UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANDRÉIA PEREIRA DE SOUZA PAVANI

**Efeito da desmineralização por ácido cítrico do enxerto
ósseo autógeno particulado no reparo de defeitos infra-
ósseos em seres humanos. Estudo clínico**

BAURU
2021

ANDRÉIA PEREIRA DE SOUZA PAVANI

Efeito da desmineralização por ácido cítrico do enxerto ósseo autógeno particulado no reparo de defeitos infra-ósseos em seres humanos. Estudo clínico

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Greggi

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende

Versão corrigida

BAURU
2021

Pavani, Andréia Pereira de Souza

Efeito da desmineralização por ácido cítrico do enxerto ósseo autógeno particulado no reparo de defeitos infra-ósseos em seres humanos. Estudo clínico / Andréia Pereira de Souza Pavani. -- Bauru, 2021.

124 p. : il. ; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 3.768.591
Data: 13/11/2019

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

A Deus,

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, meu Senhor e motivo pelo qual vivo, pois sem Ele nada seria possível. É Ele quem cuida de mim e me ajuda a cada instante da minha vida, mesmo eu sendo tão pequena e falha.

"Não to mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares." (Josué 1.9 - Bíblia Sagrada)

AGRADECIMENTOS

Não consigo citar cada nome de todos que tem estado ao meu lado ao longo dos últimos anos. Familiares, amigos, mestres, colaboradores e até mesmo os pacientes. Eu não conseguiria concluir este trabalho se não fosse a participação de cada um de vocês!

Ao meu esposo Danilo, e ao meu filho Benjamin, que ainda carrego no ventre, só sei dizer que amo vocês!

Aos meus pais, minha irmã e demais familiares, vocês são as melhores pessoas que Deus colocou em minha vida.

A todos os professores do departamento, em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi, muito obrigada pela profissional que me tornei hoje. Carrego o exemplo de cada um de vocês.

Aos meus amigos, vocês são a família que escolhi! Amo cada um de vocês!

Aos funcionários, que se tornaram amigos, aos pacientes que colaboraram com o trabalho, muito obrigada por tanto!

À Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, por nos oferecer tal estrutura excelente para nossa formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilidade da bolsa de estudo.

“Em ti confiarão os que conhecem o teu nome;
porque tu, Senhor, nunca desamparaste
os que te buscam.”

Salmos 9.10

RESUMO

A desmineralização óssea tem se mostrado vantajosa em procedimentos de enxertia. Dados recentes revelam que esse processo pode promover consolidação de enxertos, proliferação e diferenciação celular. Resultados em culturas de células, estudos em animais e enxertos em bloco em humanos se mostraram vantajosos. Porém sua utilização na periodontia em enxertos ósseos autógenos particulados não está ainda descrita na literatura. Portanto, neste estudo clínico randomizado, controlado, boca dividida, duplo-cego, foram investigados em seres humanos, os efeitos da desmineralização óssea de enxertos ósseos autógenos particulados sobre o reparo de defeitos periodontais infra-ósseos de 2 ou 3 paredes, ou defeitos combinados de 2 e 3 paredes, sendo o enxerto coletado da tábua óssea vestibular próxima ao defeito a ser tratado. No grupo controle (GC) foi enxertado osso autógeno particulado e no grupo teste (GT) o enxerto foi submetido à desmineralização por ácido cítrico pH 1 a 10% por 30 segundos. Foram realizadas análises clínicas (índice de placa - IP, índice gengival - IG, profundidade de sondagem - PS, recessão gengival - RG, nível de inserção clínico - NIC, nível de inserção relativo - NIR e quantidade/largura da mucosa ceratinizada - MC), nos períodos pré (baseline – primeiro contato com o paciente), trans (T_0 – imediatamente antes de iniciar a cirurgia) e pós-operatórios (3, 6, 9 e 12 meses, respectivamente T_3 , T_6 , T_9 e T_{12}). Avaliações radiográficas foram realizadas no baseline (para diagnóstico) e em T_6 e T_{12} para comprovação da formação óssea. Utilizando o software ImageJ, distâncias lineares foram obtidas das imagens radiográficas: da JCE até o início do defeito periodontal/crista óssea (JCE_CO), da JCE até o final do defeito (JCE_Fundo), medida do ângulo do defeito e da densidade óssea. Foram incluídos neste estudo 14 pacientes (oito homens e seis mulheres) com idade entre 28 e 70 anos ($41,07 \pm 12,03$ anos) que apresentaram 17 sítios a serem tratados em cada grupo (GC=17 e GT=17). Os resultados clínicos demonstraram redução estatística significativa do IP do baseline para T_0 e do IG de T_0 para T_6 e T_9 em ambos os grupos. Houve redução estatística significativa também para os parâmetros PS, NIC e NIR do T_0 para T_6 , representando ganho de inserção clínico em ambos os grupos. Para o parâmetro RG houve aumento do baseline para T_0 . Os resultados radiográficos demonstraram preenchimento ósseo por meio da redução estatística significativa das medidas JCE_Fundo avaliadas do baseline para T_6 , bem como aumento significativo no ângulo

