvem, em alguns casos, lesões características de periodontite ao fim de quatro (Garant e Cho 1979a, b) e nove semanas (Ryder 1980a) sendo, no entanto, a gengivite a lesão mais frequente. Segundo estes autores, o aumento de sacarose na dieta potencia a síntese de polissacarídeos extracelulares pela placa bacteriana, os quais, por sua vez, potenciam a adesão e a colonização bacteriana e aumentam a susceptibilidade das bactérias a serem fagocitadas pelos polimorfonucleares (PMN), resultando uma maior libertação extracelular de enzimas lisosomais.

Através da manipulação da dieta, pode igualmente referir-se a adição de um suplemento (1%) de pêlos cortados (Reymond e Cimasoni 1997). A impactação dos seus próprios pêlos parece ser um factor condicionante local importante no desenvolvimento da lesão periodontal do rato. É frequente observar-se a existência de pêlos no sulco gengival, particularmente na área interproximal, e menos frequentemente no interior do tecido conjuntivo subepitelial. Tem sido bastante discutido o papel da impactação dos pêlos como estímulo da resposta inflamatória local. Em ratos *germ-free*, há polimorfonucleares leucócitos no sulco gengival, na presença ou não de pêlos. Acrescente-se ainda que a presença de pêlos parece desencadear uma resposta semelhante à presença de bactérias no sulco gengival (Heijl *et al.* 1980, Ryder 1980a). Segundo Page

e Schroeder (1982), a impactação do pêlo poderia ter o efeito de uma agulha, proporcionando uma entrada directa das bactérias e seus produtos no tecido conjuntivo subepitelial mais profundo (Crawford *et al.* 1978). Foram igualmente detectados pêlos no tecido conjuntivo supra-alveolar, rodeados por macrófagos, células gigantes multinucleadas e polimorfonucleares leucócitos (Garant e Cho 1979b).

Para além da impactação de pêlos no sulco gengival, também é frequente encontrar, ao nível do sulco gengival, material vegetal (fibras de celulose) que pode ter origem na forragem da gaiola ou ser proveniente do granulado da alimentação. Este tipo de material terá um papel na resposta inflamatória semelhante ao desempenhado pelos pêlos, factor condicionante que pode ser minimizado recorrendo a procedimentos simples, como a mudança frequente da forragem da gaiola, ou a utilização de gaiolas com uma grelha no fundo, interferindo igualmente com outros hábitos como a coprofagia (Klausen 1991).

A introdução de bactérias patogénicas periodontais na área dento-gengival de ratos *germ-free* ou gnotobióticos³ tem sido frequentemente utilizada como modelo experimental nos estudos sobre a flora periopatogénica do homem (Navia 1977, Klausen 1991). Nestes estudos, algumas bactérias ou seus produtos, foram inoculados em ratos, de modo a induzir patologia periodontal. Como exemplos podemos referir várias estirpes de *Streptococcus* (Crawford *et al.* 1978, Klausen *et al.* 1986), de *Actinomyces* (Crawford *et al.* 1978, Heijl *et al.* 1980, Klausen *et al.* 1986), de *Capnocytophaga sputigena* (Heijl *et al.* 1980),

³ Os termos *germ-free* e gnotobiótico prestam-se a alguma confusão. De acordo com Navia (1977) o termo *germ-free* indica que os animais devem estar livres de qualquer contaminação externa. Mas, como tal pressuposto é na prática muito difícil de provar, o termo gnotobiótico estaria mais indicado, significando que os animais não possuem flora microbiológica, pelo menos de acordo com os meios de detecção. O termo gnotobiótico é suficientemente lato para incluir animais *germ-free*, *ex-germ-free* que foram inoculados com bactérias identificadas, a partir de uma ou mais culturas puras, e até animais convencionais desprovidos de um segmento específico da sua microflora por manipulação experimental.

de *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Eikenella corrodens* (Heijl *et al.* 1980, Samejima *et al.* 1990, Fiehn *et al.* 1992, Karimbux *et al.* 1998) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Taubman *et al.* 1983, Yoshie *et al.* 1987). Estas bactérias, quando inoculadas isoladamente ou em associações restritas, induzem lesões periodontais, de frequência e gravidade variável, 60 a 120 dias após a infecção.

A aplicação, quer por contacto quer por infiltração, de toxinas bacterianas, geralmente lipopolissacarídeos de bactérias da flora subgingival Gram negativa, demonstrou ser uma alternativa fiável na produção de lesões periodontais. Sete a dez dias após a infiltração local, observa-se uma inflamação gengival e periodontal com infiltrado inflamatório, proliferação e migração apical do epitélio juncional e reabsorção óssea, características em tudo semelhantes à lesão periodontal no homem (Suzumura *et al.* 1989, Klausen 1991, Takata *et al.* 1997, Llanereras *et al.* 2001, Dumitrescu *et al.* 2004).

Por último, a colocação de ligaduras em torno do colo dos dentes molares tem sido um dos modelos mais utilizados na criação de lesão periodontal com as características de periodontite, tanto em ratos (Abiko e Shimono 1989, Koide *et al.* 1995, Gaspersic *et al.* 2003) como em animais de maior porte (Kennedy e Polson 1973, Lindhe e Ericsson 1978, Adams *et al.* 1979, Beaumont *et al.* 1984). A ligadura vai fomentar a acumulação de placa bacteriana, desencadeando a resposta inflamatória daí decorrente. De facto, após a colocação de ligaduras em ratos *germ-free*, a única lesão observada foi o deslocamento dos tecidos gengivais e uma migração de polimorfonucleares através do epitélio juncional, certamente devido ao trauma mecânico, não havendo perda de inserção nem reabsorção do osso alveolar (Heijl *et al.* 1980). Contudo, Klausen (1991) não defende a utilização de ligaduras em animais de pequeno porte, por ser um procedimento demasiado traumático, tendo em conta o tamanho relativo das estruturas periodontais.

Tal como acontece na patogénese da doença periodontal no homem, nos ratos a patogenicidade das bactérias Gram positivas revelou ser diferente das bactérias Gram negativas. A inoculação de bactérias Gram positivas em ratos *germ-free* resulta, numa primeira fase, na formação de uma bolsa gengival crateriforme, formada pelos epitélios sulcular queratinizado e juncional. Após a acumulação de bactérias nas superfícies supragengivais, estas invadem o sulco gengival, proliferando apicalmente. A adesão do epitélio juncional à superfície dentária retrai e a gengiva livre afasta-se da massa bacteriana em crescimento por retracção lateral. Segundo Page e Schroeder (1982), esta distensão lateral da margem gengival característica nos roedores, está relacionada com o tamanho diminuto da margem gengival e do sulco gengival em relação com o tamanho das colónias bacterianas em proliferação. Geralmente, entre a placa bacteriana e a parede epitelial da bolsa forma-se uma barreira de PMN, os quais migraram através do epitélio juncional (Ryder 1980b). No tecido conjuntivo subepitelial, observam-se inúmeras células inflamatórias, predominantemente neutrófilos, alguns monócitos e pequenos linfócitos. Esta área subepitelial é muito vascularizada e o componente colagénico é escasso (Crawford *et al.* 1978, Garant e Cho 1979a, b, Ryder 1980a). Nesta fase, que nos ratos convencionais ou infectados experimentalmente pode durar semanas, não há evidência de reabsorção óssea. No entanto, em alguns, verifica-se uma alteração da resposta inflamatória que se caracteriza por surtos agudos de infiltração de numerosos PMN por todo o tecido conjuntivo supra-alveolar, inclusive no seio dos feixes de fibras transeptais (Crawford *et al.* 1978, Garant e Cho 1979a, b, Ryder 1980a). Estes surtos são desencadeados pela ulceração do epitélio juncional e pela solução de continuidade da lâmina basal (Abiko e Shimono 1991). A presença de um acentuado infiltrado inflamatório entre os feixes de fibras transeptais dos espaços interdentários está, invariavelmente, associado à presença de osteoclastos e reabsorção alveolar (Ryder 1980b, c).


Na maioria dos estudos, o infiltrado inflamatório apresenta um predomínio de

PMN, alguns monócitos e linfócitos, não se observando a presença de plasmócitos, mesmo nas lesões mais avançadas (Garant e Cho 1979b, Heijl *et al.* 1980, Ryder 1980c). No entanto, este último tipo celular foi observado em ratos com doença periodontal não experimental, ao fim de 20 a 27 meses, identificando-se a sua presença no tecido conjuntivo supra-alveolar, no ligamento periodontal e junto à medula óssea (Garant *et al.* 1983). Acrescenta-se ainda que, em ratos susceptíveis à placa bacteriana, a gengivite aguda desenvolvida nos três meses iniciais caracteriza-se por um infiltrado inflamatório com predomínio de PMN. Passados mais dois meses, quando a gengivite evolui para subaguda/crónica, já se observam plasmócitos (Isogai *et al.* 1985). O facto dos estudos de periodontite experimental serem extremamente curtos, com a duração de algumas semanas, pode justificar a escassa presença de plasmócitos no infiltrado inflamatório (Page e Schroeder 1982).

O aumento da passagem de neutrófilos através das camadas mais coronais do epitélio juncional, o alargamento do espaço intercelular e a perda de adesão à superfície dentária parecem desencadear uma conversão das células do epitélio juncional que aumentam a sua replicação, iniciando-se a formação do epitélio da bolsa (Abiko e Shimono 1991).

Com o decorrer do tempo, a placa bacteriana continua a proliferar e a colonizar a superfície radicular que, por degradação da inserção radicular das fibras de colagénio e migração apical da adesão epitelial, se apresenta desnudada e integra a bolsa periodontal em formação (Garant e Cho 1979a, b).

De facto, ratos gnotobióticos infectados por bactérias Gram positivas de origem humana, desenvolvem bolsas periodontais profundas, particularmente nos espaços interproximais, detectando-se a presença bacteriana na superfície radicular da zona mais apical da lesão (Jordan *et al.* 1972). Por outro lado, após a inoculação de bactérias Gram negativas, não se detecta a formação de placa bacteriana, mas formam-se lesões periodontais profundas caracterizadas pela proliferação apical do epitélio juncional, perda de inserção



periodontal e reabsorção óssea (Listgarten *et al.* 1978, Heijl *et al.* 1980). De modo geral, as lesões desenvolvem-se mais rapidamente nos casos de inoculação de bactérias Gram negativas.

De acordo com Caton e colaboradores (1994), todos os modelos experimentais acima referidos podem ser classificados como modelos de lesões crônicas periodontais, uma vez que reproduzem as características essenciais da lesão periodontal no homem: acumulação de placa bacteriana ou de seus produtos, reacção inflamatória, reabsorção óssea e ausência de regeneração espontânea. Ainda segundo os mesmos autores, uma das desvantagens deste tipo de modelo experimental centra-se no facto de requerer um tempo de evolução relativamente longo, de acordo com o animal utilizado. No caso da utilização do rato esse tempo é bastante mais curto, representado somente algumas semanas. Uma outra desvantagem refere-se ao facto de as lesões desenvolvidas não serem homogéneas e estandardizadas, limitando a interpretação dos resultados obtidos quando utilizado para testar técnicas regenerativas periodontais.

Ainda segundo Caton e colaboradores (1994) o modelo ideal para testar tratamentos regenerativos seria um modelo de lesão aguda/crónica, no qual o defeito periodontal seria criado cirurgicamente, com dimensões estandardizadas, como no modelo de lesão aguda. No entanto, antes do encerramento do retalho cirúrgico, seria colocado na ferida um artefacto, por exemplo uma ligadura ou um silicone, de modo a criar uma reacção inflamatória crónica. Este modelo agudo/crónico apresenta múltiplas vantagens: os defeitos são produzidos rapidamente, pelo que se torna menos dispendioso e podem ser produzidos defeitos bilaterais idênticos, no que respeita à perda de osso e de tecido conjuntivo.

TRABALHO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL



V. TRABALHO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL

Este projecto experimental foi avaliado pela Comissão Consultiva para a Protecção dos Animais utilizados para fins experimentais e/ou outros fins Científicos, prevista na alínea b) do nº 49 da Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro, tendo sido autorizada a sua realização. De igual modo, a Direcção Geral de Veterinária, Direcção de Serviços de Meios de Defesa da Saúde, Bem-estar e Alimentação Animal, autorizou a sua realização.

Neste trabalho foram utilizados 100 ratos machos albinos, da estirpe “Wistar”, com 15 semanas de idade e 334 ± 32 g de peso, mantidos no Laboratório de Investigação Experimental dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Durante a fase experimental, os animais foram mantidos em condições laboratoriais normalizadas, de acordo com a legislação em vigor (Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro; Portaria nº 1131/97 de 7 de Novembro). A dieta consistiu numa ração completa de granulado *standard* para roedores de laboratório (Panlab®) e água acidificada num regime *ad libitum*.

Esta investigação é constituída por dois estudos com protocolos e objectivos distintos. No primeiro estudo caracteriza-se histologicamente a lesão periodontal produzida pela colocação de um fio de sutura no sulco gengival do molar do rato. No segundo estudo avalia-se a influência de um derivado das proteínas da matriz do esmalte na cicatrização gengival de uma lesão periodontal experimental.





a. PERIODONTITE EXPERIMENTAL - PROTOCOLO A

Embora o rato seja, como anteriormente dissemos, um modelo experimental frequentemente empregue em Periodontologia, a sua utilização em estudos de regeneração periodontal tem sido rara. Por esse motivo, reconhecemos a necessidade de caracterizar histologicamente a lesão periodontal decorrente da colocação de um fio sutura em torno do colo de um molar, de modo a avaliar a possibilidade de, numa segunda fase, ser aplicada uma terapêutica regenerativa no seu tratamento.

Acrescente-se ainda o facto de os estudos já publicados sobre este modelo serem omissos ou apresentarem descrições sumárias referentes à metodologia de colocação de um fio de sutura nos espaços interdentários.

Uma vez que, no rato, os espaços interdentários têm dimensões muito reduzidas, desenvolvemos dois procedimentos para a colocação do fio nesses espaços: - passagem de toda a extensão da agulha, apicalmente ao ponto de contacto e - afastamento das faces interproximais, abrindo o ponto de contacto de modo a permitir a passagem do fio.

a.1. Objectivo

Este estudo experimental teve como objectivo determinar qual dos procedimentos resulta na criação de uma lesão periodontal passível de ser tratada cirurgicamente.

a.2. Material e métodos

Tendo por base protocolos experimentais já publicados (Sallay *et al.* 1982, Savani *et al.* 1985) procedeu-se à colocação de um fio de sutura em torno dos 2º molares maxilares. Foram testados dois procedimentos distintos para a passagem do fio pelos espaços interdentários: passagem da agulha



apicalmente ao ponto de contacto e o afastamento das faces interproximais com o auxílio de uma cunha.

De modo a caracterizar o tipo de lesão desenvolvida por cada um dos procedimentos, foram criados os seguintes grupos:

- no **grupo I**, grupo de controlo, não foi efectuada qualquer manipulação;
- no **grupo II**, a agulha, acoplada ao fio de sutura, passou através dos espaços interdentários entre o 1º e o 2º molar e entre o 2º e o 3º molares superiores;
- no **grupo III**, a agulha foi utilizada como cunha para abrir o ponto de contacto entre os referidos molares, de modo a permitir a passagem do fio de sutura.

O nó do fio de sutura foi posicionado na face vestibular, de forma a que o fio permanecesse numa posição infragengival na face palatina. Só foram manipulados os molares superiores, tendo sido excluídos os molares inferiores por dificuldades no acesso. Não se repetiu o mesmo procedimento em cada animal. O fio de sutura utilizado foi uma seda entrançada, não reabsorvível, 4/0 (Perma Sharp™ C17, Hu-Friedy®).

O grupo I foi constituído por 5 animais. De acordo com o tempo da experiência, dez animais foram sacrificados ao oitavo dia (subgrupos IIa e IIIa) e outros dez ao décimo quinto dia (subgrupos IIb e IIIb) (Quadro 5.1).



Quadro 1 . Esquematização dos grupos do Protocolo A – Periodontite experimental

GRUPO	PROCEDIMENTO	Tempo	n*
I	Sem manipulação	0 dias	10
II	Passagem da agulha nos espaços interdentários		
a		8 dias	10
b		15 dias	10
III	Agulha usada como cunha		
a		8 dias	10
b		15 dias	10

*n - número de dentes

a.2.1. Anestesia

A indução de anestesia geral é uma técnica fundamental nos procedimentos experimentais que requerem manipulação cirúrgica, por razões éticas, técnicas e legais. Durante a manipulação cirúrgica dos animais é necessário obter uma anestesia geral profunda de modo a permitir a sua imobilização. Na anestesia geral desta espécie de roedores utiliza-se, na maior parte dos casos, a associação de um anestésico dissociativo e de um sedativo. Os anestésicos dissociativos produzem uma imobilização rápida, sem paralisia flácida. A associação com sedativos potencia o efeito dos anestésicos dissociativos e minimiza a incidência de alguns efeitos indesejáveis destes últimos, como a hipertonicidade muscular.

Neste estudo utilizou-se a associação de cloridrato de Ketamina (Ketalar® 50mg/ml, Parke Davis) com cloridrato de clorpromazina (Lagartil®, Laboratórios Vitória), 10ml/3ml, no regime de 0,15ml por 100g de peso, em dose única por via intramuscular. Desta associação resultou uma anestesia suficientemente



profunda durante um período médio de 20 minutos, permitindo a manipulação das estruturas periodontais e periósteo.

a.2.2. Posicionamento do animal

Após a administração da anestesia, cada animal foi imobilizado em decúbito dorsal numa mesa operatória com cefalóstato (Fig. 5.1). Com a mandíbula em hiperextensão, procedeu-se à execução da técnica de acordo com o estipulado no protocolo experimental.

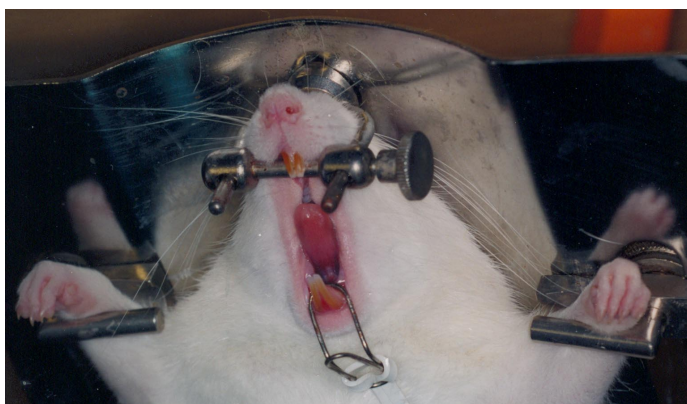


Figura 5.1

Imobilização de um rato no cefalóstato da mesa operatória.

a.2.3. Pós-operatório

No pós-operatório imediato houve um cuidado especial na recuperação anestésica, uma vez que a hipotermia é uma das causas mais frequentes de morte pós-operatória nos pequenos roedores, bem como a aspiração do material de forragem das gaiolas. Assim, a recuperação da anestesia geral foi efectuada em gaiolas individuais sem forragem e em ambiente aquecido.



a.2.4. **Sacrifício dos animais e recolha de amostras**

De acordo com os grupos experimentais já descritos, os animais foram sacrificados individualmente, através de uma sobredosagem do anestésico geral, administrado por via intramuscular. Após confirmação da ausência de sinais vitais, foi efectuada a necrópsia. De modo a optimizar o acesso ao maxilar superior, foi efectuada uma incisão cutânea mediana longitudinal supra-esternal, para proceder à separação das hemimandíbulas e luxação das articulações temporo-mandibulares.

Após efectuar incisões mesio-palatina, jugal direita e jugal esquerda, os hemimaxilares foram colhidos separadamente. Feita a remoção da pré-maxila, cada amostra (Fig. 5.2) foi colocada de imediato no fixador (formaldeído neutro tamponado a 10 %) e rotulada de acordo com o grupo experimental e o número de registo do Instituto de Patologia Experimental.

A alienação dos cadáveres e dos resíduos procedentes da eutanásia foi providenciada nos termos da legislação em vigor.

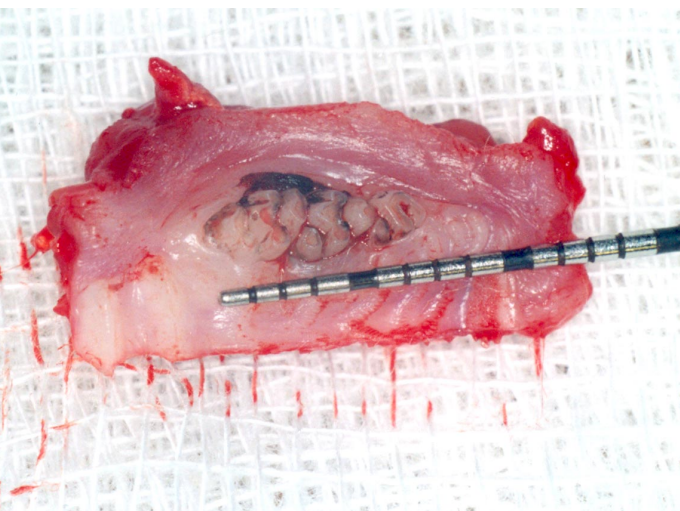


Figura 5.2

Hemimaxila esquerda do protocolo A, após colheita. O fio de sutura encontra-se numa posição infra-gengival, estando o nó posicionado vestibularmente. A sonda periodontal (CP-15UNC, Hu-Friedy®) permite a avaliação da dimensão da amostra colhida.



a.2.5. Processamento das amostras

As amostras recolhidas foram fixadas em formaldeído neutro tamponado a 10%, durante 48 horas. Depois de descalcificadas em ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 10% à temperatura ambiente, durante duas semanas, as amostras foram seccionadas no sentido vestibulo-palatino, na porção central do 2º molar, sofrendo então uma descalcificação adicional de mais quatro dias com o mesmo ácido.

a.2.6. Método de análise

Terminada a descalcificação, as amostras foram processadas para microscopia de luz. Resumidamente, as amostras depois de desidratadas, em concentrações crescentes de etanol, foram incluídas em parafina e orientadas de modo a obter cortes seriados, vestibulo-palatinos, com 6µm de espessura. Para além da coloração com hematoxilina-eosina (HE), optou-se pela utilização de mais dois métodos de coloração, nomeadamente o Tricrómico de Masson (TM) e o Brown e Brenn (BB), de modo a evidenciar a presença de colagénio e de bactérias, respectivamente. No método de Tricrómico de Masson o núcleo apresenta-se azul ou preto, o citoplasma celular, o tecido muscular e os eritrócitos coram de vermelho, destacando-se o colagénio que adquire uma coloração verde. No método Brown e Brenn, os diferentes tecidos coram de amarelo e as bactérias coram de azul e vermelho.

A avaliação histológica baseou-se numa análise descritiva dos tecidos periodontais envolvidos nas lesões, incidindo preferencialmente na vertente palatina dos tecidos periodontais do segundo molar, não tendo sido avaliada a sua vertente vestibular.



a.3. RESULTADOS

a.3.1. Aspecto macroscópico

No dia de sacrifício, os animais não apresentavam alterações do hábito externo nem do comportamento que fossem reveladoras de patologia.

Nos animais sacrificados ao oitavo dia (subgrupos IIa e IIIa) não houve modificação significativa no peso inicial. Nos animais sacrificados ao décimo quinto dia (subgrupos IIb e IIIb) verificou-se um ligeiro aumento do peso inicial, embora irrelevante.

A observação macroscópica da margem gengival palatina dos dentes manipulados (grupos II e III) revelou a presença infragengival do fio de sutura em quase todos os segundos molares, não sendo visíveis sinais de inflamação nem de placa bacteriana ou de recessão gengival (Fig. 5.3). Em todos os animais sacrificados ao oitavo dia, o segundo e o terceiro molares apresentavam uma ligeira mobilidade horizontal, enquanto que alguns dos animais sacrificados ao décimo quinto dia, para além da mobilidade horizontal, foi igualmente detectada mobilidade vertical.

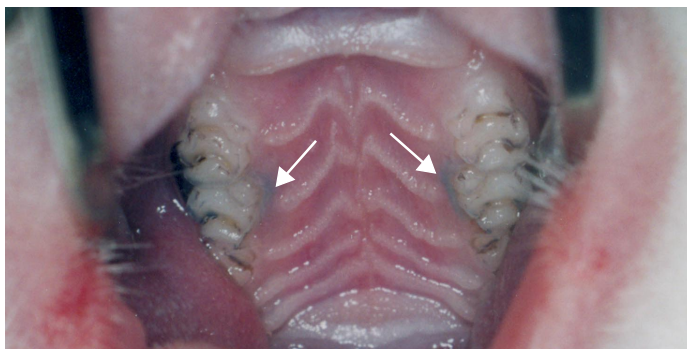
No grupo da passagem da agulha pelos espaços interdentários (grupo II), todos os segundos molares maxilares apresentavam o fio de sutura numa localização palatina infragengival. No grupo em que a agulha foi usada como cunha (grupo III), três amostras foram excluídas (uma do subgrupo IIIa e duas do subgrupo IIIb) uma vez que o fio de sutura estava ausente ou localizado acima da margem gengival. Nas restantes amostras deste grupo, o fio encontrava-se localizado numa posição infragengival.

Durante a recolha das amostras, ocorreu a dilaceração de uma das amostras do subgrupo IIa, resultante de má manipulação, o que inviabilizou o seu processamento para estudo histológico. Com efeito, dos animais sacrificados ao oitavo dia, apenas foram examinadas dezoito amostras: nove em que a agulha passou pelo espaço interdentário (subgrupo IIa) e nove em que a agulha



Figura 5.3

Fotografia intraoral, 15 dias após a colocação do fio de sutura. O fio é visível na transparência da margem gengival palatina do 2º molar, numa localização infragengival (seta). Os tecidos gengivais palatinos não apresentam sinais clínicos de inflamação.



foi usada como cunha (subgrupo IIIa). Dos animais sacrificados ao décimo quinto dia examinaram-se, igualmente, dezoito amostras: dez pertencentes ao subgrupo IIb e oito pertencentes ao subgrupo IIIb.

a.3.2. Observações em microscopia de Luz

As imagens histológicas observadas demonstram que a metodologia do processamento das amostras para estudo histológico, nomeadamente o processo de fixação e de descalcificação, foi apropriada, proporcionando a obtenção de cortes de material bem preservado e de boa qualidade.

Visando proporcionar uma certa continuidade e melhor entendimento dos eventos biológicos decorrentes das duas variantes testadas, de seguida iniciaremos a apresentação dos resultados pelo grupo sem manipulação (grupo I), seguida pelos subgrupos manipulados: subgrupo IIa, subgrupo IIb, subgrupo IIIa e subgrupo IIIb.

a.3.2.1. Sem manipulação - Grupo I

Os cortes observados em microscopia de luz, do material proveniente de animais que não foram sujeitos a qualquer manipulação, apresentam a gengiva marginal palatina de forma afilada, localizada sobre o espaço correspondente ao esmalte, ausente devido ao processo de descalcificação (Fig. 5.4).



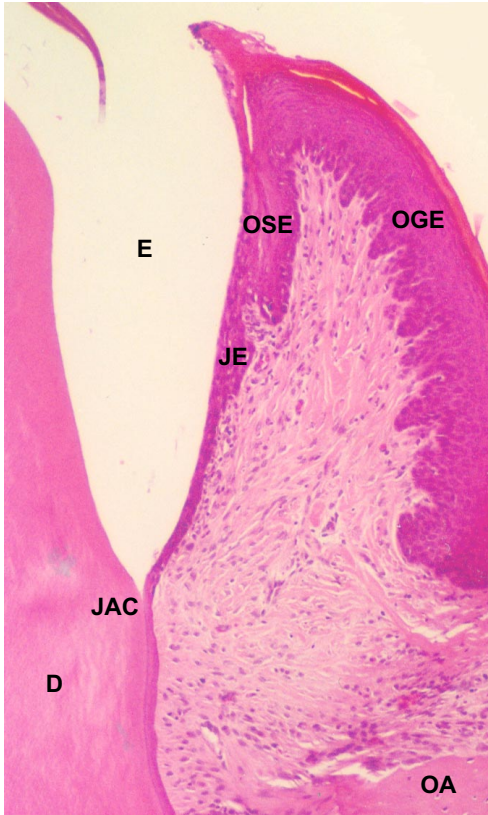


Figura 5.4

Vertente palatina dos tecidos periodontais, do segundo molar maxilar sem manipulação (grupo I). A margem gengival localiza-se acima da junção amelo-cementária (JAC). O revestimento epitelial é composto por três epitélios distintos: o epitélio oral da gengiva (OGE), o epitélio sulcular (OSE) e o epitélio juncional (JE). (E – área correspondente ao esmalte, ausente por descalcificação; D – dentina; OA – osso alveolar). (HE, 100x no original).

No revestimento epitelial da gengiva marginal observam-se três tipos de epitélio. O epitélio oral da gengiva (*oral gingival epithelium* – OGE), localizado na vertente externa, entre o vértice da margem gengival e o revestimento epitelial da mucosa palatina. Este epitélio é pavimentoso, estratificado e queratinizado (Fig. 5.5). De acordo com o grau de diferenciação dos queratinócitos, podem distinguir-se quatro estratos: - o estrato basal ou germinativo constituído por células cubóides ou prismáticas de núcleo denso e alongado, com capacidades mitóticas (compartimento proliferativo) (Fig. 5.6); - o estrato espinhoso constituído por várias camadas de queratinócitos poliédricos, cujo núcleo é ovóide (Fig. 5.7); - o estrato granuloso composto de células achatadas com pequenos grânulos densos no citoplasma (grânulos de queratohialina) (Fig. 5.8) e - o estrato



Figura 5.5

Epitélio oral da gengiva (OGE) onde se distinguem diferentes estratos (grupo I). Algumas células claras (setas) são identificáveis entre os queratinócitos. (HE, 400x no original).

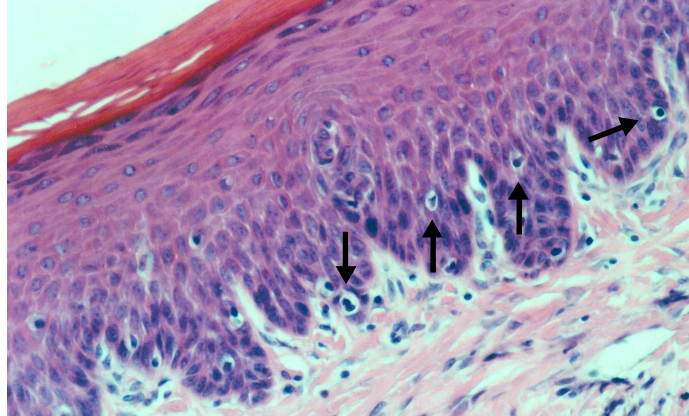


Figura 5.6

Estrato basal (EB) do OGE que contorna os prolongamentos conjuntivos (grupo I). Os queratinócitos apresentam-se cubóides com um núcleo denso. Sendo este o compartimento proliferativo, observam-se algumas células em mitose (setas). Entre os queratinócitos é possível distinguir raras células claras (*). (HE, 1000x no original).

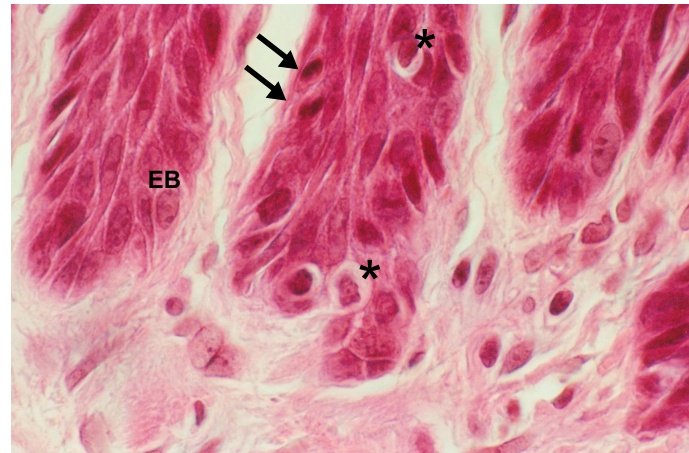
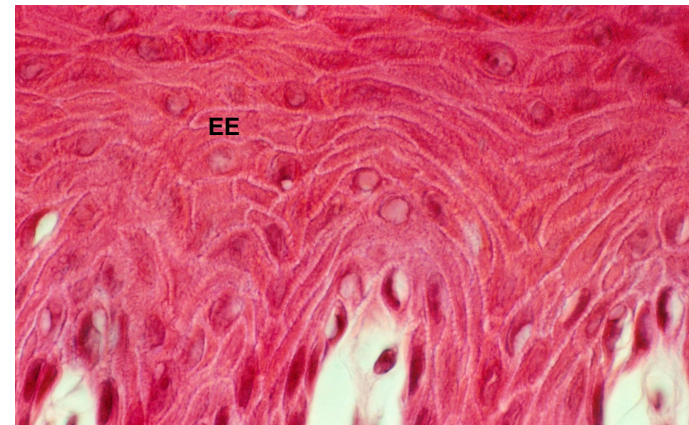


Figura 5.7

Estrato espinhoso (EE) do OGE (grupo I). O espaço intercelular entre os queratinócitos apresenta um aspecto reticulado. (HE, 1000x no original).



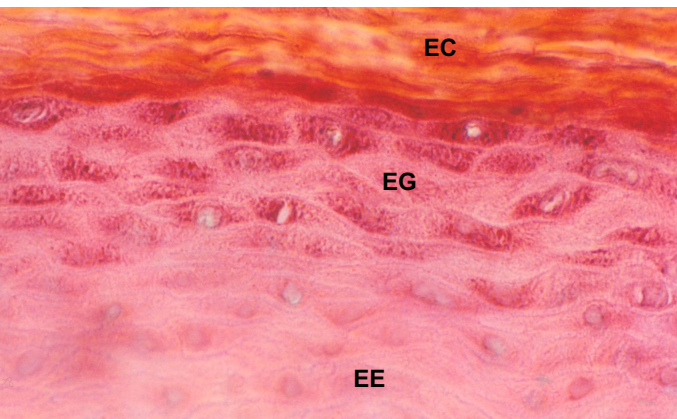


Figura 5.8

Estrato granuloso (EG) e o estrato córneo (EC) do OGE (grupo I). No estrato granuloso, os queratinócitos apresentam grânulos densos. No estrato córneo, a queratina ocupa todo o citoplasma celular e há ausência dos núcleos. (EE – estrato espinhoso) (HE, 1000x no original).

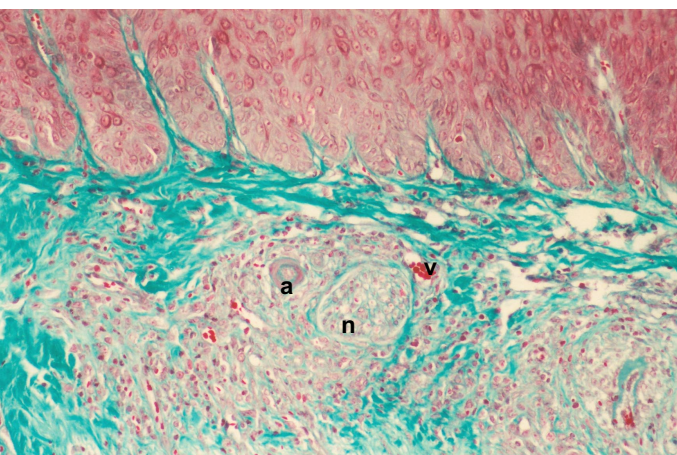


Figura 5.9

Lâmina própria do OGE (grupo I). Destaca-se o componente colagênico dos prolongamentos conjuntivos. (a – artéria; v – vénula; n – nervo) (TM, 200x no original).

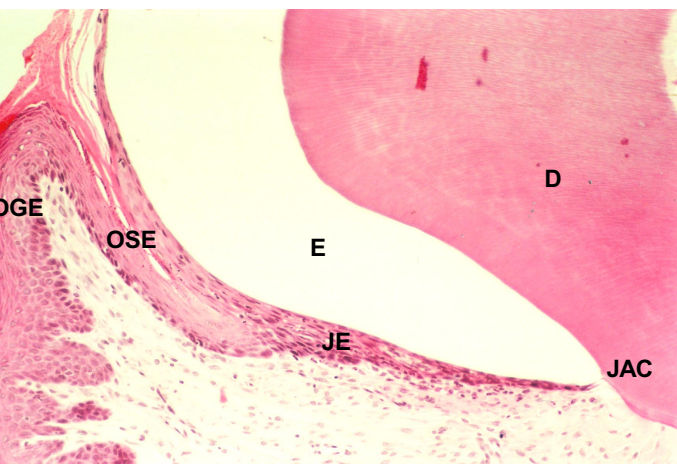


Figura 5.10

Vertente interna da gengiva marginal (grupo I). O epitélio sulcular (OSE), coronalmente em continuidade com o epitélio oral da gengiva (OGE) apresenta-se queratinizado. O epitélio junção (JE), não queratinizado, interpõem-se entre o OSE e o esmalte, ao nível da junção amelo-cementária (JAC). (E – área correspondente ao esmalte, ausente por descalcificação; D - dentina) (HE, 200x no original).



córneo constituído por células achatadas com grande afinidade para a eosina; a maior parte das células não apresentam núcleo pelo que este epitélio se pode classificar como ortoqueratósico (Fig. 5.8). Os três últimos estratos representam o compartimento de diferenciação.

Os queratinócitos constituem a grande maioria da população celular deste epitélio (população intrínseca), estando igualmente presentes outros tipos celulares (população extrínseca). Para além de células inflamatórias, geralmente neutrófilos polimorfonucleares, identificamos algumas células, localizadas mais frequentemente no estrato basal, em que o citoplasma se apresenta mais claro, sendo por essa razão designadas por “células claras” (Figs. 5.5 e 5.6). Embora o tipo de coloração empregue neste estudo não tenha a capacidade de identificar especificamente essas células, podem tratar-se de melanócitos (células produtoras de melanina) ou de células de Merkel (células neuro-endócrinas).

Este OGE apresenta uma grande interdigitação com o tecido conjuntivo subjacente, estando os prolongamentos conjuntivos no seio do epitélio (Figs. 5.4, 5.5 e 5.9).

O epitélio sulcular (*oral sulcular epithelium* – OSE) reveste a vertente interna da gengiva marginal, voltada para a coroa dentária, desde o seu vértice (em continuidade com o OGE) ao o fundo do sulco gengival (em continuidade com o epitélio juncional) (Fig. 5.4). O epitélio sulcular (OSE) apresenta algumas semelhanças com o OGE: é também estratificado e, no rato, é queratinizado, embora os estratos não sejam tão bem definidos. Pelo contrário, neste epitélio os prolongamentos conjuntivos são raros (Figs. 5.10 e 5.11).

O epitélio juncional (*junctional epithelium* - JE) localiza-se entre a porção mais apical do epitélio sulcular e a junção amelo-cementária (JAC), onde estabelece a adesão do revestimento epitelial da gengiva com a superfície dentária (Figs. 5.10, 5.11 e 5.12). O epitélio juncional (JE) apresenta-se muito diferente dos outros dois epitélios da gengiva marginal: apesar de estratificado não é possível



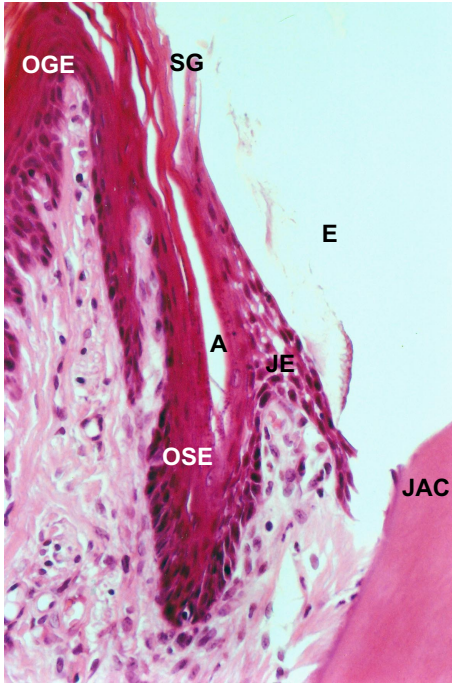


Figura 5.11

Pormenor do epitélio sulcular (OSE) (grupo I), o qual para além de se apresentar queratinizado, apresenta um prolongamento conjuntivo. O epitélio juncional (JE), não queratinizado, interpõem-se entre o OSE e o esmalte, ao nível da junção amelo-cementária (JAC). O sulco gengival (SG) é diminuto. (OGE - epitélio oral da gengiva; E – área correspondente ao esmalte, ausente por descalcificação; A – artefacto na espessura do estrato córneo do OSE; (HE, 400x no original).

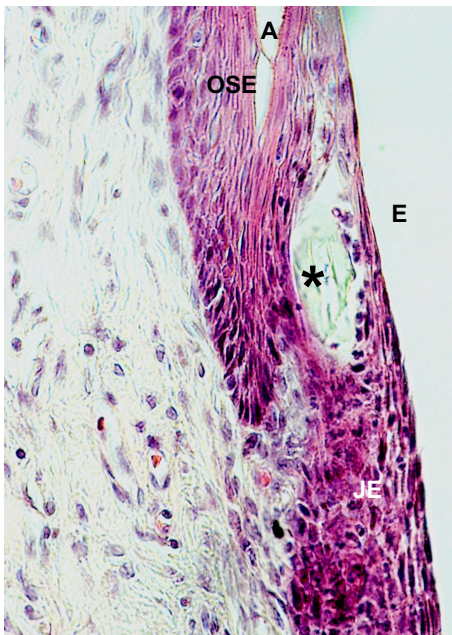


Figura 5.12

Pormenor da transição entre o epitélio sulcular (OSE) e o epitélio juncional (JE) (grupo I). Este último apresenta, na sua espessura, um pêlo em corte transversal (*). Alguns neutrófilos polimorfonucleares localizam-se entre as células epiteliais e no tecido conjuntivo. (E – área correspondente ao esmalte, ausente por descalcificação; A – artefacto na espessura do estrato córneo do OSE) (HE, 400x no original).



Figura 5.13

Pormenor de uma área da junção amelo-cementária (JAC), onde estão localizadas as células mais apicais do epitélio juncional (JE) (grupo I). Apicalmente à última célula epitelial, há fibras de colagénio (fc) que se inserem no cimento radicular (C). Alguns polimorfonucleares são visíveis na lâmina própria do epitélio. (E – área correspondente ao esmalte, ausente por descalcificação; D – dentina) (HE, 400x no original).

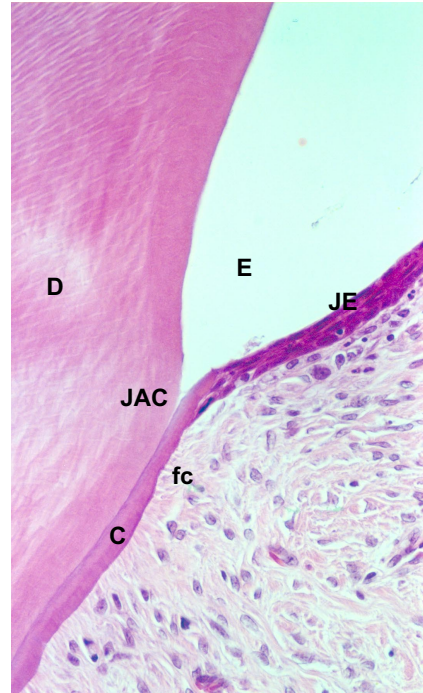
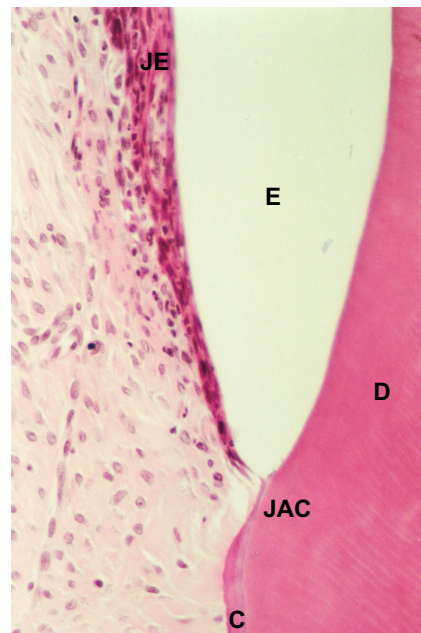


Figura 5.14

Ampliação da área da junção amelo-cementária (JAC) da figura 5.10 (grupo I). O limite apical do epitélio juncional (JE) situa-se sobre a JAC. (E – área correspondente ao esmalte, ausente por descalcificação; D – dentina; C – cimento radicular) (HE, 400x no original).



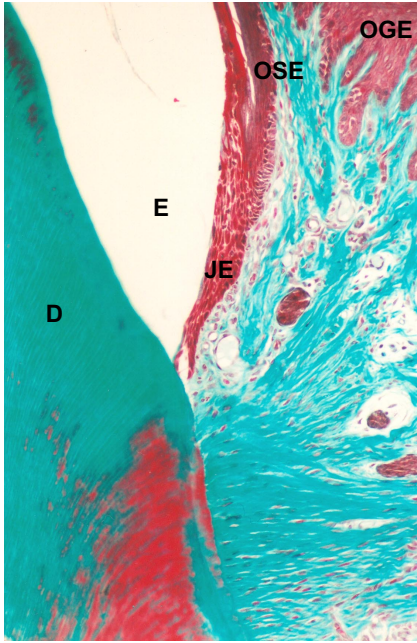


Figura 5.15

Vertente palatina dos tecidos periodontais superficiais (grupo I). O tecido conjuntivo gengival apresenta inúmeros feixes de fibras de colagénio (coradas de verde), que se estendem até aos prolongamentos conjuntivos do epitélio oral da gengiva (OGE). Na área apical ao epitélio juncional (JE) são visíveis as fibras dentogengivais que se inserem na superfície radicular. (E – área correspondente ao esmalte, ausente por descalcificação; OSE – epitélio sulcular; JE – epitélio juncional; D – dentina; (TM, 200x no original).

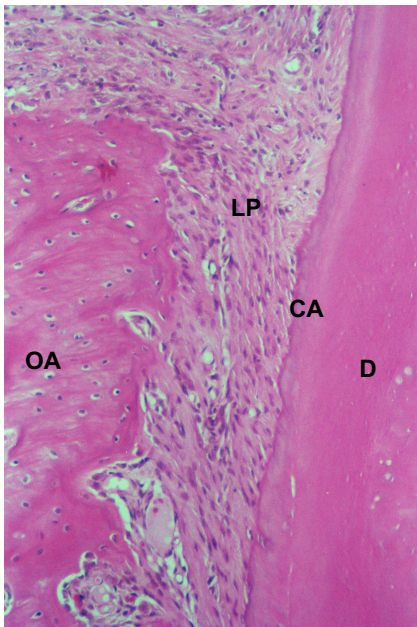


Figura 5.16

Zona coronal do ligamento periodontal (LP) (grupo I). Feixes de fibras de colagénio inserem-se no cimento acelular (CA) e no osso alveolar (OA). A superfície periodontal do osso alveolar apresenta-se irregular por remodelação óssea. O osso alveolar apresenta osteócitos dispersos na matriz mineralizada. (D – dentina) (HE, 200x no original).

diferenciar os estratos, não é queratinizado, a sua espessura é diminuta e não apresenta qualquer prolongamento conjuntivo (Figs. 5.12, 5.13 e 5.14). Em alguns cortes histológicos, identificamos, entre as células epiteliais, a presença de pêlos (frequentemente em corte transversal) e de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) (Fig. 5.12).

Na maioria dos cortes não foi possível identificar o sulco gengival, devido à justaposição entre a parte mais coronal do epitélio juncional e o OSE e à ausência, por descalcificação, do esmalte. Por vezes, é visível um espaço não preenchido que poderia ser interpretado como o sulco gengival, mas a análise mais atenta, revelou tratar-se de um artefacto entre as várias camadas córneas do OSE (Figs. 5.10, 5.11 e 5.12).

O tecido conjuntivo subepitelial apresenta-se rico em fibroblastos e fibras de colagénio, sendo raras as células inflamatórias. As fibras de colagénio formam feixes que se estendem ordenadamente até aos prolongamentos conjuntivos no OGE (Fig. 5.9). Outros feixes bem organizados, inserem-se no cimento radicular e na crista óssea alveolar (feixes dentoalveolares supra-ósseos). Alguns vasos (vénulas e arteríolas) de diâmetro variável são perceptíveis entre os feixes de fibras de colagénio (Figs. 5.4, 5.13 e 5.15).

O ligamento periodontal apresenta-se como um tecido conjuntivo denso, rico em fibroblastos e vasos sanguíneos. As fibras de colagénio estão organizadas em feixes com uma orientação maioritariamente oblíqua, com inserção no cimento radicular e no osso alveolar. Entre os feixes de fibras de colagénio observam-se maioritariamente fibroblastos, células com núcleos alongados, sendo também visíveis outros tipos celulares, de núcleo arredondado, que poderão corresponder a mastócitos, macrófagos ou outras células inflamatórias (Figs. 5.16, 5.17, 5.18 e 5.19).

O osso alveolar contém inúmeros osteócitos isolados, dispersos pela matriz mineralizada. Na sua vertente periodontal, o osso fasciculado (*bundle bone*) é caracterizado pela inserção das fibras de colagénio do ligamento periodontal

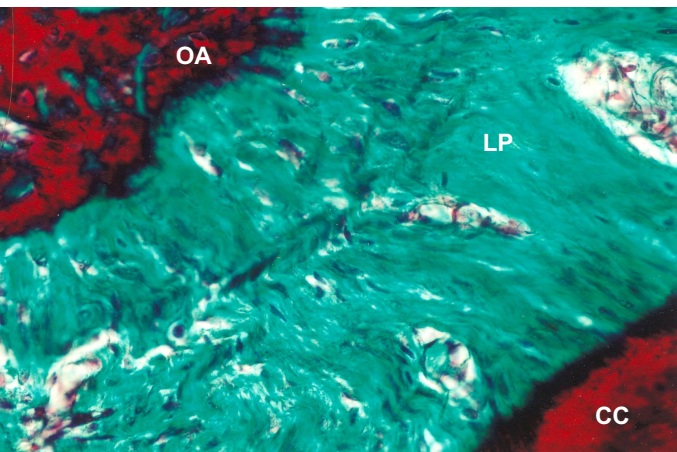


Figura 5.17

Zona do terço médio do ligamento periodontal (LP) (grupo I). Os feixes de fibras de colagénio inserem-se no cimento celular (CC) e no osso alveolar (OA). (TM, 400x no original).

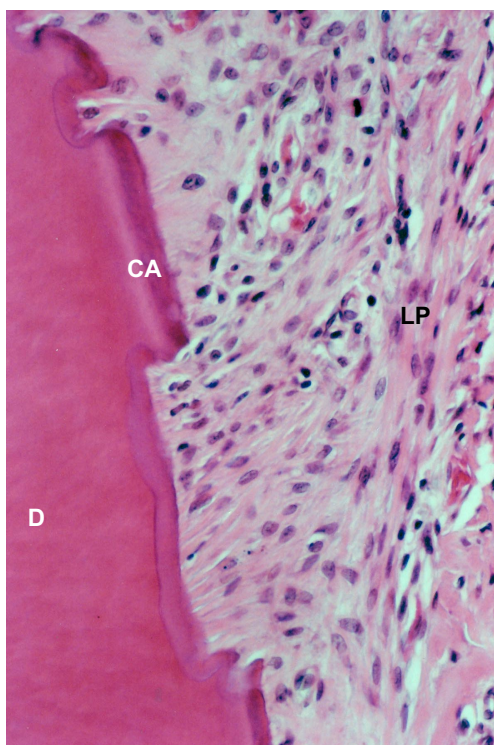


Figura 5.18

Zona do terço médio do ligamento periodontal (LP) (grupo I). As fibras de colagénio inserem-se no cimento acelular (CA) que reveste a superfície radicular. São ainda visíveis pequenas irregularidades da superfície radicular que representam antigas áreas de reabsorção radicular, agora revestidas com novo cimento acelular. (D – dentina) (HE, 400x no original).

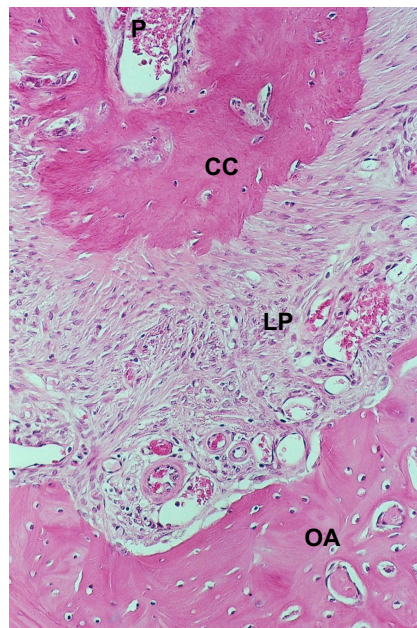


Figura 5.19

Zona apical do segundo molar maxilar (grupo I). Os feixes do ligamento periodontal (LP) inserem-se no cemento celular (CC), irradiando em direcção ao osso alveolar (OA). É notória uma área muito vascularizada na proximidade da superfície óssea. (P - polpa) (HE, 200x, no original).

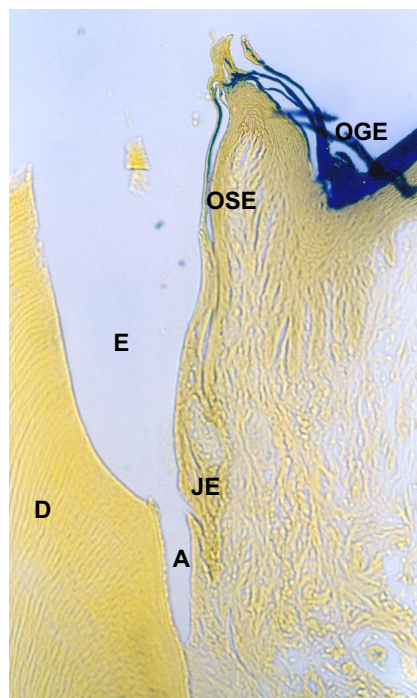


Figura 5.20

Margem gengival sem manipulação (grupo I). Não são detectáveis bactérias na superfície epitelial gengival, nem na coroa. (OGE – epitélio oral da gengiva; OSE – epitélio sulcular; JE – epitélio juncional; D – dentina; A – artefacto da adesão epitelial ao cemento radicular; E – área correspondente ao esmalte) (BB, 200x no original).