do defeito no mesmo período. A densidade óssea melhorou significativamente ao longo do estudo, tanto do baseline para o T₆, como do T₆ para o T₁₂. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais para nenhum dos parâmetros avaliados em nenhum dos períodos do estudo. Conclui-se que o enxerto ósseo autógeno particulado, desmineralizado ou não, foi eficaz para o tratamento dos defeitos infra-ósseos desta amostra, resultando em ganho de inserção periodontal e preenchimento ósseo radiográfico, de forma semelhante entre os grupos avaliados. Novos estudos são necessários considerando as especulações apontadas no presente trabalho.

Palavras-chave: regeneração óssea, ácido cítrico, enxerto ósseo.

ABSTRACT

Effect of citric acid demineralization of particulate autogenous bone graft in the repair of intra-bony defects in humans. Clinical study

Bone demineralization shown to be advantageous in grafting procedures. Recently data suggest that bone demineralization may promote bone graft consolidation as well as proliferation and differentiation of cells. Results in cell cultures, animal studies and block grafts in humans shown to be advantageous. However, such procedure has never been evaluated in periodontal treatment with particulate autogenous bone grafts. Therefore, this randomized, controlled, double-blind, split-mouth clinical trial evaluated the effects of bone demineralization of particulate autogenous bone grafts on the repair of 2- or 3-wall intra-bony periodontal defects, or combined defects of 2- and 3-wall, in humans. Graft with particulate autogenous bone was performed in control group (GC) and graft with bone demineralized with 10% citric acid pH 1 for 30 seconds was performed in test group (GT). Clinical analyzes (plaque index - IP, gingival index - IG, probing depth - PS, gingival recession - RG, clinical attachment level - NIC, relative attachment level - NIR and keratinized mucosa width - MC) were performed before (baseline - first contact with patients), trans (T_0 - immediately before to start the surgery) and postoperative (3, 6, 9 and 12 months, respectively T_3 , T_6 , T_9 and T_{12}). Radiographic evaluations were performed at baseline (for diagnosis) and at T_6 and T_{12} to confirm bone formation. At the ImageJ software, linear distances were obtained from radiographic images: from cement-enamel junction (JCE) to the periodontal defect beginning/alveolar crest (JCE_CO), from JCE to the bottom of the defect (JCE_Fundo), intra-bony defect angle and bone density. This study included 14 patients (eight men and six women) aged 28 to 70 years ($41,07 \pm 12,03$ years) who presented 17 sites to be treated in each group (GC=17 and GT=17). Clinical results showed a significant statistical reduction for IP from baseline to T_0 and for IG from T_0 to T_6 and T_9 in both groups. There was also a significant statistical reduction for the PS, NIC and NIR parameters from T_0 to T_6 , representing clinical attachment improvement in both groups. For the RG parameter, there was increase from baseline to T_0 . Radiographic results showed bone filling through the significant statistical reduction for JCE_Fundo measures from baseline to T_6 , as well as a significant increase for intra-bony defect angle in the same period. Bone density

improved significantly over the course of the study, both from baseline to T₆ and from T₆ to T₁₂. No significant statistical difference was detected between groups for any of the parameters evaluated in each study periods. Concluded that particulate autogenous bone graft, demineralized or not, was effective for the treatment of intra-bony defects in this sample, resulting in periodontal attachment gain and radiographic bone filling, similarly between the evaluated groups. More researches are needed considering the speculations pointed out in this study.

Keywords: Bone Regeneration. Citric Acid. Bone Grafting.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama de fluxo do estudo.....	44
Figura 2 -	Referências anatômicas	51
Figura 3 -	Medidas lineares JCE_Ápice, JCE_CA e JCE_Fundo	52
Figura 4 -	Medida do ângulo do defeito, baseada nas linhas JCE-Fundo e CA-Fundo	52
Figura 5 -	Determinação do polígono circundando o defeito ósseo na radiografia inicial utilizado para avaliação da densidade óssea radiográfica	53

GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Tipos de defeitos periodontais em cada um dos grupos experimentais do estudo, identificados no Baseline (n = 17 para cada grupo).....	62
Gráfico 2 -	Porcentagem de sítios que apresentaram placa para cada escore no exame inicial (Baseline), no momento da cirurgia (T ₀) e após 3 (T ₃), 6 (T ₆), 9 (T ₉) e 12 (T ₁₂) meses, em ambos os grupos experimentais do estudo.....	67
Gráfico 3 -	Porcentagem de sítios para cada escore do índice gengival no exame inicial (Baseline), no momento da cirurgia (T ₀) e após 6 (T ₆), 9 (T ₉) e 12 (T ₁₂) meses, em ambos os grupos experimentais do estudo	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição da amostra por idade (média $\pm$ desvio padrão) e gênero.....	61
Tabela 2 -	Estatística descritiva para o tipo de defeito periodontal alocado em cada grupo do estudo.....	62
Tabela 3 -	Estatística descritiva para variáveis medidas em escore de ambos os grupos	63
Tabela 4 -	Estatística descritiva para variáveis clínicas quantitativas de ambos os grupos.....	64
Tabela 5 -	Estatística descritiva para variáveis quantitativas obtidas através das imagens radiográficas de ambos os grupos. Apenas os valores descritos para o período T ₀ foram obtidos clinicamente no momento da cirurgia.....	65
Tabela 6 -	Porcentagem de sítios com placa e sangramento gengival investigados nos sítios tratados em todos os períodos do estudo nos grupos experimentais	66
Tabela 7 -	Média, desvio padrão (em mm) e comparação dos grupos experimentais em relação aos parâmetros clínicos quantitativos.....	68
Tabela 8 -	Média, desvio padrão (em mm) e comparação dos grupos experimentais em relação às medidas radiográficas. Apenas os valores de T ₀ foram obtidos clinicamente.....	70
Tabela 9 -	Valores de r e p obtidos a partir do teste de correlação entre os parâmetros estudados e a quantidade/largura de mucosa ceratinizada presente nos sítios avaliados apenas para comparações com resultados estatisticamente significativos...	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

±	Desvio padrão
%	Porcentagem
ANK	Proteína da anquilose progressiva
BMPs	Proteínas ósseas morfogenéticas
CA	Crista óssea Alveolar
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
DBM	Matriz óssea desmineralizada
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GC	Grupo Controle
GT	Grupo Teste
HA	Hidroxiapatita
IG	Índice Gengival
IP	Índice de Placa
JCE	Junção Cimento-Esmalte
MC	Mucosa Ceratinizada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMPs	Metaloproteinases da matriz
NIC	Nível de Inserção Clínico
NIR	Nível de Inserção Relativo
PME	Proteínas da matriz de esmalte
PS	Profundidade de Sondagem
RG	Recessão Gengival
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator de Crescimento transformador beta
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

	RESUMO	
1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1.	Uso de ácidos na odontologia.....	25
2.2.	Tratamento Regenerativo Periodontal de defeitos infra-ósseos.....	31
3.	PROPOSIÇÃO.....	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1.	Cálculo da amostra.....	41
4.2.	Seleção da amostra.....	42
4.3.	Randomização do estudo.....	43
4.4.	Cegamento do estudo.....	45
4.5.	Calibração do operador.....	45
4.6.	Padronização da amostra.....	45
4.7.	Padronização radiográfica.....	46
4.8.	Análise dos parâmetros clínicos periodontais.....	48
4.8.1.	<u>Índice de Placa (IP) (SILNESS; LÖE, 1964).....</u>	48
4.8.2.	<u>Índice Gengival (IG) (Löe, 1967).....</u>	48
4.8.3.	<u>Profundidade de Sondagem (PS).....</u>	49
4.8.4.	<u>Recessão Gengival (RG).....</u>	49
4.8.5.	<u>Nível de Inserção Clínico (NIC).....</u>	49
4.8.6.	<u>Nível de Inserção Relativo (NIR).....</u>	49
4.8.7.	<u>Quantidade/Largura da Mucosa Ceratinizada (MC).....</u>	50
4.9.	Análise das imagens radiográficas pelo programa ImageJ.....	51
4.10.	Avaliação da influência da mastigação e métodos de higienização no resultado do tratamento.....	54
4.11.	Procedimento cirúrgico para regeneração periodontal dos defeitos infra-ósseos.....	54
4.12.	Forma de análise dos resultados (Análise estatística)	57
5.	RESULTADOS.....	61
6.	DISCUSSÃO.....	75
7.	CONCLUSÕES.....	95

REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICES.....	113
ANEXOS.....	119

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A progressão da doença periodontal resulta em extensas destruições teciduais com a formação de defeitos ósseos (AL-FOTAWEI et al., 2014). Sendo assim, o principal objetivo da terapia periodontal regenerativa é estimular a formação dos tecidos periodontais perdidos (osso alveolar, cemento radicular e ligamento periodontal), devolvendo as características morfológicas, estruturais e funcionais originais do tecido (CORTELLINI; BOWERS, 1995; AVILA et al., 2009; PASSANEZI et al., 2011), sendo realizada após o preparo inicial, quando é possível deter o processo de doença.