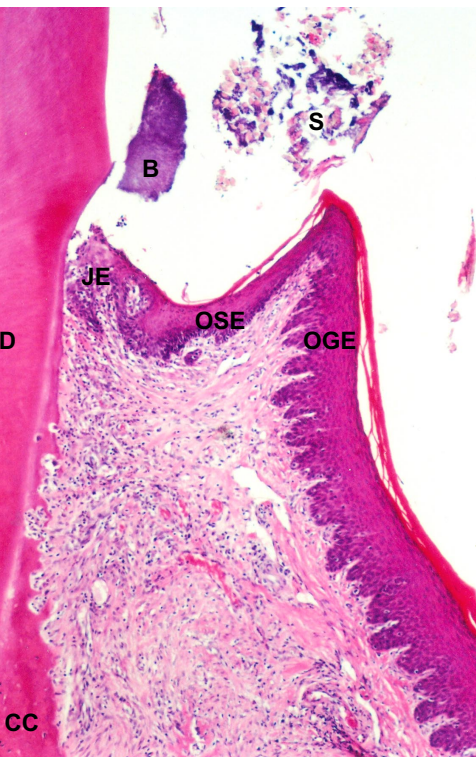


Figura 5.21

Vertente palatina dos tecidos gengivais, oito dias após a colocação do fio de sutura (subgrupo IIa). É notória a deformação do contorno gengival e a existência de um infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo gengival. (B – placa bacteriana; S – fio de sutura; D – dentina; CC – cemento celular; JE – epitélio juncional; OSE – epitélio sulcular; OGE – epitélio da gengiva) (HE, 100x no original).



Figura 5.22

Revestimento epitelial da bolsa periodontal pouco profunda (subgrupo IIa). A distinção entre o epitélio sulcular (OSE) e o epitélio juncional (JE) é bastante perceptível. O estrato basal do epitélio juncional apresenta um contorno irregular devido à sua actividade proliferativa. A adesão epitelial à superfície radicular localiza-se apicalmente à JAC. (HE, 200x no original).



(fibras de Sharpey), apresentando uma superfície irregular revestida por osteoblastos, sendo rara a presença de osteoclastos em lacunas de Howship (Fig. 5.16).

Na metade coronal da superfície radicular, a dentina é revestida por uma fina camada de cimento acelular, não apresentando células na sua espessura e nele estão também inseridas as fibras do ligamento periodontal (fibras de Sharpey) (Figs. 5.13 e 5.16). Observa-se com alguma frequência, geralmente na metade coronal da raiz, pequenas irregularidades na continuidade do cimento, interpretadas como pequenas áreas que sofreram reabsorção e posterior deposição de cimento acelular (Fig. 5.18). Na zona mais apical da raiz, a espessura total do cimento radicular aumenta devido à presença de cimento celular (Fig. 5.19). Este tipo de cimento recobre o cimento acelular a partir do terço médio radicular e aumenta gradualmente a sua espessura em direção apical. Em alguns casos, ao nível do ápex radicular a sua espessura é exuberante. Este tipo de cimento contém inúmeros cementócitos e a sua textura é globular (Fig. 5.19).

Nos cortes corados pela técnica de Brown e Brenn não se detectam bactérias sobre revestimento epitelial, nem sobre a coroa dentária (Fig. 5.20).

a.3.2.2. Passagem da agulha nos espaços interdentários - Grupo II

8 dias (subgrupo IIa):

Nos cortes referentes à passagem da agulha nos espaços interdentários, constata-se que a margem gengival palatina está deformada, devido à presença do fio de sutura no sulco gengival o qual, devido às diferentes características histológicas, poder-se-á passar a designar de bolsa periodontal pouco profunda (Fig. 5.21). Esta nova morfologia permite uma melhor distinção entre o epitélio sulcular e o epitélio juncional. O revestimento epitelial da bolsa é constituído em grande parte pelo epitélio sulcular, queratinizado (Fig. 5.22). Excluindo a sua



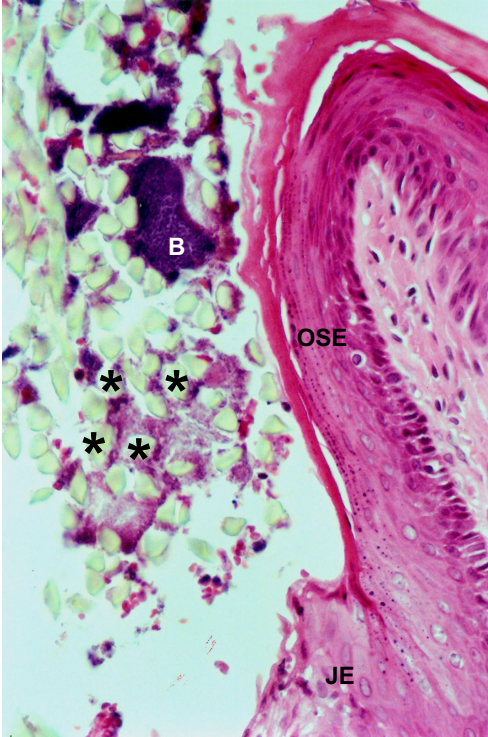


Figura 5.23

Fio de sutura em relação com epitélio sulcular (OSE) (subgrupo IIa). O estrato basal do OSE não apresenta projecções epiteliais. (EJ – epitélio juncional; B – aglomerados bacterianos; * - filamentos do fio de sutura) (HE, 400x no original).

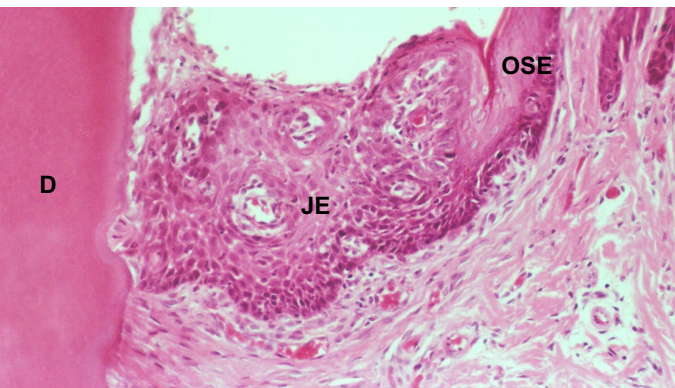


Figura 5.24

Epitélio juncional (JE) (subgrupo IIa). As alterações morfológicas deste epitélio traduzem a sua proliferação, tendo perdido a sua forma triangular. Alguns PMN interpõem-se entre as células epiteliais. (OSE – epitélio sulcular; D - dentina) (HE, 200x no original).

maior extensão, as outras características deste epitélio mantêm-se. Apesar da proximidade com o fio de sutura e com os aglomerados bacterianos a ele associados, não são abundantes as células inflamatórias que migram por entre as células epiteliais. Também são raras as projecções epiteliais em direcção ao tecido conjuntivo subjacente (Fig. 5.23). O epitélio juncional, não queratinizado, apresenta alterações: perdeu a sua forma triangular e passou a ter contornos irregulares especialmente no estrato basal, o qual apresenta sinais de proliferação. Entre as células epiteliais, são visíveis algumas células inflamatórias, predominando os PMN (Figs. 5.24 e 5.25). A adesão do epitélio juncional à superfície radicular localiza-se apicalmente à JAC, verificando-se que, durante os oito dias de permanência do fio no sulco, ocorreu uma migração apical do epitélio sobre o cimento radicular (Figs. 5.21 e 5.22).

O infiltrado inflamatório, com predomínio de PMN, concentra-se na porção do tecido conjuntivo próximo do epitélio juncional. Nesta zona de maior infiltrado, é frequente a presença de um maior número de pequenos vasos. Há fibras de colagénio inseridas no cimento radicular, apicalmente à adesão epitelial, sendo frequentes algumas células inflamatórias entre essas fibras (Figs. 5.24 e 5.25). Os feixes de fibras de colagénio do córion gengival mais afastado da superfície radicular não apresentam alterações. A superfície radicular supra-alveolar apresenta pequenas áreas de reabsorção do cimento, por vezes estendendo-se à dentina (Figs. 5.21 e 5.25).

O ligamento periodontal, na sua porção mais coronal, apresenta algumas células inflamatórias entre os feixes de fibras de colagénio. A superfície do osso alveolar apresenta-se bastante irregular na crista e na porção mais coronal da vertente periodontal (Fig. 5.26). Observam-se, ainda, áreas de remodelação óssea directamente relacionadas com áreas de grande densidade celular do ligamento periodontal (Fig. 5.27).

Na área mais apical da estrutura radicular não se observam alterações da morfologia normal das estruturas periodontais (Fig. 5.28).

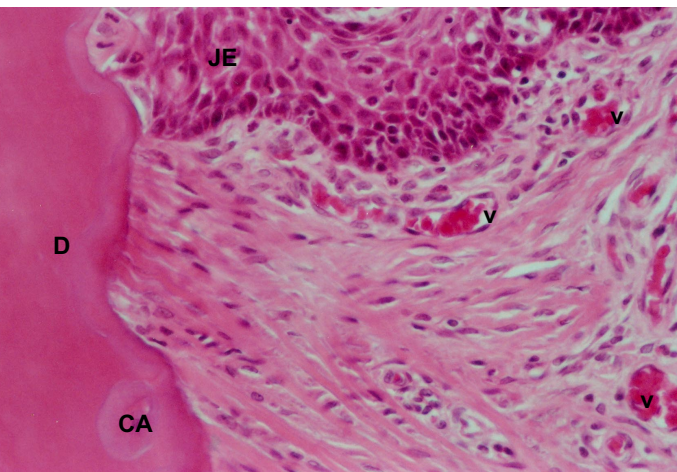


Figura 5.25

Maior ampliação do tecido conjuntivo subepitelial da figura 5.24 (subgrupo IIa). Os feixes de fibras de colagénio inserem-se no cimento acelular (CA), imediatamente apical à adesão das células do epitélio juncional (JE) à superfície radicular. Para além dos núcleos alongados dos fibroblastos, por entre as fibras de colagénio, são visíveis algumas células inflamatórias e vasos ectásicos (v). (D – dentina) (HE, 400x no original).

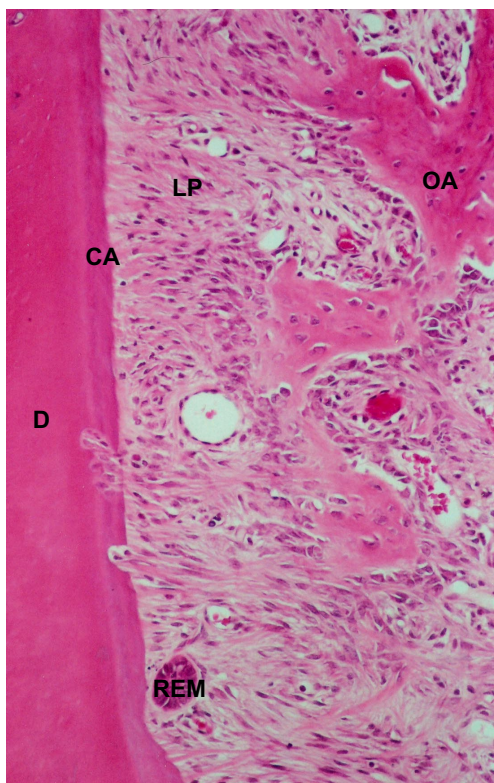


Figura 5.26

Porção coronal do ligamento periodontal (LP) (subgrupo IIa). Feixes de fibras de colagénio inserem-se no cimento acelular (CA). Na superfície radicular observam-se pequenas lacunas de reabsorção do cimento. Na proximidade da superfície radicular, é visível a presença de um aglomerado de células epiteliais – resto epitelial de Malassez (REM). A área do ligamento periodontal adjacente ao osso alveolar (OA) apresenta um grande componente celular. O osso alveolar apresenta sinais de remodelação óssea. (D – dentina) (HE, 200x no original).

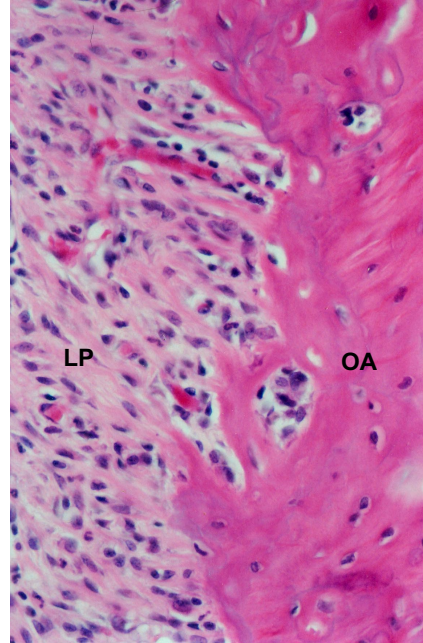


Figura 5.27

Vertente periodontal do osso alveolar (subgrupo IIa). A superfície óssea apresenta sinais de remodelação, com algumas linhas de reversão (LP – ligamento periodontal; OA – osso alveolar) (HE, 400x no original).

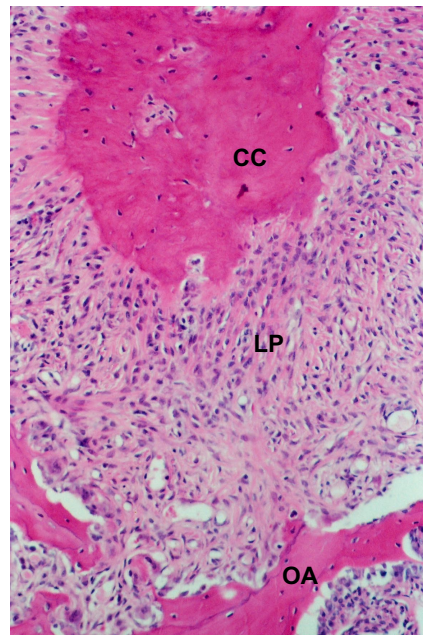


Figura 5.28

Área apical do 2º molar (subgrupo IIa). Os tecidos periodontais não apresentam alterações significativas. (CC – cimento celular; LP – ligamento periodontal; OA – osso alveolar) (HE, 200x no original).

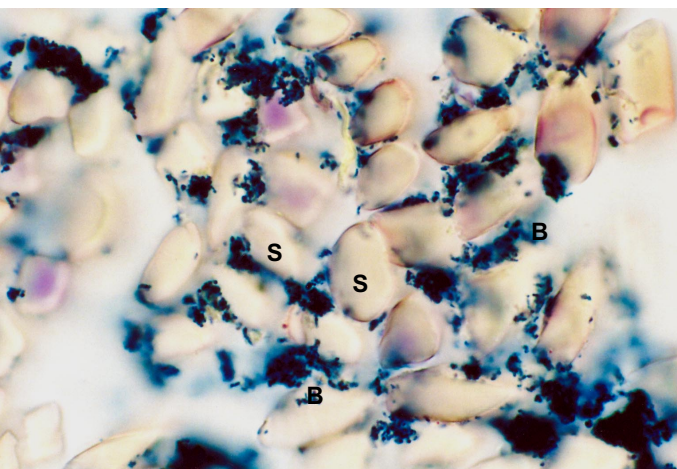


Figura 5.29

Fio de sutura 8 dias após a sua colocação no sulco gengival (subgrupo IIa). Entre os diversos filamentos que compõem o fio de sutura (S) é notória a presença de inúmeros aglomerados bacterianos (B). (BB, 1000x no original).

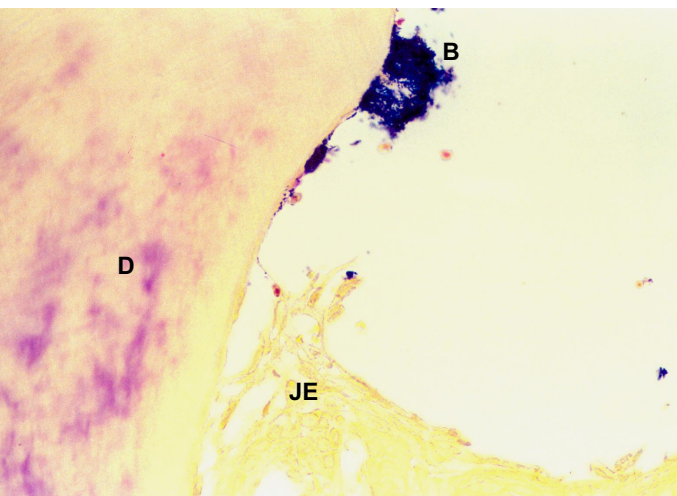


Figura 5.30

Aglomerados bacterianos na superfície radicular (subgrupo IIa). Não são visíveis bactérias no interior dos tecidos periodontais nem no interior dos túbulos dentinários. (B – aglomerados bacterianos; JE – epitélio juncional; D – dentina). (BB, 400x no original).



Alguns aglomerados bacterianos são agora visíveis, predominantemente em torno dos diversos filamentos que compõem o fio de sutura (Fig. 5.29) e sobre a superfície radicular exposta (Fig. 5.21). Não se detectam bactérias sobre o epitélio nem no interior dos túbulos dentinários (Fig. 5.30).

15 dias (subgrupo IIb):

A observação das lâminas provenientes do subgrupo IIb, demonstram um agravamento das lesões descritas aos oito dias (subgrupo IIa). No entanto, as dez amostras analisadas apresentam uma grande variabilidade na gravidade das lesões. De modo a sistematizar os resultados, as lesões observadas são classificadas como graves e muito graves.

Nos resultados classificados como lesões graves, constata-se a formação de uma bolsa periodontal (Fig. 5.31). Apesar da deformação existente na margem gengival, o revestimento epitelial apresenta-se íntegro, sem soluções de continuidade. Ao nível coronal, o revestimento epitelial da bolsa periodontal é constituído pelo epitélio sulcular queratinizado, seguindo-se-lhe mais apicalmente e justa radicular, o epitélio da bolsa (Fig. 5.32). Este último apresenta alterações morfológicas muito semelhantes às descritas ao oitavo dia (subgrupo IIa) para o epitélio juncional, mas a sua adesão radicular localiza-se mais apicalmente em relação à JAC, razão pela qual se designa por epitélio da bolsa. O facto da adesão epitelial se localizar coronalmente à crista alveolar, leva a que esta lesão seja classificada como uma bolsa periodontal supra-óssea. Um infiltrado inflamatório, constituído essencialmente por PMN e linfócitos, é bastante notório no seio do epitélio e no tecido conjuntivo subepitelial, ocupando uma área relativamente extensa (Figs. 5.32, 5.33 e 5.34). Em alguns cortes, constata-se a presença de pêlos, em corte transversal, incluídos no tecido conjuntivo subepitelial, por vezes associados a uma proliferação de células epiteliais (Fig. 5.34). Alguns sequestros ósseos estão presentes no tecido



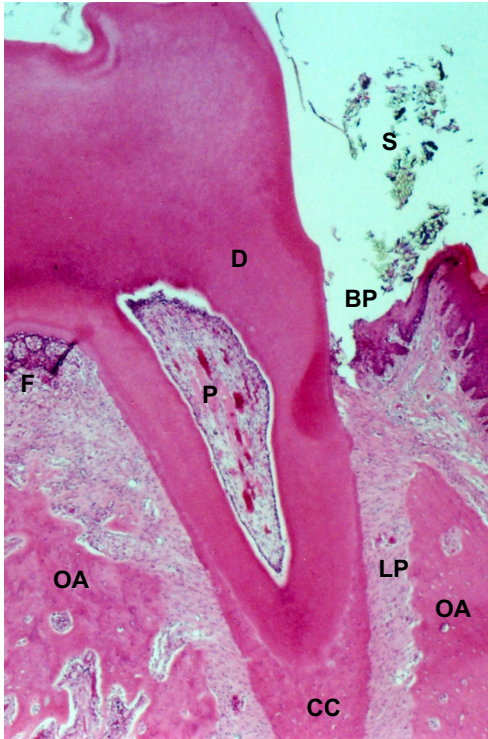


Figura 5.31

Segundo molar, 15 dias após colocação do fio de sutura (subgrupo IIb). Os tecidos periodontais apresentam alterações graves como uma bolsa periodontal (BP) e uma lesão inicial da furca (F). (S – fio de sutura; D – dentina; OA – osso alveolar; LP – ligamento periodontal; P – polpa; CC – cimento celular) (HE, 40x no original).

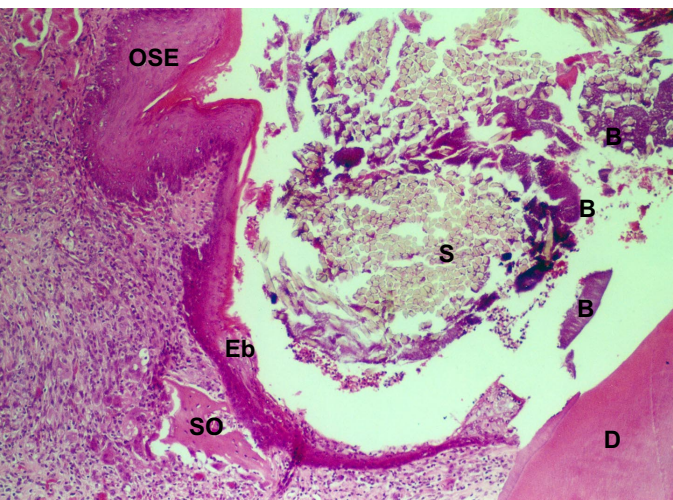


Figura 5.32

Área apical de uma bolsa periodontal (subgrupo IIb). No interior da bolsa, para além do fio de sutura (S), são visíveis aglomerados bacterianos (B) e tecidos necrosados. O revestimento epitelial da bolsa não apresenta soluções de continuidade. No tecido conjuntivo subepitelial, para além de um infiltrado inflamatório abundante, observa-se um sequestró ósseo (SO). (D – dentina; OSE – epitélio sulcular; Eb – epitélio da bolsa) (HE, 100x no original).

Figura 5.33

Área justa-radicular do epitélio da bolsa (subgrupo IIb). Neste corte, o epitélio da bolsa (Eb) não apresenta prolongamentos epiteliais para o tecido conjuntivo. Tanto no epitélio como no tecido conjuntivo subepitelial há um infiltrado inflamatório. (CA – cimento acelular, D – dentina) (HE, 400x no original).

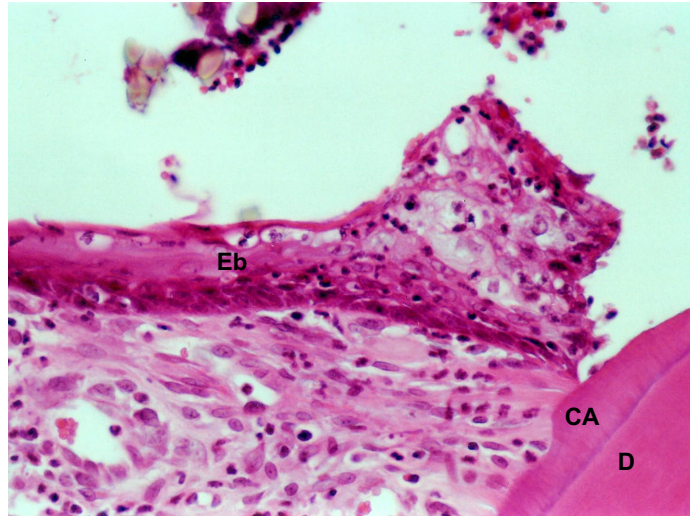
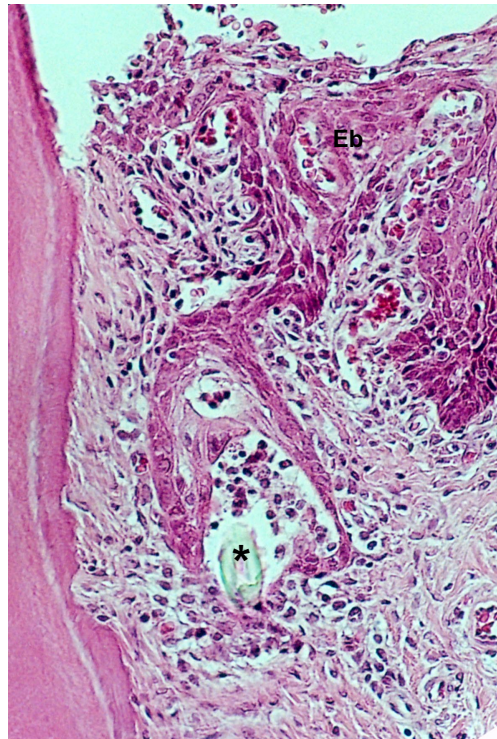


Figura 5.34

Área de adesão epitelial e de inserção conjuntiva de uma bolsa periodontal (subgrupo IIb). Pormenor do epitélio da bolsa (Eb) que apresenta prolongamentos epiteliais. A lâmina própria deste epitélio apresenta infiltrado inflamatório e ectasia vascular. No tecido conjuntivo subepitelial, há uma desorganização dos feixes colagênicos. * - pêlo em corte transversal) (HE, 200x no original).



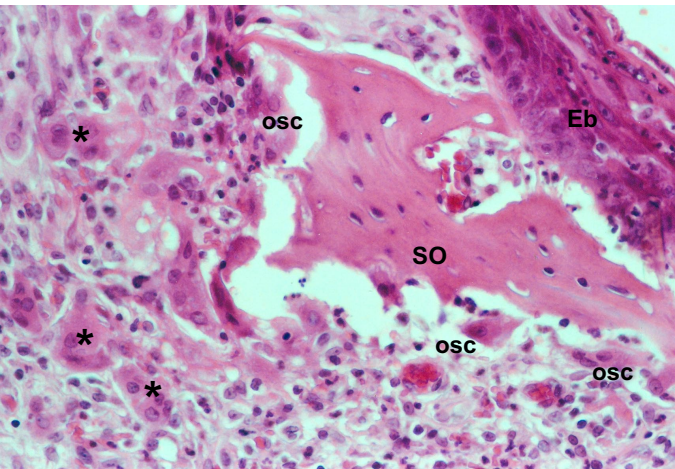
conjuntivo subepitelial (Fig. 5.32). Geralmente estes sequestros apresentam osteócitos em lacunas, alguns dos quais apresentam núcleos picnóticos. Na periferia do sequestro é frequente a presença de células multinucleadas, umas na superfície óssea (osteoclastos) enquanto que outras se observam no seio do tecido conjuntivo com acentuado infiltrado inflamatório (células gigantes de corpo estranho) (Fig. 5.35).

A superfície radicular apresenta pequenas áreas de reabsorção do cimento radicular e, em alguns casos, também da dentina, localizadas mais frequentemente no terço médio da raiz e na furca (Fig. 5.36).

Nos cortes do subgrupo IIb classificados como lesão grave, o ligamento periodontal localiza-se nos terços médio e apical da raiz, estando reduzida a sua extensão apico-coronal. Deste facto, resulta uma perda acentuada das

Figura 5.35

Maior ampliação da área com o sequestro ósseo representada na figura 5.32 (subgrupo IIb). O fragmento de tecido ósseo (SO) localiza-se próximo do epitélio da bolsa (Eb). Na superfície em relação com o tecido conjuntivo, o fragmento ósseo apresenta inúmeras células multinucleadas - osteoclastos (osc). O tecido conjuntivo apresenta uma grande densidade celular, sendo difícil a detecção de feixes de fibras colagénicas. Desse componente celular fazem parte, para além de fibroblastos, inúmeras células inflamatórias mononucleadas e células multinucleadas de características semelhantes a células gigantes de corpo estranho (*). (HE, 400x no original).





fibras de colagénio inseridas mais coronalmente (Fig. 5.31). Entre as fibras de colagénio coronais observam-se algumas células inflamatórias, predominando os PMN (Fig. 5.36).

A distância entre a crista alveolar e a JAC está aumentada, resultado da reabsorção óssea ocorrida ao nível da crista (Fig. 5.31). Tanto na crista como na vertente periodontal, a superfície do osso alveolar apresenta frequentes lacunas de reabsorção, sendo possível em alguns casos visualizar células multinucleadas no seu interior, muito provavelmente osteoclastos (Fig. 5.37). Nos casos em que o corte compreende uma zona de furca inter-radicular, observam-se células epiteliais que aderem à superfície radicular do tecto da furca (Fig. 5.38). A existência de células epiteliais nesta localização demonstra que o epitélio migrou apicalmente por destruição das fibras inter-radiculares do ligamento periodontal e reabsorção do septo ósseo inter-radicular.

Observam-se também aglomerados bacterianos nas superfícies radiculares expostas e na superfície do revestimento epitelial, mas não se detectam bactérias nos interstícios dos tecidos periodontais (Figs. 5.39 e 5.40).

Algumas lâminas do subgrupo IIb apresentam lesões classificadas como muito graves. Estas bolsas periodontais muito profundas caracterizam-se por extensa perda de inserção periodontal, englobando o terço apical da superfície radicular e a furca, cuja permeabilidade se apresenta evidente (Fig. 5.41).

O revestimento epitelial da bolsa periodontal é, em alguns locais, descontínuo devido à presença de frequentes sequestros ósseos e de um tecido inflamatório exuberante, tornando difícil a sua identificação. Na sua porção mais coronal, o revestimento epitelial da bolsa periodontal é constituído pelo epitélio sulcular queratinizado, o qual, para além de alguns prolongamentos epiteliais, não apresenta alterações significativas (Fig. 5.42). A maior parte do revestimento epitelial da bolsa é constituído pelo epitélio da bolsa, cuja extensão aumentou drasticamente. Nos casos em que é possível identificar a adesão epitelial,





Figura 5.36

Interface ligamento periodontal – superfície radicular (subgrupo IIb). Localizada no terço coronal da superfície radicular observa-se uma pequena área de reabsorção do cimento acelular (CA) e de dentina (D). (LP - ligamento periodontal) (HE, 400x no original).

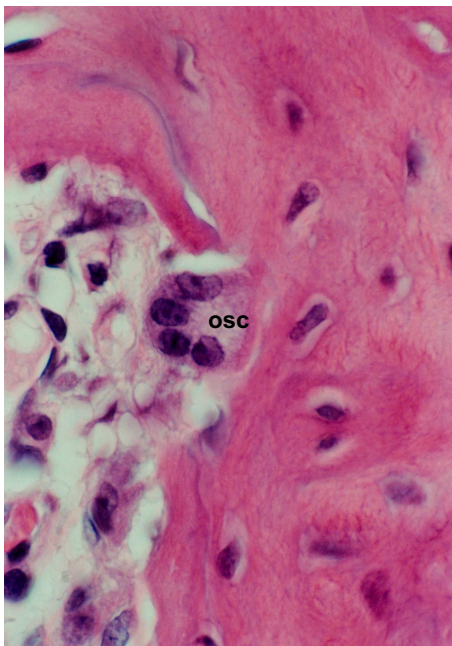


Figura 5.37

Vertente periodontal da superfície óssea alveolar (subgrupo IIb). Sobre a superfície óssea, destaca-se uma célula multinucleada, polarizada - osteoclasto (osc). (HE, 1000x no original).

Figura 5.38

Área da furca interradicular (subgrupo IIb). Podem observar-se células epiteliais aderentes ao cimento acelular (CA) da furca. Entre os feixes de fibras de colagénio interradiculares há infiltrado inflamatório. (P – polpa; D – dentina) (HE, 200x no original).

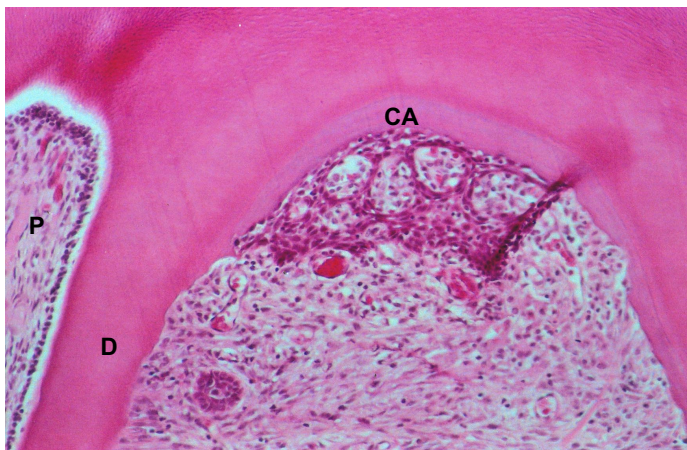
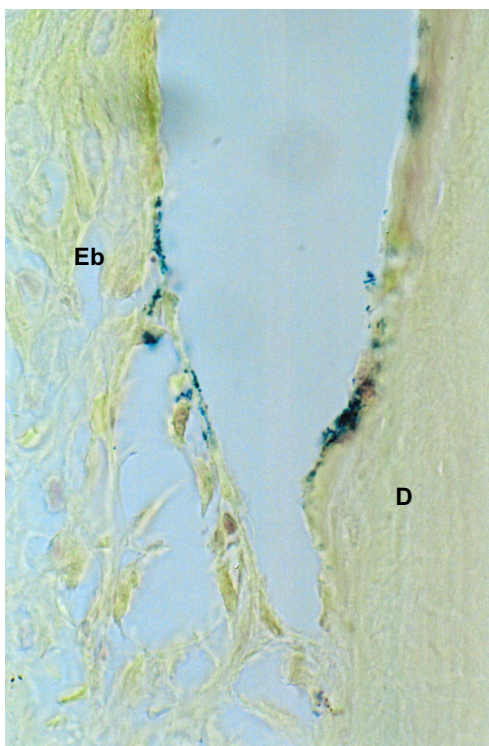


Figura 5.39

Área apical de uma bolsa periodontal (subgrupo IIb). Destacam-se pequenos aglomerados bacterianos nas superfícies radicular e epitelial. Não se detectam bactérias entre as células epiteliais e no interior dos túbulos dentinários. (D – dentina; Eb – epitélio da bolsa) (BB, 400x no original).



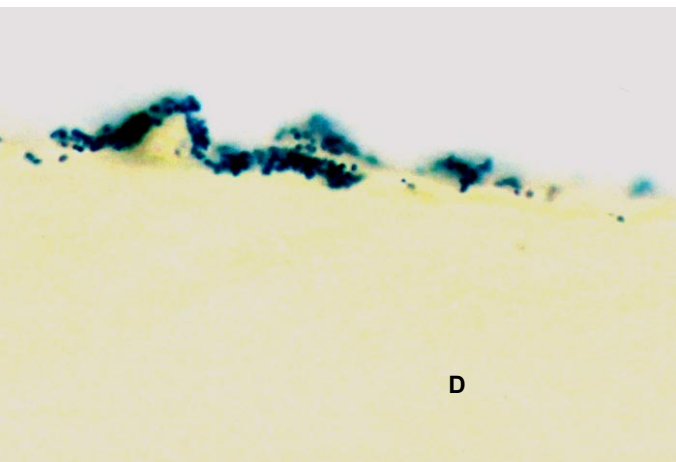


Figura 5.40

Superfície radicular de uma bolsa periodontal (subgrupo IIb). Apesar da presença de aglomerados bacterianos na superfície do cimento, não são detectáveis bactérias no interior dos túbulos dentinários. (D – dentina) (BB, 1000x no original).

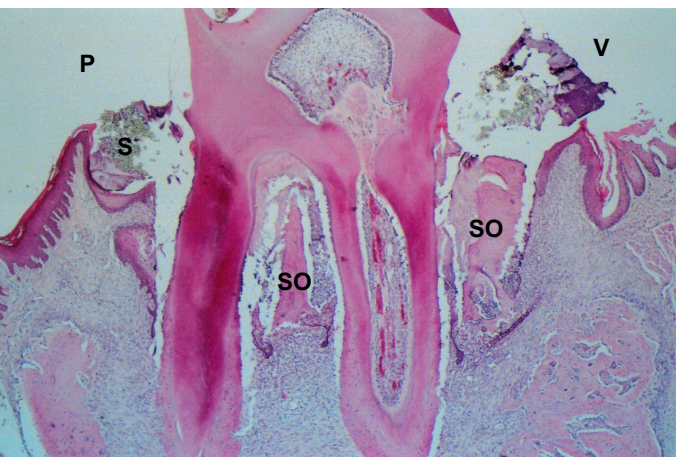


Figura 5.41

Segundo molar, 15 dias após a colocação do fio de sutura (subgrupo IIb). Os tecidos periodontais apresentam lesões muito graves: destruição quase total do suporte ósseo, inserção conjuntiva limitada ao ápex radicular e proliferação epitelial que se estende para além da metade coronal da superfície radicular. São visíveis dois grandes sequestros ósseos (SO), na zona inter-radicular e na vertente vestibular. (V – vestibulo; P – palato; S – fio de sutura) (HE, 10x no original).

Figura 5.42

Área coronal de uma bolsa periodontal profunda (subgrupo IIb). É notória a proliferação apical do epitélio da bolsa (Eb), ao longo da superfície radicular. Nesta área da bolsa, na localização do ligamento periodontal, observa-se um infiltrado inflamatório e necrose do ligamento. No tecido conjuntivo subepitelial observa-se igualmente intenso infiltrado inflamatório, mais acentuado na zona apical, em relação com o tecido ósseo. (B – placa bacteriana; S – fio de sutura; JAC – junção amelo-cementária; D – dentina; OSE – epitélio sulcular; OGE – epitélio oral da gengiva; OA – osso alveolar) (HE, 100x no original).

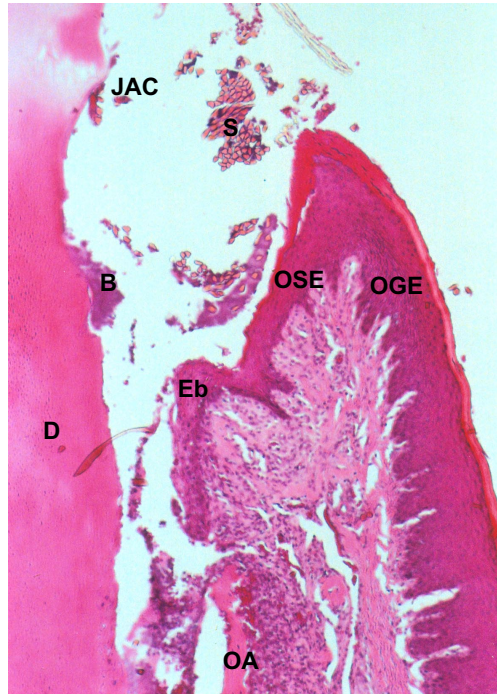
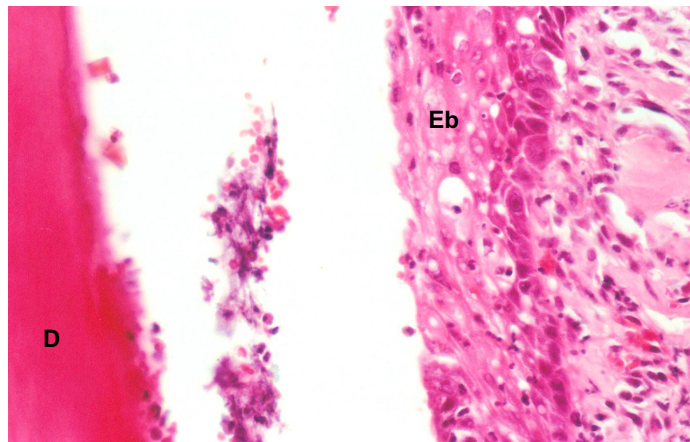


Figura 5.43

Pormenor do epitélio da bolsa (Eb) (subgrupo IIb). Este epitélio apresenta-se infiltrado por células inflamatórias. No tecido conjuntivo subepitelial, o infiltrado inflamatório é moderado. (D - dentina) (HE, 400x no original).



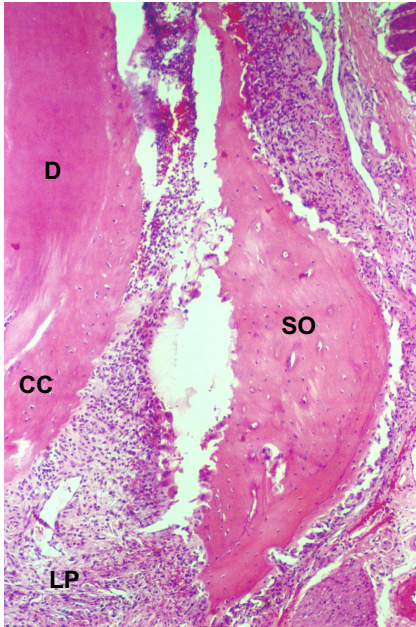


Figura 5.44

Área apical da bolsa periodontal representada na figura 5.42 (subgrupo IIb). É notável a ausência de ligamento periodontal (LP) em quase toda a extensão radicular. O remanescente do ligamento periodontal, localizado apicalmente, apresenta um infiltrado inflamatório muito exuberante. Um sequestro ósseo (SO) de grandes dimensões está rodeado por um intenso infiltrado inflamatório, cuja superfície irregular evidencia reabsorção. (D – dentina; CC – cimento celular) (HE, 100x no original).

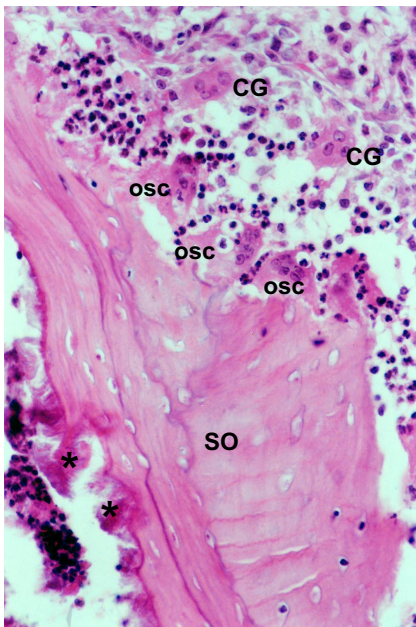


Figura 5.45

Sequestro ósseo (SO) no interior de uma bolsa periodontal profunda (subgrupo IIb). A maioria dos osteoplastos não se encontram preenchidos por osteócitos. A superfície óssea em relação com o tecido conjuntivo gengival apresenta sinais de reabsorção, destacando-se a presença de osteoclastos (osc). No tecido conjuntivo gengival observa-se um infiltrado inflamatório com algumas células multinucleadas de características semelhantes a células gigantes de corpo estranho (CG). Do lado oposto, a superfície do sequestro apresenta uma estrutura filamentososa de natureza bacteriana (*). (HE, 400x no original).

esta localiza-se numa posição apical em relação à crista alveolar, pelo que este tipo de lesão se pode designar como uma bolsa periodontal infra-óssea. No tecido conjuntivo subepitelial destaca-se um infiltrado inflamatório com predomínio de PMN e alguns linfócitos (Fig. 5.43).

Sequestros de tecido ósseo necrosado são frequentemente observados, rodeados por células inflamatórias, principalmente PMN e alguns linfócitos. Estes sequestros localizam-se tanto no tecido conjuntivo gengival (Figs. 5.44 e 5.45) como no interior da bolsa periodontal (Fig. 5.46).

O ligamento periodontal apresenta uma destruição muito extensa, praticamente total, estando o espaço correspondente ocupado por um intenso infiltrado inflamatório, com predomínio de células mononucleadas e por fragmentos de tecido ósseo (Figs 5.44, 5.47 e 5.48). Alguns destes fragmentos apresentam células multinucleadas na sua superfície (osteoclastos). Na sua proximidade, observam-se igualmente células multinucleadas entre o infiltrado inflamatório, as quais se assemelham a células gigantes de corpo estranho (Fig. 5.45). Nos casos em que a superfície do fragmento ósseo não está em relação com qualquer outro tecido, observa-se uma massa amorfa e filamentosa, que cora pela hematoxilina, e que se supõe ser de natureza bacteriana (Figs. 5.45, 5.47 e 5.49)

Nos cortes que incluem a zona da furca, são evidentes lesões de destruição extensa dos tecidos periodontais inter-radiculares, de forma que a permeabilidade das furcas é uma constante (Fig. 5.50). Os sequestros ósseos são igualmente frequentes nesta zona inter-radicular (Figs. 5.41 e 5.47). A destruição do osso alveolar é praticamente total, só permanecendo a sua porção mais apical (Figs. 5.41, 5.44 e 5.47).

Nestes casos de lesões periodontais muito graves, detectam-se bactérias em locais muito profundos, não tendo sido possível verificar, por limitações técnicas, se há invasão bacteriana dos tecidos periodontais não calcificados. Para além de grandes aglomerados bacterianos sobre a superfície radicular mais coronal

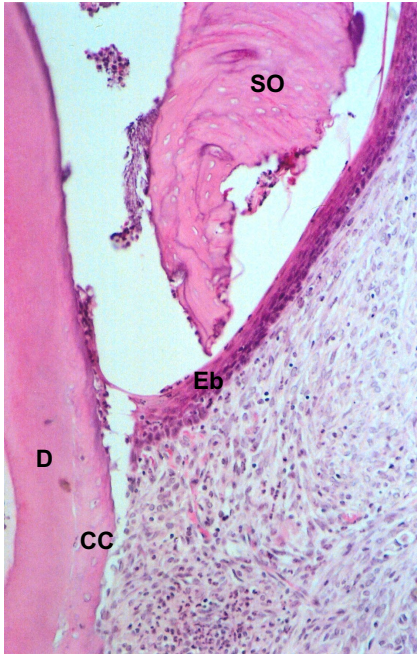


Figura 5.46

Fragmento ósseo (SO) necrosado no interior de uma bolsa periodontal profunda (subgrupo IIb) (D – dentina; CC – cimento celular, Eb – epitélio da bolsa) (HE, 200x no original).

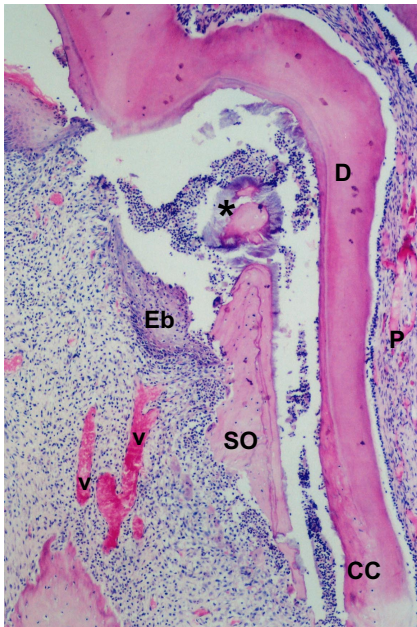


Figura 5.47

Área inter-radicular de um 2º molar (subgrupo IIb) apresentando uma lesão periodontal muito grave: destruição do tecido ósseo, ausência de inserção conjuntiva, sequestro ósseo (SO) de grandes dimensões, infiltrado inflamatório acentuado do tecido conjuntivo e estase vascular (v). (Eb – epitélio da bolsa; D – dentina; CC – cimento celular; P – polpa; * - estrutura filamentososa de origem bacteriana) (HE, 100x no original).

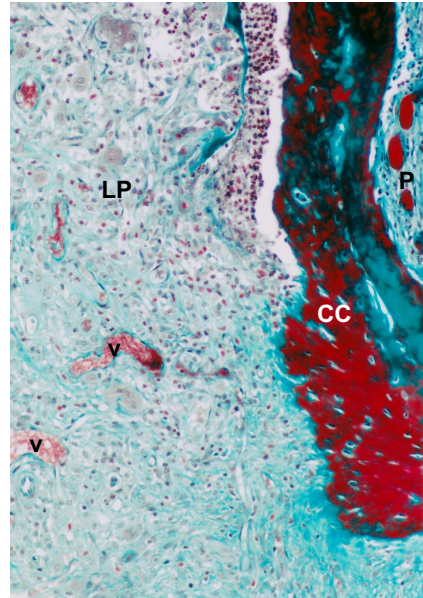


Figura 5.48

Área apical de um 2º molar (subgrupo IIb). É notória a redução do número de feixes de colagénio do ligamento periodontal (LP) e o aumento da densidade celular. Alguns vasos apresentam estase (v). (CC – cimento celular; P – polpa) (TM, 200x no original).

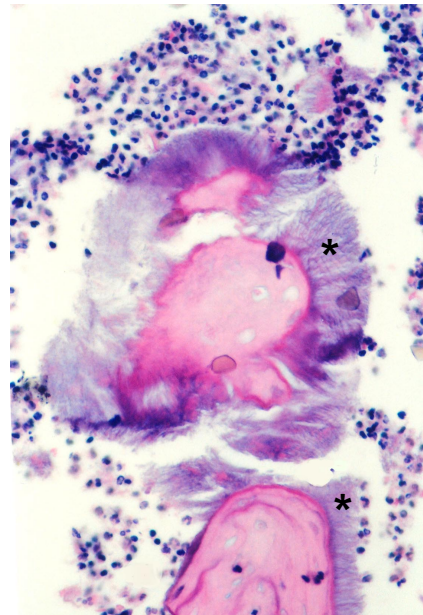


Figura 5.49

Pormenor da figura 5.47 (subgrupo IIb). Os fragmentos de tecido ósseo necrosado apresentam à superfície uma estrutura filamentososa de natureza bacteriana (*). (HE, 400x no original).

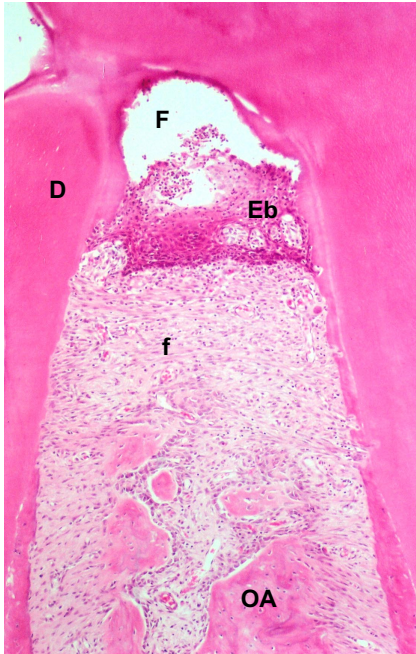


Figura 5.50

Área inter-radicular de um 2º molar (subgrupo IIb). Destaca-se a perda de inserção conjuntiva no tecto da furca, traduzindo a permeabilidade da furca (F). O epitélio da bolsa (Eb) apresenta sinais de proliferação apical. Fibras interradiculares (f) íntegras demarcam o infiltrado inflamatório do tecido conjuntivo subepitelial. O septo ósseo interradicular (OA) apresenta remodelação. (D – dentina) (HE, 100x no original).

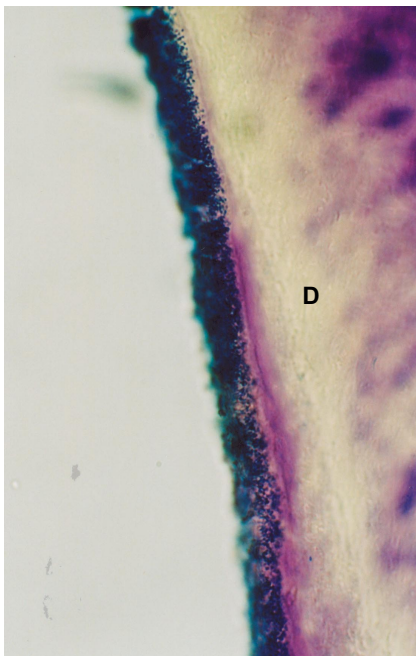


Figura 5.51

Inúmeros aglomerados bacterianos sobre a superfície radicular da porção coronal de uma bolsa periodontal profunda (subgrupo IIb). (D – dentina) (BB, 1000x no original).



Figura 5.52

Interior de uma bolsa periodontal profunda (subgrupo IIb). Destaca-se a ausência de ligamento periodontal entre a superfície radicular (corada de roxo) e a superfície óssea (corada de amarelo). Em ambas as superfícies observa-se uma estrutura filamentosa (*) sobre a qual se identificam algumas células e aglomerados bacterianos. (BB, 400x no original).

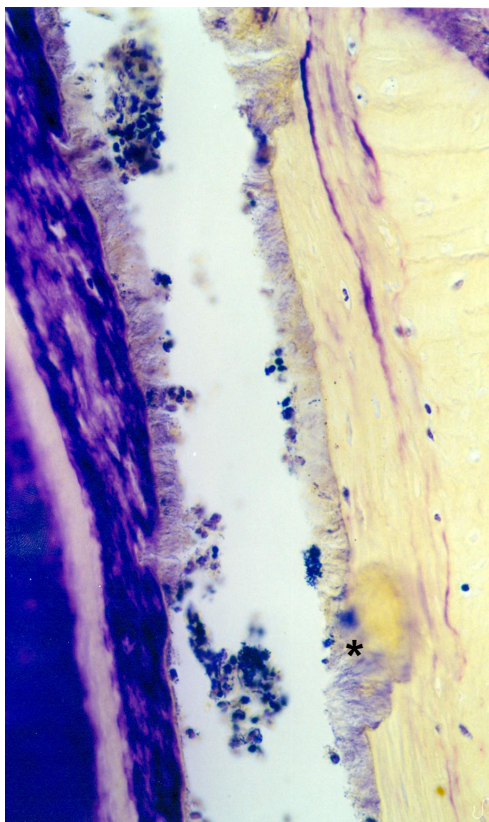
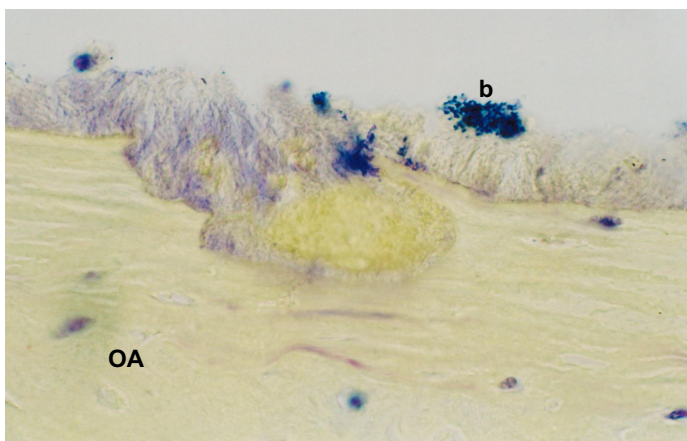


Figura 5.53

Maior ampliação da superfície óssea (OA) da figura anterior (subgrupo IIb). Para além da estrutura filamentosa de natureza bacteriana observam-se alguns aglomerados bacterianos (b). (BB, 1000x, no original).



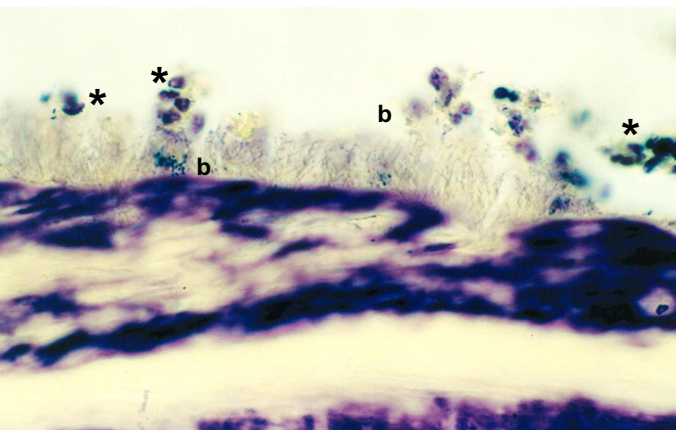


Figura 5.54

Maior ampliação da superfície radicular da figura 3.50 (subgrupo IIb). Entre a estrutura filamentososa existente na superfície são visíveis pequenos aglomerados bacterianos (b) e algumas células à superfície (*). (BB, 1000x, no original).

da bolsa periodontal (Figs. 5.42 e 5.51), observa-se uma estrutura filamentososa de natureza bacteriana, já referida anteriormente, localizada tanto sobre a superfície óssea como sobre o cimento radicular (Figs. 5.52, 5.53 e 5.54).

a.3.2.3. Agulha usada como cunha - Grupo III

8 dias (subgrupo IIIa):

Da observação dos cortes histológicos correspondentes a este subgrupo, verifica-se que há uma grande semelhança com as lesões descritas nos cortes do subgrupo IIa, embora numa apreciação global, aparentem ser menos extensas. Da análise histológica efectuada, verifica-se que o sulco gengival está deformado pela presença do fio de sutura, estando presente uma bolsa periodontal pouco profunda (Fig. 5.55). O revestimento epitelial desta bolsa, constituído pelos epitélio do sulco queratinizado e pelo epitélio juncional não queratinizado, apresenta-se contínuo e com algumas células inflamatórias entre as células epiteliais (Figs. 5.56 e 5.57). Dos dois epitélios, é o epitélio juncional que apresenta alterações mais marcadas. Essas alterações traduzem a proliferação e migração apical da adesão epitelial ao longo da superfície

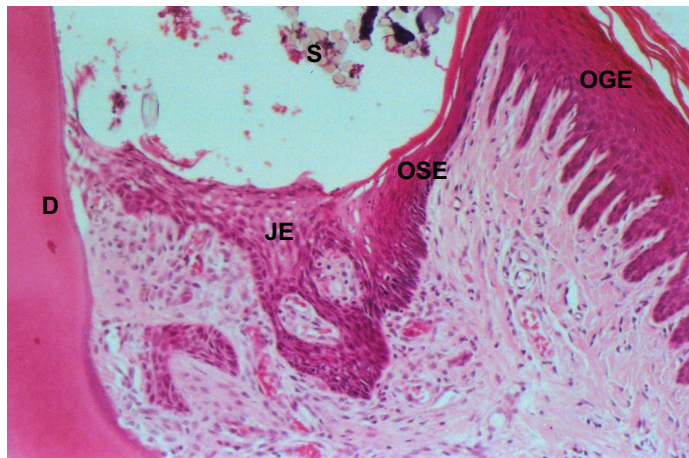
Figura 5.55

Lesão periodontal de um 2º molar 8 dias após a colocação do fio de sutura, usando a agulha como cunha (subgrupo IIIa). A margem gengival está deformada e o sulco gengival está alargado. O epitélio juncional apresenta sinais de proliferação apical, e a sua adesão à raiz migrou apicalmente em relação à JAC. O tecido conjuntivo subepitelial apresenta algum infiltrado inflamatório. (D – dentina; P – polpa; OSE – epitélio sulcular; JE – epitélio juncional; S – filamentos do fio de sutura; OA – osso alveolar) (HE, 100x no original).



Figura 5.56

Revestimento epitelial da bolsa gengival (subgrupo IIIa). A distinção entre o epitélio sulcular (OSE) e o epitélio juncional (JE) é bastante perceptível. O epitélio juncional apresenta sinais de proliferação. A adesão epitelial à superfície radicular localiza-se apicalmente à junção amelo-cementária. (D – dentina; OGE – epitélio oral da gengiva; S – filamentos do fio de sutura) (HE, 200x no original).



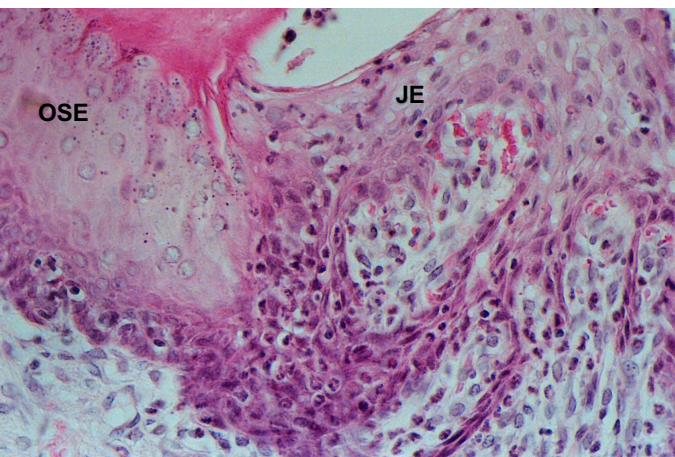


Figura 5.57

Pormenor da transição entre o epitélio sulcular (OSE) e o juncional (JE) (subgrupo IIIa). A alteração morfológica do epitélio juncional, caracterizada pelo aparecimento de prolongamentos epiteliais, são consequência da actividade proliferativa destas células. O epitélio juncional apresenta infiltrado inflamatório com predomínio de PMN. (HE, 400x no original).

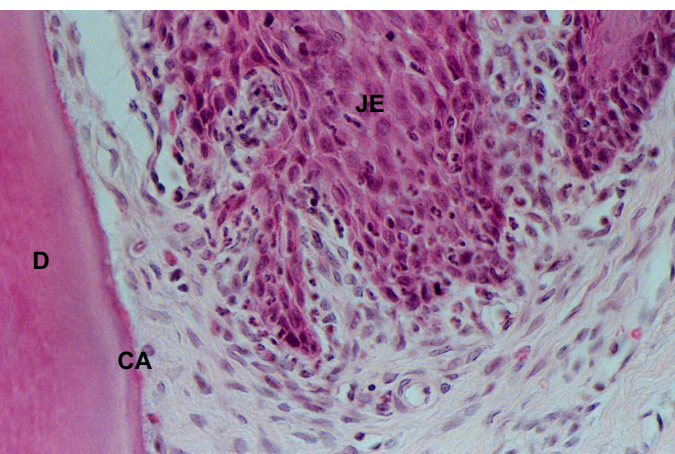


Figura 5.58

Adesão conjuntiva subepitelial (subgrupo IIIa). O epitélio juncional (JE) apresenta prolongamentos no tecido conjuntivo subjacente. Na lâmina própria deste epitélio observa-se um infiltrado inflamatório sendo os PMN predominantes. Feixes de fibras de colagénio do tecido conjuntivo subepitelial inserem-se no cimento acelular (CA). (D – dentina) (HE, 400x no original).

radicular. No tecido conjuntivo subepitelial são visíveis algumas células inflamatórias, predominando os PMN (Figs. 5.57 e 5.58). As fibras de colagénio da porção mais coronal do ligamento periodontal, apresentam-se algo desorganizadas pela presença de células inflamatórias (Fig. 5.59). Mais apicalmente, o ligamento periodontal apresenta feixes de fibras de colagénio bem organizados (Fig. 5.60). Nessa área, a vertente periodontal do osso alveolar apresenta algumas áreas de remodelação óssea, sendo raras as células multinucleadas (Fig. 5.60). Na proximidade do ápice radicular, os tecidos periodontais profundos, não apresentam alterações significativas (Fig. 5.61). Observam-se alguns aglomerados de bactérias entre os filamentos do fio de sutura e na superfície da coroa dentária, mas não foi possível detectar bactérias no interior dos tecidos periodontais (Fig. 5.62).

15 dias (subgrupo IIIb):

A análise histológica dos cortes deste subgrupo evidencia o agravamento das lesões observadas aos oito dias (subgrupo IIIb).

De um modo geral, é visível uma bolsa periodontal profunda, embora não atinja, em nenhum caso, o terço apical radicular (Figs. 5.63 e 5.64). Na sua porção mais coronal, o revestimento epitelial da bolsa periodontal é constituído pelo epitélio sulcular queratinizado (Fig. 5.64). Mais profundamente, a bolsa periodontal é revestida pelo epitélio da bolsa, não queratinizado, que adere à superfície radicular, numa localização bastante apical em relação à junção amelo-cementária. Este epitélio apresenta inúmeros prolongamentos epiteliais e infiltrado inflamatório, onde predominam os PMN (Fig. 5.65).

O tecido conjuntivo gengival apresenta um acentuado infiltrado inflamatório, com predomínio de PMN e alguns linfócitos (Figs. 5.66 e 5.67).

O ligamento periodontal remanescente, mantém a inserção conjuntiva da metade apical da superfície radicular, apresentando fibras de colagénio íntegras. A componente celular da área mais coronal do ligamento periodontal

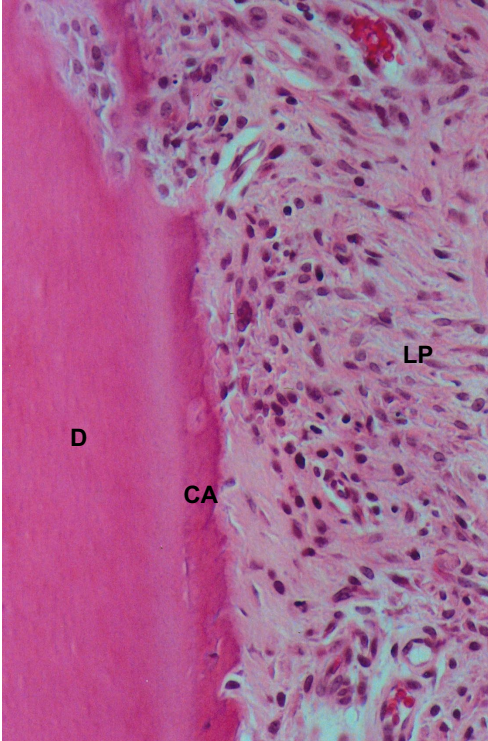


Figura 5.59

Porção coronal do ligamento periodontal (LP) (subgrupo IIIa). Feixes de fibras de colagênio inserem-se no cemento acelular (CA). Um infiltrado inflamatório está presente entre os feixes do ligamento periodontal. Mais coronalmente, observa-se uma área de reabsorção radicular. (D – dentina) (HE, 400x no original).

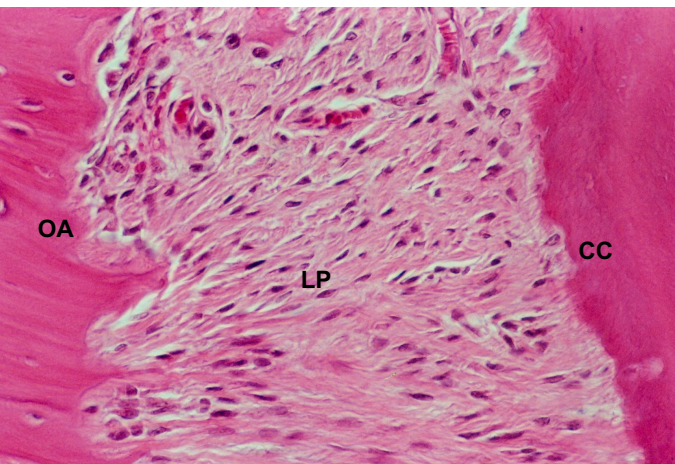


Figura 5.60

Porção mais apical do ligamento periodontal (LP) (subgrupo IIIa). Nesta área o ligamento periodontal não apresenta alterações significativas. Os feixes de fibras apresentam-se homogêneos e bem organizados, sendo rara a presença de células inflamatórias. O osso alveolar apresenta sinais de remodelação óssea. (CC – cemento celular, OA – osso alveolar) (HE, 400x no original).

Figura 5.61

Área apical do 2º molar (subgrupo IIIa). Os tecidos periodontais não apresentam alterações visíveis. (CC – cemento celular; LP – ligamento periodontal; OA – osso alveolar; P – polpa; fo – foramen apical) (HE, 200x no original).

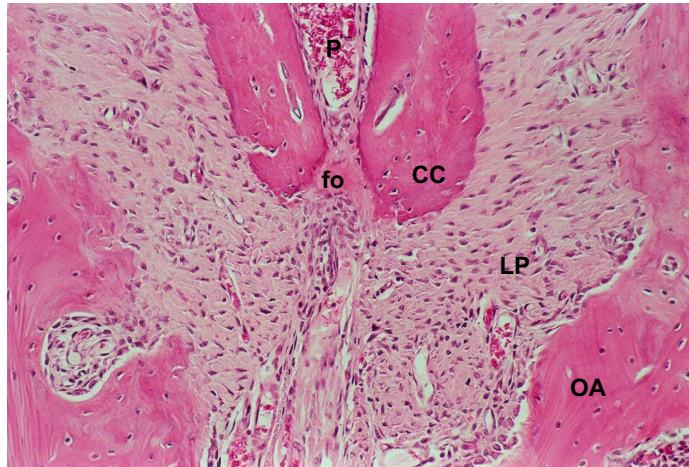
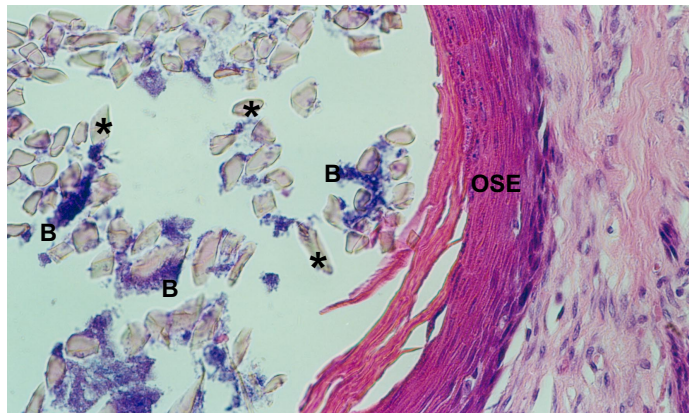


Figura 5.62

Fio de sutura na bolsa gengival, 8 dias após a sua colocação (subgrupo IIIa). É notória a presença de inúmeros aglomerados bacterianos (B) entre os diversos filamentos que compõem o fio de sutura (*). (OSE – epitélio sulcular) (HE, 400x no original).



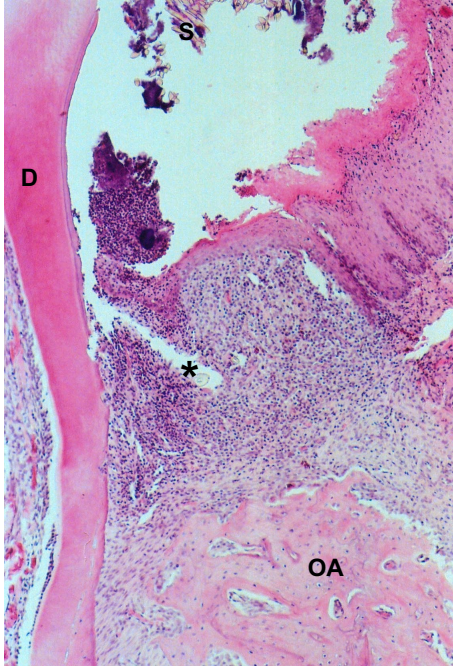


Figura 5.63

Lesão periodontal de um 2º molar, 15 dias após a colocação do fio de sutura, usando a agulha como cunha (subgrupo IIIb). Destaca-se uma bolsa periodontal profunda com migração apical da adesão epitelial. O tecido conjuntivo subepitelial apresenta um infiltrado inflamatório acentuado. (D – dentina; OA – osso alveolar; S – fio de sutura; * - pêlo em corte transversal) (HE, 100x no original).

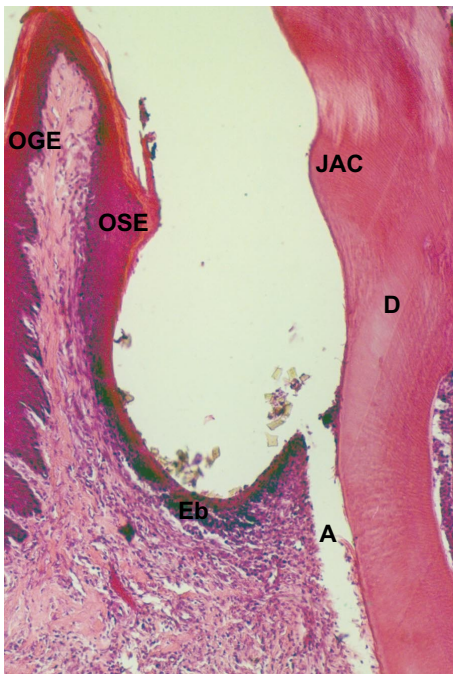


Figura 5.64

Bolsa periodontal profunda (subgrupo IIIb). Destaca-se a migração apical da adesão epitelial e perda de inserção conjuntiva. O tecido conjuntivo gengival apresenta um grande infiltrado inflamatório. (OGE – epitélio oral da gengiva; OSE – epitélio sulcular; Eb – epitélio da bolsa; D – dentina; A – artefacto; JAC – junção amelo-cementária) (HE, 100x no original).

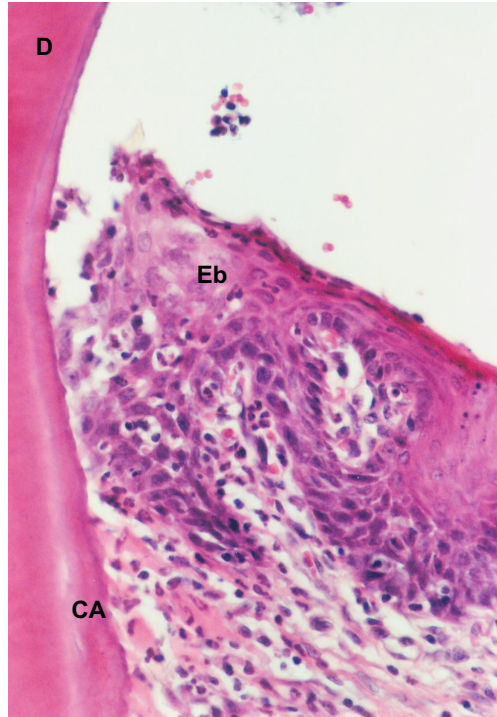


Figura 5.65

Área de adesão do epitélio da bolsa (Eb) à superfície radicular (subgrupo IIIb). O epitélio apresenta sinais de proliferação e algum infiltrado inflamatório. (D – dentina; CA – cemento acelular) (HE, 400x no original).

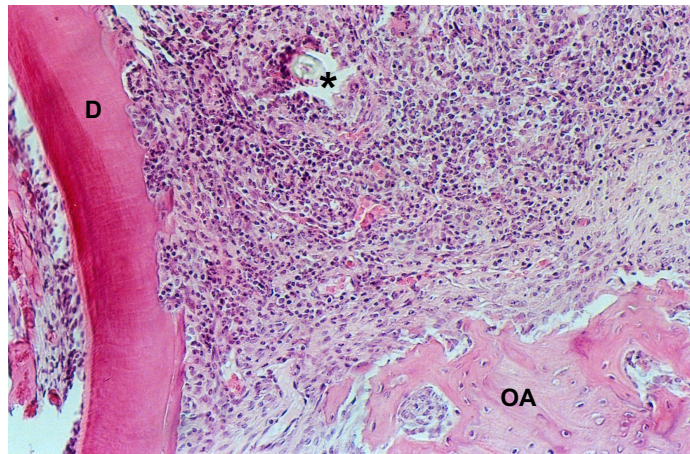


Figura 5.66

Tecido conjuntivo gengival (subgrupo IIIb). Observa-se um intenso infiltrado inflamatório, com dissociação dos feixes de fibras de colagénio. A superfície radicular apresenta áreas de reabsorção. (D – dentina; OA – osso alveolar; * - pêlo em corte transversal) (HE, 200x no original).

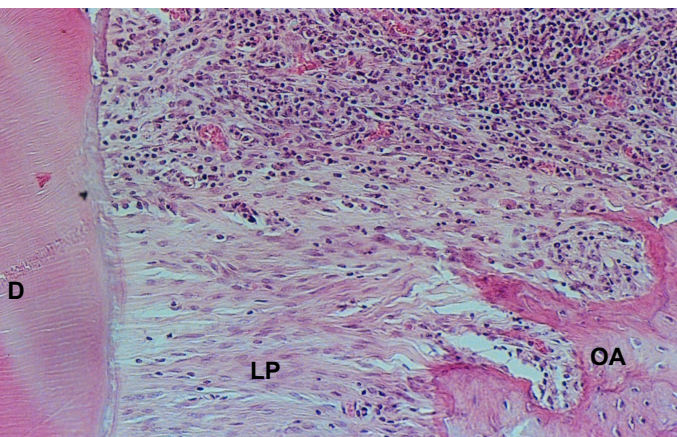


Figura 5.67

Tecido conjuntivo gengival e ligamento periodontal (LP) (subgrupo IIIb). O infiltrado inflamatório concentra-se no tecido conjuntivo supra-alveolar. A superfície do osso alveolar (OA) apresenta-se irregular por remodelação óssea (D – dentina;) (HE, 200x no original).

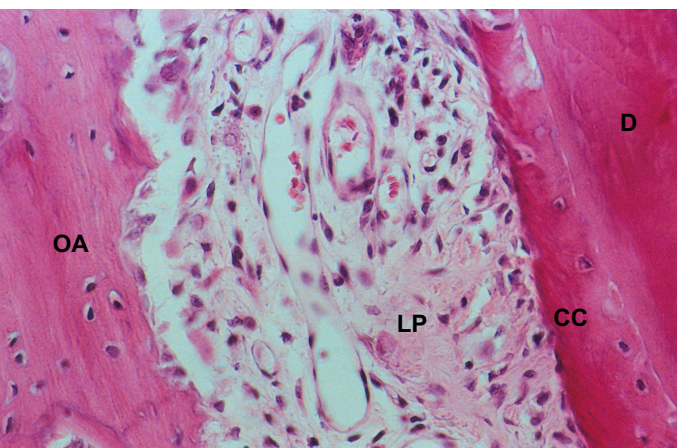


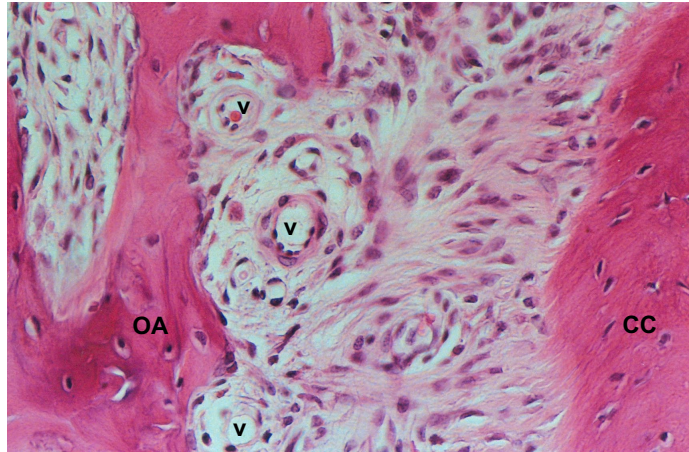
Figura 5.68

Porção do terço médio do ligamento periodontal (LP) (subgrupo IIIb). Os feixes do ligamento periodontal são escassos. Observa-se ectasia vascular. (D – dentina; CC – cimento celular; OA – osso alveolar) (HE, 400x no original).



Figura 5.69

Porção do terço apical do ligamento periodontal (subgrupo IIIb). Os feixes do ligamento periodontal apresentam-se bastante homogêneos e regulares. (CC – cemento celular; OA – osso alveolar; v - pequenos vasos) (HE, 400x no original).



é constituída por fibroblastos e algumas células inflamatórias, predominantemente PMN (Figs. 5.67, 5.68 e 5.69).

O osso alveolar, na sua porção coronal, apresenta sinais de reabsorção com algumas células multinucleadas na superfície (osteoclastos) (Fig. 5.70). Na zona mais apical da vertente periodontal, o osso alveolar apresenta áreas de remodelação óssea, sendo no entanto escassas as células multinucleadas (Fig. 5.69). Os sequestros ósseos são raros, tanto ao nível da bolsa periodontal palatina como nas lesões inter-radiculares. Ao nível da furca, apesar de ser notória a perda de inserção periodontal, com destruição das fibras mais coronais do ligamento periodontal e grande infiltrado inflamatório, não se observa, em nenhum corte, a permeabilização da furca (Figs. 5.71 e 5.72).

Na área apical, os tecidos periodontais não apresentam alterações significativas (Fig. 5.73).

Da avaliação efectuada, pode-se afirmar que neste subgrupo IIIb, as lesões observadas são semelhantes às lesões do subgrupo IIb classificadas como graves.



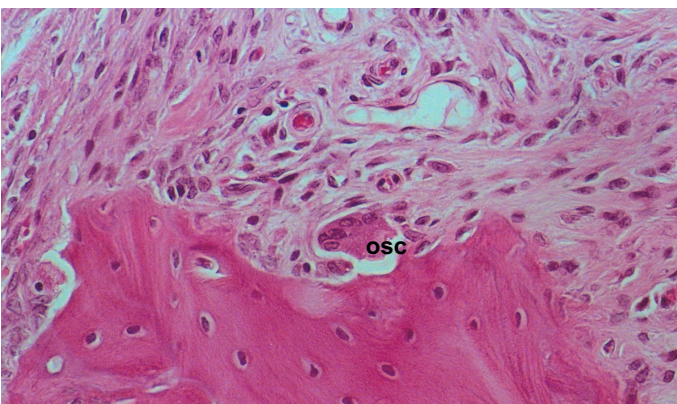


Figura 5.70

Pormenor da crista óssea alveolar (subgrupo IIIb). Uma célula multinucleada - osteoclasto (OSC) - localiza-se na superfície óssea. (HE, 400x no original).

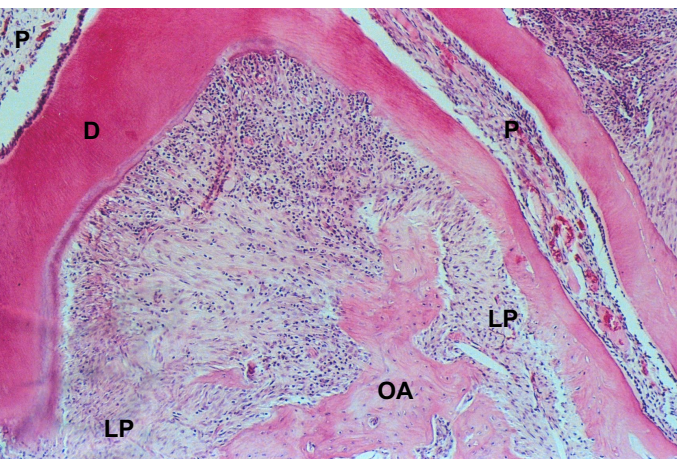


Figura 5.71

Área da furca radicular (subgrupo IIIb). A porção mais coronal do ligamento periodontal (LP) da furca apresenta um infiltrado inflamatório acentuado, dissociando os feixes interradiculares. O septo ósseo (OA) apresenta áreas de remodelação óssea. (D – dentina; P – polpa) (HE, 100x no original).

Figura 5.72

Área da furca radicular (subgrupo IIIb). O ligamento periodontal apresenta um infiltrado inflamatório mais acentuado na porção mais coronal da furca. O osso alveolar (OA) apresenta sinais de remodelação óssea. Áreas de reabsorção radicular são igualmente visíveis ao nível da furca. (D – dentina; CC – cimento celular; P – polpa) (HE, 100x no original).

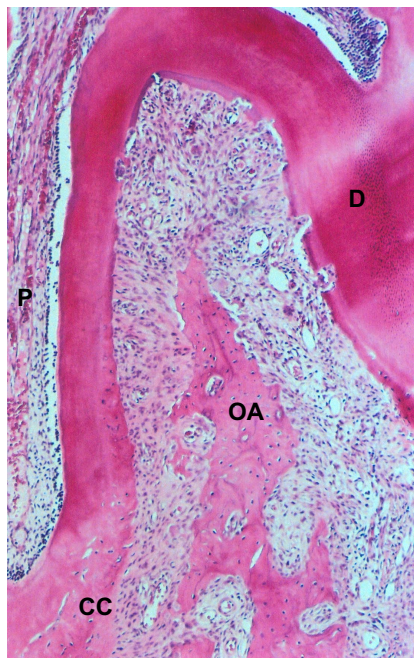
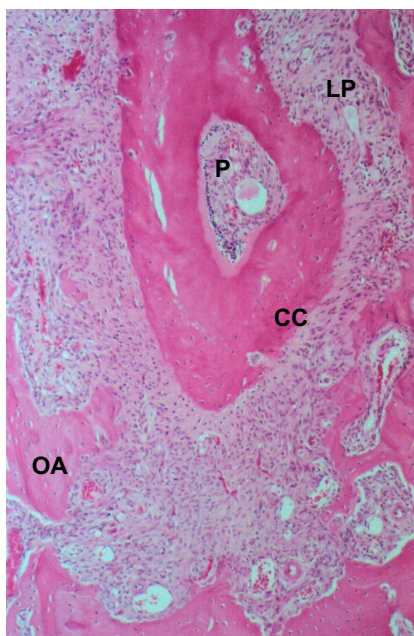


Figura 5.73

Área apical de um 2º molar (subgrupo IIIb). Os tecidos periodontais não apresentam alterações visíveis. (CC – cimento celular; LP – ligamento periodontal; OA – osso alveolar; P – polpa) (HE, 100x no original).



a.4. DISCUSSÃO

Porquê no segundo molar superior

No modelo experimental de periodontite no rato, o local da indução da lesão é variável. Alguns estudos referem a colocação de um fio de sutura no primeiro molar inferior (Kindlova *et al.* 1981, Gyorfí *et al.* 1994, Shoji *et al.* 1995, Nociti *et al.* 2000) enquanto que outros optaram pela sua colocação no segundo molar maxilar (Jordan *et al.* 1972, Irving *et al.* 1974, Sallay *et al.* 1982, Sanavi *et al.* 1985, Abiko e Shimono 1989, Samejima *et al.* 1990, Bezerra *et al.* 2000, Breivik *et al.* 2000, de Lima *et al.* 2000, Alencar *et al.* 2002, Kuhr *et al.* 2004). No presente estudo optou-se por colocar o fio de sutura em torno do segundo molar maxilar, porque esta localização demonstrou induzir grande destruição periodontal, mais rapidamente do que na mandíbula (Heijl *et al.* 1980), especialmente nos espaços interdentários (Heijl *et al.* 1980, Garant *et al.* 1983). Acrescente-se ainda que esta localização proporcionava um fácil acesso, tendo em conta a realização posterior de uma cirurgia periodontal. Por estas razões, optou-se por localizar o nó do fio de sutura na face vestibular, de modo a que o fio adquirisse uma posição infragengival na face palatina.

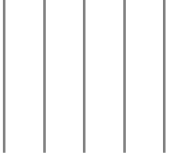
A maioria dos estudos publicados avaliaram a destruição periodontal produzida pelo fio de sutura nos espaços interdentários, após a realização de cortes histológicos no sentido mesio-distal da coroa dos molares. No presente estudo avaliou-se a lesão periodontal produzida na face palatina tendo em vista a possibilidade de realização de uma cirurgia periodontal posteriormente. Por outro lado, alguns estudos concluíram que a reabsorção óssea é maior na face palatina do que na lingual (Crawford *et al.* 1978, Heijl *et al.* 1980).

Apesar de certos autores terem utilizado um fio de nylon (Bezerra *et al.* 2000, de Lima *et al.* 2000, Alencar *et al.* 2002), a colocação de um fio de seda é a prática mais vezes descrita. De acordo com as observações por nós efectuadas,

os múltiplos filamentos que constituem o fio de seda favorecem a colonização bacteriana. De acordo com Johnson (1975), após a colocação de um fio de nylon, a migração apical do epitélio juncional só ocorreu passados 63 dias, período muito superior ao observado no nosso estudo. Pelo contrário, os autores acima referenciados, que também utilizaram um fio de nylon, observaram reabsorção óssea passados três e quatro dias.

Análise da variação de peso

Da variação de peso dos animais detectada no presente estudo, pode-se concluir que a colocação de um fio de sutura em ambos os molares superiores e/ou a anestesia afecta o seu peso corporal, uma vez que se verificou uma estabilização do peso inicial aos oito dias e um aumento pouco significativo aos quinze dias. Esta variação difere um pouco da verificada noutros trabalhos. No estudo de Bezerra e colaboradores (2000) após a colocação de fios em ambos os segundos molares superiores, houve uma diminuição de cerca de 20% do peso inicial no primeiro dia, o qual se manteve durante os restantes vinte e quatro dias. Já Koide e colaboradores (1995) verificaram que, aos sete dias, o peso dos animais com fio tinha aumentado em relação ao peso inicial. Contudo, apesar de nos animais sem fio de sutura esse aumento ter sido bastante maior, a diferença de peso entre os dois não era significativa. Durante a segunda semana, o peso dos animais com fio aumentou bastante, sendo esse aumento semelhante ao ocorrido nos animais sem fio. Acrescente-se ainda que num estudo em que só foi colocado um fio (de Lima *et al.* 2000), os ratos perderam 10% do seu peso no dia da colocação, tendo recuperado o seu peso inicial ao décimo quarto dia. De salientar que nesse estudo, ratos sem qualquer tipo de tratamento aumentaram em média, cerca de 5% do peso corporal por dia (de Lima *et al.* 2000). É de notar que em todos os estudos referenciados foram utilizados ratos Wistar, machos mas de seis a oito semanas de idade. No nosso estudo, foram utilizados ratos machos da mesma estirpe,



mas um pouco mais velhos o que pode explicar as pequenas diferenças verificadas.

A colocação do fio de sutura no 2º molar superior e/ou a anestesia geral pode ter alterado o crescimento do animal, com maior incidência na primeira semana. Certamente que a existência do fio nos molares, cria algum desconforto durante a mastigação, mais acentuado quando estas são colocadas bilateralmente. Tendo em conta que a dieta era constituída por granulados sólidos, talvez esse desconforto tenha causado alguma limitação na alimentação do animal.

Resultados ao oitavo dia (subgrupo IIa e IIIa)

Comparando a análise histológica dos dois subgrupos, verifica-se que as lesões produzidas pelos dois procedimentos testados não são significativamente diferentes. De facto, neste tempo de evolução, as características das lesões definem a constituição de uma bolsa periodontal pouco profunda. Assim, o revestimento epitelial da lesão, constituído pelo epitélio sulcular queratinizado e o epitélio juncional, apresenta-se contínuo e a sua adesão radicular localiza-se apicalmente à junção amelo-cementária. Esta observação reflecte uma migração apical da adesão epitelial por perda de inserção das fibras colagénicas mais coronais. O infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo relaciona-se com a degradação das fibras de colagénio gengivais e do ligamento periodontal e com a reabsorção óssea alveolar.

A classificação da lesão periodontal como pouco profunda deve-se ao facto da extensão da perda de inserção e da reabsorção óssea serem diminutas, quando comparadas com as lesões desenvolvidas ao fim de quinze dias de evolução, para ambos os procedimentos.

De um modo geral, estes resultados corroboram as observações de outros estudos já publicados, com o mesmo tempo de evolução. Sallay e colaboradores (1982) descreveram, aos nove dias, a existência de inflamação aguda que rodeia sequestros ósseos da margem alveolar vestibular, para além



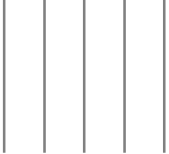
de reabsorção óssea osteoclástica com lacunas na face dentária do osso alveolar, menos frequentes em direcção apical. Na face palatina, local onde se localizou o nó, observaram reabsorção óssea sem no entanto identificarem sequestros ósseos. Este estudo permitiu verificar a existência de leucocitose no sangue periférico, com aumento do número de células mononucleares mas não de polimorfonucleares. Acrescente-se que tal observação foi confirmada no estudo de Bezerra e colaboradores (2000).

Sanavi e colaboradores (1985) referem que, aos oito dias, um epitélio sem soluções de continuidade separa o fio de sutura do tecido conjuntivo, destacando a presença de polimorfonucleares tanto no epitélio como em torno do fio.

No estudo de Koide e colaboradores (1995), sete dias após a colocação de um fio, o infiltrado inflamatório estava confinado à área subepitelial, tendo contudo sido detectados alguns osteoclastos em lacunas de reabsorção óssea. Sobaniec e colaboradores (2000) apresentam uma descrição bastante pormenorizada da lesão produzida ao fim de sete dias de permanência de um fio no primeiro molar inferior. Estes autores referem a existência de um alargamento do espaço periodontal, infiltrado inflamatório denso com predomínio de polimorfonucleares neutrófilos e alguns linfócitos e plasmócitos. O tecido conjuntivo gengival, para além de uma desorganização dos feixes de fibras colagénicas, apresenta sinais de edema, inúmeros vasos ectásicos e um exsudato inflamatório rico em proteínas, particularmente fibrina. O infiltrado inflamatório estende-se até à lâmina dura do processo alveolar, desencadeando a sua reabsorção osteoclástica. No entanto, é de salientar a ausência de referência à perda de adesão e migração do epitélio juncional.

Também Abiko e Shimono (1989) observaram lesões com as características já referenciadas, oito dias após a colocação de um elástico entre o primeiro e o segundo molares superiores: grande afastamento dos dois dentes (o espaço interdentário aumentou quatro vezes), migração apical dos tecidos periodontais,





um epitélio fino e distendido, marcado infiltrado inflamatório e acentuada reabsorção óssea alveolar com abundantes osteoclastos.

Recorrendo a microradiografias, Shoji e colaboradores (1995), demonstraram a existência de reabsorção vertical do osso na área interdentária, alargamento do espaço periodontal e envolvimento de furca e um aumento moderado de radiotransparência no osso alveolar remanescente, oito dias após a colocação de um elástico em torno do primeiro molar inferior.

No estudo de Samejima e colaboradores (1990) destaca-se o facto de haver observações correspondentes à evolução da lesão desde a colocação do fio de sutura. No primeiro dia assinala a alteração da forma da gengiva, com ulceração epitelial, mas com manutenção da adesão epitelial junto à junção amelo-cementária. No tecido conjuntivo gengival, adjacente à úlcera, observava-se um infiltrado constituído por polimorfonucleares neutrófilos e alguma desorganização das fibras colagénicas. Ao terceiro dia, desapareceu a adesão epitelial e a gengiva adere ao cimento. O osso alveolar vestibular apresentava largas lacunas de Howship com osteoclastos. Ao quinto dia os tecidos periodontais apresentavam um infiltrado inflamatório agudo e persistia uma marcada reabsorção óssea osteoclástica. Ao oitavo dia já se tinha formado uma nova adesão epitelial, subjacente ao fio de sutura, numa posição apical à junção amelo-cementária. Verificou-se igualmente uma redução do número de osteoclastos e polimorfonucleares.

Por outro lado, Gyorfí e colaboradores (1994) referem o aparecimento tardio da resposta inflamatória, uma vez que ao quarto dia esta não era notória, estando presente de uma forma evidente, com aumento da permeabilidade vascular e acumulação de células inflamatórias, células redondas e alguns plasmócitos, tanto ao oitavo como ao décimo quarto dia.

De igual modo, Koide e colaboradores (1995), três dias após a colocação do fio descreveram a existência de uma resposta inflamatória moderada, com predomínio de polimorfonucleares neutrófilos e alguns monócitos, e ectasia



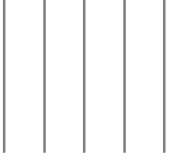
no tecido conjuntivo, desde a área subepitelial à crista alveolar. Neste tempo de evolução referem ainda a perda de inserção apical à junção amelo-cementária, assim como a reabsorção óssea da crista, tendo aí sido detectadas algumas células com actividade fosfatase ácida positiva (osteoclastos).

Resultados ao décimo quinto dia (subgrupos IIb e IIIb)

A análise histológica das lesões produzidas pelos dois procedimentos testados revelam que, aos quinze dias, há algumas diferenças que importa esclarecer. Em alguns animais, as lesões desenvolvidas por cada procedimento assemelham-se, caracterizando-se por bolsas periodontais profundas. Contudo, nos outros animais a passagem da agulha pelo espaço interdentário resultou numa destruição dos tecidos periodontais mais acentuada, caracterizada pela formação de bolsas periodontais muito profundas e uma destruição muito extensa das estruturas periodontais (subgrupo IIb).

Diferentes factores podem ter influenciado o evoluir da lesão patológica, desde factores genéticos, bioquímicos, fisiológicos e imunológicos do hospedeiro, à flora microbiológica associada a um determinado animal. Como no presente estudo, não se repetiu o mesmo procedimento no mesmo animal, a influência destes factores na comparação intra-animal estão atenuados. No entanto, a comparação intra-grupo, isto é, a comparação entre os que desenvolveram bolsas periodontais profundas e os que desenvolveram bolsas muito profundas, a partir do mesmo procedimento, pode ficar a dever-se aos factores acima referidos. Embora nos modelos animais esses factores tendam a ser controlados, os resultados do procedimento testado reflectem sempre uma variabilidade biológica inerente ao modelo, só parcialmente ultrapassada quando são utilizados animais controlados geneticamente, não tendo sido o caso neste estudo. A variabilidade subjacente ao operador deve também ser incluída entre os factores que interferem na standardização dos procedimentos (Selvig 1994). De facto, a passagem da agulha pelo espaço interdentário





revelou ser um procedimento de execução difícil e bastante traumática, pelo que, apesar de se ter usado a mesma metodologia, é possível que em alguns dos casos as manobras tenham sido mais traumáticas do que em outros. Para além da variabilidade biológica, as dificuldades encontradas na standardização da colocação do fio de sutura podem justificar as diferenças encontradas nos resultados do subgrupo IIb. No grupo III, o traumatismo mecânico do afastamento das coroas pela agulha foi transitório e de menor amplitude, o que pode explicar a maior homogeneidade nos resultados.

A amplitude dos resultados observados no subgrupo IIb pode ter ficado a dever-se ao traumatismo mecânico de colocação do fio, assim como à existência de uma flora microbiológica mais abundante e agressiva nos animais que desenvolveram lesões muito graves. Só nestes foi possível identificar a presença de grandes aglomerados bacterianos, numa localização bastante profunda das bolsas periodontais. Por outro lado, pode-se encarar esta ocorrência de forma inversa, isto é, a existência de uma lesão profunda permitiu que a proliferação bacteriana resultasse na colonização de locais mais profundos do interior da bolsa. De facto, ambas as situações devem ter ocorrido simultaneamente. Mas, uma vez que não foi efectuada qualquer análise microbiológica para identificação das bactérias presentes, não é possível esclarecer qual o papel da flora microbiana no desenvolvimento destas lesões muito graves.

A reacção inflamatória após a colocação do fio de sutura é causada pela infecção microbiana, uma vez que em animais *germ-free* o fio não causa lesão periodontal (Garant 1976, Heijl *et al.* 1980) e ainda, quando a colocação de um fio é associada à administração de antibióticos, não há destruição periodontal ou esta não é tão acentuada (Page e Schroeder 1982, Sallay *et al.* 1982).

No nosso estudo foi possível identificar a presença de aglomerados bacterianos na vizinhança dos filamentos do fio, sobre a superfície radicular e, nos casos

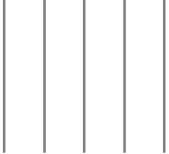


de bolsas periodontais muito profundas, sobre a superfície de sequestros ósseos. Estes aglomerados bacterianos apresentaram uma estrutura organizada, formando colónias bacterianas, não tendo sido identificadas bactérias isoladas e dispersas. Por essa razão, tais aglomerados devem ser interpretados como resultado de uma colonização bacteriana de facto, e não como o resultado de uma deslocação das bactérias existentes em torno do fio de sutura, durante o processamento laboratorial das amostras.

Um outro ponto importante, no que respeita à presença de bactérias nas lesões observadas, refere-se à ausência de colónias bacterianas no córion do tecido conjuntivo, deduzindo-se assim que não houve invasão bacteriana, mesmo nos casos de grande destruição periodontal. Aliás, este facto corrobora os resultados de diversos estudos publicados, nos quais, sob condições semelhantes ao presente estudo, não foi possível identificar invasão bacteriana do tecido conjuntivo, apesar da presença de bactérias no interior da bolsa periodontal (Sallay *et al.* 1984, Sanavi *et al.* 1985, Samejima *et al.* 1990). No entanto, em animais imuno-suprimidos a invasão bacteriana foi frequentemente relatada (Sanavi *et al.* 1985, Hemmerle e Frank 1991).

Embora não tenhamos efectuado a identificação microbiológica das bactérias presentes, as características morfológicas da estrutura filamentosa, presente em diversas amostras, permitem caracterizar esta estrutura como colónias de *Actinomyces*. De facto, as colónias desta espécie bacteriana apresentam-se geralmente sob a forma de massas amorfas e filamentosas de bacilos, com ramificações em ângulos agudos, e que coram intensamente pela hematoxilina. Esta espécie bacteriana foi identificada na flora bacteriana de ratos com doença periodontal espontânea (Page e Schroeder 1982) e a sua inoculação experimental produziu lesão periodontal (Crawford *et al.* 1978, Heijl *et al.* 1980, Klausen *et al.* 1986). Também no homem, esta espécie bacteriana está presente na placa bacteriana supragengival, em casos de saúde periodontal e de patologia, tanto na gengivite como na periodontite (Samaranayake 2002).





De uma forma geral, a análise histológica dos resultados aos quinze dias demonstrou uma evolução das lesões observadas no período anterior. Assim, houve um agravamento da perda de inserção periodontal resultando na formação de bolsas periodontais profundas e muito profundas. As primeiras caracterizaram-se pela presença de uma adesão do epitélio da bolsa ao nível do terço médio da superfície radicular, enquanto que nas muito profundas, essa adesão se localizou no terço apical. O epitélio da bolsa nas lesões pouco profundas apresentou-se contínuo mas constituído por poucas camadas celulares e com alguns polimorfonucleares. Nas bolsas muito profundas, foi difícil a identificação do epitélio da bolsa devido à existência de sequestros ósseos.

O infiltrado inflamatório nas lesões graves era em algumas áreas intenso e constituído por essencialmente por células mononucleadas, predominando os PMN para além da presença de alguns linfócitos, não tendo sido identificados plasmócitos (Baptista e Cabrita 2001). As lesões muito graves apresentavam um infiltrado inflamatório mais denso e generalizado, tendo sido identificadas algumas células multinucleadas. Aliás, a ausência de plasmócitos no infiltrado inflamatório foi sublinhada em alguns estudos publicados (Garant e Cho 1979b, Heijl *et al.* 1980, Ryder 1980c), sendo justificada pela curta duração do tempo experimental (Page e Schroeder 1982).

Nas bolsas periodontais profundas, a porção apical do ligamento periodontal, apesar de algum infiltrado inflamatório, mantinha a sua organização estrutural, ao contrário do observado nas lesões muito graves, nas quais a quase totalidade do espaço periodontal estava ocupado por um intenso infiltrado inflamatório. No que se refere ao osso alveolar, as lesões periodontais apresentavam reabsorção ao nível da crista, do septo interradicular e na vertente periodontal, sem contudo ser evidente a existência de permeabilidade da furca. Pelo contrário, nas bolsas periodontais muito profundas, a reabsorção do osso alveolar era muito extensa, resultando lesões com permeabilidade da furca interradicular e frequentes sequestros ósseos.



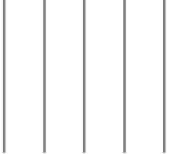
No conjunto dos artigos consultados que efectuaram a avaliação às duas semanas de evolução, ao contrário do por nós observado, verifica-se uma homogeneidade das lesões induzidas pela colocação do fio de sutura. É no entanto importante destacar que em nenhum dos artigos referidos se descreve pormenorizadamente o método pelo qual o fio foi colocado nos espaços interproximais. Por essa razão, a comparação dos resultados deverá ser efectuada tendo em conta as lesões produzidas e não os procedimentos testados.

Assim, Sallay e colaboradores (1982), aos catorze dias, descreveram a formação de uma nova adesão epitelial subjacente ao fio e uma diminuição da reabsorção óssea, com menor número de osteoclastos presentes, quando comparada com a lesão aos oito dias. Os estudos efectuados por Bezerra e colaboradores (2000, 2002, de Lima *et al.* 2000) corroboram estes resultados. Verificaram que a reabsorção óssea, iniciada por volta do terceiro dia após a colocação do fio, atinge maior significado pelo sétimo dia, mantendo-se até ao décimo primeiro, a partir do qual decresce até ao décimo quarto. Acompanhando o pico de reabsorção alveolar, verificaram igualmente a alteração da constituição do infiltrado inflamatório, passando de um predomínio de polimorfonucleares nos três primeiros dias para o predomínio de células mononucleadas entre o sétimo e o décimo primeiro dia. Nesse período verificaram igualmente um aumento do número de osteoclastos.

Enquanto que os estudos acima referidos parecem traduzir uma estabilização na evolução da lesão entre a primeira e a segunda semanas, outros estudos demonstraram um agravamento das lesões ao longo desse tempo. Aos catorze dias (Koide *et al.* 1995) e aos dezasseis dias (Gaspersic *et al.* 2003) refere-se a contínua perda de inserção periodontal e reabsorção óssea, comparativamente ao período de observação anterior.

Outros estudos ainda, com uma duração superior às duas semanas, demonstraram que a lesão periodontal continua a progredir, no que respeita à





perda de inserção, à alteração das características do infiltrado inflamatório e à reabsorção óssea. Sobaniec e colaboradores (2000) referem que, entre o décimo quarto e o vigésimo primeiro dia, o infiltrado inflamatório foi substituído por células típicas do infiltrado crónico (plasmócitos, linfócitos e macrófagos), particularmente depois do vigésimo primeiro dia. Descrevem igualmente sinais de alteração degenerativa referindo a existência de uma massa hialina, sem estrutura e sem células, a perda de inserção das fibras de colagénio e reabsorção óssea muito marcada, com zonas preenchidas por tecido de granulação exuberante.

Às quatro semanas, Galvão e colaboradores (2003) descreveram a existência de um epitélio juncional longo, abundância de células conjuntivas e vasos sanguíneos, fibras do ligamento periodontal e supra-alveolares frouxas, crista óssea alveolar irregular, ligamento periodontal com grande número de células e presença de lacunas de Howship no cimento.

No que se refere à reabsorção óssea, Kuhr e colaboradores (2004) verificaram que esta era mais significativa durante as duas primeiras semanas, decrescendo durante as seis semanas seguintes. Este facto certamente que está relacionado com a remodelação óssea fisiológica que ocorre no rato e que é responsável pelo aumento da distância da junção amelo-cementária à crista alveolar com a idade. Deste modo, com o passar do tempo, o fio de sutura afasta-se cada vez mais da crista óssea e a sua influência na reabsorção vai-se reduzindo.



a.5. CONCLUSÃO

Numa avaliação global dos resultados do protocolo A, pode-se afirmar que a permanência de um fio de sutura em torno do colo do segundo molar superior, durante oito dias, induz na face palatina, a formação de uma bolsa periodontal pouco profunda, independentemente do procedimento utilizado na sua colocação. Aos quinze dias, a lesão agrava-se, aumentando a amplitude dos tecidos periodontais afectados. Contudo neste período, o procedimento adoptado na colocação do fio tem influência na gravidade da lesão produzida, destacando-se uma grande variabilidade na extensão das lesões quando se passa toda a agulha pelo espaço interdentário. Deste modo, o procedimento mais adequado para a criação de uma lesão periodontal passível de ser tratada cirurgicamente será a colocação de um fio de sutura em torno do colo do segundo molar superior, através da utilização da agulha como cunha interdentária, o qual deverá permanecer no sulco gengival durante duas semanas.





b. A INFLUÊNCIA DE UM DERIVADO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE NO EPITÉLIO GENGIVAL - Protocolo B

De acordo com estudos *in vitro* e *in vivo*, referenciados pormenorizadamente no Capítulo III deste trabalho, um derivado das proteínas da matriz do esmalte (EMD) demonstrou ter um efeito inibidor da proliferação das células epiteliais. Os estudos *in vivo* revistos foram realizados em vários modelos animais, entre os quais o rato. No entanto, nenhum deles avaliou histomorfometricamente a cicatrização epitelial de uma lesão periodontal experimental após tratamento com EMD. Saliente-se ainda o facto de serem escassos os trabalhos que avaliam a participação dos diferentes componentes da técnica de aplicação do EMD no processo de cicatrização.

b.1. Objectivo

Este segundo estudo teve como objectivo determinar a influência de um derivado das proteínas da matriz do esmalte na cicatrização dos tecidos epiteliais da margem gengival de uma bolsa periodontal, assim como dos diferentes componentes da técnica de aplicação desse material, nomeadamente o condicionamento radicular por ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA), o veículo éster de propilenoglicol do ácido algínico (PGA) e a sua associação.

b.2. Material e métodos

A lesão periodontal experimental foi desenvolvida com base nos resultados obtidos no Protocolo A – Periodontite Experimental, anteriormente descrito. De acordo com o tipo de tratamento a efectuar, foram criados cinco grupos experimentais, com os seguintes procedimentos:

- no **grupo IV** executou-se um retalho muco-perióstico palatino nos molares maxilares: após uma incisão intra-sulcular palatina do 1º ao 3º molar,



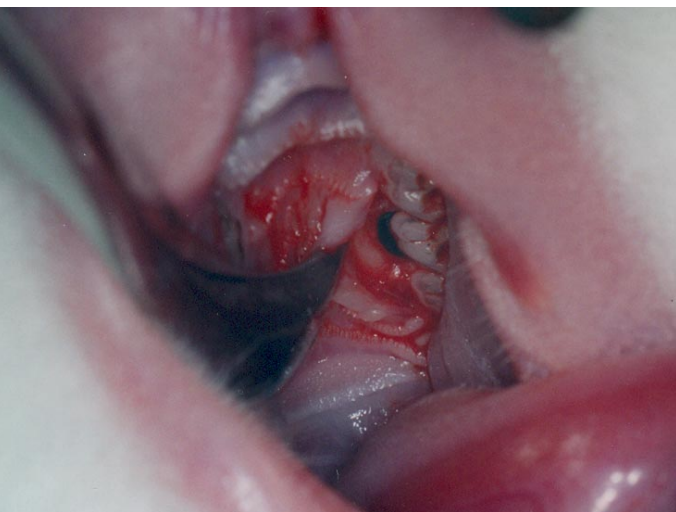


Figura 5.74

Após descolamento do retalho mucoperióstico, visualiza-se o fio de sutura no colo do segundo molar maxilar.