A utilização de enxertos ósseos particulados para tratamento de defeitos infra-ósseos visa melhorar o processo “cicatrizial” e a formação de novo osso (SCHALLHORN, 1997). Diversos são os materiais de enxertia óssea que podem ser utilizados, como os materiais autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos, os quais, dentre outros fatores, atuam como arcabouço para a formação tecidual, além de poder, ainda, auxiliar na diferenciação de células osteoprogenitoras (ELDESOQI et al., 2014).

O “padrão ouro” que reúne as características ideais para um enxerto ósseo é o osso autógeno, por se tratar de um tecido que apresenta biocompatibilidade, capacidade osteogênica e osteoindutora (CARULLI et al., 2013), além de baixo risco de reações imune inflamatórias adversas (HSIONG; MOONEY, 2006). Contudo, problemas associados a este tipo de enxerto têm ainda motivado pesquisadores a desenvolverem novos estudos, uma vez que enxertos autógenos resultam em morbidade da área doadora, têm sua reabsorção de forma imprevisível, podem necessitar de sítios cirúrgicos adicionais aumentando o tempo operatório e podem ter sua quantidade limitada (AICHELMANN-REIDY; YUKNA, 1998, KIM et al., 2012).

A característica de osteoindução, estimulando a neoformação óssea, também pode ser observada quando da utilização do osso humano liofilizado desmineralizado (LIBIN; WARD; FISHMAN, 1975). No processo de liofilização e desmineralização ocorre a exposição de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) da matriz óssea, as quais induzem a diferenciação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras (URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983).

Os processos fisiológicos de remodelação óssea podem ser acelerados com a utilização de agentes desmineralizantes nas superfícies ósseas, de acordo com

estudos publicados por um grupo de pesquisadores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP) (REZENDE et al., 2014; REZENDE et al., 2015). A hipótese desses estudos foi embasada em um dos princípios básicos da regeneração tecidual, que é a capacidade de proliferação, migração, diferenciação celular e síntese de proteínas reguladas por fatores de crescimento polipeptídicos no local da ferida (CAFFESSE; QUIÑONES, 1993; GRAVES; COCHRAN, 1994; BARTOLD; SHI; GRONTHOS, 2006).

No processo de desmineralização óssea fisiológica, o início do reparo ósseo se dá por meio da proliferação de células clásticas que, ao lançarem o conteúdo ácido de seus lisossomos no meio para eliminar a porção mineral do tecido, expondo seu conteúdo proteico, promovem exposição do colágeno tipo I da matriz óssea e proteoglicanas associadas, as quais são quimioatrativas para células precursoras de osteoblastos (URIST, 1965; URIST; DOWELL, 1968; URIST et al., 1968; POLSON; PROYE, 1983; URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983; HEATH et al., 1984; LORENZO et al., 1992; LEWANDROWSKI et al., 1997a; LI; ZHANG; KIRNERS, 2003). Dessa forma, a opção para o desenvolvimento dos estudos desenvolvidos na FOB/USP foi o uso da matriz óssea desmineralizada (DBM), a qual abriga BMPs liberadas em decorrência da ação osteoclástica previamente à fase de deposição de novo osso e são responsáveis pela indução da osteogênese (URIST, 1965), por meio da indução da diferenciação de células indiferenciadas dos tecidos adjacentes em osteoblastos (URIST et al., 1968).

O atual projeto, portanto, faz parte dessa linha de pesquisa inovadora que vem sendo ampliada gradativamente estimulada pelos resultados positivos alcançados previamente (RODRIGUES et al., 2012; DOMINGUES, 2013; REZENDE et al., 2014; REZENDE et al., 2015; SALMERON, 2015; ROJAS-PAULÚS, 2016; MANFREDI, 2016; CARVALHO, 2017; CAETANO, 2019; MANFREDI et al., 2019; CARVALHO et al., 2020; ROJAS-PAULÚS et al., 2021). A proposta deste estudo é testar a hipótese de que a desmineralização intencional, com ácido cítrico, do enxerto ósseo autógeno particulado traz resultados tão favoráveis quanto o processo fisiológico de reparo ósseo, ou ainda melhores, no que se refere ao tempo de neoformação óssea e qualidade do osso neoformado.

A fim de contribuir para solucionar esse questionamento propôs-se comparar parâmetros clínicos e radiográficos após terapia periodontal regenerativa

Introdução

quando da desmineralização ou não, com ácido cítrico, do enxerto ósseo autógeno particulado em defeitos periodontais infra-ósseos.