Figura 5.75

Removido o fio de sutura é visível uma lesão periodontal palatina no segundo molar.

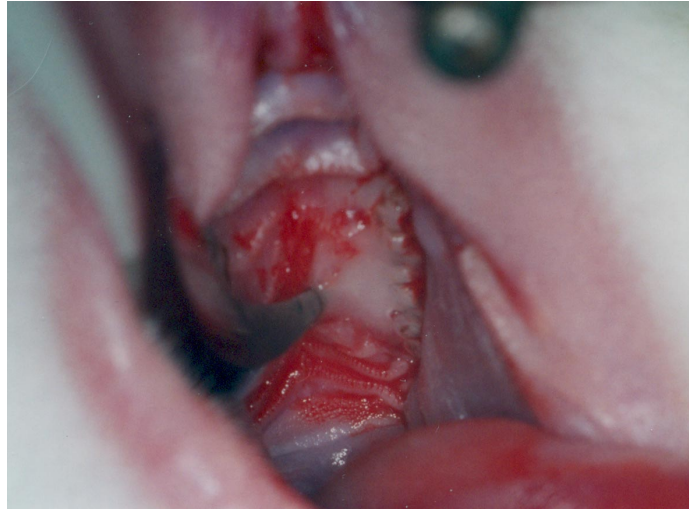


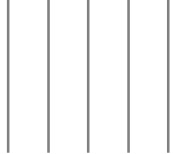
Figura 5.76

Aplicação de EDTA sobre a superfície radicular.

efectuou-se um descolamento da margem gengival e da mucosa palatina, de espessura total, de modo a expor a superfície radicular palatina do 2º molar e osso alveolar circundante (Fig. 5.74). Removido o fio de sutura, efectuou-se a raspagem e alisamento radicular da superfície exposta, após a qual se rebateu o pequeno retalho muco-perióstico, tendo-se aplicado uma pressão ligeira para o reposicionar;

- no **grupo V**, após ter sido efectuado o levantamento do retalho muco-perióstico, a remoção do fio de sutura e o alisamento radicular (Fig. 5.75), de modo idêntico ao descrito no grupo anterior, aplicou-se uma gota de gel de ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) (Fig. 5.76), sobre a superfície radicular, durante dois minutos. Em seguida lavou-se a área palatina com soro e reposicionou-se o retalho;
- no **grupo VI**, foi efectuado o levantamento do retalho muco-perióstico, a remoção do fio de sutura e o alisamento radicular de modo idêntico ao descrito





no grupo IV, aplicou-se uma gota de éster de propilenoglicol do ácido algínico (PGA) sobre a superfície radicular e reposicionou-se o retalho;

- no **grupo VII**, após ter sido efectuado o levantamento do retalho mucoperióstico, a remoção do fio de sutura e o alisamento radicular de modo semelhante ao descrito no grupo IV, aplicou-se uma gota de gel de EDTA, durante dois minutos, lavou-se a área com soro e em seguida foi aplicada uma gota de PGA e, por fim reposicionou-se o retalho;
- no **grupo VIII**, após ter sido efectuado o levantamento do retalho mucoperióstico, a remoção do fio de sutura e o alisamento radicular, como descritos no grupo IV, aplicou-se uma gota de gel de EDTA, durante dois minutos, lavou-se a área com soro, aplicou-se uma gota de um derivado das proteínas da matriz do esmalte (EMD) e por fim reposicionou-se o retalho.

Os tempos e a sequência de aplicação dos diferentes materiais utilizados cumpriram as instruções dadas pelo respectivo fabricante.

De modo a minimizar o número de animais a incluir neste protocolo, procedeu-se a uma distribuição aleatória pelos animais dos procedimentos a realizar, excluindo a repetição de um procedimento no mesmo animal. Vinte e cinco animais foram sacrificados ao décimo oitavo dia (subgrupos IVa, Va, VIa, VIIa e VIIIa), outros vinte e cinco ao vigésimo terceiro dia (subgrupos IVb, Vb, VIb, VIIb e VIIIb) e outros vinte e cinco ao trigésimo dia (subgrupos IVc, Vc, VIc, VIIc e VIIIc) (Fig. 5.77) (Quadro 5.2).

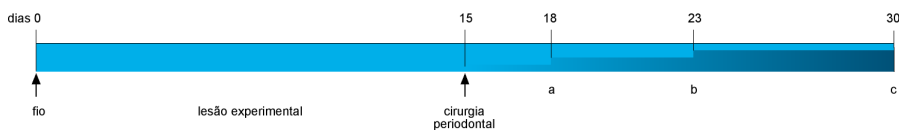


Figura 5.77 – Esquema do Protocolo B



Quadro 5.2 . Esquematização dos grupos do Protocolo B – Cicatrização epitelial.

GRUPO	TRATAMENTO (após 15 dias da colocação do fio de sutura)	Tempo	n*
IV	Remoção fio, retalho muco-perióstico simples		
a		3 dias	10
b		8 dias	10
c		15 dias	10
V	Remoção fio, retalho muco-perióstico, EDTA (2'), soro		
a		3 dias	10
b		8 dias	10
c		15 dias	10
VI	Remoção fio, retalho muco-perióstico, PGA		
a		3 dias	10
b		8 dias	10
c		15 dias	10
VII	Remoção fio, retalho muco-perióstico, EDTA (2'), soro, PGA		
a		3 dias	10
b		8 dias	10
c		15 dias	10
VIII	Remoção fio, retalho muco-perióstico, EDTA (2'), soro, EMD		
a		3 dias	10
b		8 dias	10
c		15 dias	10

*n - número de dentes

Atendendo ao tamanho das estruturas em causa, a raspagem e alisamento radiculares foram realizados com curetas Gracey Mini Five (SAS7/86, Hu-Friedy®). No acondicionamento ácido da raiz utilizou-se o ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) numa concentração de 24%, sob a forma de um gel neutro de CMC (PrefGel™, Biora AB, Malmö, Sweden) (Fig. 5.78).

A solução aquosa do éster de propilenoglicol do ácido alginico (PGA) foi cedida pela Biora (Biora AB, Malmö, Sweden) (Fig. 5.78).

O derivado das proteínas da matriz do esmalte (EMD) utilizado foi o Emdogain®Gel (Biora AB, Malmö, Sweden) pertencente aos lotes EPT 036 e EPT 037 (Fig. 5.78).

A anestesia, o posicionamento do animal, o pós-operatório, o sacrifício dos animais, a recolha de amostras e o processamento das amostras foram efectuados do modo descrito no estudo anterior.



Figura 5.78
Materiais utilizados no Protocolo B.

b.2.1. Métodos de análise

b.2.1.1. Microscopia de Luz

Neste estudo, para além da coloração com hematoxilina-eosina (HE), efectuou-se a coloração por Tricrómico de Masson (TM).

A avaliação histológica dos cortes seriados foi realizada em microscopia de luz simples e baseou-se numa análise descritiva dos tecidos periodontais superficiais.

b.2.1.2. Histomorfometria

Efectuou-se a avaliação histomorfométrica do tecido epitelial em relação com a superfície radicular, em pelo menos dois cortes de cada amostra. Os cortes foram fotografados com a máquina Coolpix 990 (Nikon®) acoplada ao microscópio óptico de campo claro Nikon® Eclipse 600 (Nikon®, Japão), com aumento de 100 vezes. As imagens digitais foram processadas recorrendo ao programa SigmaScan Pro 5.0® (SPSS Science), com um zoom de 25%.

Foi determinada a área do epitélio em relação com a superfície radicular, correspondendo ao conjunto do epitélio juncional com o epitélio sulcular e ainda a maior distância corono-apical desse tecido epitelial (Fig. 5.79). Optou-se por medir a área ocupada pelos dois epitélios uma vez que a sua individualização ao microscópio de luz era subjectiva e pouco reproduzível.

A análise estatística dos dados foi realizada com o apoio do programa Statistica 4.0 (versão Machintosh). Efectuou-se uma análise da variância para um protocolo experimental de dois factores, com medidas repetidas em um factor (ANOVAR). Um dos factores foi constituído por quatro níveis: grupos IV (cirurgia), grupo VI (PGA), grupo VII (EDTA + PGA) e grupo VIII (EDTA + EMD).

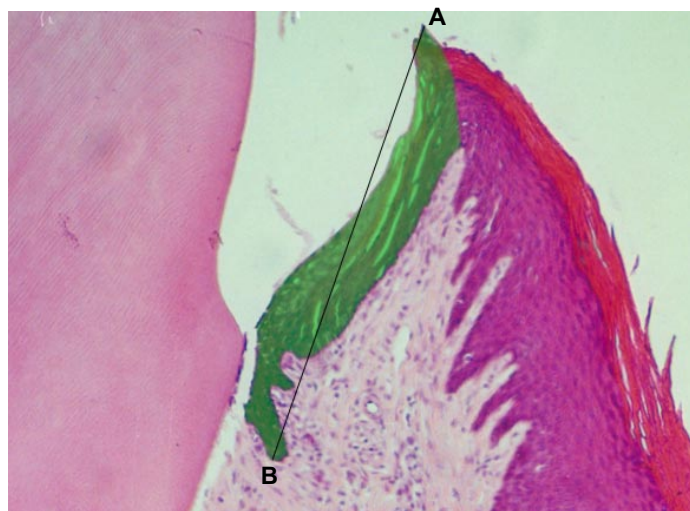
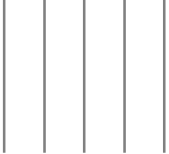


Figura 5.79

Exemplificação da área epitelial (sombreado) e da maior altura corono-apical (A - B) do epitélio delimitado.



Uma vez que não foi possível efectuar a medição da área e da altura no grupo V (EDTA) aos 3 dias, este grupo não foi considerado nesta análise. O outro factor foi constituído pelos tempos experimentais: três, oito e quinze dias. As variáveis dependentes representaram a área do epitélio medido e a altura máxima corono-apical dessa mesma área. Foi adoptado um nível de significância de 95%.

b.3. RESULTADOS

b.3.1. Aspecto macroscópico

No dia de sacrifício, os animais não apresentavam alterações do hábito externo nem do comportamento que fossem reveladoras de patologia.

Nos animais sacrificados ao décimo oitavo dia (subgrupos IVa, Va, VIa, VIIa e VIIIa) verificou-se um ligeiro aumento do peso comparativamente ao peso inicial (dia 0), embora irrelevante quando comparado com o peso ao décimo quinto dia. Nos animais sacrificados ao vigésimo terceiro dia (subgrupos IVb, Vb, VIb, VIIb e VIIIb) houve um aumento ligeiro do peso quando comparado ao do décimo quinto dia, não sendo significativo quando comparado ao peso inicial. Nos animais sacrificados ao trigésimo dia (subgrupos IVc, Vc, VIc, VIIc e VIIIc) manteve-se uma ligeira tendência de aumento de peso sem, no entanto, ser relevante quando comparada com o peso inicial.

Macroscopicamente, três dias após a realização da cirurgia periodontal, em todos os subgrupos à excepção do subgrupo Va, observou-se a interposição de uma pequena zona de tecido cicatricial entre a superfície do segundo molar e a margem gengival, incluindo as papilas interdentárias (Fig. 5.80). As amostras do subgrupo Va (EDTA) apresentavam uma área erosiva da mucosa palatina adjacente ao segundo molar, correspondendo à área de intervenção cirúrgica. Esta área erosiva representava uma solução de continuidade da margem



gingival (Fig. 5.81). Em algumas amostras deste subgrupo, a erosão estendia-se quase até à linha média palatina.

Oito dias após a execução do retalho muco-perióstico, com a excepção do subgrupo Vb, a única alteração à morfologia normal da margem gengival situava-se ao nível das papilas interdentárias palatinas, as quais não preenchiam totalmente o espaço interdentário (Fig.5.82). No subgrupo Vb (EDTA) observou-se uma área erosiva adjacente à face palatina do segundo molar, embora ocupasse uma área substancialmente menor quando comparada com o subgrupo Va (Fig. 5.83).

Quinze dias decorridos sobre a cirurgia periodontal, à excepção do subgrupo Vc, a margem gengival palatina apresentava-se normal, contornando o colo dentário do segundo molar, sem quaisquer sinais inflamatórios, nem recessão gengival (Fig. 5.84). Na maioria das hemi-maxilas do subgrupo Vc (EDTA), a margem gengival apresentava-se adaptada à face palatina, sendo contudo visível uma área cicatricial com alguns sinais inflamatórios (Fig. 5.85).

b.3.2. Observações em microscopia de Luz

As imagens histológicas observadas demonstraram que a metodologia seguida na preparação do material para estudo histológico, foi adequada. Porém, em algumas lâminas, foram detectados pequenos artefactos que, no entanto, não puseram em causa a correcta avaliação da área periodontal em estudo.

Para cada um dos cinco grupos, as alterações histológicas dos tecidos periodontais localizados acima da crista alveolar são descritas de acordo com a sequência cronológica: subgrupo a, b e c.



Figura 5.80

Hemimaxila do grupo VIII (EDTA+EMD) aos 3 dias pós-operatório (subgrupo VIIIa), sendo visível uma faixa de tecido cicatricial entre a margem gengival e a superfície dentária, na zona palatina do 2º molar.



Figura 5.81

Hemimaxila do grupo V (EDTA) aos 3 dias pós-operatório (subgrupo Va), destacando-se uma área erosiva adjacente à face palatina do 2º molar.



Figura 5.82

Hemimaxila do grupo IV (cirurgia) aos 8 dias pós-operatório (subgrupo IVb). A margem gengival apresenta um aspecto normal com exceção das papilas interdentárias palatinas que não preenchem os espaços interdentários.



Figura 5.83

Hemimaxila do grupo V (EDTA) aos 8 dias pós-operatório (subgrupo Vb). Observa-se uma área erosiva adjacente à face palatina do 2º molar.



Figura 5.84

Hemimaxila do grupo VII (EDTA+PGA) aos 15 dias pós-operatório (subgrupo VIIc), não sendo visível qualquer alteração da margem gengival palatina.



Figura 5.85

Hemimaxila do grupo V (EDTA) aos 15 dias pós-operatório (subgrupo Vc). Na margem gengival palatina do 2º molar é visível uma área cicatricial.





Figura 5.86

Imagem de uma zona superficial do tecido cicatricial, três dias após a execução de um retalho muco-perióstico simples (subgrupo IVa). Identifica-se à superfície uma zona de necrose (N) e subjacente a esta uma zona de intenso infiltrado inflamatório (infil). (* - pêlo em corte transversal; JAC – junção amelo-cementária; seta – transição entre a superfície manipulada e a não manipulada) (HE, 100x no original).

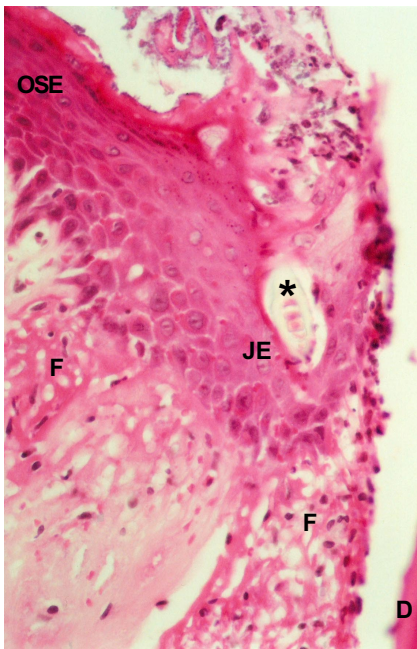


Figura 5.87

Maior ampliação da margem epitelial palatina da figura 5.86 (subgrupo IVa). É visível uma solução de continuidade entre o revestimento epitelial e a superfície radicular (D), ocupada por uma área de fibrina (F). (OSE – epitélio sulcular; JE – epitélio juncional; * – corpo estranho) (HE, 400x no original).



b.3.2.1. Retalho muco-perióstico simples - Grupo IV

3 dias (subgrupo IVa):

Os cortes histológicos deste subgrupo mostram a cicatrização de um retalho gengival muco-perióstico simples, ao fim de três dias de evolução. Destaca-se uma solução de continuidade entre a adesão epitelial e a superfície radicular, ocupada por uma pequena faixa de tecido cicatricial, que se prolonga até à crista alveolar. Este tecido cicatricial é formado por duas zonas distintas: a mais superficial caracterizada por um infiltrado inflamatório com sinais de necrose e uma zona mais extensa ocupada por fibrina colonizada por diversas células, entre as quais se destacam células inflamatórias e alguns glóbulos vermelhos. A localização deste tecido identifica a área do descolamento do retalho efectuado (Figs 5.86, 5.87 e 35.88).

Para além do tecido cicatricial, verifica-se que o epitélio juncional, não queratinizado e reduzido a uma pequena área, parece demonstrar uma certa actividade proliferativa, embora ainda pouco perceptível na maioria das lâminas (Fig. 5.87).

Devido à existência de uma zona ocupada por fibrina, as fibras de colagénio supra-alveolares apresentam-se interrompidas, sem inserção radicular (Fig. 5.88). No tecido conjuntivo gengival e no ligamento periodontal, entre os feixes de fibras de colagénio, observam-se pequenos vasos e células de aparência inflamatória, possivelmente derivados do processo inflamatório decorrente do trauma cirúrgico e da lesão periodontal existente previamente (Fig. 5.89).

Na maioria das amostras, uma análise mais atenta da superfície radicular, permite distinguir a área sujeita à raspagem e alisamento radicular, da área não manipulada. Com efeito, num número assinalável de lâminas, é possível identificar a transição entre o cimento alisado, mais coronal, e o cimento não manipulado, mais apical, apesar de não ter sido efectuado um entalhe radicular durante o procedimento cirúrgico. Na superfície manipulada (cimento alisado)



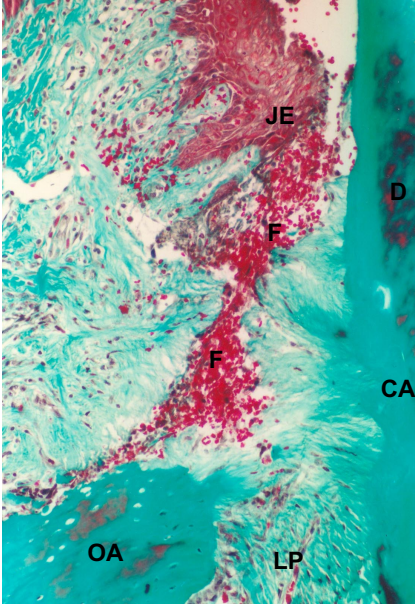


Figura 5.88

Aspecto de uma área de descontinuidade das fibras de colagénio supra-alveolares (subgrupo IVa) pela existência de uma área de fibrina (F) povoada por abundantes glóbulos vermelhos. (JE - epitélio juncional; CA – cimento acelular; D – dentina; OA – osso alveolar; LP – ligamento periodontal) (TM, 200x no original).

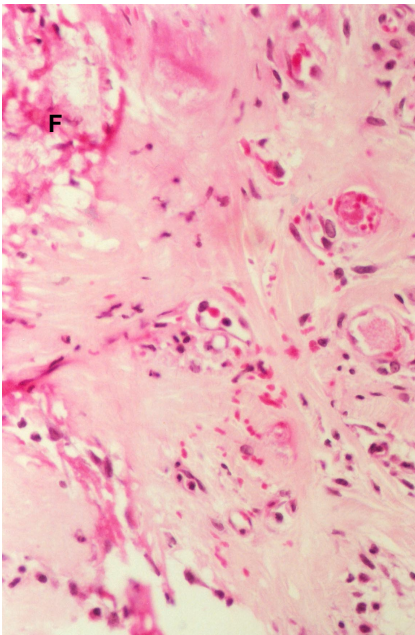


Figura 5.89

Pormenor do tecido conjuntivo adjacente a uma zona de fibrina (F), mostrando a desorganização das fibras de colagénio, algumas células inflamatórias e inúmeros vasos sanguíneos (subgrupo IVa). (HE, 400x no original).

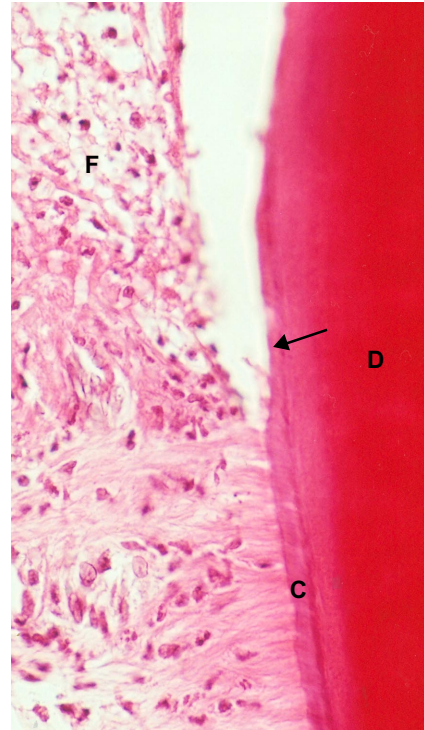


Figura 5.90

Pormenor da superfície radicular (subgrupo IVa), na zona de transição entre o cimento alisado e o não manipulado (seta). O cimento alisado não apresenta inserção de fibras de colagénio, enquanto que no cimento não manipulado é visível a presença de fibras colagénio que se inserem perpendicularmente. (D – dentina; C – cimento; F - fibrina) (HE, 400x no original).

verifica-se uma diminuição da espessura ou mesmo uma ausência de cimento acelular, o qual, quando presente, não mostra inserção de fibras de colagénio. Pelo contrário, na superfície radicular que não sofreu manipulação, o cimento apresenta uma espessura que aumenta de forma gradual à medida que se progride apicalmente. Sublinhe-se ainda que nesta porção de cimento encontram-se inseridas fibras de colagénio, sem no entanto mostrarem continuidade com as fibras do tecido conjuntivo gengival, como já foi referido (Figs. 5.88 e 5.90).

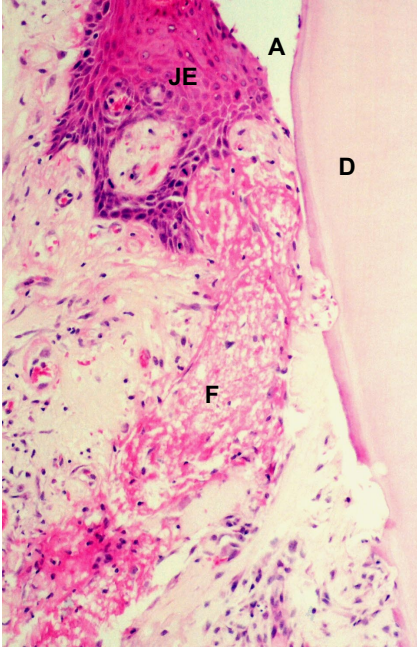


Figura 5.91

Zona de cicatrização da margem gengival palatina, oito dias após a execução de um retalho muco-perióstico simples (subgrupo IVb). O epitélio juncional (JE) localiza-se sobre a superfície radicular (D), apicalmente à junção amelo-cementária. As fibras de colagénio supra-alveolares apresentam uma solução de continuidade ocupada por fibrina (F). A superfície radicular apresenta algumas lacunas de reabsorção do cimento. (A – artefacto) (HE, 200x no original).

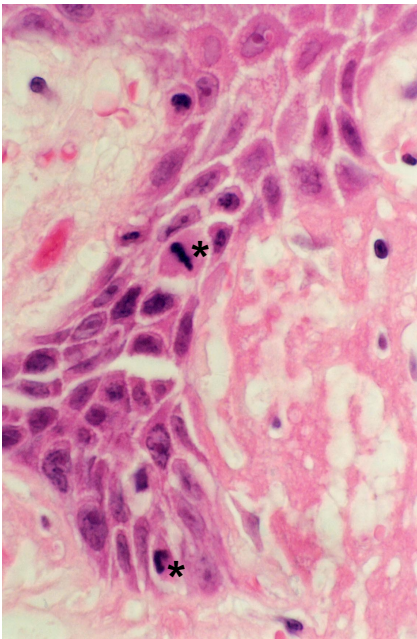


Figura 5.92

Pormenor de um prolongamento do epitélio juncional (subgrupo IVb) apresentando algumas células em mitose (*) no estrato basal. (HE, 1000x no original).

**8 dias (subgrupo IVb):**

Neste tempo pós-operatório, o processo de cicatrização evoluiu significativamente. Em relação ao observado no período anterior (subgrupo IVa), verifica-se o restabelecimento da adesão epitelial à superfície radicular, numa localização apical à junção amelo-cementária. Com efeito, o epitélio juncional, não queratinizado, adere à superfície radicular manipulada numa extensão diminuta e apresenta alguns prolongamentos epiteliais, representativos da sua actividade proliferativa (Figs. 5.91, 5.92 e 5.93).

Comparativamente com o subgrupo anterior, neste tempo, o tecido cicatricial abrange uma área mais circunscrita, não se observando a presença da zona de necrose superficial. Adjacente à superfície radicular, a faixa de fibrina estende-se até à zona de transição entre a superfície alisada e a não manipulada. Na maioria das amostras, a fibrina apresenta-se povoada por algumas células inflamatórias, sendo já possível identificar alguns fibroblastos de núcleos ovóides menos densos (Figs. 5.93 e 5.94).

Devido à persistência de uma zona cicatricial ao nível do tecido conjuntivo, as fibras de colagénio supra-alveolares apresentam-se descontínuas. Em algumas das lâminas analisadas é possível observar, na superfície radicular, lacunas de reabsorção do cimento que, por vezes, se estendem à dentina (Fig. 5.91).



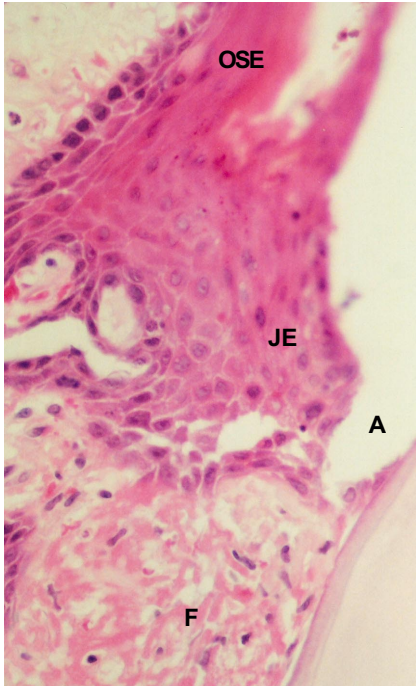


Figura 5.93

Pormenor do epitélio juncional (JE) (subgrupo IVb). (A – artefacto; OSE – epitélio sulcular; F – fibrina) (HE, 400x no original).

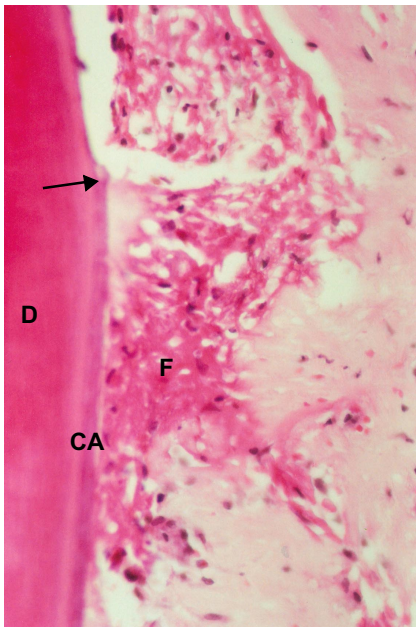


Figura 5.94

Imagem da zona de transição entre a superfície radicular manipulada e a não manipulada (seta) (subgrupo IVb). Na superfície manipulada é notória uma menor espessura do cimento radicular e a ausência de inserção de fibras de colagénio. Pelo contrário, na superfície radicular não manipulada é visível a manutenção da inserção de algumas fibras de colagénio no cimento acelular (CA), numa zona ocupada por fibrina (F). (D dentina) (HE, 400x no original).



15 dias (subgrupo IVc):

Aos quinze dias, a cicatrização dos tecidos periodontais superficiais está praticamente completa, não se observando a presença de um tecido cicatricial ou apresentando-se sob a forma de pequenas áreas vestigiais. Do processo de cicatrização resultou uma adesão epitelial à superfície radicular numa extensão relativamente longa, designando-se este epitélio por juncional longo. O limite coronal da adesão epitelial localiza-se apicalmente à junção amelo-cementária. Na maioria das amostras, a extensão apical da adesão epitelial situa-se na proximidade do limite apical da superfície radicular manipulada (Figs 5.95, 5.96 e 5.97).

Na superfície radicular não se observa a presença do tecido cicatricial, tendo sido substituído por tecido conjuntivo e pelo epitélio juncional longo. Tanto o tecido epitelial como o tecido conjuntivo apresentam algum infiltrado inflamatório. Na proximidade da extensão apical da adesão epitelial observam-se feixes de fibras de colagénio com inserção no cimento não manipulado, perpendiculares à superfície radicular. Estes feixes apresentam continuidade com o tecido conjuntivo, embora de uma forma pouco organizada (Fig. 5.96).

De acordo com estas observações, o processo de cicatrização de um retalho muco-perióstico resulta predominantemente na formação de uma adesão epitelial extensa sobre uma área radicular manipulada. Na superfície radicular não manipulada, ocorreu a reparação de algumas fibras de colagénio, cuja inserção não foi afectada pela intervenção cirúrgica.





Figura 5.95

Imagem de uma zona de cicatrização da margem gengival palatina, quinze dias após a execução de um retalho muco-perióstico simples (subgrupo IVc). Destaca-se a presença de epitélio juncional (JE) numa longa extensão da superfície radicular, embora apresente uma espessura muito reduzida. (D – dentina; OGE – epitélio oral da gengiva; JAC – junção amelo-cementária) (HE, 200x no original).

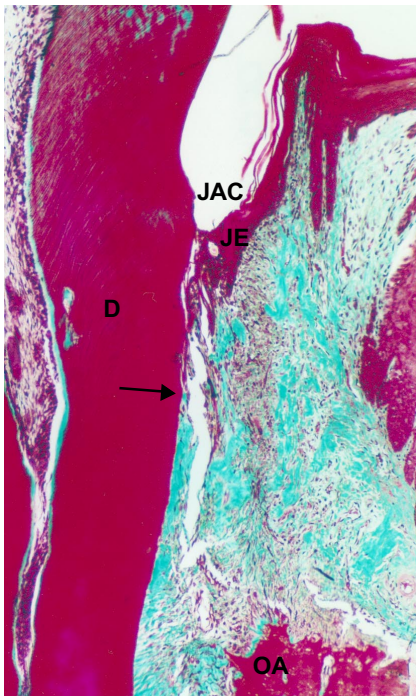


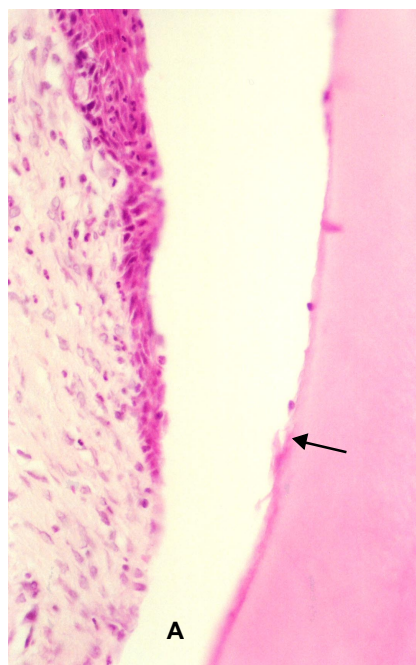
Figura 5.96

Imagem de uma zona de cicatrização da margem gengival palatina (subgrupo IVc), destacando-se a extensão do epitélio juncional (JE) ao longo da superfície radicular até à inserção de fibras de colagénio (seta). As fibras de colagénio supra-alveolares apresentam-se desorganizadas. (D – dentina; JAC – junção amelo-cementária; OA – osso alveolar) (TM, 100x no original).



Figura 5.97

Pormenor da extremidade apical do epitélio juncional longo (subgrupo IVc), localizando-se na zona de transição entre superfície radicular manipulada e a não manipulada (seta). (A – artefacto) (HE, 400x no original).



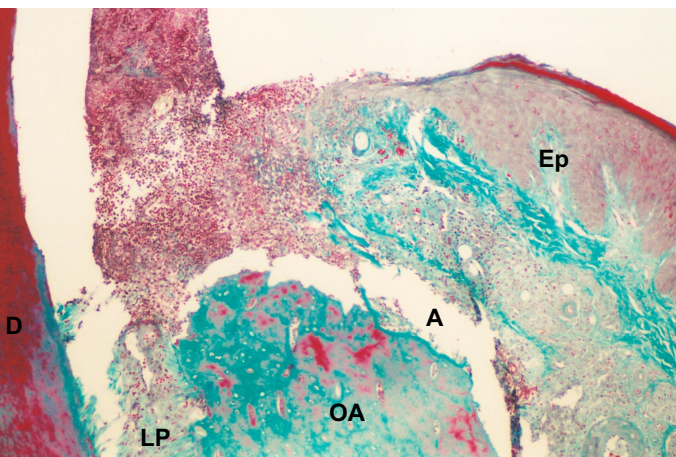


Figura 5.98

Zona cicatricial da margem gengival palatina, três dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA (subgrupo Va), mostrando uma área de erosão epitelial e uma zona extensa de tecido cicatricial entre a superfície dentária e a mucosa palatina. (D – dentina, LP – ligamento periodontal, OA – osso alveolar, Ep – epitélio da mucosa palatina, A - artefacto) (TM, 100x no original).

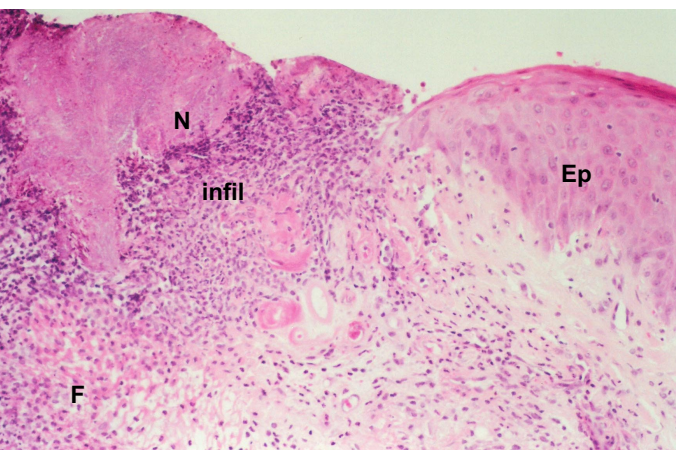


Figura 5.99

Pormenor da periferia de uma zona erosiva do revestimento epitelial palatino (subgrupo Va). Adjacente ao epitélio (Ep) observa-se um acentuado infiltrado inflamatório (infil) e, à superfície, uma área de necrose tecidual (N). Mais profundamente é visível uma área ocupada por fibrina (F), na qual se observam algumas células inflamatórias. (HE, 200x no original).



b.3.2.2. Retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA - Grupo V

3 dias (subgrupo Va)

Aos três dias de evolução, evidencia-se uma área de erosão epitelial de dimensão relativamente grande, correspondente à zona de aplicação do EDTA, ou seja à margem gengival palatina e parte da mucosa palatina do segundo molar superior. Em algumas amostras esta área de erosão abrange grande parte da mucosa palatina, restando uma pequena zona de epitélio queratinizado palatino, perto da sutura palatina. A área de erosão circunscreve-se ao epitélio, não tendo sido detectada, em nenhuma das amostras, qualquer ulceração grave do tecido conjuntivo subepitelial com exposição de tecido ósseo. Esta área de erosão apresenta, superficialmente, um tecido necrótico, subjacente ao qual se destaca um acentuado infiltrado inflamatório com predomínio de PMN (Figs. 5.98, 5.99, 5.100 e 5.101).

Na margem dentária, no tecido conjuntivo gengival subjacente à área erosiva, observa-se um intenso infiltrado inflamatório constituído por PMN e linfócitos. Na zona supra-alveolar, para além deste infiltrado, identifica-se uma extensa área ocupada por fibrina, a qual se apresenta povoada por células inflamatórias mononucleares e alguns glóbulos vermelhos (Figs. 5.98 e 5.101).

À semelhança do que se observou no subgrupo IVa, a superfície radicular manipulada apresenta-se com uma espessura reduzida de cimento e ausência de inserção de fibras de colagénio. Apicalmente, na superfície radicular não manipulada supra-alveolar, é visível a inserção de fibras de colagénio, as quais, contudo, não apresentam continuidade com o tecido conjuntivo gengival. A porção mais coronal do ligamento periodontal apresenta um infiltrado inflamatório, sendo escassos os feixes de fibras de colagénio (Fig. 5.98).



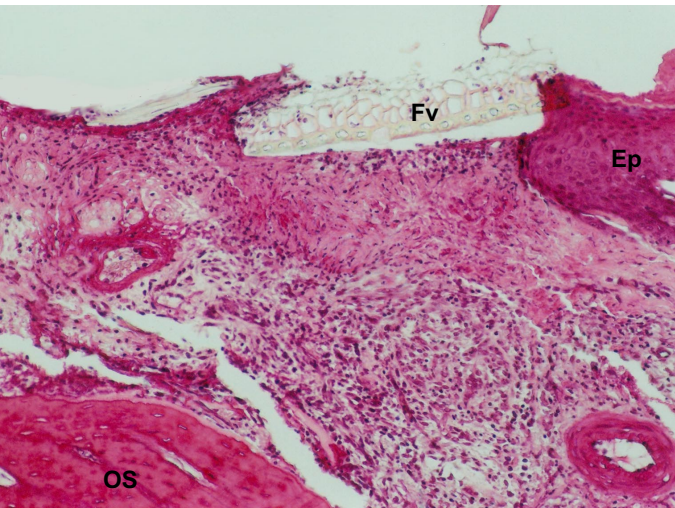


Figura 5.100

Imagem de uma zona de cicatrização da mucosa palatina (subgrupo Va). Destaca-se a existência de uma área erosiva no revestimento epitelial (Ep) da mucosa palatina, com exposição do tecido conjuntivo, o qual apresenta um intenso infiltrado inflamatório. (Os – tecido ósseo, Fv – fragmento de fibra vegetal) (HE, 200x no original).

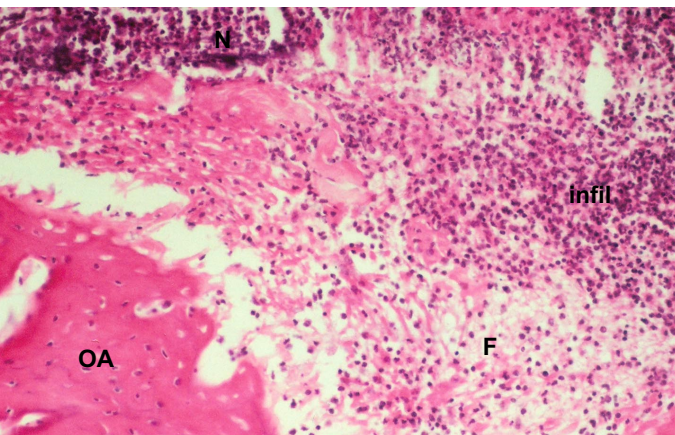


Figura 5.101

Aspecto de uma área supra-alveolar ocupada por tecido cicatricial (subgrupo Va). Nesta área distinguem-se três zonas: necrose (N) superficial, um intenso infiltrado inflamatório (infil) e, mais profundamente, fibrina (F) com algumas células inflamatórias mononucleadas. (OA – osso alveolar) (HE, 200x no original).

Figura 5.102

Imagem demonstrando uma extensão epitelial numa área de cicatrização, oito dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA (subgrupo Vb). As células epiteliais proliferam em direcção à superfície radicular, sobre o tecido conjuntivo (tc), separando-o da zona cicatricial constituída por um intenso infiltrado inflamatório (infil). (Ep – epitélio queratinizado da mucosa palatina) (TM, 200x no original).

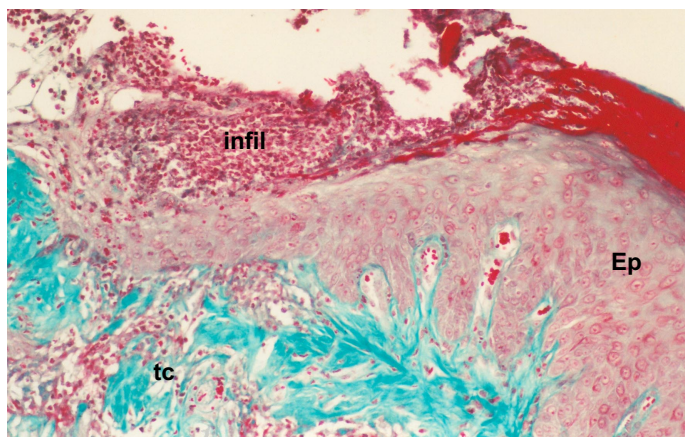
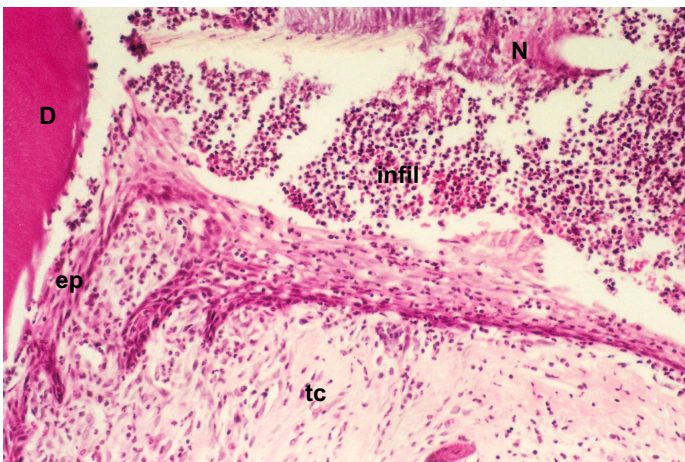


Figura 5.103

Imagem de uma zona justa-radicular (subgrupo Vb) mostrando células epiteliais sobre a superfície radicular, representativas da proliferação epitelial (ep). O epitélio separa o tecido conjuntivo (tc) de um intenso infiltrado inflamatório (infil) e necrose (N) da zona cicatricial. (D – dentina) (HE, 200x no original).



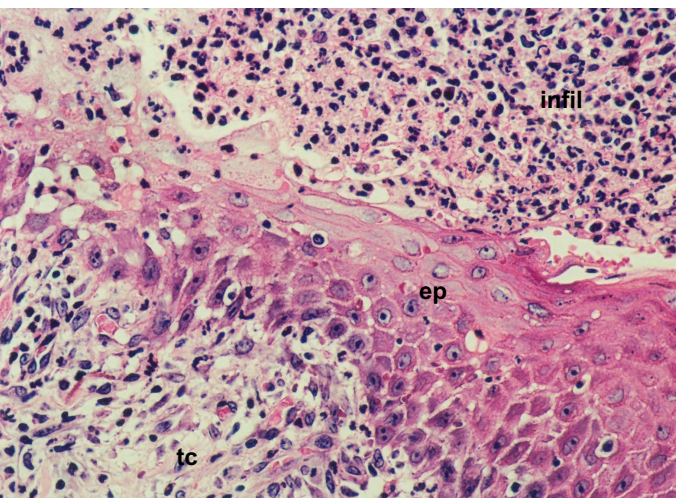


Figura 5.104

Pormenor da presença de células epiteliais (ep) separando um intenso infiltrado inflamatório (infil) do tecido conjuntivo gengival (tc) (subgrupo Vb). (HE, 400x no original).

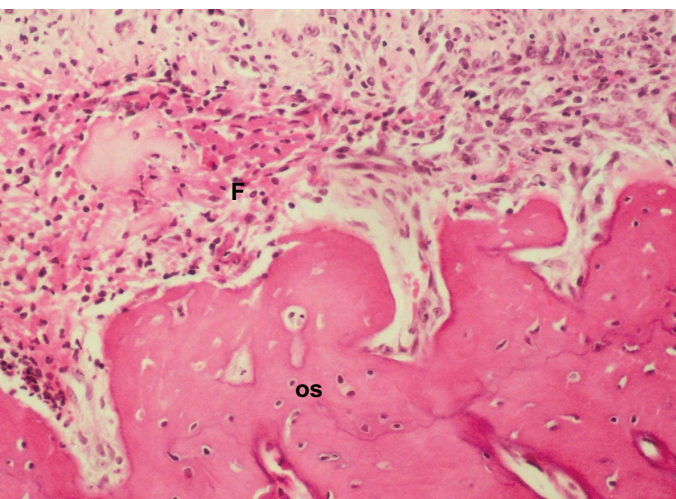


Figura 5.105

Aspecto da vertente palatina do tecido ósseo (os) (subgrupo Vb), adjacente a uma área ocupada por fibrina (F) povoada por inúmeras células. A superfície óssea apresenta-se muito irregular, evidenciando remodelação óssea. (HE, 200x no original).



8 dias (subgrupo Vb)

Aos oito dias de evolução, observa-se uma re-epitelização da zona erosiva, uma vez que o revestimento epitelial se localiza mais próximo da superfície radicular, comparativamente ao subgrupo Va. Em algumas amostras, a re-epitelização é completa, constatando-se a presença de células epiteliais sobre a superfície radicular muito embora, em nenhum dos casos, se identifique uma reconstituição total da adesão epitelial (Figs 5.102 e 5.103). Nos casos de re-epitelização parcial, as células do epitélio proliferam sobre o tecido conjuntivo e áreas de fibrina, delimitando superficialmente uma zona constituída por um intenso infiltrado inflamatório e necrose (Figs. 5.103 e 5.104).

Comparativamente ao período anterior (subgrupo Va), o tecido conjuntivo gengival apresenta um infiltrado inflamatório menos intenso com predomínio de PMN e linfócitos. Identifica-se ainda uma zona de tecido cicatricial entre a superfície radicular e a crista alveolar, sendo maioritariamente composto por fibrina povoada por inúmeras células inflamatórias e alguns fibroblastos (Fig. 5.105).

A superfície da crista alveolar, tanto na vertente palatina como na vertente periodontal, apresenta-se muito irregular, observando-se, em algumas lâminas, áreas de reabsorção óssea com a presença de células multinucleadas compatíveis morfológicamente com osteoclastos (Figs. 5.105 e 5.106).

Ao nível da superfície radicular, as fibras de colagénio com inserção na superfície radicular não manipulada mantêm a descontinuidade com o tecido conjuntivo gengival (Fig. 5.107).



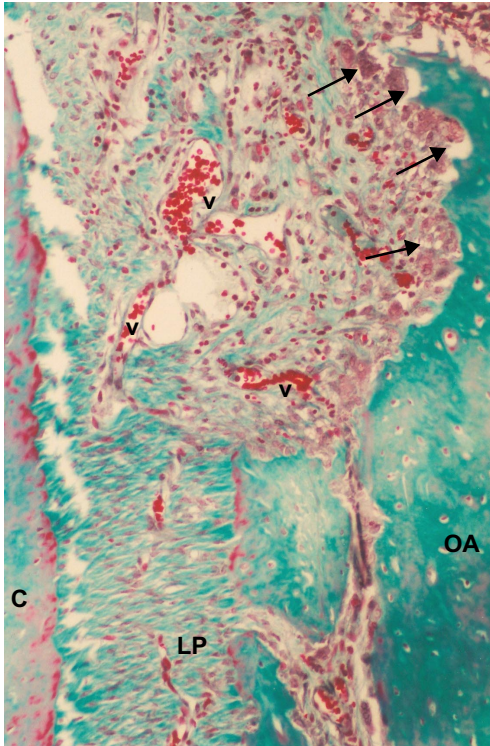


Figura 5.106

Imagem de uma zona coronal do ligamento periodontal (subgrupo Vb), que apresenta uma desorganização clara dos feixes de fibras de colagénio e inúmeros vasos (v) ectásicos. Adjacente a esta área, no osso alveolar (OA) observa-se uma extensa área de reabsorção óssea, identificando-se células multinucleadas (setas). A porção mais apical do ligamento periodontal (LP) não mostra alterações significativas. (C – cemento radicular) (TM, 200x no original).

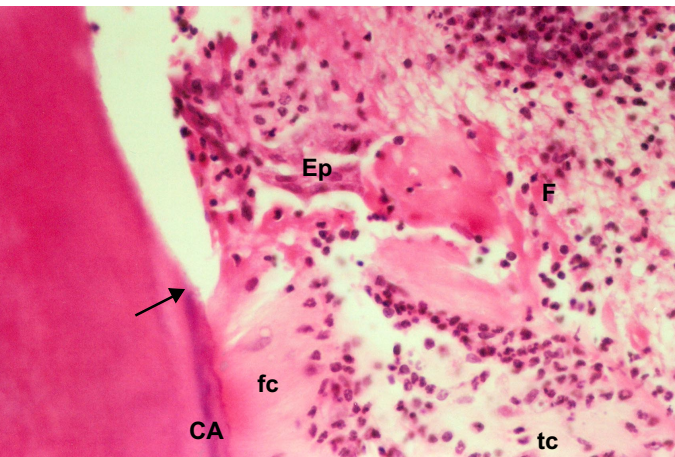


Figura 5.107

Aspecto de uma zona de transição entre a superfície radicular manipulada e não manipulada (seta) (subgrupo Vb). Adjacente à superfície radicular manipulada, é visível uma área de fibrina (F) infiltrada por células maioritariamente inflamatórias, sendo possível identificar algumas células epiteliais (Ep). Na superfície radicular não manipulada, numa situação mais apical, destaca-se a inserção de fibras de colagénio (fc) no cemento acelular (CA). (tc – tecido conjuntivo) (HE, 400x no original).



15 dias (subgrupo Vc)

Neste tempo pós-operatório observa-se a cicatrização completa da margem gengival, resultado da re-epitelização total da área erosiva em todas as amostras. No revestimento da margem gengival é possível identificar os seguintes tipos de epitélio: o epitélio oral da gengiva, queratinizado, o epitélio sulcular, também queratinizado, e o epitélio juncional não queratinizado, sendo este último o que mostra maiores alterações. Efectivamente, tanto o epitélio oral da gengiva como o epitélio sulcular, evidenciam características morfológicas que não se desviam muito das observadas no grupo I. Pelo contrário, devido ao processo proliferativo, o epitélio juncional apresenta um manifesto aumento da sua extensão apico-coronal, resultando numa maior área de adesão epitelial à superfície radicular. Estas características permitem a sua designação por epitélio juncional longo. Em todas as amostras, a sua extremidade coronal localiza-se apicalmente à junção amelo-cementária, enquanto que a sua extensão apical se localiza nas imediações da transição entre o cimento manipulado e o não manipulado (Figs. 5.108, 5.109, 5.110 e 5.111).

Tal como se verificou no grupo IVc, aos quinze dias de evolução, não é possível identificar áreas de fibrina no tecido conjuntivo gengival. Contudo, este tecido apresenta um infiltrado inflamatório, particularmente acentuado na área subepitelial. As fibras de colagénio supra-alveolares, inseridas na superfície radicular não manipulada, apresentam continuidade com o tecido conjuntivo gengival, embora não apresentem uma distribuição e orientação homogéneas (Figs. 5.108 e 5.111).

Em algumas amostras, observaram-se áreas de reabsorção radicular relativamente extensas (Fig. 5.110).

Da apreciação global do processo cicatricial após descolamento de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA, embora numa fase inicial se tenha





Figura 5.108

Imagem de uma margem gengival palatina, quinze dias após a execução de um retalho muco-perióstico e aplicação de EDTA (subgrupo Vc). O epitélio juncional longo (JE) apresenta uma adesão radicular, localizando-se apicalmente à junção amelo-cementária (JAC). Um infiltrado inflamatório intenso destaca-se ainda na área do tecido conjuntivo supra-alveolar. (D – dentina, LP – ligamento periodontal, OA – osso alveolar, OSE – epitélio sulcular, OGE - epitélio oral da gengiva) (HE, 100x no original).

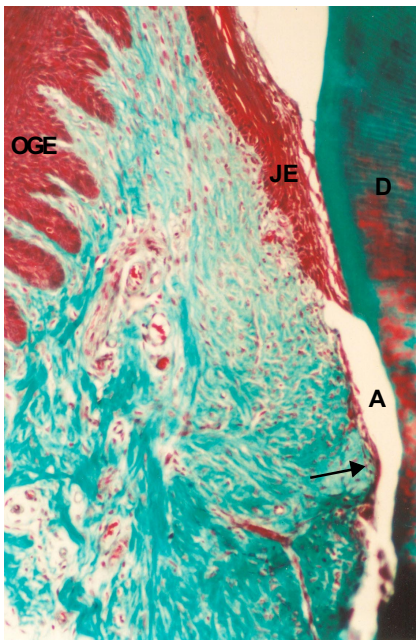


Figura 5.109

Pormenor de uma extensão do epitélio juncional (JE) ao longo da superfície radicular (subgrupo Vc). Apesar da existência de um artefacto técnico (A), é possível identificar uma estreita faixa de células epiteliais (seta) que se localiza ao longo da superfície radicular manipulada, não se identificando qualquer inserção de fibras de colagénio nessa superfície. (D - dentina; OGE – epitélio oral da gengiva) (TM, 200x no original).

Figura 5.110

Pormenor da extremidade apical de um epitélio juncional longo (JE) (subgrupo Vc). Este epitélio localiza-se numa área radicular, apical à junção amelo-cementária. Destaca-se uma extensa área de reabsorção radicular (reab). Entre as células epiteliais são visíveis alguns corpos estranhos: fragmentos de fibras vegetais (***) e um pêlo em corte transversal (*). (D – dentina) (HE, 200x no original).

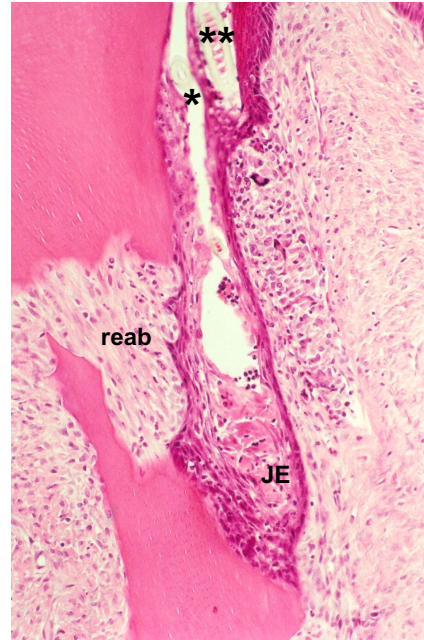


Figura 5.111

Pormenor da extremidade apical do epitélio juncional longo (JE) (subgrupo Vc). Neste caso, o epitélio proliferou até uma área de cimento celular (CC), para além da área radicular manipulada (seta). No tecido conjuntivo destaca-se a presença de um infiltrado inflamatório e de um corpo estranho (*) que se localiza profundamente. (D – dentina) (HE, 200x no original).

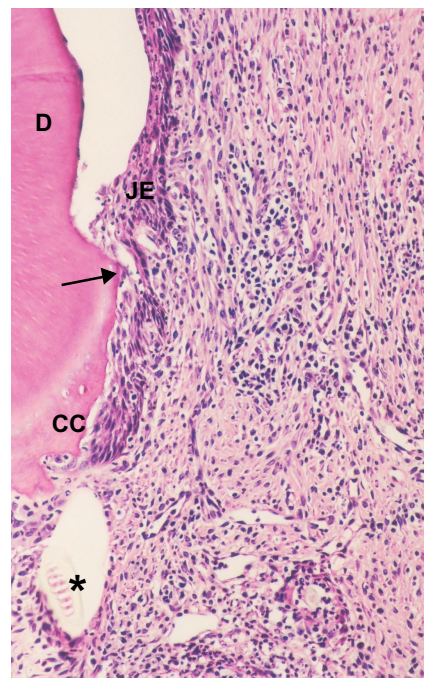




Figura 5.112

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina, três dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de PGA (subgrupo VIa). Observa-se uma área ocupada por fibrina (F) e colonizada por inúmeras células inflamatórias. Destaca-se a extensão do epitélio juncional (JE) sobre o tecido conjuntivo, em direcção à superfície dentária. (OSE – epitélio sulcular; OA – osso alveolar; D – dentina) (HE, 200x no original).

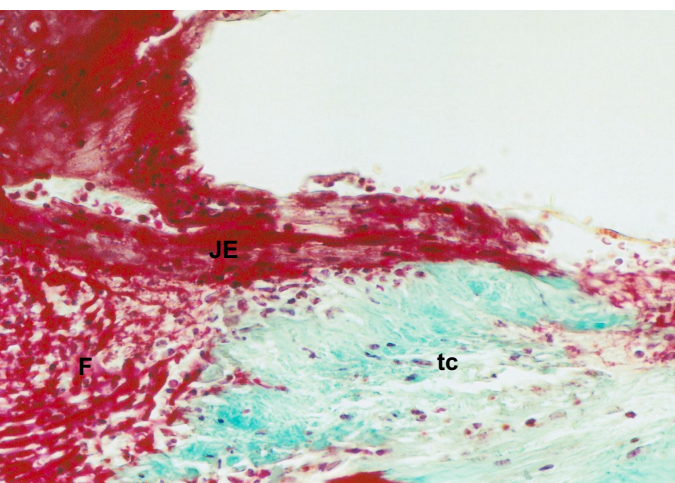


Figura 5.113

Pormenor de uma extensão do epitélio juncional (JE) sobre o tecido conjuntivo (tc) (subgrupo VIa). (F - fibrina) (TM, 400x no original).



verificado uma acentuada erosão epitelial, resulta o restabelecimento de uma adesão predominantemente epitelial, não se observando anquilose radicular. Em alguns casos, a reabsorção radicular revelou ser significativa.

b.3.2.3. Retalho muco-perióstico com aplicação de PGA - Grupo VI

A observação dos cortes histológicos deste grupo demonstrou que as alterações observadas nos três subgrupos são, de um modo geral, sobreponíveis às descritas no grupo IV.

3 dias (subgrupo VIa):

Este período pós-operatório mostra a fase inicial da cicatrização de um retalho muco-perióstico com aplicação de PGA. Na maioria das amostras observa-se a interposição de um tecido cicatricial entre o revestimento epitelial e a superfície radicular, não se verificando a presença de uma adesão epitelial. À semelhança do observado no subgrupo IVa, o tecido cicatricial prolonga-se até à crista alveolar e é constituído por três zonas distintas: a mais superficial caracterizada por uma grande densidade celular mas com sinais de necrose, uma zona intermédia com intenso infiltrado inflamatório e, mais profundamente, uma zona ocupada por fibrina colonizada por diversas células, entre as quais se destacam células inflamatórias e alguns glóbulos vermelhos. Comparativamente ao subgrupo IVa, o tecido cicatricial ocupa uma área mais extensa, sendo a zona de fibrina a mais ampla.

A margem epitelial da ferida é constituída por um epitélio pavimentoso não queratinizado com um reduzido número de camadas celulares, representando uma fase precoce da cicatrização epitelial após uma incisão cirúrgica. Em algumas lâminas, é possível identificar células epiteliais a proliferar em direcção à superfície radicular (Figs. 5.112 e 5.113).

Na superfície radicular é possível distinguir o cimento que sofreu alisamento, daquele que não foi manipulado, uma vez que este último se localiza mais



apicalmente, em continuidade com o cimento onde se inserem fibras de Sharpey do ligamento periodontal. Por interposição da área ocupada por fibrina do tecido cicatricial, as fibras de colagénio inseridas no cimento radicular não manipulado apresentam uma solução de continuidade, não se prolongando com as fibras de colagénio do tecido conjuntivo gengival. No tecido conjuntivo gengival remanescente observam-se inúmeras células inflamatórias mononucleares que derivam do processo inflamatório associado ao trauma cirúrgico e, eventualmente também, da presença residual de PGA (Fig. 5.114).

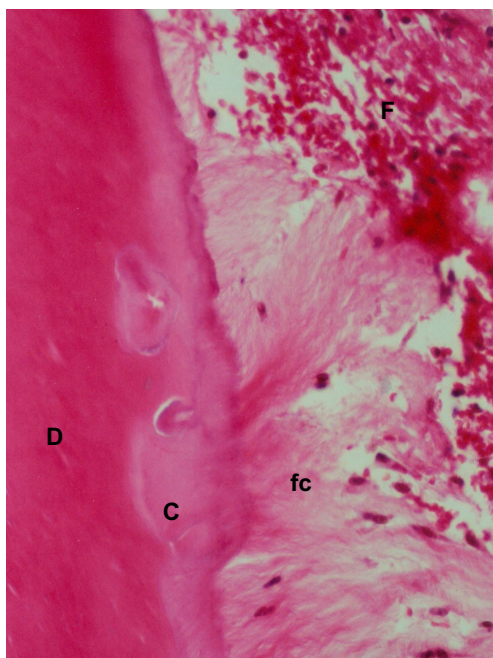


Figura 5.114

Aspecto de uma superfície radicular não manipulada, adjacente a uma zona ocupada por fibrina (F) povoada por inúmeros glóbulos vermelhos (subgrupo VIa). Destaca-se a solução de continuidade das fibras de colagénio (fc) com inserção no cimento radicular (C). (D – dentina) (HE, 400x no original).

**8 dias (subgrupo VIb):**

Neste subgrupo observa-se a evolução do processo cicatricial. Na verdade, verifica-se o restabelecimento da adesão epitelial, por proliferação do epitélio juncional, o qual, para além de apresentar alguns prolongamentos epiteliais, adere à superfície radicular numa localização apical à junção amelo-cementária (Figs. 5.115 e 5.116) .

No tecido conjuntivo subepitelial destaca-se um infiltrado inflamatório, com predomínio de células mononucleadas. Comparativamente ao período de tempo anterior (subgrupo VIa), a área ocupada por fibrina é relativamente menor, estendendo-se desde a superfície radicular, apicalmente à adesão epitelial, até à vertente palatina do osso alveolar. Sublinhe-se ainda que se apresenta povoada por um maior número de fibroblastos. Devido à presença da área ocupada por fibrina, as fibras de colagénio com inserção no cimento radicular não manipulado não apresentam continuidade com o tecido conjuntivo gengival (Fig. 5.115).

15 dias (subgrupo VIc):

Aos quinze dias de pós-operatório, à semelhança do que se observou no subgrupo IVc, verifica-se uma cicatrização praticamente completa. Do processo cicatricial resultou a formação de um epitélio juncional longo, traduzindo uma adesão epitelial à superfície radicular numa grande extensão apico-coronal, sendo no entanto constituído por escassas camadas celulares. O limite apical do epitélio situa-se nas imediações da transição entre a superfície radicular manipulada e a não manipulada (Figs 5.117, 5.118 e 5.119).

O tecido conjuntivo gengival apresenta algumas áreas com infiltrado inflamatório, localizadas mais frequentemente junto ao epitélio juncional longo. Na maioria dos cortes deste período de evolução, não se observa qualquer área de fibrina. Apicalmente ao epitélio juncional longo, é possível detectar fibras de colagénio inseridas numa área de cimento radicular não manipulado,



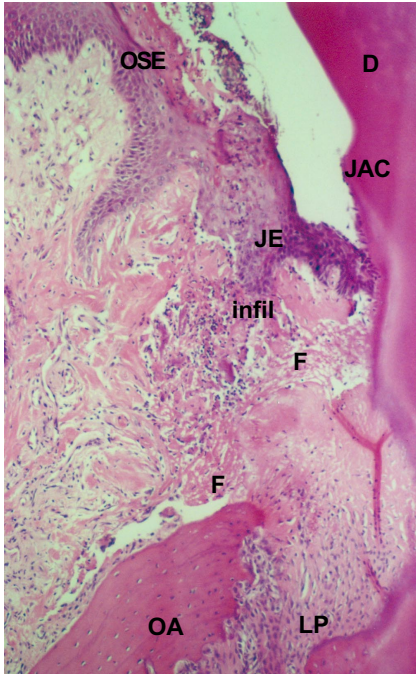


Figura 5.115

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina, oito dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de PGA (subgrupo VIb). O epitélio juncional (JE) adere à superfície radicular, apicalmente à junção amelo-cementária (JAC). Subjacente a este epitélio é visível uma área com marcado infiltrado inflamatório (infil) e uma faixa de fibrina (F) que interrompem as fibras de colagénio supra-alveolares. (OSE – epitélio sulcular; OA – osso alveolar; D – dentina; LP – ligamento periodontal) (HE, 100x no original).

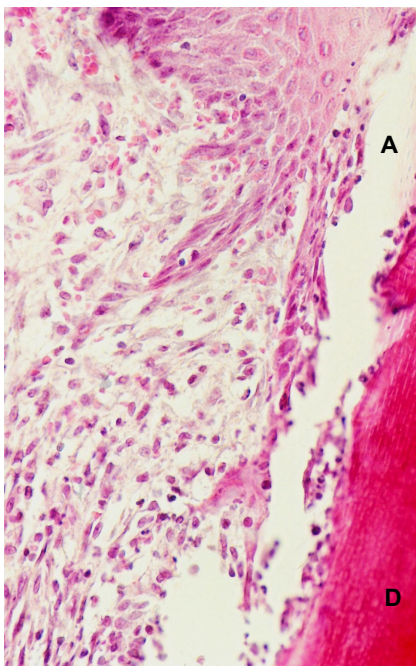


Figura 5.116

Pormenor da presença de células epiteliais ao longo da superfície radicular. (D – dentina; A – artefacto) (HE, 400x no original).

Figura 5.117

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina, quinze dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de PGA (subgrupo VIc). O epitélio juncional (JE) adere à superfície radicular numa grande extensão, apicalmente à junção amelo-cementária (JAC). Observa-se uma pequena área de infiltrado inflamatório (infil) no tecido conjuntivo subepitelial. As fibras de colagénio apresentam alguma homogeneidade na área supra-alveolar. (OSE – epitélio sulcular; OGE – epitélio oral da gengiva; OA – osso alveolar) (HE, 100x no original).



Figura 5.118

Pormenor da adesão do epitélio juncional (JE) a uma superfície radicular manipulada (subgrupo VIc). Destaca-se o reduzido número de camadas celulares que compõem este epitélio. O cemento radicular (C) apresenta-se também diminuído na sua espessura devido à raspagem efectuada. (D – dentina; A – artefacto) (HE, 400x no original).



perpendicularmente à superfície radicular. Essas fibras prolongam-se para o tecido conjuntivo gengival, embora de uma forma heterogênea (Figs. 5.117 e 5.119). Na superfície radicular não se observaram lesões significativas de reabsorção radicular.

Das observações efectuadas, verifica-se que a organização e a constituição histológica do processo de cicatrização de um retalho muco-perióstico após a aplicação de PGA resulta na formação de um epitélio juncional longo.

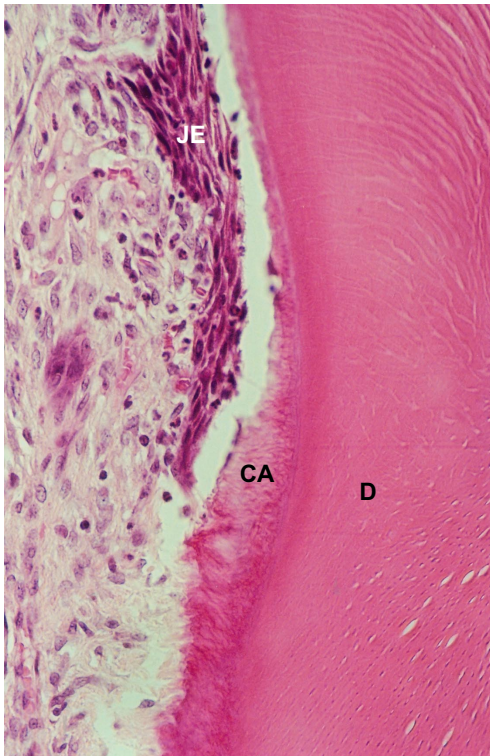


Figura 5.119

Pormenor da extremidade apical de um epitélio juncional longo (JE) (subgrupo VIc). A adesão epitelial estende-se até uma zona em que o cemento radicular apresenta um aumento significativo da sua espessura. Apicalmente ao epitélio, observa-se a inserção de fibras de colagénio sobre o cemento acelular (CA), não manipulado. (D – dentina) (HE, 400x no original).



b.3.2.4. Retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida da aplicação de PGA - Grupo VII

A avaliação histológica das lâminas deste grupo mostra algumas alterações morfológicas que, de um modo geral, se assemelham às observadas nos grupos IV e VI.

3 dias (subgrupo VIIa):

Neste subgrupo verifica-se um processo cicatricial inicial do retalho muco-perióstico, destacando-se a presença de tecido cicatricial entre o revestimento epitelial e a superfície radicular, razão pela qual não se observa adesão epitelial. O tecido cicatricial é formado por uma zona superficial de grande densidade celular e necrose, subjacente à qual se observa uma área de intenso infiltrado inflamatório e mais profundamente identifica-se uma extensa área de fibrina povoada por células, entre as quais se distinguem glóbulos vermelhos e células inflamatórias mononucleadas. Esta área de fibrina prolonga-se até à vertente palatina do osso alveolar, correspondendo à zona de intervenção cirúrgica (Figs. 5.120 e 5.121).

Na grande maioria das amostras, a margem do revestimento epitelial é constituída por um epitélio pavimentoso queratinizado. No entanto, em alguns casos é possível identificar a proliferação de células epiteliais dissociando o tecido cicatricial (Fig. 5.122). Em raras amostras observam-se lesões erosivas da margem epitelial, sendo contudo pouco significativas.

Devido à presença da área de fibrina, as fibras de colagénio inseridas no cimento não manipulado não apresentam continuidade com o tecido conjuntivo gengival (Fig. 5.120).

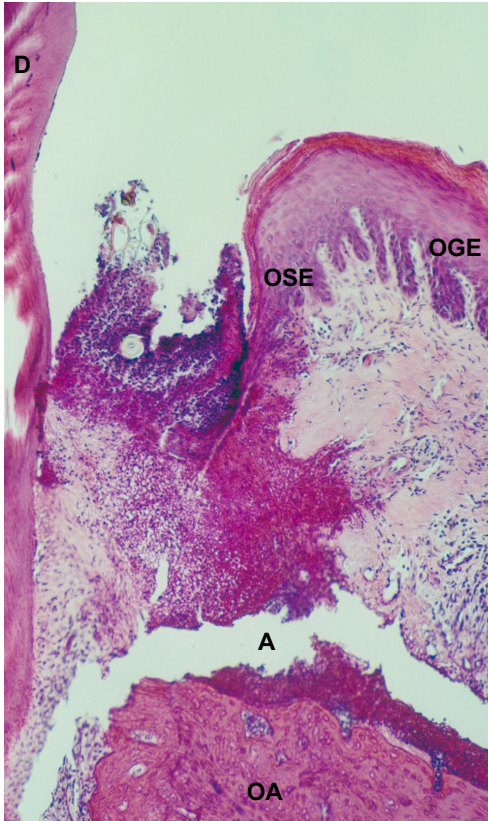


Figura 5.120

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina, três dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida de PGA (subgrupo VIIa). Destaca-se uma solução de continuidade entre o revestimento epitelial e a superfície radicular ocupada por tecido cicatricial que se prolonga até à superfície óssea supra-alveolar. (D – dentina; OGE – epitélio gengival oral; OSE – epitélio sulcular; OA – osso alveolar; A - artefacto) (HE, 100x no original).



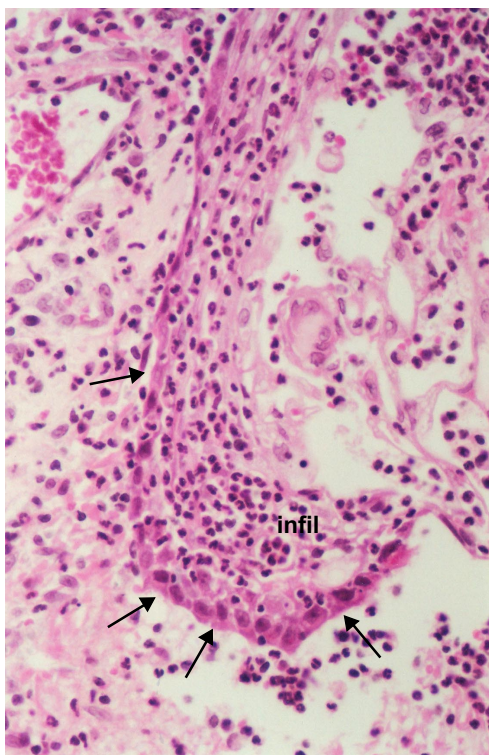
Figura 5.121

Pormenor do tecido cicatricial (subgrupo VIIa), identificando-se uma zona de necrose (N), uma zona de intenso infiltrado inflamatório (infil) e uma zona de fibrina (F) colonizada maioritariamente por células inflamatórias mononucleares. (* - pêlo em corte transversal) (HE, 400x no original).



Figura 5.122

Aspecto da presença de células epiteliais (setas) subjacentes a um intenso infiltrado inflamatório (infil) (subgrupo VIIa). (HE, 400x no original).



8 dias (subgrupo VIIb):

Neste período de tempo pós-operatório verifica-se uma evolução do processo cicatricial, sendo de destacar o restabelecimento da adesão epitelial à superfície radicular, resultante da proliferação epitelial, substituindo parcialmente o tecido cicatricial, nomeadamente a zona de necrose superficial, o intenso infiltrado inflamatório e parte da área ocupada por fibrina. Quando comparada com o subgrupo VIIa, a área de fibrina apresenta-se mais reduzida e infiltrada por células mononucleares e alguns fibroblastos (Figs. 5.123 e 5.124).

As fibras de colagénio com inserção na superfície radicular não manipulada apresentam descontinuidade com as fibras colagénicas do tecido conjuntivo gengival, devido à presença da área ocupada por fibrina (Fig. 5.123).

Em alguns cortes, a superfície da crista óssea alveolar apresenta-se muito irregular, demonstrativa de remodelação óssea, sendo possível observar a presença de osteoclastos (Figs. 5.124 e 5.125).

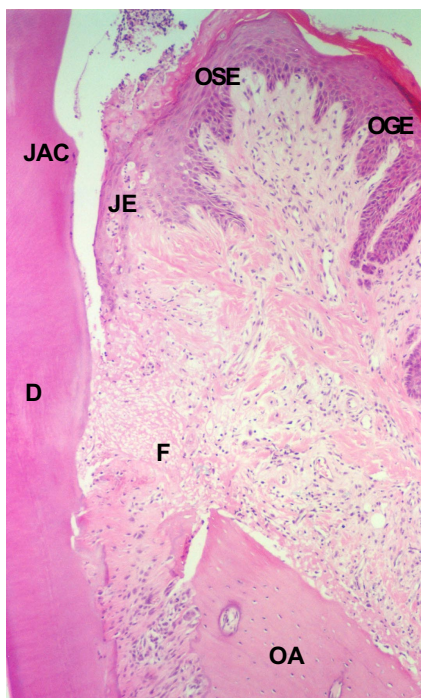


Figura 5.123

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina, oito dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida de PGA (subgrupo VIIb). O epitélio juncional (JE) estende-se ao longo da superfície radicular, apicalmente à junção amelo-cementária (JAC). Destaca-se uma área de fibrina (F) localizada entre a raiz e a superfície óssea supra-alveolar, com uma descontinuidade das fibras de colagénio. (D – dentina; OGE – epitélio oral da gengiva; OSE – epitélio sulcular; OA – osso alveolar) (HE, 100x no original).



Figura 5.124

Pormenor de um prolongamento epitelial (ep) observado numa zona de fibrina (F) localizada na proximidade da superfície óssea alveolar (OA) (subgrupo VIIb). Sobre o tecido ósseo destaca-se a presença de células multinucleadas (*), provavelmente osteoclastos. (HE, 400x no original).

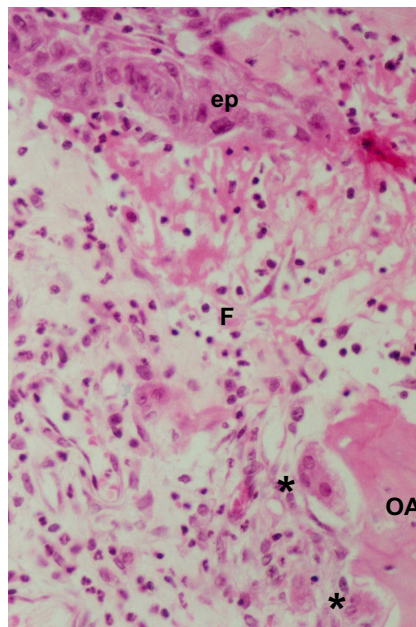
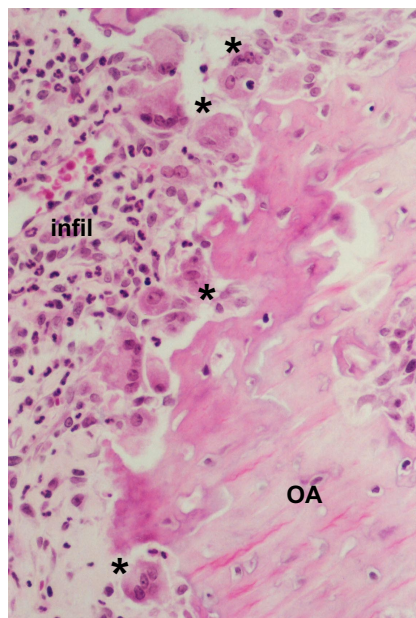


Figura 5.125

Pormenor da superfície óssea alveolar (OA) demonstrando remodelação óssea numa área adjacente a um infiltrado inflamatório (infil). Destacam-se várias células multinucleadas, provavelmente osteoclastos (*). (HE, 400x no original).



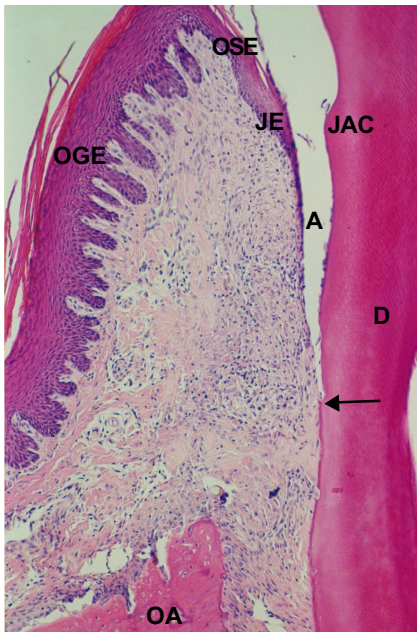


Figura 5.126

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina, quinze dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida de PGA (subgrupo VIIc). O epitélio juncional (JE) estende-se ao longo de uma grande extensão radicular. O tecido conjuntivo justa-radicular apresenta algum infiltrado inflamatório e uma desorganização das fibras de colagénio. Apicalmente à adesão epitelial, fibras de colagénio supra-alveolares inserem-se no cimento radicular não manipulado (seta) e apresentam continuidade com o tecido conjuntivo gengival. (OGE – epitélio oral da gengiva; OSE – epitélio sulcular; A – artefacto; D – dentina; OA – osso alveolar; JAC – junção amelo-cementária) (HE, 100x no original).



15 dias (subgrupo VIIc):

Aos quinze dias de evolução, o processo de cicatrização está praticamente concluído, com a formação de um epitélio juncional longo. O limite coronal deste epitélio localiza-se apicalmente à junção amelo-cementária, enquanto que o seu limite apical situa-se nas imediações da zona de transição entre a superfície radicular que sofreu raspagem e a não manipulada (Figs. 5.126 e 5.127).

Apicalmente à adesão do epitélio juncional longo, observa-se a inserção perpendicular de fibras de colagénio supra-alveolares no cimento não manipulado. Estas fibras, embora de um modo desordenado, mostram ter continuidade com as fibras de colagénio do tecido conjuntivo gengival (Figs. 5.126 e 5.128).

De acordo com as observações descritas, é possível afirmar que o processo cicatricial de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida por PGA resulta na formação de uma adesão predominantemente epitelial, representada por um epitélio juncional longo. Não se observaram imagens de anquilose nem de reabsorção radicular significativa.



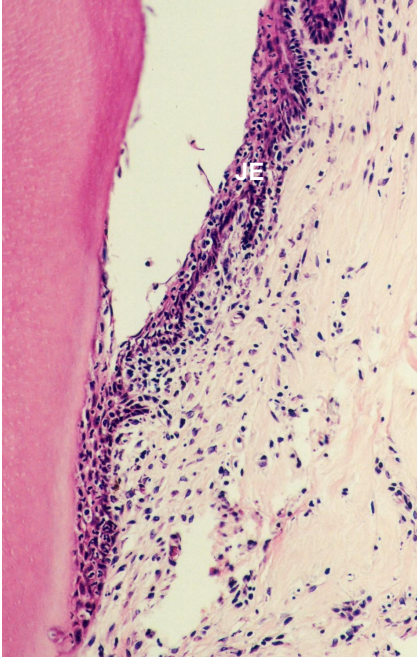


Figura 5.127

Pormenor da extremidade apical de um epitélio juncional longo (JE) (subgrupo VIIc) numa área não manipulada da raiz. Observa-se um elevado número de células inflamatórias entre as células epiteliais. (HE, 200x no original).

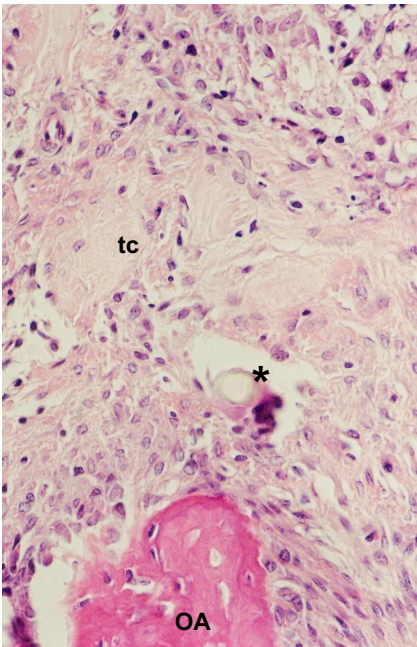


Figura 5.128

Pormenor da área supra-alveolar da figura 5.126 (subgrupo VIIc), destacando-se a inclusão de um pêlo em corte transversal (*), numa localização muito profunda do tecido conjuntivo. Numa zona mais coronal, o tecido conjuntivo (tc) apresenta uma grande densidade celular e desorganização das fibras de colagénio, não estando ainda completo o processo cicatricial. (OA – osso alveolar) (HE, 400x no original).



b.3.2.5. Retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida da aplicação de EMD - Grupo VIII

3 dias (subgrupo VIIIa)

Este subgrupo, aos três dias de evolução, mostra uma fase inicial do processo de cicatrização, à semelhança dos subgrupos com o mesmo tempo de evolução, exceção feita ao subgrupo Va. Com efeito, observa-se uma solução de continuidade ocupada por um tecido cicatricial localizado entre o revestimento epitelial e a superfície radicular, o qual se prolonga à vertente palatina do osso alveolar. Neste tecido cicatricial diferenciam-se duas áreas: uma superficial caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório e algumas zonas de necrose e, subjacente a esta, uma área ocupada por fibrina povoada por células inflamatórias mononucleares e alguns glóbulos vermelhos (Figs. 5.129, 5.130 e 5.131).

A margem do revestimento epitelial é constituída por um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Em algumas lâminas observa-se a presença de células epiteliais localizadas na demarcação do tecido conjuntivo com a área de intenso infiltrado inflamatório, demonstrando uma proliferação epitelial em direcção à superfície radicular (Figs. 5.132, 5.133 e 5.134).

Ao nível da superfície radicular é possível distinguir a área da raiz sujeita a raspagem da não manipulada. Enquanto que a primeira mostra uma espessura de cemento reduzida ou mesmo ausente, sem inserção de fibras colagénicas, a superfície não manipulada apresenta cemento acelular com fibras de colagénio nele inseridas. Contudo, estas fibras não exibem continuidade com as fibras do tecido conjuntivo gengival devido à presença de uma área de fibrina (Figs. 5.129 e 5.135).



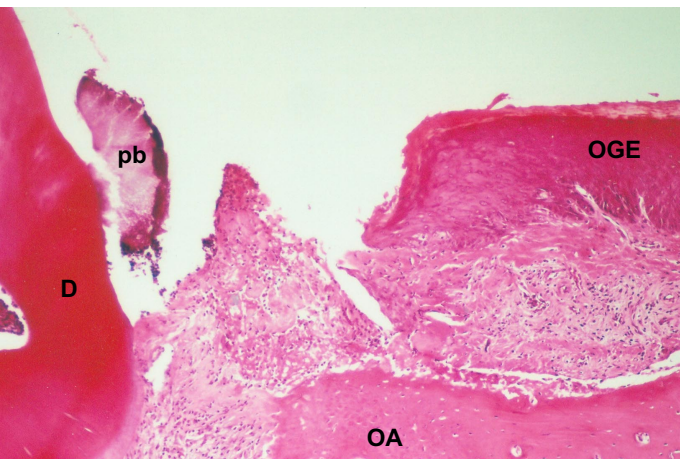


Figura 5.129

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina, três dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida por EMD (subgrupo VIIIa). Destaca-se uma solução de continuidade entre o revestimento epitelial e a superfície dentária, ocupada por um tecido cicatricial. (OGE – epitélio oral da gengiva; D – dentina; OA – osso alveolar; pb – placa bacteriana) (HE, 100x no original).

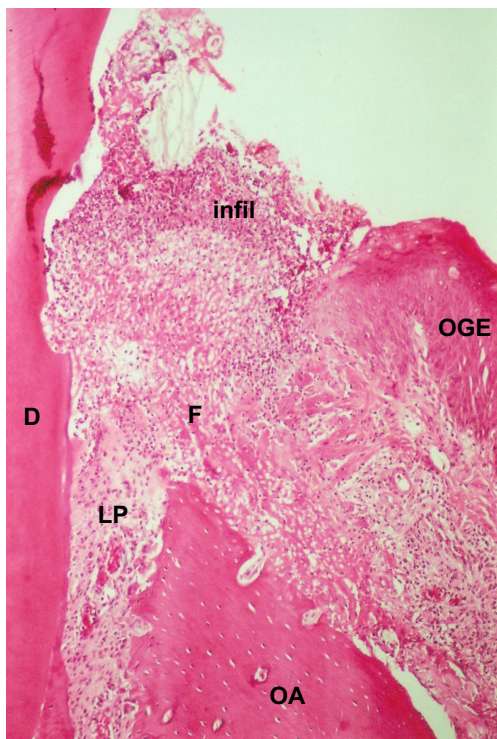


Figura 5.130

Aspecto de uma zona cicatricial da margem gengival palatina (subgrupo VIIIa). No tecido cicatricial localizado entre o revestimento epitelial e a superfície radicular distingue-se uma zona superficial de intenso infiltrado inflamatório (infil) e mais profundamente uma extensa área ocupada por fibrina (F) povoada por algumas células, que se prolonga até à vertente palatina do osso alveolar (OA). (OGE – epitélio oral da gengiva; D – dentina; LP – ligamento periodontal) (HE, 100x no original).

Figura 5.131

Pormenor do tecido cicatricial localizado na área supra-alveolar (subgrupo VIIIa) onde é visível uma zona ocupada por fibrina (F) colonizada por células mononucleares, derivadas do processo inflamatório. (OA – osso alveolar; Ep – tecido epitelial; infil – infiltrado inflamatório) (HE, 200x no original).

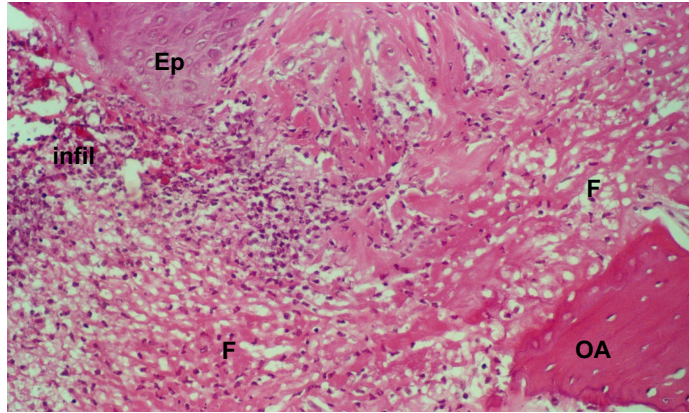
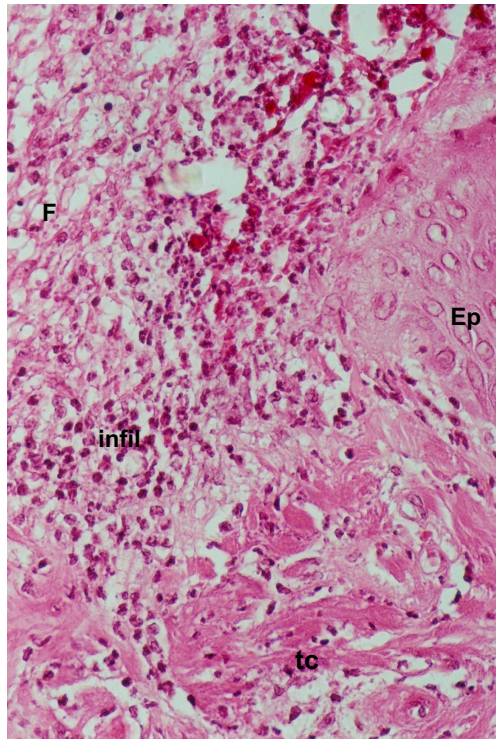


Figura 5.132

Maior ampliação da margem do revestimento epitelial palatino (Ep) (subgrupo VIIIa). Nesta zona não há sinais de proliferação epitelial, embora seja visível a distinção entre o tecido conjuntivo gengival (Tc) e o tecido cicatricial com um intenso infiltrado inflamatório (infil) e fibrina (F). (HE, 400x no original).



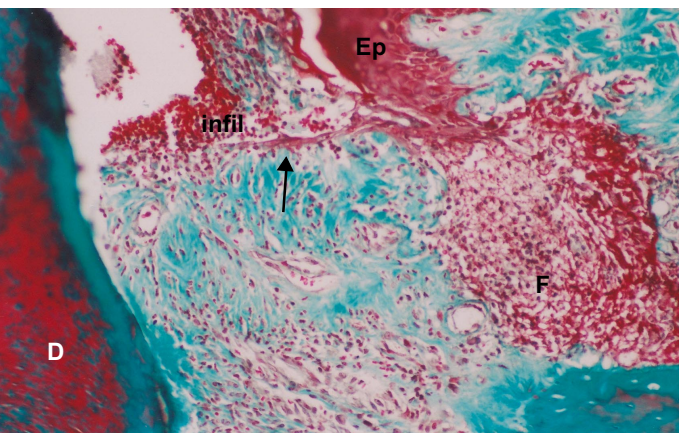


Figura 5.133

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina (subgrupo VIIIa) mostrando a proliferação de células epiteliais em direcção à superfície radicular (seta). (D – dentina; Ep – epitêlio; infil – infiltrado inflamatório; F - fibrina) (TM, 200x no original).

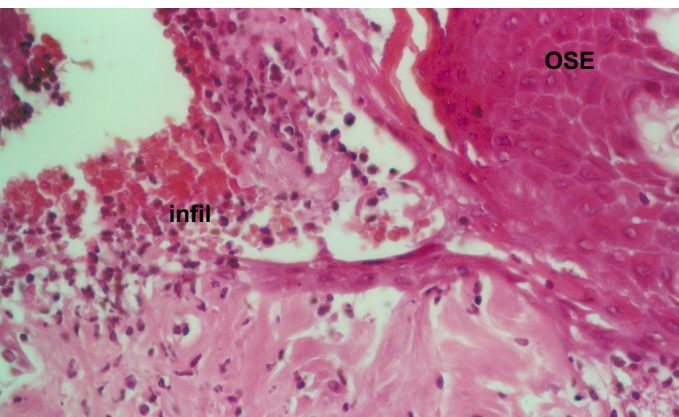


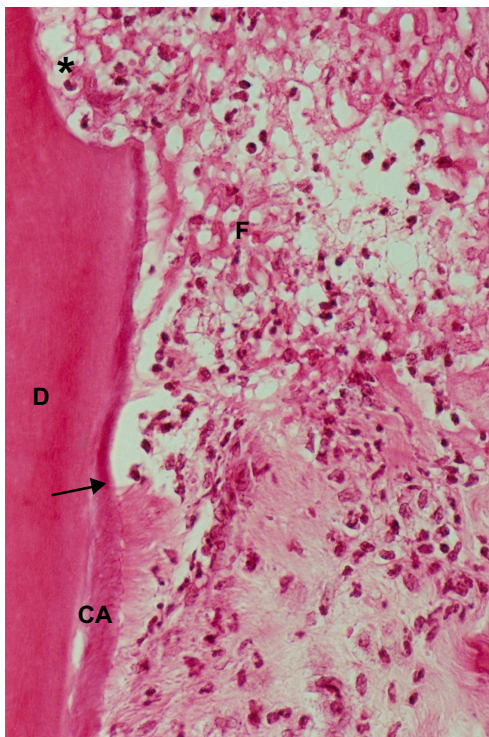
Figura 5.134

Pormenor da margem do revestimento epitelial (subgrupo VIIIa), destacando-se a presença de células epiteliais sob o infiltrado inflamatório (infil). (OSE – epitêlio sulcular) (HE, 400x no original).



Figura 5.135

Pormenor de uma zona de transição entre a superfície radicular manipulada e a não manipulada (seta) (subgrupo VIIIa). Na porção mais coronal da raiz observa-se uma lacuna de reabsorção radicular (*). Adjacente a esta, a superfície radicular apresenta uma pequena área de cimento manipulado, onde se verifica a existência de fibrina (F) povoada predominantemente por células inflamatórias. A superfície de cimento não manipulado (CA) mostra a inserção de fibras de colagénio. (D – dentina) (HE, 400x no original).



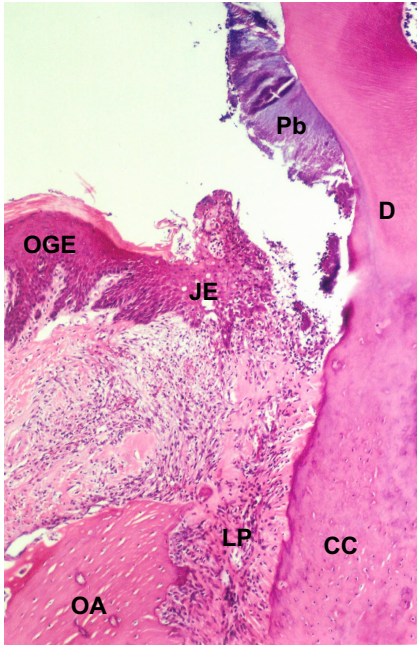


Figura 5.136

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina, oito dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida por EMD (subgrupo VIIIb). Neste corte histológico, não se observa a presença de adesão do epitélio juncional (JE) à superfície radicular. O tecido conjuntivo supra-alveolar e o ligamento periodontal (LP) apresentam um moderado infiltrado inflamatório. (OGE – epitélio oral da gengiva; D – dentina; Pb – placa bacteriana; CC – cimento celular; OA – osso alveolar) (HE, 100x no original).

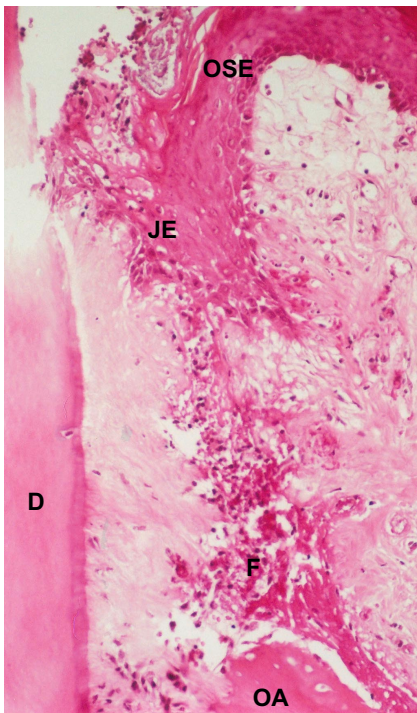


Figura 5.137

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina (subgrupo VIIIb). Neste caso, verifica-se a adesão do epitélio juncional (JE) na superfície radicular manipulada. Apicalmente à adesão epitelial, destaca-se uma área justa-radicular de colágeno com presença rara de células. (D – dentina; OSE – epitélio sulcular; OA – osso alveolar; F – fibrina) (HE, 200x no original).



8 dias (subgrupo VIIIb)

Neste espaço de tempo pós-operatório, o processo de cicatrização evolui favoravelmente, de acordo com os padrões descritos nos outros subgrupos correspondentes aos oito dias. Comparativamente ao tempo experimental anterior (subgrupo VIIIa), verifica-se uma aproximação do revestimento epitelial à superfície radicular, com o restabelecimento da adesão epitelial, embora este não seja observado em todas as lâminas (Figs. 5.136, 5.137 e 5.141). O epitélio juncional, para além de um infiltrado inflamatório de intensidade variável, apresenta sinais de actividade proliferativa, observando-se prolongamentos epiteliais, sendo contudo raros na superfície radicular. Com efeito, e ao contrário do que se verifica com os outros subgrupos deste período pós-operatório, é raro observar-se a extensão do epitélio juncional ao longo da superfície radicular (Figs. 5.138, 5.139 e 5.140).

Neste tempo experimental, não se observa a presença de zonas de necrose no tecido cicatricial. A área ocupada por fibrina apresenta-se mais circunscrita e com maior número de células, entre as quais já é possível identificar alguns fibroblastos. Nessa área são visíveis pequenas zonas de colagénio aparentemente não organizado em fibras e onde as células são raras. Estas zonas localizam-se tanto na superfície radicular como no córion em relação com a zona de intervenção cirúrgica (Figs. 5.137, 5.139 e 5.141).

Ao nível da superfície radicular não manipulada, as fibras de colagénio aí inseridas não apresentam continuidade com as fibras do tecido conjuntivo gengival (Figs. 5.136, 5.137 e 5.140).



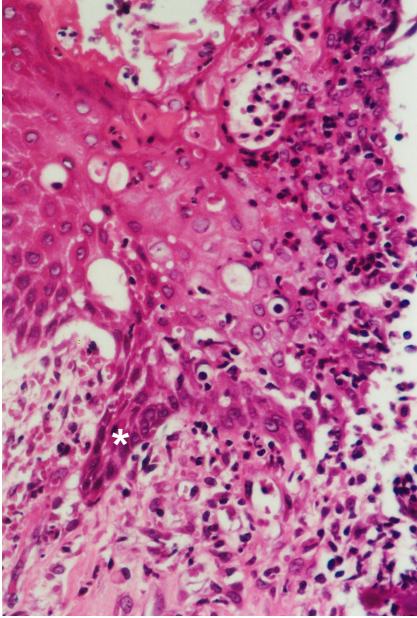


Figura 5.138

Imagem de pormenor do epitélio juncional (subgrupo VIIIb). Para além da existência de um prolongamento epitelial (*), destaca-se a interposição de inúmeras células inflamatórias mononucleadas entre as células epiteliais. (HE, 400x no original).



Figura 5.139

Imagem de pormenor de uma zona da superfície radicular adjacente à adesão epitelial (subgrupo VIIIb), mostrando uma área com predomínio de colagénio não organizado em feixes e raros elementos celulares (col). Esta zona não tem continuidade com o tecido conjuntivo gengival devido à presença de uma faixa de fibrina (F). (D – dentina; JE – epitélio juncional) (HE, 400x no original).

Figura 5.140

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina (subgrupo VIIIb). As fibras de colagénio com inserção na superfície radicular apresentam uma solução de continuidade com o tecido conjuntivo gengival devido à presença de tecido cicatricial composto por fibrina (F). Destaca-se uma área justa radicular com predominância de colagénio e poucas células (*). (D – dentina; OGE – epitélio oral da gengiva; OSE – epitélio sulcular; OA – osso alveolar; LP – ligamento periodontal) (TM, 100x no original).

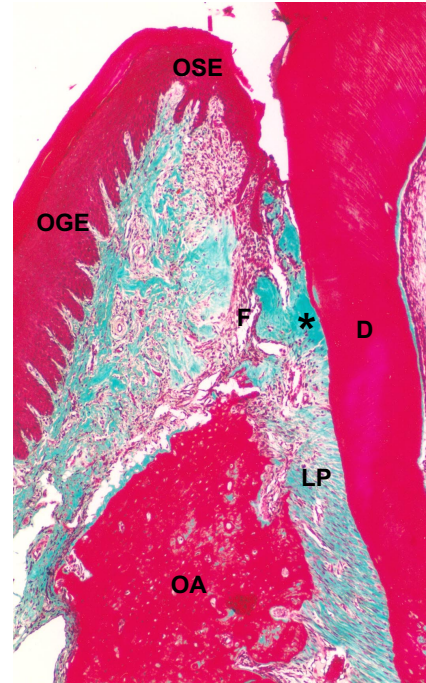
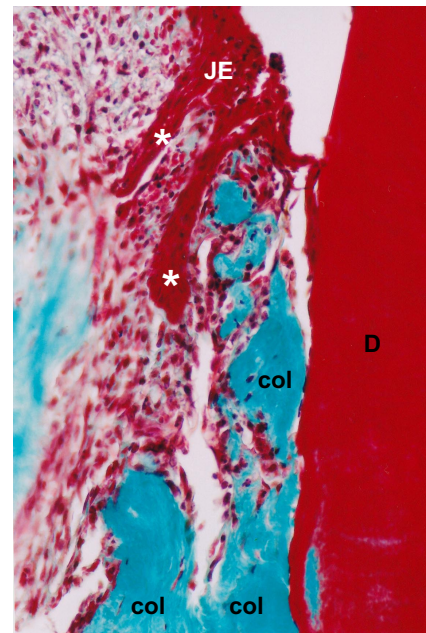


Figura 5.141

Pormenor da zona de adesão epitelial na superfície radicular (subgrupo VIIIb). Para além dos prolongamentos epiteliais (*), destaca-se a presença justa-radicular de áreas de colagénio (col) com escasso número de células. (D – dentina; JE – epitélio juncional) (TM, 400x no original).



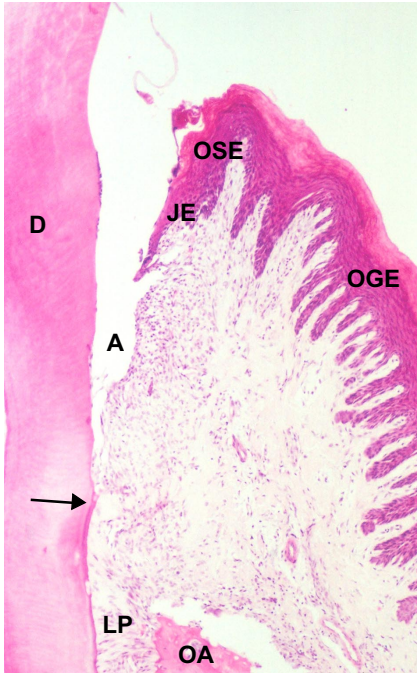


Figura 5.142

Imagem de uma zona cicatricial da margem gengival palatina, quinze dias após a execução de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida por EMD (subgrupo VIIIc). A adesão do epitélio juncional (JE) à superfície radicular localiza-se apicalmente à JAC, na superfície radicular manipulada. O tecido conjuntivo justa-radicular apresenta algum infiltrado inflamatório. Mais apicalmente, na superfície radicular não manipulada, é visível a inserção perpendicular de fibras de colagénio. (A – artefacto; seta – transição entre a área radicular raspada e a não manipulada; OGE – epitélio oral da gengiva; OSE – epitélio sulcular; D – dentina; LP – ligamento periodontal; OA – osso alveolar) (HE, 100x no original).

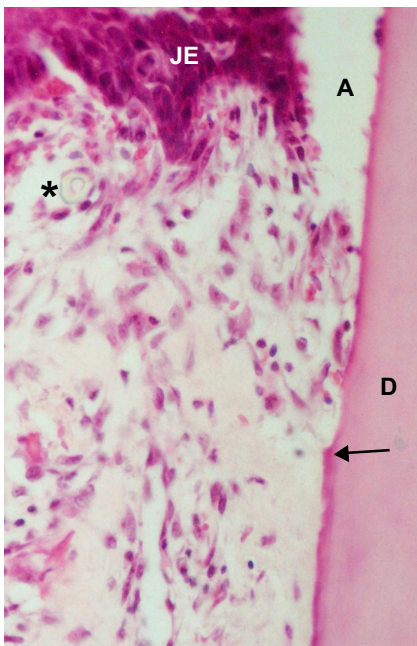


Figura 5.143

Pormenor de uma zona de cicatrização justa-radicular (subgrupo VIIIc). A adesão do epitélio juncional (JE) à superfície radicular localiza-se numa área manipulada. Apicalmente à adesão epitelial, a superfície radicular manipulada não apresenta inserção de fibras de colagénio, ao contrário do que se verifica na porção não manipulada. (A – artefacto; seta – transição entre a superfície radicular manipulada e a não manipulada; D – dentina; * - pêlo em corte transversal) (HE, 400x no original).



15 dias (subgrupo VIIIc)

Aos quinze dias de evolução, a cicatrização dos tecidos periodontais superficiais está praticamente completa. Destaca-se agora a adesão do epitélio juncional à superfície radicular, localizando-se apicalmente à JAC, mas numa extensão relativamente curta quando comparada aos outros subgrupos do mesmo tempo pós-operatório. Na maioria dos cortes, a extremidade apical da adesão epitelial localiza-se coronalmente à transição da superfície radicular manipulada para a não manipulada (Figs. 5.142, 5.143 e 5.146).

Em grande parte das amostras, o tecido cicatricial está ausente.

Na superfície radicular manipulada, apicalmente à adesão epitelial, o tecido conjuntivo adjacente à raiz apresenta algumas fibras de colagénio que se dispõem paralelamente à superfície. Na superfície radicular não manipulada, verifica-se a presença de fibras de colagénio com inserção perpendicular no cimento radicular, os quais se prolongam para o tecido conjuntivo gengival, embora ainda de uma forma desordenada (Figs. 5.143, 5.144, 5.145, 5.147 e 5.148).

Em nenhuma das amostras se observou anquilose radicular, nem reabsorção radicular significativa.

Da avaliação da cicatrização de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida de EMD, verifica-se que, ao contrário do observado em todos os outros grupos, este processo resulta na formação de uma adesão epitelial de pequena extensão e de uma adesão conjuntiva.





Figura 5.144

Pormenor de uma zona de transição entre a superfície radicular manipulada e não manipulada (seta) (subgrupo VIIIc). Na porção manipulada, a superfície radicular não apresenta cemento nem inserção perpendicular de fibras de colagénio. Na porção não manipulada, observa-se a inserção perpendicular de fibras de colagénio no cemento acelular (CA). (D – dentina) (HE, 400x no original).

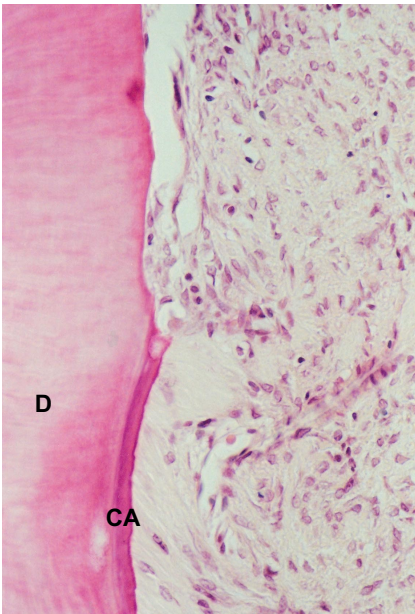


Figura 5.145

Pormenor de uma zona de transição entre a superfície radicular manipulada e a não manipulada (subgrupo VIIIc). Na porção manipulada observa-se a presença de fibras de colagénio, que se dispõem paralelamente à superfície, em contraste com o que se verifica na área não manipulada mais apical, onde as fibras de colagénio se inserem perpendicularmente no cemento. (D – dentina; CA – cemento acelular) (HE, 400x no original).

Figura 5.146

Pormenor de uma adesão epitelial e da inserção conjuntiva na superfície radicular (subgrupo VIIIc). A adesão epitelial localiza-se sobre a superfície manipulada. Destaca-se a ausência de inserção perpendicular de fibras de colagénio na superfície radicular. O epitélio juncional (JE) apresenta-se deformado pela presença da raiz de um pêlo (P). (D – dentina; JAC – junção amelo-cementária; OSE – epitélio sulcular) (HE, 400x no original).