Revisão de
Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 USO DE ÁCIDOS NA ODONTOLOGIA

Não é recente o uso de substâncias ácidas na odontologia. Stewart (1899) preconizava o uso de ácido clorídrico ou sulfúrico na superfície radicular a fim de eliminar as bactérias dos sítios periodontais, estabelecendo-se como pioneiro para que outros estudos fossem desenvolvidos na área de biomodificação de cimento e dentina das superfícies radiculares (BAL; EREN; BALOS, 1990; HERITIER, 1983; LABAHN et al., 1992). Buonocore (1995) apresentou um método simples para aumentar a adesividade da resina ao esmalte, desmineralizando a superfície do esmalte com ácido fosfórico a 85% por 30 segundos observou que essa adesão era maior se comparada à superfície não desmineralizada. Com o objetivo de potencializar os processos reparativos em tratamentos cirúrgicos, outros autores também desenvolveram estudos relacionados à desmineralização de enxertos alógenos (URIST, 1965; URIST et al., 1968; LEWANDROWSKI et al., 1997b).

O uso de agentes químicos desmineralizantes para biomodificação radicular têm sido amplamente documentado na literatura, com o objetivo de potencializar o processo de reparo nos tratamentos dos defeitos periodontais, uma vez que tal processo resulta na liberação de fatores que atuam na cicatrização periodontal e na criação de um substrato que privilegia a seleção de células nos eventos de reparação (REGISTER, BURDICK, 1975; WIKESJÖ, NILVÉUS, SELVIG, 1992; STERRETT BANKEY MURPHY, 1993; MARIOTTI, 2003; AMARAL et al., 2011; SILVA et al., 2016). Os agentes mais utilizados para este fim são o ácido cítrico (GARRETT, CRIGGER, EGELBERG, 1978), tetraciclina (TERRANOVA, MARTIN, 1982; ISIK et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2000) e EDTA (BLOMLOF, LINDSKOG, 1995; BLOMLOF, BLOMLOF, LINDSKOG, 1996).

Durante o processo de desmineralização da dentina, foi observada exposição de fibras colágenas, fatores de crescimento e outras citocinas, que são capazes de regular a diferenciação de células osteoprogenitoras (SCHWARTZ et al., 2000). Supõe-se, assim que esses mesmos eventos possam ocorrer em superfícies ósseas desmineralizadas, uma vez que, é de conhecimento científico que o colágeno é um dos elementos mais abundantes no osso (WALLACE et al., 2014). Os efeitos dos modificadores químicos atuando sobre as superfícies de cimento e dentina são

bem documentados na literatura, entretanto há escassez de estudos relacionados à desmineralização óssea, tanto sobre a caracterização dessas superfícies quanto ao comportamento celular sobre superfícies ósseas vitais.

O tecido ósseo é sabidamente um tecido conjuntivo especializado formado por uma matriz inorgânica composta principalmente por cristais de hidroxiapatita (HA), caracterizando a superfície mineralizada do tecido ósseo que reveste a matriz orgânica. Esta é composta por fibras colágenas tipo I (95%), proteínas não colágenas e proteoglicanas, conferindo capacidade osteoindutora ao tecido (BARRÈRE; VAN; BLITTERSWIJK, DE GROOT, 2006).

O mecanismo de remodelação óssea é iniciado pela desmineralização, com a produção de ácidos pelos osteoclastos (MELCHER, 1976). Essas substâncias promovem a liberação de enzimas da superfície óssea ao dissolverem a fase mineral, hidrolizando a matriz orgânica e formando cavidades ou lacunas que logo são preenchidas por proteínas. Estas, por sua vez, também produzidas pelos osteoclastos, atuam como substrato para a adesão e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (DODDS et al., 1995).

Na década de 1960, vários trabalhos de Urist (URIST, 1965; URIST, 1968; URIST; DOWELL, 1968; URIST et al., 1968) fizeram com que a desmineralização óssea ganhasse expressão, quando foi demonstrado em animais a capacidade de indução óssea intramuscular de diferentes substratos após sua desmineralização *in vitro*, o que foi evidência suficiente para a teoria da indução óssea por meio da desmineralização.

Com base nesses resultados, Urist (1965) foi o primeiro a utilizar o termo BMP para especificar as proteínas ósseas da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), essenciais para a formação óssea endocondral (MAIA et al., 2013). De acordo com PIETRZAK et al. (2012), sua liberação se dá de acordo com o nível de desmineralização. Já foram identificadas e caracterizadas mais de 15 BMPs, sendo as únicas a influenciar a proliferação e diferenciação de osteoblastos a partir de células progenitoras *in vitro*, bem como *in vivo* (MAIA et al., 2013). Presume-se que as BMPs tenham papel quimiotático no recrutamento de células progenitoras, promovendo sua maturação em condrócitos, osteoblastos e osteócitos (KHOJASTEH et al., 2013).

A osteogênese e a remodelação óssea são dependentes de metaloproteinases da matriz (MMPs), cuja liberação tem sido proporcionada após a

desmineralização ácida (LI; ZHANG; KIRNERS, 2003; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008). MMP-2 e MMP-9, na forma ativa ou inativa, são expressas tanto por osteoblastos como por células do tecido conjuntivo durante as diferentes etapas da regeneração óssea alveolar, na substituição do coágulo sanguíneo por tecido conjuntivo, durante a formação, maturação e remodelação óssea (LORENZO et al., 1992). Além das MMP-2 e MMP-9 expressas durante a regeneração óssea (COOK et al., 1995; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008), também são importantes a osteopontina (OPN) (HU; TANG; HE, 2013), a proteína da anquilose progressiva (ANK) (KIM et al., 2010) e a sialoproteína óssea (BSP) (BIANCO et al., 1991; GANSS; KIM; SODEK, 1999; OGATA, 2008).

A fim de acelerar o reparo ósseo, Rezende (2008) foi o primeiro trabalho a empregar a desmineralização óssea *in situ*, utilizando ácido cítrico pH 1 a 50% por 3 minutos em superfícies de contato de enxertos ósseos autógenos em bloco realizados em calvária de cobaias. Os resultados revelaram que espécimes tratados com ácido apresentaram aumento da formação e da densidade de novo osso na interface enxerto-leito, bem como da extensão das superfícies de consolidação desses enxertos. Rodrigues e colaboradores (2012) e Domingues (2013) confirmaram tais resultados em coelhos e Rezende et al. (2015) em cultura de células.

O processo de desmineralização melhorou o comportamento elástico de enxertos em bloco *onlay* realizados por Rodrigues et al. (2012) em tíbias de coelhos. Foi observado que o módulo de elasticidade da interface enxerto-leito foi maior, aos 90 dias, quando comparadas as amostras desmineralizadas, por ácido etilino-diamino-tetracético (EDTA) a 24% durante 3 minutos, com as amostras não desmineralizadas. Portanto, os autores sugerem que a inserção de implantes nesta interface pode ocorrer com menor risco de destacamento do enxerto.

Domingues (2013) realizou, também em tíbias de coelhos, enxertos ósseos em bloco tipo *onlay*, com desmineralização da interface enxerto-leito utilizando ácido cítrico por 3 minutos. Foi observado histomorfometricamente, após 15, 30 e 45 dias que a desmineralização resultou em maior área de formação óssea e maior extensão de superfícies ósseas consolidadas, especialmente aos 30 dias.

De acordo com Rezende e colaboradores (2014), a desmineralização por ácido cítrico pH 1 a 50% durante 3 minutos das superfícies ósseas da interface de enxertos ósseos autógenos em bloco, tipo *onlay*, e do leito receptor promoveu e acelerou a formação e a consolidação ósseas das superfícies de contato em

comparação a interfaces que não foram submetidas à desmineralização, verificando assim maior consolidação e densidade do osso neoformado. Análises histomorfométricas demonstraram que o procedimento de desmineralização resultou em neoformação óssea e consolidação dos enxertos aos 30 dias, sendo alcançados pelos espécimes não desmineralizados apenas aos 60 dias, antecipando, portanto, os eventos de reparo. Dessa forma, sugeriu-se que a desmineralização seria uma alternativa vantajosa sobre a perfuração e/ou desgaste do leito como métodos para melhorar a consolidação dos enxertos, por não apresentar risco de reabsorção e preservar a estrutura óssea já fragilizada pela reabsorção natural.

Em 2015, Rezende et al., buscando entender os fenômenos que justificariam os bons resultados observados com a desmineralização de enxertos ósseos, estudaram o efeito da desmineralização superficial óssea em calvária de cobaias, utilizando ácido cítrico pH 1 a 50% durante 15, 30 e 180 segundos, sobre o comportamento de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre as superfícies por 14, 48 e 72 horas. Por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os autores observaram que a desmineralização ácida produziu maior área óssea de cobertura por células e estágios mais adiantados de diferenciação na morfologia de pré-osteoblastos em cultura, quando comparados com as amostras não desmineralizadas, especialmente nos tempos de 15 e 30 segundos. Assim, os autores ressaltaram a importância desse procedimento na regeneração de defeitos ósseos.