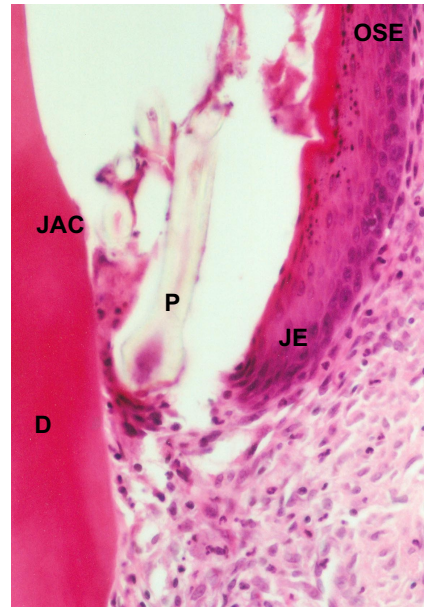
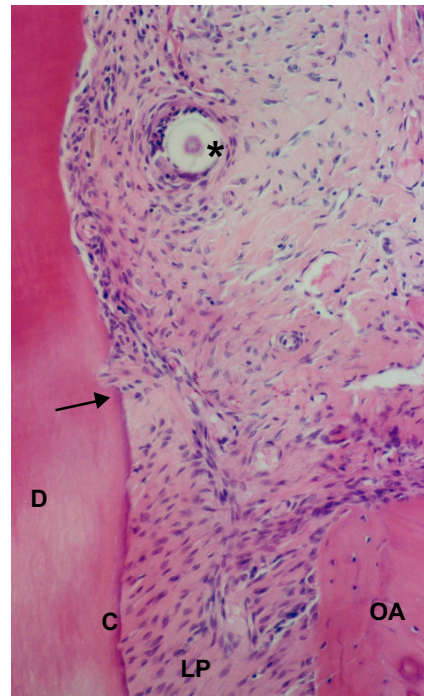


Figura 5.147

Pormenor de uma zona do tecido conjuntivo supra-alveolar (subgrupo VIIIc) apresentando-se rico em fibras de colagénio mas sem orientação definida. Na superfície radicular manipulada, mais coronal, as fibras de colagénio dispõem-se paralelamente à superfície, não se verificando a sua inserção perpendicular, ao contrário do que se verifica na área não manipulada mais apical. (seta – transição entre a superfície radicular manipulada e a não manipulada; * - pêlo em corte transversal; D – dentina; C – cemento; LP – ligamento periodontal; OA – osso alveolar) (HE, 200x no original).



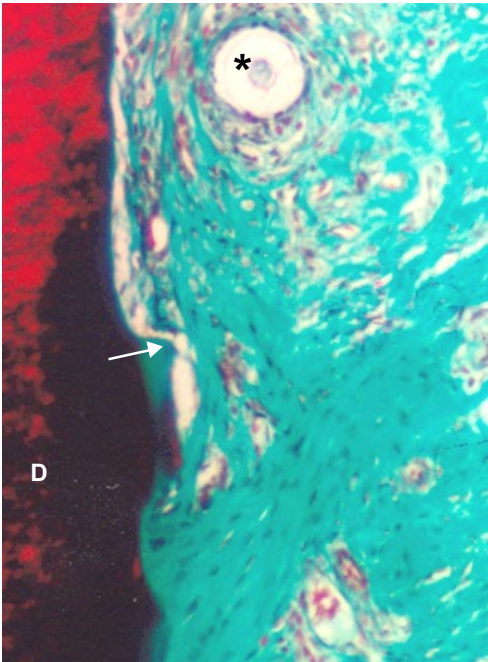


Figura 5.148

Pormenor de uma zona de transição entre a superfície radicular e a não manipulada (seta) (subgrupo VIIIc). Na superfície manipulada, zona de ausência de cimento radicular, as fibras de colagénio justa-radulares apresentam uma orientação paralela à superfície radicular. Na superfície não manipulada, observa-se uma inserção perpendicular das fibras de colagénio no cimento radicular. (D – dentina; * - pêlo em corte transversal) (TM, 400x no original).

b.3.3. Histomorfometria

Como foi descrito no “Material e Métodos”, optou-se por efectuar a medição da área epitelial em relação com a face dentária, correspondendo ao conjunto do epitélio sulcular e do epitélio juncional, uma vez que a linha de demarcação entre os dois epitélios revelou ser subjectiva e pouco reproduzível.

As dimensões apresentadas referem-se a pixels, tendo-se optado por não efectuar a sua conversão para o sistema métrico, uma vez que o objectivo não era apresentar as dimensões reais das estruturas medidas, mas sim estabelecer uma comparação entre os grupos.

b.3.3.1. Análise da área

Efectuada a análise da variância (ANOVAR) da área epitelial, verificam-se diferenças significativas entre os grupos $F(3,105) = 4,81$; $p = 0,0035$ e ao longo do tempo $F(2,105) = 21,51$; $p < 0,0001$, não sendo significativa a interacção entre estes factores $F(6,105) = 1,08$; $p = 0,3813$ (Gráfico 5.1).

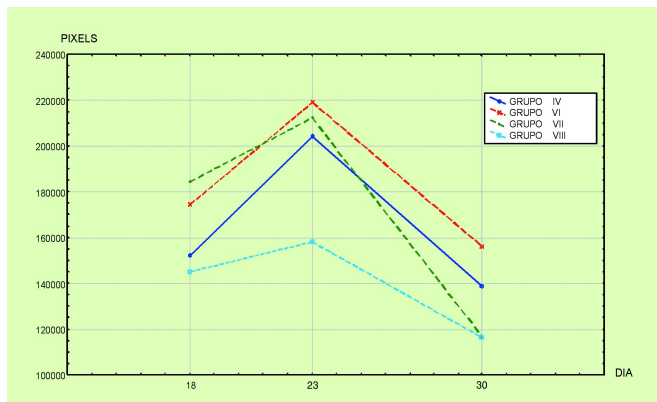


Gráfico 5.1

De modo a poder esclarecer onde se situam essas diferenças, efectuaram-se comparações *post-hoc* recorrendo ao método dos mínimos quadrados.

Aos três dias, verifica-se não existirem diferenças significativas quando se comparam todas as áreas entre os grupos.

Aos 8 dias, verifica-se que a área do grupo VIII (EDTA+EMD) é significativamente inferior à do grupo IV (cirurgia) ($p=0,025$), à do grupo VI (PGA) ($p= 0,003$) e à do grupo VII (EDTA + PGA) ($p=0,008$). Entre os grupos IV, VI e VII, as diferenças não são significativas.

Aos 15 dias, verifica-se que a área do grupo VI (PGA) é significativamente superior à do grupo VII (EDTA+PGA) ($p=0,05$) e à do grupo VIII (EDTA+EMD) ($p=0,053$). As diferenças entre o grupo IV (cirurgia) e os grupos VI (PGA), VII (EDTA+PGA) e VIII (EDTA+EMD) não são significativas, assim como as diferenças entre o grupo VII (EDTA+PGA) e o grupo VIII (EDTA+EMD).

b.3.3.2. Análise da altura

Efectuada a análise da variância (ANOVAR) da altura epitelial, não se verificam diferenças significativas entre os grupos $F(3,105) = 1,066$; $p = 0,366$ e ao longo do tempo $F(2,105) = 1,564$; $p = 0,21$. Também não se verifica uma interacção significativa entre estes factores $F(6,105) = 1,343$; $p = 0,244$ (Gráfico 5.2).

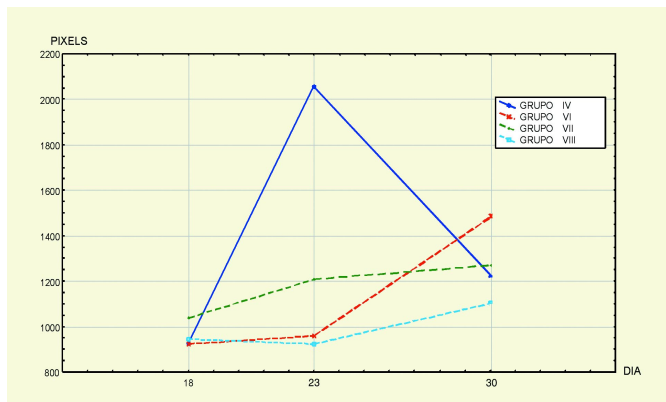


Gráfico 5.2



b.4. DISCUSSÃO

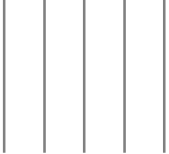
Este estudo situa-se no âmbito da regeneração periodontal, objectivo final de qualquer terapêutica periodontal reconstrutiva.

Porque não conhecemos estudos *in vivo* testando os efeitos da aplicação de EMD na regeneração periodontal experimental no modelo rato, assim, este estudo pode ser considerado o primeiro estudo *in vivo* a avaliar histometricamente o epitélio gengival após a aplicação de EMD. Os resultados demonstram que a aplicação de EMD resulta, aos quinze dias, na formação de uma adesão epitelial pouco extensa e de uma adesão conjuntiva caracterizada pela presença de fibras colagénicas dispostas paralelamente à superfície radicular.

O teste dos tratamentos regenerativos em modelos animais é indispensável, uma vez que fornece um meio de análise histológica e histométrica dos tecidos periodontais formados durante e após a conclusão do processo cicatricial. É de salientar que estes estudos não são passíveis de serem efectuados no homem, excepto em casos isolados, visto que obrigariam à remoção parcial ou total do dente e dos tecidos periodontais, o que levantaria graves problemas éticos. Acrescente-se ainda que a avaliação de uma técnica regenerativa obriga ao uso de controlos não tratados, o que colocaria igualmente questões do foro ético quando aplicados no homem. Por último, o estudo de novas técnicas, potencialmente lesivas, exigem o seu teste prévio em modelos animais (Caton *et al.* 1994, Wikesjö *et al.* 1994).

Os modelos animais mais usados no âmbito da cirurgia periodontal regenerativa usam o cão e os primatas não humanos. Estes últimos, devido à sua proximidade na escala filogenética com o homem, representam o modelo ideal. No entanto, são animais de difícil manuseio, cuja aquisição e manutenção é extremamente onerosa.





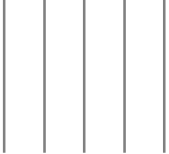
Devido ao seu temperamento dócil e à susceptibilidade natural para a doença periodontal, o cão, particularmente o *beagle*, tem sido um modelo muito utilizado em periodontologia, nomeadamente em estudos sobre a progressão da doença periodontal, sobre a cicatrização tecidual e regeneração periodontal e igualmente na área da implantologia. A colocação de um fio de sutura em torno do colo dos pré-molares, potencia a acumulação de placa bacteriana e acelera a progressão da doença periodontal. Ao fim de algumas semanas, estão criadas lesões ósseas que se assemelham às lesões periodontais avançadas no homem, com envolvimento de furca de classe II e III (Wikesjö *et al.* 1991b). No entanto, devido à diferente arquitectura e rápida remodelação ósseas, algumas lesões experimentais no cão demonstraram uma percentagem de cicatrização espontânea significativa. Por esse motivo este modelo experimental tem sido criticado quando utilizado nos estudos de regeneração periodontal.

Com o objectivo de testar os efeitos da terapêutica periodontal regenerativa, devem ser criadas lesões periodontais em animais de laboratório com as mesmas características que os defeitos encontrados no homem. Estes incluem bolsas periodontais profundas, com perda óssea, horizontal ou vertical, e superfícies radiculares sem fibras de Sharpey e expostas a placa bacteriana. De acordo com os resultados obtidos no protocolo A, a colocação de um fio de sutura em torno do colo do segundo molar superior, durante duas semanas, origina o desenvolvimento de lesões periodontais cujas características principais cumprem os requisitos enumerados.

De acordo com a classificação dos tipos de lesões periodontais experimentais apresentada por Caton e colaboradores (1994), pode-se considerar que o modelo deste estudo se enquadra no modelo de lesão crónica. Reportando-se à utilização de primatas não humanos, Caton e colaboradores (1994), caracterizam o modelo crónico de lesão como sendo o resultado da colocação

de um meio retentor de placa na área infragengival, durante um intervalo de tempo que, nos primatas será de três a seis meses. Este tempo experimental longo é apontado como uma das principais desvantagens deste modelo crónico, enquanto que a pouco significativa ou mesmo ausência de regeneração espontânea é referida como uma grande vantagem. No que se refere ao rato, a colocação de um fio de sutura induz o aparecimento de lesões periodontais profundas ao fim de duas semanas, como foi observado no protocolo A. Por esse facto, neste último modelo animal, o tempo de desenvolvimento das lesões não pode ser considerado como uma desvantagem.

No que se refere à possibilidade de, no rato, ocorrer cicatrização espontânea das lesões, os escassos estudos existentes apresentam resultados contraditórios. No trabalho de Garnick (1977), um mês após a remoção do fio de sutura e do restabelecimento de uma dieta normal, metade dos animais apresentavam um epitélio juncional longo. No entanto, com o passar do tempo, verificaram que a extensão do epitélio juncional diminuía. Aos seis meses não se observaram diferenças na extensão do epitélio juncional entre os animais sujeitos à colocação do fio e os que não foram manipulados (Garnick *et al.* 1982). Já na investigação de Abiko e Shimono (1989), oito semanas após a remoção do elástico interdentário manteve-se a presença de um epitélio juncional longo. No estudo de Listgarten e colaboradores (1982), o período de observação estendeu-se até aos doze meses, tendo-se verificado que com o decorrer do tempo, a altura do epitélio juncional foi diminuindo até não haver diferenças significativas com o grupo não manipulado. As observações efectuadas indicaram igualmente que a percentagem de adesão conjuntiva aumentava, em detrimento da adesão epitelial, sendo que a extremidade mais apical do epitélio juncional se deslocou para coronal. Estes resultados reflectem a reversibilidade da adesão epitelial. No entanto, importa salientar que no último trabalho referido, o ponto de partida é representado por tecidos periodontais saudáveis, na medida em que não houve a indução prévia de



lesão periodontal, o que certamente determinou os resultados observados a longo prazo.

De facto, o rato tem alguma capacidade de cicatrizar espontaneamente as lesões induzidas experimentalmente, pelo menos a médio prazo. No entanto, e tendo em conta o objectivo deste nosso trabalho e os tempos experimentais testados, consideramos que a cicatrização espontânea que eventualmente possa ter ocorrido não afectou significativamente os resultados.

O tempo relativamente curto de permanência do fio no sulco gengival desencadeou, como foi verificado no protocolo A, uma reacção inflamatória de características agudas. Apesar disso, o modelo utilizado não deve ser confundido com um modelo de lesão aguda. Tal como Caton e colaboradores (1994) o descrevem, no modelo agudo a lesão é criada cirurgicamente e, de imediato, é tratada pela técnica em estudo. Deste modo, neste modelo a superfície radicular não fica sujeita à acumulação de placa bacteriana e os tecidos que compõem o retalho não apresentam as alterações características da patologia periodontal. Obviamente, que no modelo agudo a cicatrização reflecte uma grande participação de regeneração espontânea.

Na opinião de Wikesjö e colaboradores (1994), uma vez efectuado o tratamento adequado da superfície radicular (remoção da placa bacteriana e do cimento impregnado por toxinas bacterianas), as condições de cicatrização pós-cirúrgica não dependem das condições prévias da raiz, justificando deste modo a utilização do modelo agudo de lesão, o qual para além de reduzir o tempo experimental, assegura uma standardização do tamanho da lesão criada. No entanto, verifica-se que, de um modo geral, os modelos crónicos obtêm resultados de regeneração inferiores aos modelos agudos (Wikesjö *et al.* 1991a). Isto poderá ficar a dever-se à constituição do retalho ser menos favorável à regeneração, uma vez que se encontra infiltrado por células inflamatórias, acrescida à incapacidade de realizar um tratamento da superfície radicular totalmente eficaz.



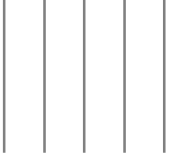
O tecido conjuntivo subepitelial tem um papel importante na regulação da proliferação do epitélio gengival. Na doença periodontal, a presença de um infiltrado inflamatório, para além de modificar o componente celular do tecido conjuntivo, altera a expressão de algumas integrinas e de outras moléculas de adesão na interface epitélio-tecido conjuntivo. Estas alterações favorecem a proliferação das células epiteliais no seio do tecido conjuntivo e ao longo da superfície radicular. Do mesmo modo, elas podem influenciar os processos de cicatrização, tanto conjuntivo como epitelial (Nanci 2003).

No presente estudo optámos pela utilização de um modelo crónico de lesão periodontal, uma vez que se considerou importante a alteração da superfície radicular pela presença de placa bacteriana conjuntamente com a existência de um infiltrado inflamatório nos tecidos que compõem o retalho mucoperióstico, tentando deste modo simular a situação clínica.

A doença periodontal, quer no homem quer na maioria dos modelos animais, não é simétrica, nem as lesões apresentam uma topografia regular. A possibilidade de criar defeitos iguais em dentes contralaterais, permitindo assim a avaliação estatística dos dados histométricos, é uma das grandes vantagens da experimentação animal. No entanto, a criação de dois defeitos iguais contralaterais só acontece quando se procede à remoção cirúrgica dos tecidos periodontais e se passa de imediato ao seu tratamento (modelo agudo). Nos casos de doença espontânea ou de indução da lesão através da colocação de fios de sutura (modelo crónico), as lesões são assimétricas e muito irregulares devido à variabilidade do processo patológico. Tendo em conta o objectivo deste estudo, não se considerou indispensável a obtenção de duas lesões contralaterais com a mesma dimensão.

Nos estudos de regeneração periodontal, as lesões criadas nos modelos animais devem ter um tamanho suficiente, de modo a permitir a sua





manipulação cirúrgica e a colocação dos dispositivos a testar. De facto, uma das maiores dificuldades técnicas do presente estudo centrou-se na utilização do rato como modelo experimental: a reduzida dimensão das estruturas dento-gengivais impediu, por exemplo, a execução da sutura do retalho na fase final da cirurgia. No entanto, visto que o material testado se apresenta sob a forma de gel, e a necessidade de permanência no local cirúrgico se restringe a alguns minutos, a ausência de sutura no final do procedimento cirúrgico não parece ser determinante na obtenção de resultados credíveis. De facto, noutros estudos em ratos, a realização de uma cirurgia periodontal não foi concluída com a sutura do retalho (Listgarten *et al.* 1982, Okuda *et al.* 1998).

O modelo experimental escolhido não seria aplicável se o objectivo deste estudo fosse a avaliação da regeneração de todos os tecidos periodontais. Com efeito, sabe-se que um dos factores que determinam o tipo de cicatrização é a estabilidade da ferida cirúrgica durante a fase inicial de cicatrização (Wikesjö e Nilvéus 1990). Ora, neste trabalho, devido a condicionantes do próprio modelo experimental, essa estabilização não estaria assegurada por diversas razões, nomeadamente, a ausência de sutura no retalho, já referida, a constante acção traumática da língua quando o retalho é palatino e, como veremos, a ausência de controlo da placa bacteriana.

Sublinhe-se que este estudo restringe-se à cicatrização epitelial, não incluindo a investigação dos outros componentes tecidulares da regeneração periodontal. A utilização deste modelo foi portanto julgada adequada.

De acordo com Caton e colaboradores (1994), nos estudos de regeneração periodontal em modelos animais serão necessárias raízes suficientemente longas e largas de modo a permitir uma perda de suporte significativa (6 a 7 mm), sem comprometer a estabilidade da peça dentária. No rato, o estabelecimento de lesões com as dimensões referidas comprometeria a

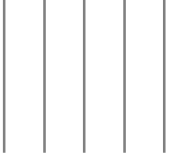


manutenção do dente na arcada, dado que as raízes dos dentes molares não excedem alguns milímetros. De facto, durante a recolha de algumas amostras do subgrupo IIb, foram detectados casos de mobilidade dentária vertical. De acordo com o respectivo exame histológico, havia uma destruição periodontal tão extensa que, qualquer manipulação cirúrgica posterior resultaria na esfoliação do dente afectado.

A dimensão da lesão é igualmente importante tendo em conta as distâncias relativas que as células envolvidas no processo cicatricial têm que percorrer (Melcher 1976). Se as lesões são demasiado pequenas, pode ocorrer uma regeneração espontânea significativa, tanto nos locais de controlo como nos locais de teste, comprometendo a capacidade de evidenciar as diferenças entre os grupos e reduzindo a sensibilidade do modelo (Caton *et al.* 1994). Contudo, tendo em conta o objectivo deste nosso trabalho, este facto não parece ser relevante na escolha do modelo animal. Por outro lado, os resultados observados no grupo que serviu de controlo negativo, no qual só se efectuou a cirurgia (Grupo IV), a regeneração espontânea ao décimo quinto dia não foi significativa, uma vez que a formação de um epitélio juncional longo sobre a área manipulada da raiz foi o modo de cicatrização mais frequente.

Nos estudos sobre terapêuticas regenerativas que incluem uma análise histomorfométrica é fundamental conseguir identificar, após a cicatrização, o ponto mais apical da lesão original, de modo a quantificar o ganho de inserção. Para ultrapassar o facto de um defeito não poder ser avaliado histologicamente antes e depois da cirurgia, um dos métodos utilizados é a criação de um par de lesões idênticas. Este método, como já foi referido, não é aplicável no modelo utilizado. Um método alternativo refere-se à marcação de um ponto na superfície radicular, através de um pequeno entalhe, que geralmente é colocado ao nível da crista óssea. No entanto, a aplicação deste entalhe vai resultar em valores pré-cirúrgicos sobrestimados da extensão do processo





patológico, já que a crista óssea está separada da zona patológica por fibras dento-gengivais intactas e pelo epitélio juncional (Selvig 1994). Para excluir esta área que, para além do mais vai essencialmente reproduzir reparação e não regeneração, pode optar-se por tomar como referência do ponto mais apical do processo patológico a extremidade apical dos cálculos infragengivais. Contudo, esta referência só pode ser utilizada em modelos que desenvolvam cálculos dentários (Cole *et al.* 1980).

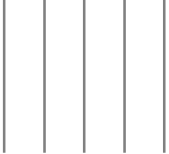
No modelo utilizado, considerou-se que a colocação de um ponto de referência radicular, efectuando um entalhe radicular com uma broca esférica, seria um procedimento demasiado iatrogénico. Apesar da broca de diâmetro mais reduzido ter 0,4 mm, ao efectuar-se um entalhe na superfície radicular poder-se-ia criar uma exposição dos tecidos da polpa, devido à reduzida espessura da parede canalar. Acrescente-se o facto da área do entalhe poder representar uma percentagem muito elevada da área radicular exposta. Para além disso, esse ponto de referência teria que ser colocado ao nível da crista alveolar, uma vez que não se identificaram cálculos dentários.

Por outro lado, alguns autores (Garrett 1996) chamam a atenção para o facto da realização de um entalhe radicular estimular a regeneração, por criar uma irregularidade da superfície radicular. Isto é, quando os tecidos regenerados se localizam exclusivamente na área dos entalhes efectuados, não devem ser considerados como sendo resultantes da terapêutica testada.

No rato, embora não tenha sido possível realizar um entalhe, o facto de se ter realizado uma raspagem e alisamento radicular, permitiu visualizar na maior parte das lâminas histológicas a transição entre a superfície radicular manipulada e a não manipulada. Saliente-se que estudos previamente publicados optaram pelo mesmo procedimento (Lisgarten *et al.* 1982). Tendo em conta a avaliação histométrica efectuada neste estudo, a ausência de um entalhe radicular não se revelou essencial.

O período experimental em estudos histológicos de regeneração periodontal varia desde as duas semanas até aos 3 a 6 meses, consoante o modelo animal. A adesão do tecido conjuntivo pode ser confirmada ao fim de 2 semanas, não estando esse processo dependente da formação de novo cemento radicular. Se, no entanto, o objectivo do estudo for o de avaliar a extensão máxima do processo regenerativo, incluindo a formação de novo cemento e novo osso, o período experimental tem de ser mais longo. No cão, o cemento não se forma antes das três semanas após cirurgia; às 6 semanas, novo cemento e osso preenchem a furca previamente permeável (Selvig 1994). Uma vez que o rato não foi utilizado como modelo no estudo da regeneração de todos os tecidos periodontais, não há tempos experimentais estabelecidos para a formação de cada tipo de tecido.

Na utilização de modelos animais para testar procedimentos cirúrgicos surgem alguns problemas práticos de grande importância. O controlo pós-operatório da placa bacteriana no local cirúrgico é fundamental para otimizar os resultados da cicatrização. Nos primatas não humanos, esse controlo antibacteriano pode ser realizado recorrendo-se a antibioterapia sistémica e/ou controlo local da placa bacteriana, quer mecânico, quer químico. No entanto, o comportamento deste tipo de animais obriga a que ele seja sedado de cada vez que se efectue esse controlo local, tornando este procedimento muito demorado (Caton *et al.* 1994). Nos cães, o controlo mecânico local da placa bacteriana pode ser efectuado mais facilmente, devido à sua natureza dócil. Nos animais de pequeno porte, geralmente recorre-se a antibioterapia sistémica. Contudo, no protocolo realizado optou-se por não o efectuar, assumindo os riscos de infecção local. Tal decisão baseou-se no facto de tanto o EMD, o PGA e o EDTA demonstrarem algum poder antibacteriano, tanto *in vitro* (Sculean *et al.* 2001a, Newman *et al.* 2003), como *in vivo* (Arweiler *et al.* 2002) e ainda no facto da antibioterapia sistémica não ter demonstrado influência nos resultados de estudos clínicos (Sculean *et al.* 2001b). De facto,



embora não tenhamos efectuado qualquer cuidado especial referente ao controlo de placa bacteriana, não foi observada qualquer infecção pós-operatória local que tivesse interferido com o processo cicatricial.

A variabilidade biológica é por vezes utilizada para explicar resultados experimentais divergentes. Esta variabilidade pode ser devida à influência de factores genéticos, bioquímicos, fisiológicos e imunológicos do hospedeiro, ou à flora microbiológica associada a um determinado animal. Estes factores podem actuar no seu todo ou serem mascarados por mínimas diferenças na configuração do defeito, manuseamento do retalho e infecção pós-cirúrgica. Embora estes factores tendam a ser controlados nos modelos animais, os resultados da terapêutica testada reflectem sempre uma variabilidade biológica inerente ao modelo, só parcialmente ultrapassada quando são utilizados animais controlados geneticamente.

Grupo IV

De acordo com os resultados deste estudo, a cicatrização de um retalho mucoperiosteico ao décimo quinto dia resulta predominantemente na formação de um epitélio juncional longo, responsável pela adesão epitelial extensa sobre uma área radicular manipulada. Na superfície radicular não manipulada, as fibras de colagénio que mantiveram a sua inserção radicular viram restabelecida a sua continuidade para o tecido conjuntivo.

No presente estudo, o conjunto das observações efectuados nos três tempos de evolução indicam que o epitélio juncional deriva do epitélio gengival da extremidade da ferida cirúrgica, o qual prolifera entre o infiltrado inflamatório e o tecido conjuntivo gengival, até estabelecer contacto com a superfície dentária, perto da extremidade apical da superfície alisada. Seguidamente, o epitélio migra coronalmente resultando a formação de um epitélio juncional longo, enquanto que o infiltrado inflamatório é eliminado. Não parece haver evidência



da formação de nova adesão conjuntiva na superfície alisada. Na zona mais apical, onde o cimento e as fibras nele inseridas não foram afectadas, a adesão conjuntiva original é reparada.

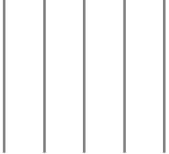
Estes resultados corroboram as observações efectuadas por Listgarten e colaboradores (1982) com um retalho muco-perióstico, sem no entanto ter sido induzida uma lesão periodontal prévia. Dez dias após a realização da cirurgia, com raspagem e alisamento radicular, a maioria dos cortes histológicos apresentava uma proliferação epitelial numa direcção apical mas sem contacto com a superfície radicular. Contudo, algumas amostras (2 em 6) demonstravam, já neste tempo de evolução, o restabelecimento de um novo epitélio juncional. Três semanas após a cirurgia, verificou-se a presença de um epitélio juncional longo, aparentemente por deslocação coronal das células apicais que originalmente tinham contactado com o dente perto da extremidade apical da lesão cirúrgica.

Do mesmo modo, o estudo de Abe e colaboradores (1994) demonstrou a formação de um epitélio juncional longo catorze dias após a raspagem e alisamento radicular. Apicalmente ao epitélio, o tecido conjuntivo apresentava algumas fibras colagénicas dispostas paralelamente à superfície radicular. Estudos com outros modelos experimentais obtiveram resultados semelhantes. Depois de induzir doença periodontal, a realização de uma cirurgia de retalho muco-perióstico, resultou na formação de um epitélio juncional longo, tanto no cão (Beaumont *et al.* 1984) como no primata não humano (Magnusson *et al.* 1983, Sculean *et al.* 2000b, c).

Saliente-se ainda que, no homem, a cicatrização de um retalho muco-perióstico sobre uma superfície radicular afectada por doença periodontal resulta na formação de um epitélio juncional longo (Caton e Zander 1976, Listgarten e Rosenberg 1979, Caton *et al.* 1980, Steiner *et al.* 1981, Stahl *et al.* 1982).

A cicatrização através da formação de um epitélio juncional longo coloca várias questões: será esse epitélio um local de menor resistência à placa bacteriana?;





Poderá esse epitélio converter-se num epitélio juncional com as características originais? De acordo com Magnusson e colaboradores (1983), o epitélio juncional longo não apresenta uma resistência à acumulação de placa inferior ao epitélio juncional. Saliente-se ainda que a monitorização a longo prazo de resultados clínicos demonstrou que o epitélio juncional longo mantém a sua posição na superfície radicular, desde que seja mantido um bom controlo de placa bacteriana (Lindhe e Nyman 1975, 1984).

Grupo V

Da aplicação de EDTA sobre a superfície radicular, destacam-se dois pontos. O primeiro refere-se à erosão do recobrimento epitelial da área de aplicação do ácido na maioria das lâminas histológicas do subgrupo Va (3 dias). Tal erosão pode ter ficado a dever-se à acção directa do ácido sobre os tecidos periodontais ou a uma manipulação traumática do retalho. Neste nosso estudo, devido ao tamanho das estruturas, a aplicação do gel de EDTA durante dois minutos não se limitou exclusivamente à superfície radicular, estendendo-se igualmente ao retalho muco-perióstico, e talvez por isso, se tenha observado a erosão do revestimento epitelial do retalho muco-perióstico. Contudo, diversos estudos defendem a utilização de condicionadores da raiz com pH neutro por estes não terem demonstrado acção necrótica sobre os tecidos periodontais, ao contrário do verificado com os agentes de pH ácido (Register e Burdick 1975, Blomlöf e Lindskog 1995a, Blomlöf *et al.* 1995, Gamal e Mailhot 2003). No entanto, estes estudos foram realizados em modelos animais de maior porte (cão e macaco), em que facilmente se controla a área de aplicação do ácido, impedindo o seu contacto com o retalho.

Por outro lado, a necrose superficial do retalho também pode ter ficado a dever-se à manipulação traumática do retalho. No entanto, como a manipulação do retalho foi estandardizada para todos os grupos, tal facto não parece ser razão suficiente para tal observação.

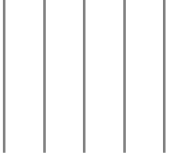


O processo cicatricial após descolamento de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA resultou no restabelecimento de uma adesão predominantemente epitelial com a formação de um epitélio juncional em toda a extensão da área manipulada da raiz, não se observando a formação de uma adesão conjuntiva.

As observações do presente estudo corroboram os resultados obtidos após o tratamento com EDTA de defeitos agudos/crónicos de furcas com envolvimento de classe III em primatas não humanos (Donos *et al.* 2003). Nesse estudo, a aplicação de EDTA resultou em regeneração periodontal numa extensão muito limitada, localizando-se o novo cemento com a inserção de fibras colagénicas e o novo osso praticamente no entalhe efectuado cinco meses antes. Apesar de estas observações terem sido inúmeras vezes referidas como demonstrativas de regeneração periodontal, actualmente têm sido desvalorizadas. Embora a extensão do epitélio juncional não tenha sido avaliada, na observação da imagem histológica publicada é possível identificar a presença de um epitélio juncional longo numa localização ligeiramente coronal ao entalhe radicular.

Estas observações contrariam as de outros estudos *in vivo* efectuados em primatas não humanos. Blomlöf e colaboradores (1996) observaram, às oito semanas, a formação de uma adesão conjuntiva (fibras colagénicas orientadas paralelas à superfície radicular) e de um epitélio juncional longo pouco extenso. No entanto, esse estudo recorreu à utilização de um modelo experimental de defeito agudo, sem contaminação da superfície radicular por placa bacteriana, o que pode ter influenciado os resultados observados. Em defeitos agudo/crónicos (bolsas infraósseas de uma parede) (Cochran *et al.* 2003a, b), a aplicação de EDTA resultou em regeneração periodontal, com a formação de novo cemento com inserção de fibras colagénicas do ligamento periodontal e de novo osso, numa posição coronal ao entalhe efectuado cinco meses antes. Embora não tenha sido efectuada, em ambos os estudos, qualquer avaliação





histométrica do epitélio juncional é possível observar nas imagens histológicas publicadas, a existência de um epitélio juncional longo cuja extremidade apical se aproxima da extremidade coronal do novo cemento.

O facto de, no presente estudo, se ter verificado necrose no retalho mucoperióstico pode ter alterado o potencial regenerativo do EDTA evidenciado nos estudos acima referidos.

Alguns autores defendem a utilização EDTA, com pH neutro, no condicionamento ácido da raiz de modo a favorecer a regeneração periodontal. Blomlöf e colaboradores (1995a,b, 1996) salientam o facto do EDTA poder potenciar a cicatrização periodontal através da exposição da matriz colagénica da dentina, aumentando assim a capacidade de retenção de substâncias biologicamente activas na superfície radicular. Esses autores sublinham ainda como vantagem a aparente biocompatibilidade do EDTA, uma vez que a indução de efeitos adversos é pouco significativa, comparativamente a outros agentes condicionadores de menor pH.

A avaliação clínica da utilização de EDTA isoladamente, para além de os estudos publicados serem escassos, não apresenta diferenças significativas nos parâmetros clínicos representativos de regeneração periodontal, comparativamente à cirurgia periodontal (Mayfield *et al.* 1998, Blomlöf *et al.* 2000) ou à utilização de ácido cítrico (Blomlöf *et al.* 2000). Da revisão sistemática da literatura publicada por Mariotti (2003) resultou a ausência de regeneração periodontal nos três estudos analisados referentes ao EDTA.

Grupo VI

Das observações efectuadas, verifica-se que a organização e a constituição histológica do processo de cicatrização de um retalho muco-perióstico após a aplicação de PGA resulta na formação de um epitélio juncional longo. Aliás, estes resultados são muito semelhantes aos verificados no grupo IV.

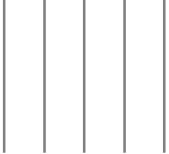
Apesar da solução aquosa de PGA ter um pH ácido de 5,5, da sua aplicação

não se observaram quaisquer sinais de necrose sobre os tecidos moles constituintes do retalho muco-perióstico. Tal facto pode ser justificado pelas características desta solução aquosa se alterarem de acordo com as condições do meio. Quando em contacto com os fluidos tecidulares a viscosidade do PGA diminui drasticamente, uma vez que a temperatura aumenta e o pH se neutraliza, permitindo a sua difusão pela área cirúrgica sem interferir com a formação do coágulo nem actuando como barreira ou mantenedor de espaço. De facto, só foi detectada a presença de PGA durante as quarenta e oito horas seguintes à reimplantação de um molar no rato, tendo a maior parte sido eliminada nas 24 horas iniciais (Gestrelius *et al.* 1997a). Estes factos podem justificar os resultados observados neste grupo, demonstrando que o PGA não altera a cicatrização periodontal, nem exerce qualquer influência sobre a proliferação das células epiteliais da gengiva no rato. Por outro lado, também não se verificou a existência de uma resposta inflamatória alterada. Estas características validam a compatibilidade tecidular deste veículo. Acrescente-se o facto de não haver, em qualquer estudo pré-clínico referente ao EMD, um grupo de controlo negativo com a aplicação exclusiva de PGA, sem previamente realizarem o condicionamento ácido, não permitindo assim uma comparação com os nossos resultados.

Grupo VII

De acordo com as observações descritas, é possível afirmar que, neste modelo experimental, o processo cicatricial de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida de PGA resulta na formação de uma adesão predominantemente epitelial, representada por um epitélio juncional longo. Deste modo, observamos uma cicatrização de cariz reparativo e não regenerativo.

Estes resultados sobrepõem-se aos observados tanto no grupo V (EDTA) como no grupo VI (PGA), não se verificando assim uma alteração do potencial regenerativo quando os dois produtos são aplicados cumulativamente. De facto,



uma vez que nenhum dos dois produtos, quando aplicado isoladamente, demonstrou ter capacidade de regenerar os tecidos periodontais, antevia-se que da sua combinação não resultasse qualquer efeito regenerativo.

Estas observações corroboram, em certa medida, os resultados obtidos no estudo *in vivo* realizado num modelo experimental agudo de deiscência no primata não humano (Hammarström *et al.* 1997). Às oito semanas, a aplicação de PGA após o condicionamento ácido da superfície radicular com ácido cítrico ou fosfórico resultou na formação de novo cemento radicular só em 10% da extensão do defeito, localizando-se essencialmente na base do defeito, e na ausência de novo osso. Neste artigo, a única referência ao modo de cicatrização dos tecidos epiteliais deste grupo encontra-se na discussão e é caracterizada como uma migração apical do epitélio. É de salientar que este estudo apresenta diferenças significativas comparativamente ao modelo experimental do nosso estudo. Assim, para além de se tratar de animais de grande porte, o tempo experimental foi substancialmente mais longo, não sendo apresentados resultados intercalares. Acrescente-se o facto do condicionamento ácido da raiz ter sido realizado com soluções de ácidos de pH baixo.

Para além do estudo referido anteriormente, não se encontram publicadas outras avaliações histológicas do tratamento de lesões experimentais com EDTA e PGA, tanto em modelos experimentais como no homem. Devido a esse facto, vamos nesta discussão extrapolar para os resultados referentes a estudos clínicos.

Dos artigos clínicos por nós revistos, três deles incluíam, como grupo de controlo, o tratamento dos defeitos infraósseos com o condicionamento ácido da raiz (com EDTA ou com ácido fosfórico) seguido da aplicação de PGA (Heijl *et al.* 1997, Pontoriero *et al.* 1999, Okuda *et al.* 2000). Comparativamente ao EMD, o PGA demonstrou sempre resultados clínicos inferiores, com uma diferença estatisticamente significativa, tanto na diminuição da PD como no ganho de CAL. Relativamente ao preenchimento ósseo do defeito, o PGA



demonstrou uma perda contínua de osso aos doze meses e uma ausência de formação de novo osso aos trinta e seis meses.

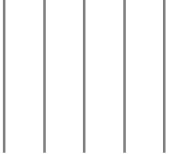
Estes resultados clínicos podem reflectir tanto a formação de um epitélio juncional longo ou uma adesão conjuntiva, mas nunca serão sinónimo de uma regeneração *ad integrum* dos defeitos periodontais, uma vez que o ganho de CAL não corresponde à perda de inserção ocorrida durante o processo patológico (só um terço é recuperado nos grupos de EMD). Acrescente-se ainda que a profundidade de sondagem final não se inclui no intervalo de valores de profundidade do sulco gengival assumidos como normais. É também de destacar a ausência de formação de novo osso.

Grupo VIII

Da avaliação da cicatrização de um retalho muco-perióstico com aplicação de EDTA seguida de EMD, verifica-se que, ao contrário do observado em todos os outros grupos, este processo resultou na formação de uma adesão conjuntiva e de uma adesão epitelial de pequena extensão.

Aos quinze dias de cicatrização, na área não manipulada, estabeleceu-se uma adesão conjuntiva observando-se fibras de colagénio dispostas paralelamente à superfície e ausência de formação de novo cemento. Uma vez estabelecida uma adesão conjuntiva, ela certamente que assume uma forma irreversível, isto é, não será substituída por adesão epitelial no normal decorrer do processo cicatricial. Estas observações parecem corresponder à primeira fase da formação do cemento, na cicatrização de furcas de classe III em cães, depois do seu tratamento por GTR (Araújo *et al.* 1997). Nesse estudo experimental, a formação de cemento iniciou-se às duas semanas de cicatrização, estando descritas três fases. Durante a primeira fase, observou-se a organização das fibras de colagénio adjacentes e perpendiculares à superfície radicular. Numa segunda fase, verificou-se o agrupamento das fibras de colagénio e a deposição da matriz. Por último, verificou-se a adição de células e fibras de colagénio





organizadas paralelamente à superfície radicular. De facto, apesar de o rato apresentar um metabolismo relativamente rápido, aos quinze dias de cicatrização não seria de prever a observação de novo cemento já mineralizado. Para nos certificarmos da formação de novo cemento o tempo experimental deveria ser mais prolongado. No cão, este facto só foi observado às oito semanas. No entanto, relembramos que o objectivo deste nosso trabalho não foi a avaliação da cicatrização dos tecidos mineralizados, mas sim do tecido epitelial.

Um dos objectivos das técnicas de regeneração periodontal é prevenir a proliferação das células epiteliais ao longo da raiz. Como foi demonstrado nos estudos *in vitro* referidos pormenorizadamente no Capítulo III deste trabalho, o EMD não estimula a proliferação de células epiteliais (Gestrelius *et al.* 1997a, Okuda *et al.* 2000, Lyngstadaas *et al.* 2001), evidenciando um efeito citostático (Kawase *et al.* 2000, 2001). Acrescente-se ainda que a expressão genómica do factor de crescimento dos queratinócitos (KGF) demonstrou estar *downregulated* após a exposição de fibroblastos do ligamento periodontal ao EMD (Parkar e Tonetti 2004), não favorecendo deste modo, a proliferação epitelial.

De acordo com os resultados deste nosso estudo *in vivo*, o EMD inibe a proliferação das células epiteliais na fase inicial da cicatrização, confirmando os resultados de um trabalho preliminar por nós efectuado (Baptista e Cabrita 2002). O tratamento estatístico da quantificação histométrica efectuada confirmou os resultados dos estudos *in vitro*, uma vez que aos oito dias a área do epitélio do grupo EMD era significativamente inferior comparativamente aos outros grupos. Aos quinze dias, essa diferença deixou de ser significativa, apesar de apresentar um menor valor médio. No que respeita a quantificação da altura epitelial, o grupo EMD apresentou sempre valores inferiores, embora não estatisticamente diferentes dos outros tratamentos.

Este modelo experimental, devido ao tamanho reduzido das coroas dentárias, não permitiu a obtenção de cortes histológicos em número suficiente de modo a



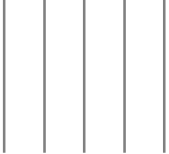
serem efectuadas técnicas de imunohistoquímica, as quais ajudariam a esclarecer os processos celulares implicados na inibição da proliferação epitelial.

O único estudo com quantificação histomorfométrica do epitélio juncional após a aplicação de EMD foi realizado em defeitos infra-ósseos agudos/crónicos em cães (Sallum *et al.* 2004). Neste estudo, aos quatro meses, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na extensão do epitélio juncional entre os diversos grupos (EMD, GTR, EMD+GTR e OFD). No entanto, da combinação de tratamentos (EMD+GTR) resultou um epitélio juncional que, em média, tinha cerca de metade da extensão do resultante da cirurgia de retalho simples. Os grupos de GTR e de EMD obtiveram valores médios de epitélio juncional muito semelhantes. Para além do facto de ter sido efectuado num modelo experimental diferente e uma vez que estes resultados se reportam a uma fase tardia da cicatrização, não se justifica a sua comparação com o nosso estudo.

Em alguns estudos animais (Hammarström *et al.* 1997, Cochran *et al.* 2003b) refere-se que, após a aplicação de EMD, a extensão apical do epitélio juncional ao longo da raiz era muito limitada, comparativamente aos grupos de controlo. É de salientar que na maioria dos estudos (Araújo e Lindhe 1998, Sculean *et al.* 1998, 2000c, Donos *et al.* 2003) só foi avaliada a formação de novo cimento e de novo osso, não havendo qualquer referência à localização ou extensão do epitélio juncional após a cicatrização do defeito.

Nos estudos com avaliação histológica do tratamento de lesões periodontais com EMD no homem, são raras as referências ao comportamento do tecido epitelial na cicatrização dessas lesões. No entanto, e fazendo um resumo sumário dos casos publicados (Tabela 3.6, Capítulo III), verifica-se que, aos seis meses, dos vinte e dois defeitos tratados, sete cicatrizaram com a formação de um epitélio juncional longo, seis apresentaram a formação de novo cimento com inserção de fibras de colagénio mas sem formação de novo osso e nove cicatrizaram segundo os parâmetros histológicos da regeneração periodontal, com formação de novo cimento, novo ligamento periodontal e novo osso.





Com base nestas observações, em cerca de um terço dos casos houve proliferação das células epiteliais ao longo da superfície radicular após a aplicação de EMD. Estes resultados divergentes reflectem, entre outros factores, a variabilidade biológica da cicatrização no homem.

Histomorfometria

A quantificação histomorfométrica confirmou a análise histológica. A análise estatística efectuada comprovou que, aos oito dias, a área epitelial (epitélio sulcular e epitélio juncional) no grupo EMD era significativamente inferior aos outros grupos testados, nomeadamente ao controlo negativo (cirurgia de retalho simples) e aos controlos positivos (aplicação do veículo (PGA) isoladamente e aplicação de um condicionador ácido (EDTA) seguida pelo veículo). Aos quinze dias, apesar do grupo teste apresentar um menor valor médio da área epitelial, a diferença deixou de ser significativa em relação aos outros grupos. No que se refere à quantificação da altura epitelial, o grupo EMD demonstrou uma menor extensão nos três tempos experimentais, embora a diferença com os outros grupos avaliados não fosse estatisticamente significativa.

b.5. CONCLUSÕES

Embora o rato não seja um dos modelos animais mais frequentemente utilizados nos estudos sobre terapêuticas regenerativas periodontais, a escolha deste modelo experimental proporcionou uma boa análise do material regenerativo testado, permitindo uma utilização racional do número de animais, o estabelecimento de grupos com diferentes tempos experimentais, de acordo com o objectivo do presente estudo.

Como conclusão pode afirmar-se que a aplicação de um derivado das proteínas da matriz do esmalte, neste modelo experimental, inibiu a proliferação do epitélio



gingival ao longo da superfície radicular, na fase inicial da cicatrização. Esse efeito inibitório não decorre dos componentes da sua técnica de aplicação, uma vez que resultaram na formação de um epitélio juncional longo. A análise histológica foi comprovada pela quantificação histomorfométrica.

Este estudo *in vivo* confirma que a inibição da proliferação epitelial numa fase inicial do processo de cicatrização é um dos processos pelo qual o derivado das proteínas da matriz do esmalte induz regeneração periodontal.



RESUMO



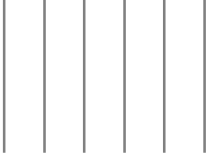
RESUMO

A periodontite e as suas sequelas inflamatórias alteram a estrutura e a integridade do periodonto. Este processo patológico pode levar à destruição da adesão do tecido conjuntivo ao dente, à exposição da superfície radicular ao meio oral, à reabsorção do osso alveolar e, por último, à perda do dente. A primeira fase do tratamento periodontal tem por objectivo o controlo da infecção e a eliminação da inflamação induzida pela placa bacteriana de modo a suster a progressão da doença. Tendo em conta as fases posteriores do tratamento dos defeitos periodontais, a regeneração os tecidos destruídos é um objectivo fundamental.

Entre os diferentes tecidos que compõem o periodonto, o ligamento periodontal é principal reservatório de células com capacidade de regenerar o cemento radicular, o ligamento periodontal e o osso alveolar. Diversas técnicas cirúrgicas associadas à colocação de diferentes materiais, sintéticos ou naturais, têm demonstrado alguma eficácia na obtenção desse objectivo. A utilização de membranas semipermeáveis, de alo-enxertos ósseos desmineralizados e de um derivado das proteínas da matriz do esmalte demonstram, por análise histológica quer no homem como em animais, ter capacidade para induzir regeneração periodontal. De igual modo, estudos clínicos controlados referem que essas abordagens terapêuticas proporcionam um benefício acrescido em termos de ganho de inserção clínica quando comparadas com a cirurgia de retalho simples. Contudo, nenhuma das terapêuticas regenerativas evidenciou uma superioridade significativa em relação às outras. Acrescente-se ainda que, actualmente, os resultados clínicos são pouco previsíveis e insuficientes, tendo em conta que os casos de restituição integral dos tecidos perdidos são pouco frequentes.

Recentemente, um derivado das proteínas da matriz do esmalte (EMD), foi apresentado como promotor da regeneração periodontal. A regeneração





compreende, de forma simultânea e sequenciada, a migração celular, a proliferação, a diferenciação, a interação célula-célula e a formação de matrizes mineralizadas. Estes são também os processos envolvidos no desenvolvimento dos tecidos periodontais. Sendo que as amelogeninas, principal constituinte do EMD, têm um papel importante na formação radicular, a sua aplicação na terapêutica regenerativa baseia-se em processos biomiméticos. Diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que o EMD influencia o metabolismo das células do ligamento periodontal assim como das células epiteliais, osteoblásticas e do folículo dentário. No entanto, os eventos moleculares e celulares envolvidos na regeneração periodontal mediada por EMD ainda são parcialmente desconhecidos.

A experimentação animal é fundamental para o desenvolvimento dos materiais e técnicas utilizadas na regeneração periodontal. Além de proporcionar importantes informações sobre o processo de cicatrização, possibilita, também, o teste de novas abordagens terapêuticas.

O rato é um modelo animal frequentemente utilizado em Periodontologia, como modelo experimental de periodontite. Contudo, a sua utilização no estudo das terapêuticas regenerativas tem sido pouco frequente, particularmente como modelo agudo/crónico de lesão periodontal. Por esse motivo, foi necessário caracterizar histologicamente a lesão periodontal resultante da colocação de um fio sutura em torno do colo de um molar do rato, de modo a avaliar a possibilidade de, numa segunda fase, se efectuar seu tratamento recorrendo a técnicas de regeneração periodontal.

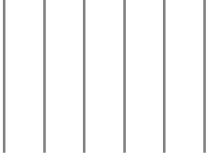
O trabalho experimental desta dissertação inclui dois estudos.

O primeiro teve por objectivo determinar qual dos procedimentos de colocação do fio de sutura no espaço interdentário dos molares resultava no desenvolvimento de uma lesão periodontal passível de ser tratada cirurgicamente. Os procedimentos testados foram a passagem da agulha através do espaço interdentário, apicalmente ao ponto de contacto e o

afastamento das faces interproximais de modo a permitir a passagem do fio de sutura. Ambos os procedimentos foram avaliados histologicamente ao fim de uma e duas semanas. Apesar de aos oito dias ambos os procedimentos terem resultado no desenvolvimento de bolsas periodontais pouco profundas, aos quinze dias verificou-se uma diferenciação entre os procedimentos quanto à evolução das lesões. Assim, nos casos em que a agulha passou pelos espaços interdentários as lesões progrediram de forma variável consoante as amostras, tendo-se verificado, em algumas delas, a formação de bolsas muito profundas que se estendiam para além do terço apical da raiz. Por outro lado, após o afastamento das faces interproximais as lesões progrediram de forma menos acentuada, verificando-se a formação de bolsas periodontais que, em nenhum dos casos, ultrapassavam o terço médio da raiz. Como conclusão, pode afirmar-se que o procedimento mais adequado para a criação de uma lesão periodontal passível de ser tratada cirurgicamente é a colocação de um fio de sutura através do afastamento das faces interproximais, o qual deverá permanecer no sulco gengival durante duas semanas.

O segundo estudo teve como objectivo a avaliação da influência de um derivado das proteínas da matriz do esmalte na cicatrização dos tecidos epiteliais da margem gengival de uma bolsa periodontal. Para além da aplicação do EMD, foram igualmente testados cada um dos componentes dessa técnica, nomeadamente o condicionamento por ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), o veículo éster de propilenoglicol do ácido alginico (PGA) e a associação do EDTA com o PGA. O retalho muco-perióstico simples constituiu o controlo negativo. Os períodos de estudo estabelecidos foram os seguintes: três, oito e quinze dias. O processo de cicatrização epitelial foi analisado por microscopia de luz em cortes histológicos descalcificados, com quantificação histomorfométrica e respectivo tratamento estatístico.

A cicatrização de um retalho muco-perióstico ao décimo quinto dia resultou predominantemente na formação de um epitélio juncional longo, o mesmo



tendo sido verificado com aplicação de EDTA, de PGA e da sua associação. De destacar, três dias após a aplicação de EDTA, a presença, em algumas amostras, de uma área de erosão epitelial significativa, mas que se apresentou cicatrizada no final do estudo. Deste modo, nestes grupos observou-se uma cicatrização de cariz reparativo e não regenerativo. A aplicação de EMD resultou na formação de uma adesão epitelial de pequena extensão e de uma adesão conjuntiva, ao contrário do verificado nos restantes grupos.

A quantificação histomorfométrica, aos oito dias, revelou que a área epitelial analisada (epitélio sulcular e epitélio juncional) no grupo EMD era significativamente inferior comparativamente aos outros grupos. Aos quinze dias, apesar da diferença não ser significativa, o EMD apresentou um menor valor médio da área epitelial. No que se refere à quantificação da altura epitelial, o EMD demonstrou uma menor extensão nos três tempos experimentais, embora a diferença com os outros materiais avaliados não se tenha revelado estatisticamente significativa.

Deste estudo conclui-se que o EMD, neste modelo experimental, inibe a proliferação epitelial, numa fase inicial da cicatrização, uma vez que resultou na formação de um epitélio juncional pouco extenso e na formação de uma nova adesão conjuntiva. Este estudo *in vivo*, confirma que este poderá ser um dos processos pelo qual o derivado das proteínas da matriz do esmalte induz regeneração periodontal. Os componentes da técnica de aplicação do EMD não contribuíram para a cicatrização de cariz regenerativo, uma vez que a sua aplicação resultou na formação de um epitélio juncional longo. A análise histológica foi confirmada pelos resultados da quantificação histomorfométrica. Este estudo *in vivo*, confirma que a inibição da proliferação epitelial é um dos processos pelo qual o derivado das proteínas da matriz do esmalte induz regeneração periodontal.