Ainda em 2015, Salmeron demonstrou que o procedimento de desmineralização superficial com ácido cítrico pode alterar a composição química e a topografia superficial do osso fresco podendo influenciar o comportamento de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1. Após a desmineralização com ácido cítrico a 10% ou 50% durante 30 segundos, foram observadas formações de picos e depressões de forma regular nas superfícies ósseas de calvárias de ratos. Tais formações apresentaram distâncias médias entre dois picos compatíveis com o diâmetro médio de células pré-osteoblásticas, sendo assim estas células são capazes de fazer o reconhecimento das superfícies como rugosas, o que inibiria a migração celular, mas favoreceria sua diferenciação. Foi verificado ainda que após 24, 48 e 72 horas em cultura, os pré-osteoblastos recobriram maior área de superfície e em maior espessura de camadas celulares sobre os espécimes desmineralizados do que os não desmineralizados. Além disso, as células apresentaram características morfológicas compatíveis com estágios mais avançados de diferenciação do que as células

cultivadas sobre superfícies não desmineralizadas. Por microscopia confocal, foi verificado que houve maior expressão de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 nas superfícies desmineralizadas do que nas superfícies controle, o que levou à conclusão de que a desmineralização de superfícies ósseas parece contribuir para antecipar os eventos biológicos que resultam na deposição de novo osso.

A observação desses resultados promissores também incentivou o desenvolvimento do estudo de Rojas-Paulús (2016), o qual se baseou na hipótese de possíveis efeitos benéficos da desmineralização óssea artificial *in situ* pelo uso de ácidos durante procedimentos cirúrgicos regenerativos. O autor partiu do princípio de que a desmineralização poderia antecipar a reabsorção, um dos eventos da remodelação óssea, e, conseqüentemente, acelerar o processo de reparo, podendo então ter sua aplicação em defeitos periodontais. Este estudo foi pioneiro na literatura ao utilizar ácidos para desmineralização de enxertos ósseos autógenos particulados a fim de avaliar seus efeitos no reparo de defeitos críticos em calvárias de ratos. Após a criação dos defeitos e preenchimento com enxerto ósseo particulado desmineralizado por ácido cítrico pH 1 a 50% ou tetraciclina hidrocloreada a 50mg/ml em diferentes tempos de aplicação (15, 30 e 60 segundos), os animais foram sacrificados para análises microtomográfica e histomorfométrica. A partir da análise dos resultados, foi possível concluir que a desmineralização com ácido cítrico por 15 e 30 segundos promoveu maior área, volume e densidade de formação óssea quando comparada com enxertos não desmineralizados (ROJAS-PAULÚS et al., 2021).

Seguindo a linha de pesquisa, Manfredi (2016) se propôs a avaliar comparativamente o comportamento de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre superfícies ósseas de calvária de ratos desmineralizadas com tetraciclina ácida (50mg/mL) e com ácido cítrico (10%, pH 1) em diferentes tempos de aplicação (15, 30 e 60 segundos). Os pré-osteoblastos foram cultivados sobre as amostras por 24, 48 e 72 horas, as quais foram examinadas à microscopia eletrônica de varredura e analisadas com espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para análise da composição química superficial. Os resultados revelaram que a área de recobrimento superficial por células foi significativamente maior após 24 e 48 horas de cultura nos grupos submetidos à desmineralização ácida quando comparados ao grupo controle (onde não foi feita a desmineralização), com células apresentando morfologia compatível com estágios mais avançados de diferenciação. Concluiu-se, portanto, que a desmineralização quer por ácido cítrico ou tetraciclina de superfícies

ósseas são favoráveis para o crescimento e diferenciação de células pré-osteoblásticas (MANFREDI et al., 2019).

Carvalho (2017) investigou, em calvária de ratos Wistar, os efeitos da desmineralização óssea sobre o reparo de enxertos ósseos em bloco cujas superfícies de contato foram submetidas ao tratamento com tetraciclina hidrocloreto na concentração de 50mg/ml ou ácido cítrico a 10% (pH=1) por 15, 30 e 60 segundos. Após 7, 30 e 60 dias, blocos teciduais contendo os enxertos foram removidos e processados para análise microscópica qualitativa e quantitativa do osso neoformado na interface enxerto-leito. Além disso, secções de tecido foram submetidas a análise imunohistoquímica dos seguintes marcadores de formação e reabsorção óssea, respectivamente, osteocalcina e fosfatase ácida tartarato resistente. A análise qualitativa demonstrou estágios mais avançados no processo de reparo ósseo desde os 7 dias nos grupos desmineralizados em relação ao controle (não desmineralizado), com consolidação ocorrendo a partir dos 30 dias de pós-operatório. A análise quantitativa demonstrou aumento significativo da área de osso neoformado e de superfícies de consolidação óssea com o tempo. Maior porcentagem de área de osso neoformado ocorreu nos grupos desmineralizados com ácido cítrico por 15 segundos (grupo AC15) e tetraciclina por 60 segundos (grupo TCN60) quando comparados ao grupo controle em todos os períodos avaliados. Concluiu-se, portanto, que a desmineralização das superfícies ósseas de contato entre o enxerto ósseo e o leito receptor promoveu maior área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito do que a não desmineralização, principalmente nos períodos mais precoces de reparação. A consolidação do osso neoformado ao enxerto e ao leito receptor também foi maior em todos os grupos desmineralizados em relação ao controle. Os melhores resultados, entretanto, foram apresentados pelos grupos AC15 e TCN60 (CARVALHO et al., 2020).