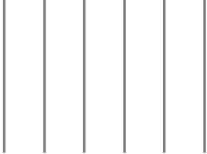
ABSTRACT

Periodontitis and its inflammatory sequelae changes the structure and the integrity of the periodontium. This pathologic process can lead to the destruction of the connective tissue attachment to the tooth, exposure of the root surface to the oral cavity, resorption of the alveolar bone and ultimately, to tooth loss. The aim of the initial phase of the periodontal therapy is to control the infection and to eliminate of plaque-induced inflammation, arresting the disease progression. In order to go one step further, the treatment of the residual periodontal defects will have to be regenerated.

Among the different tissues that compose the periodontium, the periodontal ligament contains the necessary stem and/or progenitor cells that have the capacity to regenerate the lost periodontal tissue, including root cementum, alveolar bone and new periodontal ligament. Several surgical techniques associated to the application of different materials, natural or synthetic, have demonstrated some efficacy in achieving periodontal regeneration. Histological analysis in man and in animals demonstrated that the use of barrier membranes, demineralized bone allografts or enamel matrix derivatives is capable of inducing regeneration. Controlled clinical trials also supported that these therapeutic approaches provided added benefits in terms of clinical attachment level as compared to the open flap procedures alone. Nevertheless, none of these regenerative approaches has shown a clear superiority above the others. Having in mind that the complete restitution of lost tissues is not very frequent, currently these clinical results are fairly unpredictable.

Recently, an enamel matrix derivative (EMD) has been introduced to promote periodontal regeneration. The regeneration comprises, in a simultaneous and sequential form, cell migration, proliferation, differentiation, cell to cell interactions and finally formation of mineralized matrices. These are also the processes involved in the development of periodontal tissues. The amelogenins, the major





component of EMD, have a very important role in root formation. Its regenerative therapeutic application is based in biomimetics. Several studies, both *in vitro* and *in vivo*, demonstrate that the EMD affects the metabolism of the periodontal ligament fibroblasts, the epithelial cells, osteoblasts cells and of the dental follicle cells. Nevertheless, the molecular and cellular events involved in periodontal regeneration mediated by EMD are, yet to be completely understood.

Animal experiments are of great importance to the development of the materials and the techniques used in periodontal regeneration. Besides giving important informations about the healing process, they also allow the testing of new therapeutic approaches.

The rat is an animal model frequently used in Periodontology, namely as an experimental model of periodontitis. However, its use in the development of regenerative therapeutics has been less frequent, particularly as an acute/chronic model for periodontal lesions. In order to evaluate the possibility of carrying out the surgical treatment of an experimental periodontal defect, it was necessary to characterize histologically the periodontal lesion resulting from the application of a suture at the gingival sulcus of a molar tooth. Therefore, the experimental work comprises two studies.

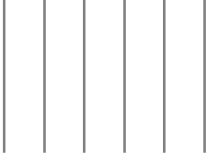
The first study was undertaken to determine which of the procedures of placing the sutures around the second molar tooth resulted in the development of a periodontal lesion, susceptible of being surgically treated. The crossing of the suture needle through the interdental space was one of the procedures that was tested. The suture was placed apically to the contact point and allowing the interproximal surfaces to be separated, in order to allow the suture to pass through the contact point. Both procedures have been histologically evaluated after one and two weeks. After one week both procedures resulted in shallow periodontal pockets. However, after two weeks, the lesions progressed in different ways according to the procedure. In the cases in which the suture

needle passed through the interdental space, the lesions varied in depth, some of them extending to the apical third of the root surface. The distancing of the interproximal surfaces resulted in the formation of a deep periodontal pocket, never extending over the middle third of the root. In conclusion, the most adequate procedure in the development of a periodontal lesion susceptible of being surgically treated was shown to be the application of a suture by distancing both interproximal crown surfaces. The suture remained in the gingival sulcus for two weeks.

The aim of the second study was to evaluate the influence of enamel matrix derivatives in epithelial healing of the gingival margin of a periodontal pocket. Besides the application of EMD, we also tested each of the components of that technique: the root conditioning by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), the vehicle alone (propylene glycol alginate - PGA) and the association of EDTA with PGA. The full thickness flap was used as a negative control. The established experimental time periods were the following: three, eight and fifteen days. The process of epithelial healing was analyzed by light microscopy in decalcified histological sections, with histomorphometrics quantification and statistical analysis.

At fifteenth days, the open flap procedure healing predominantly resulted in the formation of a long junctional epithelium. The same was verified through the application of EDTA, of PGA as well as with their association. It should be stressed that, three days after the application of EDTA, it could be observed, in some of the samples, the presence of a significant area of epithelial erosion that has, nonetheless, healed by the end of the study. Therefore, in these groups, we could verify that was mainly a reparative rather than a regenerative healing. The application of EMD resulted in the formation of an epithelial adhesion of small extension and of a new connective attachment, a good representation of an inicial regenerative healing.

Histomorphometrics quantification, at eight days, revealed that the analyzed



epithelial area (oral sulcular epithelium and junctional epithelium) in the EMD group was significantly smaller than the other groups. At fifteen days, in spite of the fact that the differences were not statistically significant, the mean epithelial area was smaller in the EMD group. Concerning the quantification of the epithelial height, the EMD demonstrated a lesser extension at all three experimental periods, even though the difference between the evaluated material was not statistically significant.

This study leads us to conclude that the EMD, in this experimental model, inhibits epithelial proliferation, in the initial phase of healing, since it has resulted in the formation of a lesser extensive junctional epithelium as well as in the formation of a new connective attachment. This *in vivo* study confirms that this may be one of the different processes involved in EMD-mediated periodontal regeneration. The components of the EMD technique did not contribute to the regenerative healing, as they resulted in the formation of a long junctional epithelium. The histomorphometrics confirmed the histological observations.

This *in vivo* study confirms that the epithelial proliferation inhibition is one of the mechanisms involved in the induction of periodontal regeneration by enamel matrix derivatives.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, Y.; Hara, Y.; Saku, T. & Kato, I. (1994). Immunohistological study of cytokeratin 19 expression in regenerated junctional epithelium of rats. *J Periodontal Res*; **29**: 418-420.
- Abiko, Y. & Shimono, M. (1989). Regeneration of periodontal tissues following experimentally induced periodontitis in rats: a comparison of sucrose-rich and conventional diets. *Bull Tokyo Dent Coll* ; **30**: 195-204.
- Abiko, Y. & Shimono, M. (1991). An ultrastructural study of the pocket epithelium in rats. *Bull Tokyo Dent Coll*; **32**: 27-34.
- Adams, R.A.; Zander, H.A. & Polson, A.M. (1979). Cell populations in the transseptal fiber region before, during and after experimental periodontitis in squirrel monkeys. *J Periodontol*; **50**: 7-12.
- Alencar, V.B.; Bezerra, M.M.; Lima, V.; Abreu, A.L.; Brito, G.A.; Rocha, F.A. & Ribeiro, R.A. (2002). Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*; **73**: 251-256.
- Alger, F.A.; Solt, C.W.; Vuddhakanok, S. & Miles, K. (1990). The histologic evaluation of new attachment in periodontally diseased human roots treated with tetracycline-hydrochloride and fibronectin. *J Periodontol*; **61**: 447-455.
- Altieri, E.T.; Reeve, C.M. & Sheridan, P.J. (1979). Lyophilized bone allografts in periodontal intraosseous defects. *J Periodontol*; **50**: 510-519.
- American Academy of Periodontology (1996). Periodontal regeneration around natural teeth. Concensus Report. *Ann Periodontol*; **1**: 667-670.
- American Academy of Periodontology. (1996). Epidemiology of periodontal diseases. Position paper. *J Periodontol*; **67**: 935-945.
- American Academy of Periodontology. (2001a). *Glossary of periodontal terms*, 4th Edition. American Academy of Periodontology, Chicago.
- American Academy of Periodontology. (2001b). Guidelines for periodontal therapy. Position Paper. *J Periodontol*; **72**: 1624-1628.
- American Academy of Periodontology. (2001c). Position paper: Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration. *J Periodontol*; **72**: 834-838.

- Amstad-Jossi, M. & Schroeder, H.F. (1978). Age-related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germ-free rats. *J Periodontal Res*; **13**: 76-90.
- Anitua, E. (1999). Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*; **14**: 529-535.
- Araújo, M.G.; Berglundh, T. & Lindhe, J. (1997). On the dynamics of periodontal tissue formation in degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*; **24**: 738-746.
- Araújo, M.G. & Lindhe, J. (1998). GTR treatment of degree III furcation defects following application of enamel matrix proteins. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*; **25**: 524-530.
- Armitage, G.C. (1996). Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol*; **1**: 37-215.
- Armitage, G.C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*; **4**: 1-6.
- Arweiler, N.B.; Ausschill, T.M.; Donos, N. & Sculean, A. (2002). Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality. *Clin Oral Investig*; **6**: 205-209.
- Aukhil, I.; Pettersson, E. & Suggs, C. (1986). Guided tissue regeneration. An experimental procedure in beagle dogs. *J Periodontol*; **57**: 727-734.
- Baptista, I.P. & Cabrita, A.S. (2001). Avaliação de um modelo experimental de doença periodontal no rato Wistar. *Rev Port de Estomatol Cir Maxilofac*; **42**: 91-99.
- Baptista, I.P. & Cabrita, A.S. (2002). Periodontal healong in rat experimental periodontal defects after application of Emdogain. Preliminary Study. *J Dent Res*; **81** Spec Iss A: A-453 (abstract 3700).
- Barboza, E.P.; de Souza, R.O.; Caula, A.L.; Neto, L.G.; Caula F.O. & Duarte, M.E. (2002). Bone regeneration of localized chronic alveolar defects utilizing cell binding peptide associated with anorganic bovine-derived bone mineral: a clinical and histological study. *J Periodontol*; **73**: 1153-1159.

- Bartold, P.M. & Narayanan, A.S. (Eds) (1998). *Biology of the periodontal connective tissues*. Quintessence Books, London pp151-241.
- Bartold, P.M.; McCulloch, C.A.; Narayanan, A.S. & Pitaru, S. (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000*; **24**: 253-269.
- Baum, B.J. & Mooney, D.J. (2000). The impact of tissue engineering on dentistry. *J Am Dent Assoc*; **131**: 309-318.
- Beaumont, R.H.; O'Leary, T.J. & Kafrawy, A.H. (1984). Relative resistance of long junctional epithelial adhesions and connective tissue attachments to plaque-induced inflammation. *J Periodontol*; **55**: 213-223.
- Becker, W.; Becker, B. E.; Prichard, J. F.; Caffesse, R.; Rosenberg, E. & Gian-Grasso, J. (1987). Root isolation for new attachment procedures. A surgical and suturing method: three case reports. *J Periodontol*; **58**: 819-826.
- Becker, W.; Becker, B.E.; Berg, L.; Prichard, J.; Caffesse, R. & Rosenberg, E. (1988). New attachment after treatment with root isolation procedures: report for treated Class III and Class II furcations and vertical osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **8**: 8-23.
- Beertsen, W.; VandenBos, T. & Everts, V. (1999). Root development in mice lacking functional tissue non-specific alkaline phosphatase gene: inhibition of acellular cementum formation. *J Dent Res*; **78**: 1221-1229.
- Bergenholtz, A. & Babay, N. (1998). Scanning electron microscopy of the root surface texture of extracted periodontally diseased teeth following various etching and chelating regimens. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **18**: 171-179.
- Bezerra, M.M.; de Lima, V.; Alencar, V.B.; Vieira, I.B.; Brito, G.A.; Ribeiro, R.A. & Rocha, F.A. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*; **71**: 1009-1014.
- Bhatnagar, R.S.; Qian, J.J.; Wedrychowska, A.; Sadeghi, M.; Wu, Y.M. & Smith, N. (1999). Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng*; **5**: 53-65.

- Blomlöf, J. & Lindskog, S. (1995a). Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. *J Clin Periodontol*; **22**: 464-468.
- Blomlöf, J. & Lindskog, S. (1995b). Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. *Eur J Oral Sci*; **103**: 17-24.
- Blomlöf, J.; Jansson, L.; Blomlöf, L. & Lindskog, S. (1995). Long-time etching at low pH jeopardizes periodontal healing. *J Clin Periodontol*; **22**: 459-463.
- Blomlöf, J.; Jansson, L.; Blomlöf, L. & Lindskog, S. (1996). Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing. *J Clin Periodontol*; **23**: 50-55.
- Blomlöf, L.; Jonsson, B.; Blomlöf, J. & Lindskog, S. (2000). A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. II. Surgical periodontal treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **20**: 566-573.
- Bogle, G.; Adams, D.; Crigger, M.; Klinge, B. & Egelberg, J. (1981). New attachment after surgical treatment and acid conditioning of roots in naturally occurring periodontal disease in dogs. *J Periodontal Res*; **16**: 130-133.
- Bosshardt, D.D. & Schroeder, H.E. (1996). Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec*; **245**: 267-292.
- Bosshardt, D.D. & Nanci, A. (2004). Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol*; **31**: 184-192.
- Bowers, G.M.; Chadroff, B.; Carnevale, R.; Mellonig, J.; Corio, R.; Emerson, J.; Stevens, M. & Romberg, E. (1989a). Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part I. *J Periodontol*; **60**: 664-674.
- Bowers, G.M.; Chadroff, B.; Carnevale, R.; Mellonig, J.; Corio, R.; Emerson, J.; Stevens, M. & Romberg, E. (1989b). Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part II. *J Periodontol*; **60**: 675-682.
- Bowers, G.M.; Chadroff, B.; Carnevale, R.; Mellonig, J.; Corio, R.; Emerson, J.; Stevens, M. & Romberg, E. (1989c). Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part III. *J Periodontol*; **60**: 683-693.

- Bowers, G.; Felton, F.; Middleton, C.; Glynn, D.; Sharp, S.; Mellonig, J.; Corio, R.; Emerson, J.; Park, S.; Suzuki, J.; Ma, S.; Rombert, E. & Reddi, A.H.. (1991). Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects when osteogenin is combined with demineralized freeze-dried bone allograft and with purified bovine collagen. *J Periodontol*; **62**: 690-702.
- Boyne, P.J.; Marx, R.E.; Nevins, M.; Triplett, G.; Lazaro, E.; Lilly, L.C.; Alder, M. & Nummikoski, P. (1997). A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **17**: 11-25.
- Boyan, B.D.; Weesner, T.C.; Lohmann, C.H.; Andreacchio, D.; Carnes, D.L.; Dean, D.D.; Cochran, D.L. & Schwartz, Z. (2000). Porcine fetal enamel matrix derivative enhances bone formation induced by demineralized freeze dried bone allograft in vivo. *J Periodontol*; **71**: 1278-1286.
- Bratthall, G.; Soderholm, G.; Neiderud, A. M.; Kullendorff, B.; Edwardsson, S. & Attstrom, R. (1998). Guided tissue regeneration in the treatment of human intrabony defects. Clinical, radiographical and microbiological results: a pilot study. *J Clin Periodontol*; **25**: 908-914.
- Bratthall, G.; Lindberg, P.; Havemose-Poulsen, A.; Holmstrup, P.; Bay, L.; Soderholm, G.; Norderyd, O.; Andersson, B.; Rickardsson, B.; Hallstrom, H.; Kullendorff, B. & Skold Bell, H. (2001). Comparison of ready-to-use EMDOGAIN-gel and EMDOGAIN in patients with chronic adult periodontitis. *J Clin Periodontol*; **28**: 923-929.
- Bravo, M.; Llorda, J.J. & Cortés, J. (2003). Epidemiología - Salud bucodental en España y Portugal. In: *1º Workshop Ibérico Control de Placa e Higiene Bucodental*. Sanz, M. Ed. Ergon. Madrid pp17-34.
- Breivik, T.; Opstad, P.K.; Gjermo, P. & Thrane, P.S. (2000). Effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity on periodontal tissue destruction in rats. *Eur J Oral Sci*; **108**: 115-122.
- Breivik, T.; Gundersen, Y.; Fonnum, F.; Vaagenes, P. & Opstad P.K. (2005). Chronic glycine treatment inhibits ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *J Periodontal Res*; **40**: 43-7.

- Brett, P.M.; Parkar, M.; Olsen, I. & Tonetti, M. (2002). Expression profiling of periodontal ligament cells stimulated with enamel matrix proteins in vitro: a model for tissue regeneration. *J Dent Res*; **81**: 776-783.
- Brunsvold, M.A. & Mellonig, J.T. (1993). Bone grafts and periodontal regeneration. *Periodontol 2000*; **1**: 80-91.
- Burt, A.B. (1991). The distribution of periodontal destruction in the populations of industrialized countries. In: Risk Markers for Oral Diseases. Volume 3. *Periodontal Diseases. Markers of disease susceptibility and activity*. Johnson, N.W. Ed. Cambridge University Press. Cambridge pp9-26.
- Buser, D.; Warrer, K. & Karring, T. (1990). Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J Periodontol*; **61**: 597-601.
- Caffesse, R.G.; Holden, M.J.; Kon, S. & Nasjleti, C.E. (1985). The effect of citric acid and fibronectin application on healing following surgical treatment of naturally occurring periodontal disease in beagle dogs. *J Clin Periodontol*; **12**: 578-590.
- Caffesse, R.G.; Kerry, G.J.; Chaves, E.S.; McLean, T.N.; Morrison, E.C.; Lopatin, D.E.; Cafesse, E.R. & Stults, D.L. (1988a). Clinical evaluation of the use of citric acid and autologous fibronectin in periodontal surgery. *J Periodontol*; **59**: 565-569.
- Caffesse, R.G.; Smith, B.A.; Castelli, W.A. & Nasjleti, C.E. (1988b). New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol*; **59**: 589-594.
- Caffesse, R.G.; Dominguez, L.E.; Nasjleti, C.E.; Castelli, W.A.; Morrison, E.C. & Smith, B.A. (1990a). Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration (GTR). *J Periodontol*; **61**: 45-50.
- Caffesse, R.G.; Smith, B.A.; Duff, B.; Morrison, E.C.; Merrill, D. & Becker, W. (1990b). Class II furcations treated by guided tissue regeneration in humans: case reports. *J Periodontol*; **61**: 510-514.
- Callens, A. (1997). Growth factors in periodontal regeneration - a review. In: *Proceedings of the 2nd European Workshop on Periodontology. Chemicals in Periodontics*. Lindhe, J. Ed. Quintessence Books. Berlin pp284-302.

- Camargo, P.M.; Lekovic, V.; Weinlaender, M.; Vasilic, N.; Kenney, E.B. & Madzarevic, M. (2001). The effectiveness of enamel matrix proteins used in combination with bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects in humans. *J Clin Periodontol*; **28**: 1016-1022.
- Camargo, P.M.; Lekovic, V.; Weinlaender, M.; Vasilic, N.; Madzarevic, M. & Kenney, E.B. (2002). Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res*; **37**: 300-306.
- Camelo, M.; Nevins, M.L.; Schenk, R.K.; Simion, M.; Rasperini, G.; Lynch, S.E. & Nevins, M. (1998). Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Gide. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **18**: 321-331.
- Camelo, M.; Nevins, M.L.; Schenk, R.K.; Lynch, S.E. & Nevins, M. (2003). Periodontal regeneration in human Class II furcations using purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) with bone allograft. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **23**: 213-225.
- Cardaropoli, G. & Leonhardt, A. S. (2002). Enamel matrix proteins in the treatment of deep intrabony defects. *J Periodontol*; **73**: 501-504.
- Carinci, F.; Pezzetti, F.; Volinia, S.; Laino, G.; Arcelli, D.; Caramelli, E.; Degidi, M. & Piattelli, A. (2004). P-15 cell-binding domain derived from collagen: analysis of MG63 osteoblastic-cell response by means of a microarray technology. *J Periodontol*; **75**: 66-83.
- Carranza, F.A.; Kenney, E.B. Jr.; Lekovic, V.; Talamante, E.; Valencia, J. & Dimitrijevic, B. (1987). Histologic study of healing of human periodontal defects after placement of porous hydroxylapatite implants. *J Periodontol*; **58**: 682-688.
- Casati, M.Z.; Sallum, E.A.; Nociti, F.H. Jr.; Caffesse, R.G. & Sallum, A.W. (2002). Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol*; **73**: 789-796.
- Caton, J. & Zander, H.A. (1976). Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. *J Clin Periodontol*; **3**: 54-58.

- Caton, J. & Nyman, S. (1980). Histometric evaluation of periodontal surgery. I. The modified Widman flap procedure. *J Clin Periodontol*; **7**: 212-223.
- Caton, J.; Nyman, S. & Zander, H. (1980). Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *J Clin Periodontol*; **7**: 224-231.
- Caton, J.G. & Greenstein, G. (1993). Factors related to periodontal regeneration. *Periodontol 2000*; **1**: 9-15.
- Caton, J.; Mota L.; Gandini, L. & Laskaris, B. (1994). Non-human primate models for testing the efficacy and safety of periodontal regeneration procedures. *J Periodontol*; **65**: 1143-1150.
- Chano, L.; Tenenbaum, H.C.; Lekic, P.C.; Sodek, J. & McCulloch, C.A. (2003). Emdogain regulation of cellular differentiation in wounded rat periodontium. *J Periodontal Res*; **38**: 164-174.
- Cho, M.I. & Garant, P.R. (1988). Ultrastructural evidence of directed cell migration during initial cementoblast differentiation in root formation. *J Periodontal Res*; **23**: 268-276.
- Cho, M.I. & Garant, P. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*; **24**: 9-27.
- Claffey, N.; Motsinger, S.; Ambruster, J. & Egelberg, J. (1989). Placement of a porous membrane underneath the mucoperiosteal flap and its effect on periodontal wound healing in dogs. *J Clin Periodontol*; **16**: 12-16.
- Cochran, D.L. & Wozney, J.M. (1999). Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000*; **19**: 40-58.
- Cochran, D.L.; Schenk, R.; Buser, D.; Wozney, J.M. & Jones, A.A. (1999). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol*; **70**: 139-150.
- Cochran, D.L.; Jones, A.A.; Lilly, L.C.; Fiorellini, J.P. & Howell, H. (2000). Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol*; **71**: 1241-1257.

- Cochran, D.L.; Jones, A.; Heijl, L.; Mellonig, J.T.; Schoolfield, J. & King, G.N. (2003a). Periodontal regeneration with a combination of enamel matrix proteins and autogenous bone grafting. *J Periodontol*; **74**: 1269-1281.
- Cochran, D.L.; King, G.N.; Schoolfield, J.; Velasquez-Plata, D.; Mellonig, J.T. & Jones, A. (2003b). The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. *J Periodontol*; **74**: 1043-1055.
- Cole, R.T.; Crigger, M.; Bogle, G.; Egelberg, J. & Selvig, K.A. (1980). Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. *J Periodontal Res*; **15**: 1-9.
- Cole, R.; Nilvéus, R.; Ainamo, J.; Bogle, G.; Crigger, M. & Egelberg, J. (1981). Pilot clinical studies on the effect of topical citric acid application on healing after replaced periodontal flap surgery. *J Periodontal Res*; **16**: 117-122.
- Cortellini, P.; Clauser, C. & Pini-Prato, G.P. (1993). Histologic assessment of new attachment following the treatment of a human buccal recession by means of a guided tissue regeneration procedure. *J Periodontol*; **64**: 387-391.
- Cortellini, P.; Pini-Prato, G.P. & Tonetti, M.S. (1995). The modified papilla preservation technique. A new surgical approach for interproximal regenerative procedures. *J Periodontol*; **66**: 261-266.
- Cortellini, P.; Paolo, G.; Prato, P. & Tonetti, M.S. (1996). Long-term stability of clinical attachment following guided tissue regeneration and conventional therapy. *J Clin Periodontol*; **23**: 106-111.
- Cortellini, P.; Carnevale, G.; Sanz, M. & Tonetti, M.S. (1998). Treatment of deep and shallow intrabony defects. A multicenter randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*; **25**: 981-987.
- Cortellini, P.; Pini-Prato, G.P. & Tonetti, M.S. (1999). The simplified papilla preservation flap. A novel surgical approach for the management of soft tissues in regenerative procedures. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **19**: 589-599.
- Cortellini, P. & Tonetti, M.S. (2000). Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontol 2000*; **22**: 104-132.

- Cortellini, P. & Tonetti, M.S. (2001). Microsurgical approach to periodontal regeneration. Initial evaluation in a case cohort. *J Periodontol*; **72**: 559-569.
- Cortellini, P.; Tonetti, M.S.; Lang, N.P.; Suvan, J.E.; Zucchelli, G.; Vangsted, T.; Silvestri, M.; Rossi, R.; McClain, P.; Fonzar, A.; Dubravec, D. & Adriaens, P. (2001). The simplified papilla preservation flap in the regenerative treatment of deep intrabony defects: clinical outcomes and postoperative morbidity. *J Periodontol*; **72**: 1702-1712.
- Crawford, J.M.; Taubman, M.A. & Smith, D.J. (1978). The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *J Periodontal Res*; **13**: 316-325.
- Crigger, M.; Bogle, G.; Nilvéus, R.; Egelberg, J. & Selvig, K.A. (1978). The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. *J Periodontal Res*; **13**: 538-549.
- Davenport, D.R.; Mailhot, J.M.; Wataha, J.C.; Billman, M.A.; Sharawy, M.M. & ShROUT, M.K. (2003). Effects of enamel matrix protein application on the viability, proliferation, and attachment of human periodontal ligament fibroblasts to diseased root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol*; **30**: 125-131.
- de Lima, V.; Bezerra, M.M.; de Alencar, V.B.; Vidal, F.D.; da Rocha, F.A.; Brito, G.A. & Ribeiro, R. (2000). Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci*; **108**: 123-129.
- de Obarrio, J.J.; Araúz-Dutari, J.I.; Chamberlain, T.M. & Croston, A. (2000). The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **20**: 486-497.
- De Sanctis, M.; Zucchelli, G. & Clauser, C. (1996a). Bacterial colonization of barrier material and periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*; **23**: 1039-1046.
- De Sanctis, M.; Zucchelli, G. & Clauser, C. (1996b). Bacterial colonization of bioabsorbable barrier material and periodontal regeneration. *J Periodontol*; **67**: 1193-1200.

- Dean, D.D.; Lohmann, C.H.; Sylvia, V.L.; Cochran, D.L.; Liu, Y.; Boyan, B.D. & Schwartz, Z. (2002). Effect of porcine fetal enamel matrix derivative on chondrocyte proliferation, differentiation, and local factor production is dependent on cell maturation state. *Cells Tissues Organs*; **171**: 117-127.
- Donos, N.; Sculean, A.; Glavind, L.; Reich, E. & Karring, T. (2003). Wound healing of degree III furcation involvements following guided tissue regeneration and/or Emdogain. A histological study. *J Clin Periodontol*; **30**: 1061-1068.
- Dragoo, M.R. & Kaldahl, W.B. (1983). Clinical and histological evaluation of alloplasts and allografts in regenerative periodontal surgery in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **3**: 8-29.
- Dumitrescu, A.L.; Abd-El-Aleem, S.; Morales-Asa, B. & Donaldson, L.F. (2004). A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol*; **31**: 596-603.
- Eggert, F.M.; Germain, J.P. & Cohen, B. (1980). The gingival epithelium of rodent molars with limited eruption. *Acta Anat*; **107**: 297-306.
- Esposito, M.; Coulthard, P. & Worthington, H.V. (2003). Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003875.
- Fardal, O. & Lowenberg, B.F. (1990). A quantitative analysis of the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts to human dental root surfaces in vitro. *J Periodontol*; **61**: 529-535.
- Fiehn, N.E.; Klausen, B. & Evans, R.T. (1992). Periodontal bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous Streptococcus sanguis. *J Periodontal Res*; **27**: 609-614.
- Fiorellini, J.P. & Nevins, M.L. (2003). Localized ridge augmentation/preservation. A systematic review. *Ann Periodontol*; **8**: 321-327.
- Flemmig, T.F.; Ehmke, B.; Bolz, K.; Kubler, N.R.; Karch, H.; Reuther, J.F. & Klaiber, B. (1998). Long-term maintenance of alveolar bone gain after implantation of autolyzed, antigen-extracted, allogenic bone in periodontal intraosseous defects. *J Periodontol*; **69**: 47-53.

- Francetti, L.; Del Fabbro, M.; Basso, M.; Testori, T. & Weinstein, R. (2004). Enamel matrix proteins in the treatment of intra-bony defects. A prospective 24-month clinical trial. *J Clin Periodontol*; **31**: 52-59.
- Froum, S. & Stahl, S.S. (1987). Human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. II. 13 to 18 months. *J Periodontol*; **58**: 103-109.
- Froum, S.J. (1996). Human histologic evaluation of HTR polymer and freeze-dried bone allograft. A case report. *J Clin Periodontol*; **23**: 615-620.
- Froum, S.J.; Weinberg, M.A. & Tarnow, D. (1998). Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. A clinical study. *J Periodontol*; **69**: 698-709.
- Froum, S.J.; Weinberg, M.A.; Rosenberg, E. & Tarnow, D. (2001). A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: a 12-month re-entry study. *J Periodontol*; **72**: 25-34.
- Froum, S.; Weinberg, M.; Novak, J.; Mailhot, J.; Mellonig, J.; Van Dyke, T.; McClain, P.; Papanou, P.N.; Childers, G.; Ciancio, S.; Blieden, T.; Polson, A.; Greenstein, G.; Yukna, R.; Wallace, M.L.; Patters, M. & Wagener, C. (2004). A multicenter study evaluating the sensitization potential of enamel matrix derivative after treatment of two infrabony defects. *J Periodontol*; **75**: 1001-1008.
- Fuentes, P.; Garrett, S.; Nilvéus, R. & Egelberg, J. (1993). Treatment of periodontal furcation defects. Coronally positioned flap with or without citric acid root conditioning in class II defects. *J Clin Periodontol*; **20**: 425-430.
- Galvão, M.P.; Chapper, A.; Rosing, C.K.; Ferreira, M.B. & de Souza, M.A. (2003). Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras*; **17**: 56-62.
- Gamal, A.Y. & Mailhot, J.M. (2003). The effects of EDTA gel conditioning exposure time on periodontitis-affected human root surfaces: surface topography and PDL cell adhesion. *J Int Acad Periodontol*; **5**: 11-22.
- Garant, P.R. (1976). Plaque-neutrophil interaction in monoinfected rats as visualized by transmission electron microscopy. *J Periodontol*; **47**: 132-138.

- Garant, P.R. & Cho, M.I. (1979a). Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. I. Histometric and histologic study. *J Periodontal Res*; **14**: 297-309.
- Garant, P.R. & Cho, M.I. (1979b). Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. II. Ultrastructural features of the inflamed subepithelial connective tissue. *J Periodontal Res*; **14**: 310-322.
- Garant, P.R.; Paik K.S. & Cho, M.I. (1983). The distribution of plasma cells in naturally occurring periodontitis lesions in rats. A light and electron microscopic study. *J Periodontol*; **54**: 227-235.
- Garnick, J.J. (1977). Long junctional epithelium: epithelial reattachment in the rat. *J Periodontol*; **48**: 722-729.
- Garnick, J.J.; Singh, B. & McKinney, R.V. (1982). Maintenance of long junctional epithelium in the rat. *J Dent Res*; **61**: 681-685.
- Garrett, S. (1996). Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol*; **1**: 621-666.
- Gaspersic, R.; Stiblar-Martincic, D.; Osredkar, J. & Skaleric, U. (2003). Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF-alpha on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*; **38**: 198-203.
- Gestrelius, S.; Andersson, C.; Johansson, A.C.; Persson, E.; Brodin, A.; Rydhag, L. & Hammarström, L. (1997a). Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol*; **24**: 678-684.
- Gestrelius, S.; Andersson, C.; Lidstöm, D.; Hammarström, L. & Somerman, M. (1997b). In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*; **24**: 685-692.
- Giannobile, W.V.; Finkelman, R.D. & Lynch, S.E. (1994). Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol*; **65**: 1158-1168.

- Giannobile, W.V.; Hernandez, R.A.; Finkelman, R.D.; Ryan, S.; Kiritsy, C.P.; D'Andrea, M. & Lynch, S.E. (1996). Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontol Res*; **31**: 301-312.
- Giannobile, W.V.; Ryan, S.; Shih, M.S.; Su, D.L.; Kaplan, P.L. & Chan, T.C. (1998). Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol*; **69**: 129-137.
- Giannobile, W.V. (1999). Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. In: *Tissue engineering applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Marx, R.E. Ed. Quintessence Publishing Co, Inc. Chicago pp231-243.
- Giannobile, W.V.; Lee, C.S.; Tomala, M.P.; Tejada, K.M. & Zhu, Z. (2001). Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *J Periodontol*; **72**: 815-823.
- Giannobile, W.V. & Somerman, M.J. (2003). Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol*; **8**: 193-204.
- Golub, L.M.; Ramamurthy, N.; McNamara, T.F.; Gomes, B.; Wolff, M.; Casino, A.; Kapoor, A.; Zambon, J.; Ciancio, S.; Schneir, M. & Perry, H. (1984). Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res*; **19**: 651-655.
- Gottlow, J.; Nyman, S., Karring, T. & Lindhe, J. (1984). New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol*; **11**: 494-503.
- Gottlow, J.; Nyman, S.; Lindhe, J.; Karring, T. & Wennström, J. (1986). New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol*; **13**: 604-616.
- Gottlow, J.; Karring, T. & Nyman, S. (1990). Guided tissue regeneration following treatment of recession-type defects in the monkey. *J Periodontol*; **61**: 680-685.
- Gottlow, J.; Nyman, S. & Karring, T. (1992). Maintenance of new attachment gained through guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*; **19**: 315-317.

- Graves, D.T.; Kang, Y.M. & Kose, K.N. (1994). Growth factors in periodontal regeneration. *Compend Contin Educ Dent*; **15 Suppl 18**: S672-677.
- Guerra, F.A. (2003). *Biomimética. Formulações haptotáticas para aplicação em regeneração óssea*. Universidade de Coimbra.
- Gunsolley, J.C.; Elswick, R.K. & Davenport, J.M. (1998). Equivalence and superiority testing in regeneration clinical trials. *J Periodontol*; **69**: 521-527.
- Gurinsky, B.S.; Mills, M.P. & Mellonig, J.T. (2004). Clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft and enamel matrix derivative versus enamel matrix derivative alone for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol*; **75**: 1309-1318.
- Gutierrez, M.A.; Mellonig, J.T. & Cochran, D.L. (2003). Evaluation of enamel matrix derivative as an adjunct to non-surgical periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, **30**, 739-745.
- Gyorfi, A.; Fazekas, A.; Suba, Z.; Ender, F. & Rosivall, L. (1994). Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Clin Periodontol*; **21**: 601-605.
- Haase, H.R. & Bartold, P.M. (2001). Enamel matrix derivative induces matrix synthesis by cultured human periodontal fibroblast cells. *J Periodontol*; **72**: 341-348.
- Hagenaars, S.; Louwerse, P.H.; Timmerman, M.F.; Van der Velden, U. & Van der Weijden, G.A. (2004). Soft-tissue wound healing following periodontal surgery and Emdogain application. *J Clin Periodontol*; **31**: 850-856.
- Hahn, J.; Rohrer, M.D. & Tofe, A.J. (2003). Clinical, radiographic, histologic, and histomorphometric comparison of PepGen P-15 particulate and PepGen P-15 flow in extraction sockets: a same-mouth case study. *Implant Dent*; **12**: 170-174.
- Hakki, S.S.; Berry, J.E. & Somerman, M.J. (2001). The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. *J Periodontol*; **72**: 679-687.
- Hamamoto, Y.; Kawasaki, N.; Jarnbring, F. & Hammarström, L. (2002). Effects and distribution of the enamel matrix derivative Emdogain in the periodontal tissues of rat molars transplanted to the abdominal wall. *Dent Traumatol*; **18**: 12-23.

- Hammarström, L. (1997). Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*; **24**: 658-668.
- Hammarström, L.; Heijl, L. & Gestrelus, S. (1997). Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*; **24**: 669-677.
- Handelsman, M.; Davarpanah, M. & Celletti, R. (1991). Guided tissue regeneration with and without citric acid treatment in vertical osseous defects. *Int J Periodont Res Dent*; **11**: 351- 363.
- Haney, J.M.; Nilvéus, R.E.; McMillan, P.J. & Wikesjö, U.M. (1993). Periodontal repair in dogs: expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes support wound stabilization and enhance bone regeneration. *J Periodontol*; **64**: 883-890.
- Harrel, S.K.; Wilson, T.G. & Nunn, M.E. (2005). Prospective assessment of the use of enamel matrix proteins with minimally invasive surgery. *J Periodontol*; **76**: 380-384.
- Hartman, G.A.; Arnold, R.M.; Mills, M.P.; Cochran, D.L. & Mellonig, J.T. (2004). Clinical and histologic evaluation of anorganic bovine bone collagen with or without a collagen barrier. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **24**: 127-135.
- He, J.; Jiang, J.; Safavi, K.E.; Spångberg, L.S. & Zhu, Q. (2004). Emdogain promotes osteoblast proliferation and differentiation and stimulates osteoprotegerin expression. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; **97**: 239-245.
- Heard, R.H.; Mellonig, J.T.; Brunsvold, M.A.; Lasho, D.J.; Meffert, R.M. & Cochran, D.L. (2000). Clinical evaluation of wound healing following multiple exposures to enamel matrix protein derivative in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Periodontol*; **71**: 1715-1721.
- Heden, G.; Wennström, J. & Lindhe, J. (1999). Periodontal tissue alterations following Emdogain treatment of periodontal sites with angular bone defects. A series of case reports. *J Clin Periodontol*; **26**: 855-860.
- Heden, G. (2000). A case report study of 72 consecutive Emdogain-treated intrabony periodontal defects: clinical and radiographic findings after 1 year. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **20**: 127-139.

- Heijl, L.; Wennström, J.; Lindhe, J. & Socransky, S.S. (1980). Periodontal disease in gnotobiotic rats. *J Periodontal Res*; **15**: 405-419.
- Heijl, L. (1997). Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*; **24**: 693-696.
- Heijl, L.; Heden, G.; Svärdröm, G. & Östgren, A. (1997). Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol*; **24**: 705-714.
- Hemmerle, J. & Frank, R.M. (1991). Bacterial invasion of periodontal tissues after experimental immunosuppression in rats. *J Biol Buccale*; **19**: 271-282.
- Heymann, R.; Wroblewski, J.; Terling, C.; Midtvedt, T. & Öbrink, B. (2001). The characteristic cellular organization and CEACAM1 expression in the junctional epithelium of rats and mice are genetically programmed and not influenced by the bacterial microflora. *J Periodontol*; **72**: 454-460.
- Hiatt, W.H.; Schallhorn, R.G. & Aaronian, A.J. (1978). The induction of new bone and cementum formation. IV. Microscopic examination of the periodontium following human bone and marrow allograft, autograft and nongraft periodontal regenerative procedures. *J Periodontol*; **49**: 495-512.
- Hoang, A.M.; Oates, T.W. & Cochran, D.L. (2000). In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol*; **71**: 1270-1277.
- Hoang, A.M.; Klebe, R.J.; Steffensen, B.; Ryu, O.H.; Simmer, J.P. & Cochran, D.L. (2002). Amelogenin is a cell adhesion protein. *J Dent Res*; **81**: 497-500.
- Howell, T.H.; Fiorellini, J.P.; Paquette, D.W.; Offenbacher, S.; Giannobile, W.V. & Lynch, S.E. (1997). A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol*; **68**: 1186-1193.
- Irving, J.T.; Socransky, S.S. & Heeley, J.D. (1974). Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. *J Periodontal Res*; **9**: 73-80.
- Isidor, F.; Karring, T.; Nyman, S. & Lindhe, J. (1985). New attachment formation on citric acid treated roots. *J Periodont Res*; **20**: 421-430.

- Isogai, E.; Isogai H.; Sawada H.; Kaneko H.; Ito N et al. (1985). Microbial ecology of plaque in rats with naturally occurring gingivitis. *Infect Immun*; **48**: 520-527.
- Isogai, E.; Isogai, H.; Sawada, H. & Ito, N. (1986). Bacterial adherence to gingival epithelial cells of rats with naturally occurring gingivitis. *J Periodontol*; **57**: 225-230.
- Jepsen, S.; Eberhard, J.; Herrera, D. & Needleman, I. (2002). A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? *J Clin Periodontol*; **29 Suppl 3**, 103-116; discussion: 160-102.
- Jiang, J.; Fouad, A.F.; Safavi, K.E.; Spångberg, L.S. & Zhu, Q. (2001a). Effects of enamel matrix derivative on gene expression of primary osteoblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; **91**: 95-100.
- Jiang, J.; Safavi, K.E., Spångberg, L.S. & Zhu, Q. (2001b). Enamel matrix derivative prolongs primary osteoblast growth. *J Endod*; **27**: 110-112.
- Jin, Q.M.; Anusaksathien, O.; Webb, S.A.; Rutherford, R.B. & Giannobile, W.V. (2003a). Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *J Periodontol*; **74**: 202-213.
- Jin, Q.M.; Zhao, M.; Webb, S.A.; Berry, J.E.; Somerman, M.J. & Giannobile, W.V. (2003b). Cementum engineering with three-dimensional polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*; **67A**: 54-60.
- Johnson, I.H. (1975). Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res*; **10**: 332-345.
- Jordan, H.V.; Keyes, P.H. & Bellack, S. (1972). Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with *actinomyces* of human origin. *J Periodontal Res*; **7**: 21-28.
- Kalpidis, C.D. & Ruben, M.P. (2002). Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *J Periodontol*; **73**: 1360-1376.
- Karimbux, N.Y.; Ramamurthy, N.S.; Golub, L.M. & Nishimura, I. (1998). The expression of collagen I and XII mRNAs in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats: the effect of doxycycline and chemically modified tetracycline. *J Periodontol*; **69**: 34-40.

- Karring, T.; Nyman, S. & Lindhe, J. (1980). Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol*; **7**: 96-105.
- Karring, T.; Isidor, F.; Nyman, S. & Lindhe, J. (1985). New attachment formation on the teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol*; **12**: 51-60.
- Karring, T.; Lindhe, J. & Cortellini, P. (2003). Regenerative Periodontal Therapy. In: *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Lindhe, J; Karring, T.; Lang, N.P. Eds. Blackwell Munksgaard. 4th Ed. Oxford pp650-704.
- Kawana, F.; Sawae, Y.; Sahara, T.; Tanaka, S.; Debari, K.; Shimizu, M. & Sasaki, T. (2001). Porcine enamel matrix derivative enhances trabecular bone regeneration during wound healing of injured rat femur. *Anat Rec*; **264**: 438-446.
- Kawase, T.; Okuda, K.; Yoshie, H. & Burns, D.M. (2000). Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. *J Periodontal Res*; **35**: 291-300.
- Kawase, T.; Okuda, K.; Momose, M.; Kato, Y.; Yoshie, H. & Burns, D.M. (2001). Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodontal Res*; **36**: 367-376.
- Kawase, T.; Okuda, K.; Yoshie, H. & Burns, D.M. (2002). Anti-TGF-beta antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21WAF1/cip1 and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodontal Res*; **37**: 255-262.
- Kawase, T.; Okuda, K.; Wolff, L.F. & Yoshie, H. (2003). Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*; **74**: 858-864.
- Keith, J.D. Jr. (2004). Localized ridge augmentation with a block allograft followed by secondary implant placement: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **24**: 11-17.
- Kennedy, J.E. & Polson, A.M. (1973). Experimental marginal periodontitis in squirrel monkeys. *J Periodontol*; **44**: 140-144.
- Kindlova, M.; Marikova, Z. & Broukal, Z. (1981). Age-dependent changes in the rat periodontium. *J Periodontal Res*; **16**: 497-503.

- Kinoshita, A.; Oda, S.; Takahashi, K.; Yokota, S. & Ishikawa, I. (1997). Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol*; **68**: 103-109.
- Klausen, B.; Hougen, H.P.; Eriksen, W.H. & Fiehn, N.E. (1986). Induction of periodontal bone loss in athymic (nude) rats monoinfected with *streptococcus mutans*. *J Periodontal Res*; **21**: 5-12.
- Klausen, B. (1991). Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*; **62**: 59-73.
- Klinge, B. (1997). Root Surface Conditioning In *Proceedings of the 2nd European Workshop on Periodontology. Chemicals in Periodontics*. Lindhe, J. Ed. Quintessence Books. Berlin pp276-283.
- Koide, M.; Suda, S.; Saitoh, S.; Ofuji, Y.; Suzuki, T.; Yoshie, H.; Takai, M.; Ono, Y.; Taniguchi, Y. & Hara, K. (1995). *In vivo* administration of IL-1 beta accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *J Oral Pathol Med*; **24**: 420-434.
- Kornman, K.S. & Robertson, P.B. (2000). Fundamental principles affecting the outcomes of therapy for osseous lesions. *Periodontol 2000*; **22**: 22-43.
- Krauser, J.T.; Rohrer, M.D. & Wallace, S.S. (2000). Human histologic and histomorphometric analysis comparing OsteoGraf/N with PepGen P-15 in the maxillary sinus elevation procedure: a case report. *Implant Dent*; **9**: 298-302.
- Kuhr, A.; Popa-Wagner, A.; Schmoll, H.; Schwahn, C. & Kocher, T. (2004). Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*; **39**: 101-106.
- Lallier, T.E.; Yukna, R.; St Marie, S. & Moses, R. (2001). The putative collagen binding peptide hastens periodontal ligament cell attachment to bone replacement graft materials. *J Periodontol*; **72**: 990-997.
- Laurell, L.; Gottlow, J.; Zybutz, M. & Persson, R. (1998). Treatment of intrabony defects by different surgical procedures. A literature review. *J Periodontol*; **69**: 303-313.
- Lekic, P. & McCulloch, C.A. (1996). Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec*; **245**: 327-341.

- Lekovic, V.; Camargo, P.M.; Weinlaender, M.; Nedic, M.; Aleksic, Z. & Kenney, E.B. (2000). A comparison between enamel matrix proteins used alone or in combination with bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol*; **71**: 1110-1116.
- Lekovic, V.; Camargo, P.M.; Weinlaender, M.; Kenney, E.B. & Vasilic, N. (2001a). Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol*; **72**: 583-589.
- Lekovic, V.; Camargo, P.M.; Weinlaender, M.; Vasilic, N.; Djordjevic, M. & Kenney, E.B. (2001b). The use of bovine porous bone mineral in combination with enamel matrix proteins or with an autologous fibrinogen/fibronectin system in the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol*; **72**: 1157-1163.
- Lekovic, V.; Camargo, P.M.; Weinlaender, M.; Vasilic, N. & Kenney, E.B. (2002). Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol*; **73**: 198-205.
- Lekovic, V.; Camargo, P.M.; Weinlaender, M.; Vasilic, N.; Aleksic, Z. & Kenney, E.B. (2003). Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *J Clin Periodontol*; **30**: 746-751.
- Lindhe, J. & Nyman, S. (1975). The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *J Clin Periodontol*; **2**: 67-79.
- Lindhe, J. & Ericsson, I. (1978). Effect of ligature placement and dental plaque on periodontal tissue breakdown in the dog. *J Periodontol*; **49**: 343-350.
- Lindhe, J. & Nyman, S. (1984). Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*; **11**: 504-514.
- Lindhe, J.; Westfelt, E.; Nyman, S.; Socransky, S.S. & Haffajee, A.D. (1984). Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*; **11**: 448-458.

- Listgarten, M.A. (1975). Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. *J Periodontol*; **46**: 677-680.
- Listgarten, M.A.; Johnson D.; Nowotny, A.; Tanner, A.C. & Socransky, S.S. (1978). Histopathology of periodontal disease in gnotobiotic rats monoinfected with *Eikenella corrodens*. *J Periodontal Res*; **13**: 134-148.
- Listgarten, M.A. & Rosenberg, M.M. (1979). Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J Periodontol*; **50**: 333-344.
- Listgarten, M.A.; Rosenberg, S. & Lerner, S. (1982). Progressive replacement of epithelial attachment by a connective tissue junction after experimental periodontal surgery in rats. *J Periodontol*; **53**: 659-670.
- Llavaneras, A.; Ramamurthy, N.S.; Heikkilä, P.; Teronen, O.; Salo, T.; Rifkin, B.R.; Ryan, M.E.; Golub, L.M. & Sorsa, T. (2001). A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J Periodontol*; **72**: 1069-1077.
- Löe, H.; Anerud, A.; Boysen, H. & Morrison, E. (1986). Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*; **13**: 431-445.
- Lowenguth, R.A. & Blieden, T.M. (1993). Periodontal regeneration: root surface demineralization. *Periodontol 2000*; **1**: 54-68.
- Lynch, S.E.; de Castilla, G.R.; Williams, R.C.; Kiritsy, C.P.; Howell, T.H.; Reddy, M.S. & Antoniadis, H.N. (1991). The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*; **62**: 458-467.
- Lynch, S.E.; Genco, R.J. & Marx, R.E. (Eds) (1999). *Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Quintessence Publishing Co, Inc. Chicago.
- Lyngstadaas, S.P.; Lundberg, E.; Ekdahl, H.; Andersson, C. & Gestrelus, S. (2001). Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*; **28**: 181-188.

- Machtei, E.E.; Grossi, S.G.; Dunford, R.; Zambon, J.J. & Genco, R.J. (1996). Long-term stability of Class II furcation defects treated with barrier membranes. *J Periodontol*; **67**: 523-527.
- Magnusson, I.; Runstad, L.; Nyman, S. & Lindhe, J. (1983). A long junctional epithelium - a locus minoris resistentiae in plaque infection? *J Clin Periodontol*; **10**: 333-340.
- Magnusson, I.; Claffey, N.; Bogle, G.; Garrett, S. & Egelberg, J. (1985). Root resorption following periodontal flap procedures in monkeys. *J Periodontal Res*; **20**: 79-85.
- Mariotti, A. (2003). Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. *Ann Periodontol*; **8**: 205-226.
- Marx, R.E.; Carlson, E.R.; Eichstaedt, R.M.; Schimmele, S.R.; Strauss, J.E. & Georgeff, K.R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; **85**: 638-646.
- Matsuda, N.; Horikawa, M.; Watanabe, M.; Kitagawa, S.; Kudo, Y. & Takata, T. (2002). Possible involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in mitogenic response of periodontal ligament cells to enamel matrix derivative. *Eur J Oral Sci*; **110**: 439-444.
- Mayfield, L.; Söderholm, G.; Norderyd, O. & Attström, R. (1998). Root conditioning using EDTA gel as an adjunct to surgical therapy for the treatment of intraosseous periodontal defects. *J Clin Periodontol*; **25**: 707-714.
- Mazor, Z.; Peleg, M.; Garg, A.K. & Luboshitz, J. (2004). Platelet-Rich Plasma for Bone Graft Enhancement in Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement: Patient Series Study. *Implant Dent*; **13**: 65-72.
- McClain, P.K. & Schallhorn, R.G. (1993). Long-term assessment of combined osseous composite grafting, root conditioning, and guided tissue regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **13**: 9-27.
- McClain, P.K. & Schallhorn, R.G. (2000). Focus on furcation defects—guided tissue regeneration in combination with bone grafting. *Periodontol 2000*; **22**: 190-212.
- Meadows, C.L.; Gher, M.E.; Quintero, G. & Lafferty, T.A. (1993). A comparison of polylactic acid granules and decalcified freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. *J Periodontol*; **64**: 103-109.

- Melcher, A.H. (1976). On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*; **47**: 256-260.
- Mellonig, J.T. (1999). Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery: technique and clinical and histologic case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **19**: 8-19.
- Minabe, M.; Kodama, T.; Kogou, T.; Takeuchi, K.; Fushimi, H.; Sugiyama, T. & Mitarai, E. (2002). A comparative study of combined treatment with a collagen membrane and enamel matrix proteins for the regeneration of intraosseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **22**: 595-605.
- Moore, J.A.; Ashley, F.P. & Waterman, C.A. (1987). The effect on healing of the application of citric acid during replaced flap surgery. *J Clin Periodontol*; **14**: 130-135.
- Moskow, B.S.; Karsh, F. & Stein, S.D. (1979). Histological assessment of autogenous bone graft. A case report and critical evaluation. *J Periodontol*; **50**: 291-300.
- Murphy, K. G. (1996). Interproximal tissue maintenance in GTR procedures: description of a surgical technique and 1 year reentry results. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **16**: 463-477.
- Murphy, K.G. & Gunsolley, J.C. (2003). Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Periodontol*; **8**: 266-302.
- Nagano, T.; Iwata, T.; Ogata, Y.; Tanabe, T.; Gomi, K.; Fukae, M.; Arai, T. & Oida, S. (2004). Effect of heat treatment on bioactivities of enamel matrix derivatives in human periodontal ligament (HPDL) cells. *J Periodontal Res*; **39**: 249-256.
- Nanci, A. (Ed) (2003). *Ten Cate's Oral Histology. Development, structure and function*. Mosby. 6th Ed. St Louis pp240-274; 397-416.
- Navia, J.M. (1977). *Animal Models in Dental Research*. The University of Alabama Press. Alabama pp298-337.
- Needleman, I.; Tucker, R.; Giedrys-Leeper, E. & Worthington, H. (2002). A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal infrabony defects. *J Periodontal Res*; **37**: 380-388.

- Nevins, M.L.; Camelo, M.; Nevins, M.; King, C.J.; Oringer, R.J.; Schenk, R.K. & Fiorellini, J.P. (2000). Human histologic evaluation of bioactive ceramic in the treatment of periodontal osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **20**: 458-467.
- Nevins, M.; Camelo, M.; Nevins, M. L.; Schenk, R.K. & Lynch, S.E. (2003a). Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol*; **74**: 1282-1292.
- Nevins, M.L.; Camelo, M.; Lynch, S.E.; Schenk, R.K. & Nevins, M. (2003b). Evaluation of periodontal regeneration following grafting intrabony defects with bio-oss collagen: a human histologic report. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **23**: 9-17.
- Newman, S.A.; Coscia, S.A.; Jotwani, R.; Iacono, V.J. & Cutler, C.W. (2003). Effects of enamel matrix derivative on *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*; **74**: 1191-1195.
- Nociti, F.H. Jr.; Nogueira-Filho, G.R.; Primo, M.T.; Machado, M.A.; Tramontina, V.A.; Barros, S.P. & Sallum, E.A. (2000). The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol*; **71**: 1460-1464.
- Nyman, S.; Karring, T.; Lindhe, J. & Planten, S. (1980). Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*; **7**: 394-401.
- Nyman, S.; Lindhe, J. & Karring, T. (1981). Healing following surgical treatment and root demineralization in monkeys with periodontal disease. *J Clin Periodontol*; **8**: 249-258.
- Nyman, S.; Gottlow, J.; Karring, T. & Lindhe, J. (1982a). The regenerative potential of periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol*; **9**: 257-265.
- Nyman, S.; Lindhe, J.; Karring, T. & Rylander, H. (1982b). New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*; **9**: 290-296.
- Ohshima, M.; Suzuki, N.; Yamaguchi, Y.; Maeno, M.; Otsuka, K. & Ito, K. (2002). Effect of enamel matrix derivative on the differentiation of C2C12 cells. *J Periodontol*; **73**: 543-550.

- Okubo, K.; Kobayashi, M.; Takiguchi, T.; Takada, T.; Ohazama, A.; Okamatsu, Y. & Hasegawa, K. (2003). Participation of endogenous IGF-I and TGF-beta 1 with enamel matrix derivative-stimulated cell growth in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*; **38**: 1-9.
- Okuda, K.; Murata, M.; Sugimoto, M.; Saito, Y.; Kabasawa, Y.; Yoshie, H.; Saku, T. & Hara, K. (1998). TGF-beta1 influences early gingival wound healing in rats: an immunohistochemical evaluation of stromal remodelling by extracellular matrix molecules and PCNA. *J Oral Pathol Med*; **27**: 463-469.
- Okuda, K.; Momose, M.; Miyazaki, A.; Murata, M.; Yokoyama, S.; Yonezawa, Y.; Wolff, L.F. & Yoshie, H. (2000). Enamel matrix derivative in the treatment of human intrabony osseous defects. *J Periodontol*; **71**: 1821-1828.
- Okuda, K.; Miyazaki, A.; Momose, M.; Murata, M.; Nomura, T.; Kubota, T.; Wolff, L.F. & Yoshie, H. (2001). Levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and matrix metalloproteinases-1 and -8 in gingival crevicular fluid following treatment with enamel matrix derivative (EMDOGAIN). *J Periodontal Res*; **36**: 309-316.
- Okuda, K.; Kawase, T.; Momose, M.; Murata, M.; Saito, Y.; Suzuki, H.; Wolff, L.F. & Yoshie, H. (2003). Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*; **74**: 849-857.
- Oringer, R.J. (2002). Biological mediators for periodontal and bone regeneration. *Compend Contin Educ Dent*; **23**: 501-510.
- Ouhayoun, J. (1997). Bone grafts and biomaterials used as bone graft substitutes. In: *Proceedings of the 2nd European Workshop on Periodontology. Chemicals in Periodontics*. Lindhe, J. Ed. Quintessence Books. Berlin pp313-356.
- Page, R.C. & Schroeder, H.E. (1982). *Periodontitis in Man and Other Animals. A Comparative Review*. Karger. Basel pp58-239.
- Page, R.C. (1994). Animal models in reconstructive periodontal therapy. *J Periodontol*; **65**: 1142.
- Page, R.C.; Offenbacher, S.; Schroeder, H.E.; Seymour, G.J. & Kornman, K.S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*; **14**: 216-248.

- Papapanou, P.N. & Tonetti, M.S. (2000). Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions. *Periodontol 2000*; **22**: 8-21.
- Parashis, A. & Tsiklakis, K. (2000). Clinical and radiographic findings following application of enamel matrix derivative in the treatment of intrabony defects. A series of case reports. *J Clin Periodontol*; **27**: 705-713.
- Parkar, M.H. & Tonetti, M. (2004). Gene expression profiles of periodontal ligament cells treated with enamel matrix proteins in vitro: analysis using cDNA arrays. *J Periodontol*; **75**: 1539-1546.
- Parodi, R.; Liuzzo, G.; Patrucco, P.; Brunel, G.; Santarelli, G.A.; Birardi, V. & Gasparetto, B. (2000). Use of Emdogain in the treatment of deep intrabony defects: 12-month clinical results. Histologic and radiographic evaluation. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **20**: 584-595.
- Parodi, R.; Santarelli, G.A. & Gasparetto, B. (2004). Treatment of intrabony pockets with Emdogain: results at 36 months. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **24**: 57-63.
- Petinaki, E.; Nikolopoulos, S. & Castanas, E. (1998). Low stimulation of peripheral lymphocytes, following in vitro application of Emdogain. *J Clin Periodontol*; **25**: 715-720.
- Petrungaro, P.S. (2001). Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent*; **22**: 729-732.
- Pietruska, M.D. (2001). A comparative study on the use of Bio-Oss and enamel matrix derivative (Emdogain) in the treatment of periodontal bone defects. *Eur J Oral Sci*, **109**, 178-181.
- Pini Prato, G.P.; Rotundo, R.; Magnani, C. & Soranzo, C. (2000). Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **20**: 552-559.
- Pitaru, S. & Melcher, A.H. (1987). Organization of an oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblasts attached to dental tissue: relationship between cells and mineralized and demineralized tissue. *J Periodontal Res*; **22**: 6-13.

- Pitaru, S.; McCulloch, C.A. & Narayanan, S.A. (1994). Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res*; **29**: 81-94.
- Pontoriero, R.; Lindhe, J.; Nyman, S.; Karring, T.; Rosenberg, E. & Sanavi, F. (1988). Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars. A clinical study. *J Clin Periodontol*; **15**: 247-254.
- Pontoriero, R.; Lindhe, J.; Nyman, S.; Karring, T.; Rosenberg, E. & Sanavi, F. (1989). Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. A clinical study of degree III involvements. *J Clin Periodontol*; **16**: 170-174.
- Pontoriero, R.; Nyman, S.; Ericsson, I. & Lindhe, J. (1992). Guided tissue regeneration in surgically-produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog. *J Clin Periodontol*; **19**: 159-163.
- Pontoriero, R. & Lindhe, J. (1995). Guided tissue regeneration in the treatment of degree III furcation defects in maxillary molars. *J Clin Periodontol*; **22**: 810-812.
- Pontoriero, R.; Wennström, J. & Lindhe, J. (1999). The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled clinical study. *J Clin Periodontol*; **26**: 833-840.
- Pontoriero, R.; Wennström, J. & Lindhe, J. (1999). The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled clinical study. *J Clin Periodontol*; **26**: 833-840.
- Qian, J.J. & Bhatnagar, R.S. (1996). Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res*; **31**: 545-554.
- Ramfjord, S.P.; Caffesse, R.G.; Morrison, E.C.; Hill, R.W.; Kerry, G.J.; Appleberry, E.A.; Nissle, R.R. & Stults, D.L. (1987). 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol*; **14**: 445-452.
- Rasperini, G.; Ricci, G. & Silvestri, M. (1999). Surgical technique for treatment of infrabony defects with enamel matrix derivative (Emdogain): 3 case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*, **19**, 578-587.
- Register, A.A. & Burdick, F.A. (1975). Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range. *J Periodontol*; **46**: 646-655.

- Renvert, S. & Persson, G.R. (2002). A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. *J Clin Periodontol*; **29 Suppl 3**: 82-89; discussion: 90-81.
- Reymond, F. & Cimasoni, G. (1997). Radiographic measurement of alveolar bone loss in the living rat. *J Periodontol*; **68**: 141-144.
- Reynolds, M.A. & Bowers, G.M. (1996). Fate of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony defects. *J Periodontol*; **67**: 150-157.
- Reynolds, M.A.; Aichelmann-Reidy, M.E.; Branch-Mays, G.L. & Gunsolley, J.C. (2003). The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol*; **8**: 227-265.
- Richardson, C.R.; Mellonig, J.T.; Brunsvold, M.A.; McDonnell, H.T. & Cochran, D.L. (1999). Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Clin Periodontol*; **26**: 421-428.
- Rincon, J.C.; Haase, H.R. & Bartold, P.M. (2003). Effect of Emdogain on human periodontal fibroblasts in an in vitro wound-healing model. *J Periodontal Res*; **38**: 290-295.
- Ripamonti, U. & Reddi, A.H. (1994). Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J Periodontal Res*; **29**: 225-235.
- Ripamonti, U.; Heliotis, M.; Rueger, D.C. & Sampath, T.K. (1996). Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hop-1/bmp-7) in the baboon (*Papio ursinus*). *Arch Oral Biol*; **41**: 121-126.
- Ripamonti, U.; Crooks, J.; Petit, J.C. & Rueger, D.C. (2001). Periodontal tissue regeneration by combined applications of recombinant human osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-2. A pilot study in Chacma baboons (*Papio ursinus*). *Eur J Oral Sci*; **109**: 241-248.
- Ririe, C.M.; Crigger, M. & Selvig, K.A. (1980). Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. *J Periodontal Res*; **15**: 314-327.

- Robinson, M.; Hart, D. & Pigott, G.H. (1991). The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. *Lab Anim*; **25**: 247-253.
- Romanowski, A.W.; Squier, C.A. & Lesch, C.A. (1988). Permeability of rodent junctional epithelium to exogenous protein. *J Periodontal Res*; **23**: 81-86.
- Rosen, P.S.; Marks, M.H. & Reynolds, M.A. (1996). Influence of smoking on long-term clinical results of intrabony defects treated with regenerative therapy. *J Periodontol*; **67**: 1159-1163.
- Rosen, P.S.; Reynolds, M.A. & Bowers, G.M. (2000). The treatment of intrabony defects with bone grafts. *Periodontol 2000*; **22**: 88-103.
- Rosen, P.S. & Reynolds, M.A. (2002). A retrospective case series comparing the use of demineralized freeze-dried bone allograft and freeze-dried bone allograft combined with enamel matrix derivative for the treatment of advanced osseous lesions. *J Periodontol*; **73**: 942-949.
- Roux, D.; Meunier, C. & Woda, A. (1993). A biometric analysis in the rat of the horizontal component of physiological tooth migration and its response to altered occlusal function. *Arch Oral Biol*; **38**: 957-963.
- Rutherford, R.B.; Niekrash, C.E.; Kennedy, J.E. & Charette, M.F. (1992). Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontal Res*; **27**: 285-290.
- Rutherford, R.B.; Ryan, M.E.; Kennedy, J.E.; Tucker, M.M. & Charette, M.F. (1993). Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol*; **20**: 537-544.
- Ryder, M.I. (1980a). Histological and ultrastructural characteristics of the periodontal syndrome in the rice rat. I. General light microscopic observations and ultrastructural observations of initial inflammatory changes. *J Periodontal Res*; **15**: 502-515.
- Ryder, M.I. (1980b). Histological and ultrastructural characteristics of the periodontal syndrome in the rice rat. II. Ultrastructural observations on changes in the gingival sulcus, gingival epithelium and lamina propria. *J Periodontal Res*; **15**: 574-584.

- Ryder, M.I. (1980c). Histological and ultrastructural characteristics of the periodontal syndrome in the rice rat. III. Ultrastructural observations on changes in the transseptal fiber area and alveolar crest. *J Periodontal Res*; **15**: 585-598.
- Sallay, K.; Sanavi, F.; Ring, I.; Pham, P.; Behling, U.H. & Nowotny, A. (1982). Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontal Res*; **17**: 263-274.
- Sallay, K.; Listgarten, M.; Sanavi, F.; Ring, I. & Nowotny, A. (1984). Bacterial invasion of oral tissues of immunosuppressed rats. *Infect Immun*; **43**: 1091-1093.
- Sallum, E.A.; Pimentel, S.P.; Saldanha, J.B.; Nogueira-Filho, G.R.; Casati, M.Z.; Nociti, F.H. & Sallum, A.W. (2004). Enamel matrix derivative and guided tissue regeneration in the treatment of dehiscence-type defects: a histomorphometric study in dogs. *J Periodontol*; **75**: 1357-1363.
- Samaranayake, L.P. (2002). *Essential Microbiology for Dentistry*. Churchill Livingstone. 2nd Ed Edinburgh pp105-109.
- Samejima, Y.; Ebisu, S. & Okada, H. (1990). Effect of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*; **25**: 308-315.
- Sanavi, F.; Listgarten, M.A.; Boyd, F.; Sallay, K. & Nowotny, A. (1985). The colonization and establishment of invading bacteria in periodontium of ligature-treated immunosuppressed rats. *J Periodontol*; **56**: 273-280.
- Sanz, M. & Giovannoli, J.L. (2000). Focus on furcation defects: guided tissue regeneration. *Periodontol 2000*; **22**: 169-189.
- Sanz, M.; Tonetti, M.S.; Zabalegui, I.; Sicilia, A.; Blanco, J.; Rebelo, H.; Rasperini, G.; Merli, M.; Cortellini, P. & Suvan, J.E. (2004). Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or barrier membranes: results from a multicenter practice-based clinical trial. *J Periodontol*; **75**: 726-733.
- Sawae, Y.; Kawana, F.; Sahara, T. & Sasaki, T. (2001). Effects of Emdogain on calcified nodule formation in rat parietal bone defects. *J Dent Res*; **80**: 1338 (abstract 103).
- Saygin, N.E.; Giannobile, W.V. & Somerman, M.J. (2000). Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol 2000*; **24**: 73-98.

- Scarano, A.; Iezzi, G.; Petrone, G.; Orsini, G.; Degidi, M.; Strocchi, R. & Piattelli, A. (2003). Cortical bone regeneration with a synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric pilot study. *Implant Dent*; **12**: 318-324.
- Scheyer, E.T.; Velasquez-Plata, D.; Brunsvold, M.A.; Lasho, D.J. & Mellonig, J.T. (2002). A clinical comparison of a bovine-derived xenograft used alone and in combination with enamel matrix derivative for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol*; **73**: 423-432.
- Schroeder, H.E. (1992). Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol*; **142**: 1-59.
- Schwartz, Z.; Carnes, D.L. Jr.; Pulliam, R.; Lohmann, C.H.; Sylvia, V.L.; Liu, Y.; Dean, D.D.; Cochran, D.L. & Boyan, B.D. (2000). Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol*; **71**: 1287-1296.
- Sculean, A.; Donos, N.; Reich, E.; Karring, T. & Brex, M. (1998). Regeneration of oxytalan fibres in different types of periodontal defects: a histological study in monkeys. *J Periodontal Res*; **33**: 453-459.
- Sculean, A.; Donos, N.; Blaes, A.; Lauermann, M.; Reich, E. & Brex, M. (1999a). Comparison of enamel matrix proteins and bioabsorbable membranes in the treatment of intrabony periodontal defects. A split-mouth study. *J Periodontol*; **70**: 255-262.
- Sculean, A.; Donos, N.; Windisch, P.; Brex, M.; Gera, I.; Reich, E. & Karring, T. (1999b). Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration. *J Periodontal Res*, **34**, 310-322.
- Sculean, A.; Reich, E.; Chiantella, G.C. & Brex, M. (1999c). Treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative (Emdogain): a report of 32 cases. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **19**: 157-163.
- Sculean, A.; Chiantella, G.C.; Windisch, P. & Donos, N. (2000a). Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative (Emdogain). *Int J Periodontics Restorative Dent*; **20**: 374-381.

- Sculean, A.; Donos, N.; Brex, M.; Karring, T. & Reich, E. (2000b). Healing of fenestration-type defects following treatment with guided tissue regeneration or enamel matrix proteins. An experimental study in monkeys. *Clin Oral Investig*; **4**: 50-56.
- Sculean, A.; Donos, N.; Brex, M.; Reich, E. & Karring, T. (2000c). Treatment of intrabony defects with guided tissue regeneration and enamel-matrix-proteins. An experimental study in monkeys. *J Clin Periodontol*; **27**: 466-472.
- Sculean, A.; Auschill, T.M.; Donos, N.; Brex, M. & Arweiler, N.B. (2001a). Effect of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) on ex vivo dental plaque vitality. *J Clin Periodontol*; **28**: 1074-1078.
- Sculean, A.; Blaes, A.; Arweiler, N.; Reich, E.; Donos, N. & Brex, M. (2001b). The effect of postsurgical antibiotics on the healing of intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins. *J Periodontol*; **72**: 190-195.
- Sculean, A.; Donos, N.; Miliauskaite, A.; Arweiler, N. & Brex, M. (2001c). Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or bioabsorbable membranes. A 4-year follow-up split-mouth study. *J Periodontol*; **72**: 1695-1701.
- Sculean, A.; Windisch, P.; Chiantella, G.C.; Donos, N.; Brex, M. & Reich, E. (2001d). Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. A prospective controlled clinical study. *J Clin Periodontol*; **28**: 397-403.
- Sculean, A.; Barbé, G.; Chiantella, G.C.; Arweiler, N.B.; Berakdar, M. & Brex, M. (2002a). Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol*; **73**: 401-408.
- Sculean, A.; Chiantella, G.C.; Windisch, P.; Gera, I. & Reich, E. (2002b). Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) combined with a bovine-derived xenograft (Bio-Oss) for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **22**: 259-267.
- Sculean, A.; Windisch, P.; Keglevich, T.; Fabi, B.; Lundgren, E. & Lyngstadaas, P.S. (2002c). Presence of an enamel matrix protein derivative on human teeth following periodontal surgery. *Clin Oral Investig*; **6**: 183-187.

- Sculean, A.; Windisch, P.; Keglevich, T.; Chiantella, G.C.; Gera, I. & Donos, N. (2003a). Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative combined with a bovine-derived xenograft. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **23**: 47-55.
- Sculean, A.; Windisch, P.; Keglevich, T. & Gera, I. (2003b). Histologic evaluation of human intrabony defects following non-surgical periodontal therapy with and without application of an enamel matrix protein derivative. *J Periodontol*; **74**: 153-160.
- Sculean, A.; Donos, N.; Schwarz, F.; Becker, J.; Brex, M. & Arweiler, N.B. (2004). Five-year results following treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*; **31**: 545-549.
- Sculean, A.; Pietruska, M.; Schwarz, F.; Willershausen, B.; Arweiler, N.B. & Auschill, T.M. (2005). Healing of human intrabony defects following regenerative periodontal therapy with an enamel matrix protein derivative alone or combined with a bioactive glass. A controlled clinical study. *J Clin Periodontol*; **32**: 111-117.
- Selvig, K.A.; Kersten, B.G.; Chamberlain, A.D.; Wikesjö, U.M. & Nilvéus, R.E. (1992). Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using ePTFE barrier membranes: scanning electron microscopic evaluation of retrieved membranes versus clinical healing. *J Periodontol*; **63**: 974-978.
- Selvig, K.A. (1994). Discussion: animal models in reconstructive therapy. *J Periodontol*; **65**: 1169-1172.
- Selvig, K.A.; Sigurdsson, T.J. & Wikesjö, U.M. (1995). "Collagen adhesion" revisited. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **15**: 528-537.
- Selvig, K.A.; Sorensen, R.G.; Wozney, J.M. & Wikesjö, U.M. (2002). Bone repair following recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulated periodontal regeneration. *J Periodontol*; **73**: 1020-1029.
- Shoji, K.; Horiuchi, H. & Shinoda, H. (1995). Inhibitory effects of a bisphosphonate (risedronate) on experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res*; **30**: 277-284.
- Sigurdsson, T.J.; Lee, M.B.; Kubota, K.; Turek, T.J.; Wozney, J.M. & Wikesjö, U.M. (1995). Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol*; **66**: 131-138.

- Sigurdsson, T.J.; Nygaard, L.; Tatakis, D.N.; Fu, E.; Turek, T.J.; Jin, L.; Wozney, J.M. & Wikesjö, U.M. (1996). Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **16**: 524-537.
- Sigurdsson, T.J.; Nguyen, S. & Wikesjö, U.M. (2001). Alveolar ridge augmentation with rhBMP-2 and bone-to-implant contact in induced bone. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **21**: 461-473.
- Silvestri, M.; Rasperini, G. & Euwe, E. (1999). Enamel matrix derivative in treatment of infrabony defects. *Pract Periodontics Aesthet Dent*; **11**: 615-618.
- Silvestri, M.; Ricci, G.; Rasperini, G.; Sartori, S. & Cattaneo, V. (2000). Comparison of treatments of infrabony defects with enamel matrix derivative, guided tissue regeneration with a nonresorbable membrane and Widman modified flap. A pilot study. *J Clin Periodontol*; **27**: 603-610.
- Silvestri, M.; Sartori, S.; Rasperini, G.; Ricci, G.; Rota, C. & Cattaneo, V. (2003). Comparison of infrabony defects treated with enamel matrix derivative versus guided tissue regeneration with a nonresorbable membrane. *J Clin Periodontol*; **30**: 386-393.
- Slavkin, H. (1976). Towards a cellular and molecular understanding of periodontics: cementogenesis revisited. *J Periodontol*, **47**, 249- 255.
- Slavkin, H.C.; Bessem, C.; Bringas, P. Jr.; Zeichner-David, M.; Nanci, A. & Snead, M.L. (1988). Sequential expression and differential function of multiple enamel proteins during fetal, neonatal, and early postnatal stages of mouse molar organogenesis. *Differentiation*; **37**: 26-39.
- Smith, B.A.; Mason, W.E.; Morrison, E.C. & Caffesse, R.G. (1986). The effectiveness of citric acid as an adjunct to surgical re-attachment procedures in humans. *J Clin Periodontol*; **13**: 701-708.
- Sobaniec, H. & Sobaniec - Lotowska, M. E. (2000). Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit*; **6**: 875-881.
- Spahr, A. & Hammarström, L. (1999). Response of dental follicular cells to the exposure of denuded enamel matrix in rat molars. *Eur J Oral Sci*; **107**: 360-367.

- Spahr, A.; Lyngstadaas, S.P.; Boeckh, C.; Andersson, C.; Podbielski, A. & Haller, B. (2002). Effect of the enamel matrix derivative Emdogain on the growth of periodontal pathogens in vitro. *J Clin Periodontol*; **29**: 62-72.
- Stabholz, A.; Kettering, J.; Aprecio, R.; Zimmerman, G.; Baker, P.J. & Wikesjö, U.M. (1993). Retention of antimicrobial activity by human root surfaces after in situ subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine. *J Periodontol*; **64**: 137-141.
- Stahl, S.S.; Slavkin, H.C.; Yamada, L. & Levine, S. (1972). Speculations about gingival repair. *J Periodontol*; **43**: 395-402.
- Stahl, S.S.; Froum, S.J. & Kushner, L. (1982). Periodontal healing following open debridement flap procedures. II. Histologic observations. *J Periodontol*; **53**: 15-21.
- Stahl, S.S.; Froum, S.J. & Kushner, L. (1983). Healing responses of human intraosseous lesions following the use of debridement, grafting and citric acid root treatment. II. Clinical and histologic observations: one year postsurgery. *J Periodontol*; **54**: 325-338.
- Stahl, S.S. & Froum, S.J. (1987). Histologic and clinical responses to porous hydroxylapatite implants in human periodontal defects. Three to twelve months postimplantation. *J Periodontol*; **58**: 689-695.
- Stahl, S.S.; Froum, S. & Tarnow, D. (1990). Human histologic responses to guided tissue regenerative techniques in intrabony lesions. Case reports on 9 sites. *J Clin Periodontol*; **17**: 191-198.
- Steiner, S.S.; Crigger, M. & Egelberg, J. (1981). Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. II. Histologic observations of cases following replaced flap surgery. *J Periodontal Res*; **16**: 109-116.
- Stenport, F. & Johansson, C.B. (2003). Enamel matrix derivative and titanium implants. *J Clin Periodontol*; **30**: 359-363.
- Suzuki, N.; Ohyama, M.; Maeno, M.; Ito, K. & Otsuka, K. (2001). Attachment of human periodontal ligament cells to enamel matrix-derived protein is mediated via interaction between BSP-like molecules and integrin alpha(v)beta3. *J Periodontol*; **72**: 1520-1526.

- Suzumura, Y.; Kameyama, Y.; Mizutani, M.; Kato, K.; Kondo, K. & Mabuchi, R. (1989). Long junctional epithelium produced by application of bacterial protease in rats. *J Periodontal Res*; **24**: 217-221.
- Sykaras, N.; Triplett, R.G.; Nunn, M.E.; Iacopino, A.M. & Opperman, L.A. (2001). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration and osseointegration of dental implants. *Clin Oral Implants Res*; **12**: 339-349.
- Takata, T.; Miyauchi, M.; Ogawa, I.; Ito, H.; Kobayashi, J. & Nikai, H. (1997). Reactive change in proliferative activity of the junctional epithelium after topical application of lipopolysaccharide. *J Periodontol*; **68**: 531-535.
- Takei, H.H.; Han, T.J.; Carranza, F.A. Jr.; Kenney, E.B. & Lekovic, V. (1985). Flap technique for periodontal bone implants. Papilla preservation technique. *J Periodontol*; **56**: 204-210.
- Taubman, M.A.; Yoshie, H.; Wetherell, J.R. Jr.; Ebersole, J.L. & Smith, D.J. (1983). Immune response and periodontal bone loss in germfree rats immunized and infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*; **18**: 393-401.
- Terranova, V.P.; Franzetti, L.C.; Hic, S.; DiFlorio, R.M.; Lyall, R.M.; Wikesjö, U.M.; Baker, P.J.; Christersson, L.A. & Genco, R.J. (1986). A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodontal Res*; **21**: 330-337.
- Tokiyasu, Y.; Takata, T.; Saygin, E. & Somerman, M. (2000). Enamel factors regulate expression of genes associated with cementoblasts. *J Periodontol*; **71**: 1829-1839.
- Tominaga, K.; Tamura, I.; Kasuno, K.; Itoh, Y.; Hara, R. & Tanaka, A. (2001). Tissue response to subcutaneous injection of Emdogain in rats. *J Dent Res*; **80**: 616.
- Tonetti, M.S.; Pini-Prato, G. & Cortellini, P. (1995). Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. A preliminary retrospective study. *J Clin Periodontol*; **22**: 229-234.
- Tonetti, M.S.; Pini-Prato, G.P. & Cortellini, P. (1996). Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery. *J Clin Periodontol*; **23**: 548-556.

- Tonetti, M.S.; Lang, N.P.; Cortellini, P.; Suvan, J.E.; Adriaens, P.; Dubravec, D.; Fonzar, A.; Fourmoussis, I.; Mayfield, L.; Rossi, R.; Silvestri, M.; Tiedemann, C.; Topoll, H.; Vangsted, T. & Wallkamm, B. (2002). Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. *J Clin Periodontol*; **29**: 317-325.
- Tonetti, M.S.; Fourmoussis, I.; Suvan, J.; Cortellini, P.; Bragger, U. & Lang, N.P. (2004). Healing, post-operative morbidity and patient perception of outcomes following regenerative therapy of deep intrabony defects. *J Clin Periodontol*; **31**: 1092-1098.
- Trombelli, L.; Scabbia, A. & Calura, G. (1994). Nondiseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of the effects of solution concentration and application time. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **14**: 460-469.
- Trombelli, L.; Scabbia, A.; Zangari, F.; Griselli, A.; Wikesjö, U.M. & Calura, G. (1995). Effect of tetracycline HCl on periodontally-affected human root surfaces. *J Periodontol*; **66**: 685-691.
- Trombelli, L.; Bottega, S. & Zucchelli, G. (2002a). Supracrestal soft tissue preservation with enamel matrix proteins in treatment of deep intrabony defects. *J Clin Periodontol*; **29**: 433-439.
- Trombelli, L.; Heitz-Mayfield, L.J.; Needleman, I.; Moles, D. & Scabbia, A. (2002b). A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J Clin Periodontol*; **29 Suppl 3**: 117-135; discussion: 160-112.
- Tsitoura, E.; Tucker, R.; Suvan, J.; Laurell, L.; Cortellini, P. & Tonetti, M. (2004). Baseline radiographic defect angle of the intrabony defect as a prognostic indicator in regenerative periodontal surgery with enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*; **31**: 643-647.
- Van den Bergh, J.P.; ten Bruggenkate, C.M.; Groeneveld, H.H.; Burger, E.H. & Tuinzing, D.B. (2000). Recombinant human bone morphogenetic protein-7 in maxillary sinus floor elevation surgery in 3 patients compared to autogenous bone grafts. A clinical pilot study. *J Clin Periodontol*; **27**: 627-636.
- Van der Pauw, M.T.; Van den Bos, T.; Everts, V. & Beertsen, W. (2000). Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol*; **71**: 31-43.

- Van der Pauw, M.T.; Everts, V. & Beertsen, W. (2002). Expression of integrins by human periodontal ligament and gingival fibroblasts and their involvement in fibroblast adhesion to enamel matrix-derived proteins. *J Periodontal Res*; **37**: 317-323.
- Vandana, K.L.; Shah, K. & Prakash, S. (2004). Clinical and radiographic evaluation of Emdogain as a regenerative material in the treatment of interproximal vertical defects in chronic and aggressive periodontitis patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **24**: 185-191.
- Vanheusden, A.J.; Goffinet, G.; Zahedi, S.; Nusgens, B.; Lapiere, C.M. & Rompen, E.H. (1999). *In vitro* stimulation of human gingival epithelial cell attachment to dentin by surface conditioning. *J Periodontol*; **70**: 594-603.
- Velasquez-Plata, D.; Scheyer, E.T. & Mellonig, J.T. (2002). Clinical comparison of an enamel matrix derivative used alone or in combination with a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol*; **73**: 433-440.
- Vignery, A. & Baron, R. (1980). Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodelling in the adult rat. *Anat Rec*; **196**: 191-200.
- Wachtel, H.; Schenk, G.; Bohm, S.; Weng, D.; Zuhr, O. & Hurzeler, M.B. (2003). Microsurgical access flap and enamel matrix derivative for the treatment of periodontal intrabony defects: a controlled clinical study. *J Clin Periodontol*; **30**: 496-504.
- Wallace, S. S. & Froum, S. J. (2003). Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol*; **8**: 328-343.
- Wang, H.L.; Pappert, T.D.; Castelli, W.A.; Chiego, D.J. Jr.; Shyr, Y. & Smith, B.A. (1994). The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol*; **65**: 429-436.
- Warrer, K.; Karring, T. & Gotfredsen, K. (1993). Periodontal ligament formation around different types of dental titanium implants. I. The self-tapping screw type implant system. *J Periodontol*; **64**: 29-34.

- Watanabe, K.; Petro, B.J.; Sevendal, M.; Anshuman, S.; Jovanovic, A. & Tyner, A.L. (2004). Histochemical examination of periodontal junctional epithelium in p21/p27 double knockout mice. *Eur J Oral Sci*; **112**: 253-258.
- Wennström, J.L. & Lindhe, J. (2002). Some effects of enamel matrix proteins on wound healing in the dento-gingival region. *J Clin Periodontol*; **29**: 9-14.
- Wikesjö, U.M.; Claffey, N.; Christersson, L.A.; Franzetti, L.C.; Genco, R.J.; Terranova, V.P. & Egelberg, J. (1988). Repair of periodontal furcation defects in beagle dogs following reconstructive surgery including root surface demineralization with tetracycline hydrochloride and topical fibronectin application. *J Clin Periodontol*; **15**: 73-80.
- Wikesjö, U.M. & Nilvéus, R. (1990). Periodontal repair in dogs: effect of wound stabilization on healing. *J Periodontol*; **61**: 719-724.
- Wikesjö, U.M. & Nilvéus, R. (1991). Periodontal repair in dogs. Healing patterns in large circumferential periodontal defects. *J Clin Periodontol*; **18**: 49-59.
- Wikesjö, U.M.; Claffey, N.; Nilvéus, R. & Egelberg, J. (1991a). Periodontal repair in dogs: effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. *J Periodontol*; **62**: 180-184.
- Wikesjö, U.M.; Selvig, K.A.; Zimmerman, G. & Nilvéus, R. (1991b). Periodontal repair in dogs: healing in experimentally created chronic periodontal defects. *J Periodontol*; **62**: 258-263.
- Wikesjö, U.M.; Nilvéus, R.E. & Selvig, K.A. (1992). Significance of early healing events on periodontal repair: A review. *J Periodontol*; **63**: 158-165.
- Wikesjö, U.M.; Kean, C.J. & Zimmerman, G.J. (1994). Periodontal repair in dogs: supraalveolar defect models for evaluation of safety and efficacy of periodontal reconstructive therapy. *J Periodontol*; **65**: 1151-1157.
- Wikesjö, U.M.; Guglielmoni, P.; Promsudthi, A.; Cho, K.S.; Trombelli, L.; Selvig, K.A.; Jin, L. & Wozney, J.M. (1999). Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol*; **26**: 392-400.

- Windisch, P.; Sculean, A.; Klein, F.; Toth, V.; Gera, I.; Reich, E. & Eickholz, P. (2002). Comparison of clinical, radiographic, and histometric measurements following treatment with guided tissue regeneration or enamel matrix proteins in human periodontal defects. *J Periodontol*; **73**: 409-417.
- Yamasaki, A.; Nikai, H.; Niitani, K. & Ijuhin, N. (1979). Ultrastructure of the junctional epithelium of germfree rat gingiva. *J Periodontol*; **50**: 641-648.
- Yoneda, S.; Itoh, D.; Kuroda, S.; Kondo, H.; Umezawa, A.; Ohya, K.; Ohyama, T. & Kasugai, S. (2003). The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect. *J Periodontal Res*; **38**: 333-342.
- Yoshie, H.; Taubman, M.A.; Olson, C.L.; Ebersole, J.L. & Smith, D.J. (1987). Periodontal bone loss and immune characteristics after adoptive transfer of Actinobacillus-sensitized T cells to rats. *J Periodontal Res*; **22**: 499-505.
- Yuan, K.; Chen, C.L. & Lin, M.T. (2003). Enamel matrix derivative exhibits angiogenic effect in vitro and in a murine model. *J Clin Periodontol*; **30**: 732-738.
- Yukna, R.A.; Mayer, E.T. & Amos, S.M. (1989). 5-year evaluation of durapatite ceramic alloplastic implants in periodontal osseous defects. *J Periodontol*; **60**: 544-551.
- Yukna, R.A.; Callan, D.P.; Krauser, J.T.; Evans, G.H.; Aichelmann-Reidy, M.E.; Moore, K.; Cruz, R. & Scott, J.B. (1998). Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol*; **69**: 655-663.
- Yukna, R.A.; Krauser, J.T.; Callan, D.P.; Evans, G.H.; Cruz, R. & Martin, M. (2000). Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol*; **71**: 1671-1679.
- Yukna, R. A.; Salinas, T.J. & Carr, R.F. (2002a). Periodontal regeneration following use of ABM/P-1 5: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*; **22**: 146-155.

- Yukna, R.A.; Krauser, J.T., Callan, D.P.; Evans, G.H.; Cruz, R. & Martin, M. (2002b). Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *J Periodontol*; **73**: 123-128.
- Zamet, J.S.; Darbar, U.R.; Griffiths, G.S.; Bulman, J.S.; Bragger, U.; Burgin, W. & Newman, H.N. (1997). Particulate bioglass as a grafting material in the treatment of periodontal intrabony defects. *J Clin Periodontol*; **24**: 410-418.
- Zetterström, O.; Andersson, C.; Eriksson, L.; Fredriksson, A.; Friskopp, J.; Heden, G.; Jansson, B.; Lundgren, T.; Nilvéus, R.; Olsson, A.; Renvert, S.; Salonen, L.; Sjöström, L.; Winell, A.; Östgren, A. & Gestrelus, S. (1997). Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol*; **24**: 697-704.
- Zhu, Q.; Safavi, K.E. & Spångberg, L.S. (1999). Adhesion of human osteoblasts to enamel matrix derivatives. *J Endod*; **25**: 296 (abstract OR56).
- Zhu, Z.; Lee, C.S.; Tejada, K.M. & Giannobile, W.V. (2001). Gene transfer and expression of platelet-derived growth factors modulate periodontal cellular activity. *J Dent Res*; **80**: 892-897.
- Zucchelli, G.; Bernardi, F.; Montebugnoli, L. & De Sanctis, M. (2002). Enamel matrix proteins and guided tissue regeneration with titanium-reinforced expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of infrabony defects: a comparative controlled clinical trial. *J Periodontol*; **73**: 3-12.
- Zucchelli, G.; Amore, C.; Montebugnoli, L. & De Sanctis, M. (2003). Enamel matrix proteins and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a comparative controlled clinical trial. *J Periodontol*; **74**: 1725-1735.

ANEXO I

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP	<i>American Academy of Periodontology</i>	Academia Americana de Periodontologia
ABM	<i>anorganic bone matrix</i>	matriz inorgânica óssea mineralizada
ALP	<i>alkaline phosphatase</i>	fosfatase alcalina
APG		ácido poliglicólico
BG	<i>bioglass</i>	biovidro
BMP	<i>bone morphogenetic proteins</i>	proteínas morfogenéticas ósseas
BPBM	<i>bovine porous bone mineral</i>	xeno-enxerto mineralizado
BSP	<i>bone sialoprotein</i>	sialoproteína óssea
CAL	<i>clinical attachment level</i>	nível de inserção clínica
CALh	<i>horizontal clinical attachment level</i>	ganho de inserção clínica horizontal
CALv	<i>vertical clinical attachment level</i>	ganho de inserção clínica vertical
cAMP	<i>cyclic adenosin monophosphate</i>	adenosina monofosfato cíclica
DFDBA	<i>demineralized freeze-dried bone allograft</i>	aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado
e-PTFE	<i>expanded polytetra fluoroethylene</i>	politetrafluoroetileno expandido
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	fator de crescimento epidérmico
EMD	<i>enamel matrix derivative</i>	derivado das proteínas da matriz do esmalte
FDDBA	<i>mineralized freeze-dried bone allograft</i>	aloenxerto ósseo liofilizado mineralizado
FGF	<i>fibroblast growth factors</i>	fatores de crescimento fibroblásticos
GTR	<i>guided tissues regeneration</i>	regeneração guiada de tecidos
HA	<i>hydroxyapatite</i>	hidroxiapatite
IGF	<i>insulin-like growth factors</i>	fatores de crescimento insulín-like
IL	<i>interleukin</i>	interleucina
JAC		junção amelo-cementária
JE	<i>junctional epithelium</i>	epitélio juncional

KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>	factor de crescimento dos queratinócitos
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>	metaloproteinases da matriz
NA		não avaliado
NS		não significativo
OCN	<i>osteocalcin</i>	osteocalcina
OFD	<i>open flap debridement</i>	cirurgia de retalho
OGE	<i>oral gingival epithelium</i>	epitélio oral da gengiva
OPN	<i>osteopontin</i>	osteopontina
OSE	<i>oral sulcular epithelium</i>	epitélio sulcular
PD	<i>probing depth</i>	profundidade de sondagem
PDh	<i>horizontal probing depth</i>	profundidade de sondagem horizontal
PDv	<i>vertital probing depth</i>	profundidade de sondagem vertical
PDGF	<i>platelet-derived growth factors</i>	fatores de crescimento derivado das plaquetas
PGA	<i>propylene glycol alginate</i>	éster de propilenoglicol do ácido algínico
PLA	<i>poli-L-lactic acid</i>	ácido poliláctico
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophil</i>	neutrófilo polimorfonuclear
PRP	<i>platelet-rich plasma</i>	plasma rico em plaquetas
RBD	<i>radiographic bone density</i>	densidade óssea radiográfica
RCT	<i>randomized controlled trials</i>	estudos clínicos controlados e aleatórios
RE	<i>gingival recession</i>	recessão gengival
TGF-β	<i>transforming growth factors beta</i>	fatores de transformação de crescimento beta
TNF	<i>tumour necrosis factor</i>	factor de necrose tumoral
TTC	<i>tetracycline hydrochloride</i>	cloridrato de tetraciclina
W	<i>wall</i>	parede de defeito infra-ósseo

ANEXO II

Quadros referentes aos resultados dos parâmetros clínicos de alguns dos estudos clínicos referenciados.

1. Estudos de séries de casos clínicos

	Pré-op	12 meses	Δ
PD	8,6 \pm 2,14	3,4 \pm 1,21	5,2 \pm 2,38 *
CAL	10,2 \pm 2,23	5,5 \pm 2,29	4,6 \pm 2,13 *
RE	1,5 \pm 1,60	2,2 \pm 2,48	- 0,6 \pm 2,39 **

Quadro 1 - Resultados clínicos da profundidade de sondagem (PD), nível de inserção clínico (CAL) e recessão gengival (RE), em mm, do tratamento de 145 defeitos infra-ósseos com EMD.

Δ - diferença entre pré-operatório e 12 meses; *p<0,001; **p<0,01

Adaptado de Heden e colaboradores, 1999.

	Pré-op	12 meses	Δ
PD	8,3	3,6	4,7 \pm 2,1 *
CAL	10,0	5,9	4,2 \pm 1,9 *

Quadro 2 - Resultados clínicos da profundidade de sondagem (PD) e nível de inserção clínico (CAL), em mm, do tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD.

Δ - diferença entre pré-operatório e 12 meses; *p<0,001

Adaptado de Heden, 2000.

	Pré-op	8 meses	Δ
PD	8,7 \pm 1,5	4,3 \pm 1,6 *	
CAL	10,6 \pm 1,9	7,6 \pm 1,8 *	3,0 \pm 1,5
RE	1,8 \pm 1,2	3,3 \pm 0,9 *	

Quadro 3 - Resultados clínicos da profundidade de sondagem (PD), nível de inserção clínico (CAL) e de recessão gengival (RE) em mm, do tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD.

*p<0,001

Adaptado de Sculean e colaboradores, 1999c.

	Pré-op	12 meses	Δ
PD	8,4 ± 1,5	4,0 ± 1,1	4,4 ± 1,3
CAL	10,2 ± 1,3	6,6 ± 1,2	3,6 ± 1,2
RE	1,8 ± 1,2	2,6 ± 1,2	- 0,8 ± 0,8

Quadro 4 - Resultados clínicos da profundidade de sondagem (PD), nível de inserção clínico (CAL) e de recessão gengival (RE) em mm, do tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD.

Δ - diferença entre pré-operatório e 12 meses.

Adaptado de Parashis e Tsiklakis, 2000.

	Pré-op	12 meses	Δ
PD	8,09 ± 2,12	3,19 ± 1,47	4,9 ± 1,0*
CAL	10,38 ± 2,38	6,95 ± 1,83	3,43
RE	2,29 ± 1,38	3,76 ± 1,76	-1,47

Quadro 5 - Resultados clínicos da profundidade de sondagem (PD), nível de inserção clínico (CAL) e recessão gengival (RE), em mm, do tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD.

Δ - diferença entre pré-operatório e 12 meses; *p<0,0001

Adaptado de Parodi e colaboradores, 2000.

	Pré-op	12 meses	Δ
PD	10,30 ± 1,05	3,15 ± 0,47	7,15 ± 0,88*
CAL	11,50 ± 1,96	5,05 ± 1,64	6,45 ± 0,50*
RE	1,25 ± 1,44	1,75 ± 1,14	- 0,50 ± 0,71**

Quadro 6 - Resultados clínicos da profundidade de sondagem (PD), nível de inserção clínica (CAL) e recessão gengival (RE), em mm, do tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD.

Δ - diferença entre pré-operatório e 12 meses; *p<0,001; **p<0,05.

Adaptado de Cardaropoli e Leonhardt, 2002.

	Pré-op	12 meses	Δ
PD	8,9 ± 1,7	3,5 ± 0,9	5,4 ± 1,8*
CAL	10,1 ± 1,6	5,4 ± 1,2	4,7 ± 1,7*
RE	1,2 ± 1,0	1,9 ± 1,1	- 0,7 ± 0,8*

Quadro 7 - Resultados clínicos da profundidade de sondagem (PD), nível de inserção clínico (CAL) e recessão gengival (RE), em mm, do tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD.

Δ - diferença entre pré-operatório e 12 meses; *p<0,0000.

Adaptado de Trombelli e colaboradores, 2002.

2. Estudos comparativos entre o EMD e a cirurgia de retalho

	PGA				EMD			
	pré-op (34)	8 M (34)	16 M (31)	36 M (27)	pré-op (34)	8 M (34)	16 M (31)	36 M (27)
PD	7,8±1,1	4,4±1,0	4,5±1,0	4,6±1,0	7,8±1,4	5,1±1,5	5,1±1,3	5,2±1,2
CAL	9,4±1,5	7,1±1,0	7,0±1,9	7,1±1,8	9,3±2,0	7,6±2,2	7,5±2,1	7,1±2,2
% da perda óssea inicial		- 2	- 4	0		13	31	36

Quadro 8 - Resultados da profundidade de sondagem (PD), do nível de inserção clínica (CAL) em mm (média ± desvio padrão), e da percentagem da perda óssea inicial, após o tratamento de defeitos infra-ósseos com PGA e com EMD.

(n) - número de defeitos.

Adaptado de Heijl e colaboradores, 1997.

	OFD			EMD		
	pré-op	Δ 8 M	Δ 36 M	pré-op	Δ 8 M	Δ 36 M
PD	7,5	3,8 \pm 1,6	3,2 \pm 2,0	7,5	4,3 \pm 1,4	3,8 \pm 1,8*
CAL	9,0	2,9 \pm 1,4	2,2 \pm 1,4	8,8	3,3 \pm 1,4	2,9 \pm 1,7*
% da perda óssea inicial		4	0		15	31

Quadro 9 - Resultados da profundidade de sondagem (PD), do nível de inserção clínica (CAL) em mm (média \pm desvio padrão), e da percentagem da perda óssea inicial, após o tratamento de defeitos infra-ósseos com EMD ou OFD; * $p < 0,05$.

Adaptado de Zetterström e colaboradores, 1997.

	PGA			EMD		
	Pré-op	12 M	Δ	Pré-op	12 M	Δ
PD	6,22 \pm 0,73	4,00 \pm 1,03	2,22 \pm 0,81	6,33 \pm 0,91	3,39 \pm 0,85	3,00 \pm 0,97
CAL	6,83 \pm 1,20	6,00 \pm 1,28	0,83 \pm 0,86	6,72 \pm 1,13	4,94 \pm 1,00	1,72 \pm 1,07
RE	0,61 \pm 0,98	1,83 \pm 1,15	-1,22 \pm 0,88	0,39 \pm 0,78	1,61 \pm 1,09	-1,22 \pm 0,16

Quadro 10 - Resultados da profundidade de sondagem (PD), do nível de inserção clínica (CAL) e da recessão gengival (RE) em mm (média \pm desvio padrão), do tratamento de defeitos infra-ósseos, no grupo de controlo (PGA) e no grupo teste (EMD).

Δ - diferença entre pré-operatório e 12 meses.

Adaptado de Okuda e colaboradores, 2000.

3. Estudos comparativos entre o EMD e a GTR

	GTR 16			EMD 16		
	Pré-op	8 M	Δ	Pré-op	8 M	Δ
PD	8,3 ± 1,7	4,3 ± 0,7	4,0	8,1 ± 1,7	4,3 ± 1,2	3,8
CAL	10,1 ± 1,9	7,1 ± 1,7	2,9 ± 1,5	10,3 ± 1,8	7,2 ± 1,2	3,1
RE	1,8 ± 1,5	2,9 ± 1,5	- 1,1	2,1 ± 1,3	2,9 ± 1,1	- 0,8

Quadro 11 - Resultados da profundidade de sondagem (PD), do nível de inserção clínica (CAL) e da recessão gengival (RE) em mm (média ± desvio padrão), do tratamento de defeitos infra-ósseos, no grupo de controle (GTR) e no grupo teste (EMD).

Δ - diferença entre pré-operatório e 8 meses.

Adaptado de Sculean e colaboradores, 1999a.

	GTR 12					EMD 12				
	Pré-op	12 M	48 M	Δ12 M	Δ48 M	pré-op	12 M	48 M	Δ12 M	Δ48 M
PD	8,1±1,8	3,6±0,8	4,7±1,2	4,5	3,4	8,1±1,8	3,8±1,2	4,7±1,2	4,3	3,4
CAL	9,8±1,5	6,6±1,7	6,9±1,8	3,2	2,9	9,8±2,0	6,4±1,6	6,8±1,8	3,4	3,0
RE	1,7±1,6	3,0±1,5	2,2±1,0	- 1,3	- 0,5	1,7±1,0	2,6±0,9	2,1±1,0	- 0,9	- 0,4

Quadro 12 - Resultados da profundidade de sondagem (PD), do nível de inserção clínica (CAL) e da recessão gengival (RE) em mm (média ± desvio padrão), do tratamento de defeitos infra-ósseos, no grupo de controle (GTR) e no grupo teste (EMD).

Δ12 M - diferença entre pré-operatório e 12 meses; Δ48 M - diferença entre pré-operatório e 48 meses.

Adaptado de Sculean e colaboradores, 2001c.

	GTR 14			EMD 14		
	Pré-op	12 M	Δ	Pré-op	12 M	Δ
PD	8,4 \pm 1,7	4,2 \pm 0,7	4,2 \pm 1,9	8,4 \pm 1,9	4,3 \pm 1,2	4,1 \pm 1,7
CAL	10,3 \pm 1,9	7,1 \pm 1,8	3,1 \pm 1,5	10,6 \pm 1,8	7,2 \pm 1,1	3,4 \pm 1,5
RE	1,9 \pm 1,5	3,0 \pm 1,5	-1,1 \pm 1,4	2,2 \pm 1,3	2,9 \pm 1,2	-0,7 \pm 0,8

	OFD 14			EMD + GTR 14		
	Pré-op	12 M	Δ	Pré-op	12 M	Δ
PD	8,6 \pm 1,8	4,9 \pm 1,8	3,7 \pm 1,4	8,6 \pm 1,5	4,3 \pm 1,3	4,3 \pm 1,4
CAL	10,1 \pm 1,6	8,4 \pm 1,7	1,7 \pm 1,5	10,0 \pm 1,7	6,6 \pm 1,6	3,4 \pm 1,1
RE	1,8 \pm 1,1	3,5 \pm 1,3	-1,7 \pm 1,1	1,1 \pm 0,6	2,2 \pm 1,0	-1,1 \pm 0,9

Quadro 13 - Resultados da profundidade de sondagem (PD), do nível de inserção clínica (CAL) e da recessão gengival (RE) em mm (média \pm desvio padrão), do tratamento de defeitos infra-ósseos, em quatro modalidades de tratamento: EMD, GTR, EMD+GTR e OFD.

Δ - diferença entre pré-operatório e 12 meses.

Adaptado de Sculean e colaboradores, 2001d.

I - INTRODUÇÃO	5
II - TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO PERIODONTAL.Revisão da literatura.	3
a. Regeneração guiada de tecidos	19
a.1. Tratamento de defeitos infra-ósseos	24
a.2. Tratamento de lesões de furca	27
b. Enxertos ósseos e materiais de substituição	32
b.1. Tratamento de defeitos infra-ósseos	38
b.2. Tratamento de lesões de furca	43
b.3. Peptídeo sintético P-15	45
c. Biomodificação da raiz	47
c.1. Condicionamento ácido da superfície radicular	48
c.2. Mediadores biológicos na regeneração periodontal	50
c.2.1. Factores de crescimento	50
c.2.1.1. Factores de crescimento derivados das plaquetas	51
c.2.1.2. Proteínas morfogenéticas ósseas	55
c.2.2. Proteínas de adesão	57
c.2.3. Proteínas da matriz extracelular	58
d. Engenharia tecidual com células vivas	58
e. Terapêutica genética	61
III - DERIVADO DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE	63
a. Racionalização – conceitos actuais de regeneração	65
b. Princípio biológico	68
b.1. Cementogénese	68
b.2. Cimento radicular e sua importância na regeneração periodontal	70
c. Proteínas da matriz do esmalte na regeneração periodontal	73
c.1. Estudos <i>in vitro</i>	77
c.2. Estudos <i>in vivo</i>	84

c.3. Estudos pré-clínicos	88
c.4. Estudos clínicos	97
c.4.1. Tratamento de defeitos infra-ósseos	97
c.4.1.1. Estudos de séries de casos clínicos	97
c.4.1.2. Estudos comparativos entre o EMD e a cirurgia de retalho	104
c.4.1.3. Estudos comparativos entre o EMD e a GTR	114
c.4.1.4. Estudos comparativos entre o EMD e os substituintes ósseos	122
c.4.1.5. Resultados a médio e a longo prazo	128
c.4.1.6. Revisões sistemáticas da literatura	130
c.4.1.6.1 Influência de factores modificadores	137
c.5. Estudos de avaliação histológica no homem	140
c.6. Segurança e reacções adversas	148

IV - O RATO COMO MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE 155

V - TRABALHO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL 169

a. Periodontite experimental - Protocolo A	172
a.1. Objectivo	172
a.2. Material e métodos	172
a.2.1. Anestesia	174
a.2.2. Posicionamento do animal	175
a.2.3. Pós-operatório	175
a.2.4. Sacrifício dos animais e recolha de amostras	176
a.2.5. Processamento das amostras	177
a.2.6. Método de análise	177
a.3. Resultados	178
a.3.1. Aspecto macroscópico	178
a.3.2. Observações em microscopia de luz	179
a.3.2.1. Sem manipulação - Grupo I	179

a.3.2.2. Passagem da agulha nos espaços interdentários - Grupo II	191
a.3.2.3. Agulha usada como cunha - Grupo III	212
a.4. Discussão	224
Porquê no segundo molar superior	224
Análise da variação de peso	225
Resultados ao oitavo dia	226
Resultados ao décimo quinto dia	229
a.5. Conclusão	235
b. A influência de um derivado das proteínas da matriz do esmalte	
no epitélio gengival - Protocolo B	237
b.1. Objectivo	237
b.2. Material e métodos	237
b.2.1. Métodos de análise	242
b.2.1.1. Microscopia de luz	242
b.2.1.2. Histomorfometria	243
b.3. Resultados	244
b.3.1. Aspecto macroscópico	244
b.3.2. Observações em microscopia de luz	245
b.3.2.1. Retalho muco-periódico simples - Grupo IV	249
b.3.2.2. Retalho muco-periódico com aplicação de EDTA - Grupo V	259
b.3.2.3. Retalho muco-periódico com aplicação de PGA - Grupo VI	269
b.3.2.4. Retalho muco-periódico com aplicação de EDTA seguida da	
aplicação de PGA - Grupo VII	275
b.3.2.5. Retalho muco-periódico com aplicação de EDTA seguida da	
aplicação de EMD - Grupo VIII	283
b.3.3. Histomorfometria	297
b.3.3.1. Análise da área	297
b.3.3.2. Análise da altura	298

b.4. Discussão	299
Grupo IV	308
Grupo V	310
Grupo VI	312
Grupo VII	313
Grupo VIII	315
Histomorfometria	318
b.5. Conclusões	318
VI - RESUMO	321
ABSTRACT	327
VII - BIBLIOGRAFIA	331
VIII - ANEXO I	375
ANEXO II	381