A observação de todos esses resultados promissores em animais e culturas de células incentivou os pesquisadores a iniciarem os estudos em seres humanos. Caetano (2019) utilizou o ácido cítrico a 10% (pH1) por 30 segundos para avaliar o efeito da desmineralização da interface enxerto-leito de enxertos em bloco, realizando diferentes avaliações (clínica, histomorfométrica, imuno-histoquímica e tomográfica). Em um ensaio clínico de boca-dividida, os pacientes foram submetidos a cirurgias de enxerto autógeno em bloco para reconstrução óssea em região anterior de maxila. Após seis meses foram removidas biópsias durante a perfuração para instalação de

implantes nas áreas enxertadas, que revelaram maior formação óssea na interface do enxerto desmineralizado.

Resultados promissores como esses visam contribuir com a realização de enxertos ósseos autógenos. A introdução, na técnica atualmente vigente, de um procedimento não oneroso, simples e rápido, que é a desmineralização, poderá, se bem-sucedida, substituir outros procedimentos utilizados para melhorar o processo “cicatricial” da terapia periodontal regenerativa.

Dados publicados recentemente por nossa equipe de pesquisadores indicaram que quando o ácido cítrico é aplicado sobre superfícies ósseas na concentração de 10% e durante 15 a 30 segundos, pré-osteoblastos cultivados sobre essas superfícies apresentam maior espalhamento, área de cobertura superficial mais extensa e com morfologia compatível com estágios mais avançados de diferenciação em comparação a pré-osteoblastos cultivados sobre superfícies tratadas com ácido cítrico na concentração de 50% (REZENDE et al., 2015). Esses resultados, portanto, levaram à opção pela concentração de 10% do ácido cítrico no presente estudo, assim como em trabalhos prévios (MANFREDI, 2016; CARVALHO, 2017; CAETANO, 2019; MANFREDI et al., 2019; CARVALHO et al., 2020).

2.2 TRATAMENTO REGENERATIVO PERIODONTAL DE DEFEITOS INFRA-ÓSSEOS

A doença periodontal é uma doença inflamatória que acomete os tecidos que circundam os dentes, tanto o periodonto de proteção (gengiva) quanto o periodonto de sustentação (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar), em resposta ao acúmulo de placa bacteriana. Apesar do biofilme bacteriano ser o fator etiológico principal desta patologia, a doença periodontal é multifatorial, sendo também influenciada por outras condições como os fatores locais, sistêmicos, microbiológicos, imunológicos, ambientais e genéticos (KIM, 2006).

A infecção bacteriana crônica e progressiva leva ao desenvolvimento de gengivite que pode progredir para perda de inserção tecidual e consequentemente destruição do tecido ósseo alveolar (KIM, 2006). Quando a base da bolsa periodontal está localizada apicalmente à crista óssea alveolar, tais defeitos são classificados como infra-ósseos, os quais apresentam grandes desafios para o tratamento

periodontal (NEEDLEMAN et al., 2012). Tal destruição progressiva dos tecidos de suporte dos dentes pode culminar até mesmo em perdas dentárias, se a doença não for tratada (TONETTI; CHRISTIANSEN; CORTELLINI, 2017; PAPAPANOU et al., 2018).

Frente à progressão da doença periodontal, observam-se extensas destruições teciduais sendo que o tecido ósseo não é capaz de se reparar sem intervenção profissional. Dessa forma, com o intuito de reverter o processo da doença, prevenindo perdas dentárias futuras, a terapia periodontal regenerativa visa estimular a formação dos tecidos periodontais perdidos, devolvendo características tanto morfológicas como estruturais originais do tecido (SCHALLHORN, 1977; CORTELLINI; BOWERS, 1995; AVILA et al., 2009; PASSANEZI et al., 2011; CORTELLINI et al., 2017).

A Academia Americana de Periodontia (2005) definiu regeneração periodontal, histologicamente, como a regeneração dos tecidos de suporte dentários, cemento radicular, ligamento periodontal e tecido ósseo alveolar, sendo alcançada sobre uma superfície radicular previamente comprometida. Sendo assim, os enxertos ósseos tem sido amplamente utilizados para o tratamento de defeitos ósseos periodontais (REYNOLDS et al., 2003), visando melhora no processo de reparo e formação de novo osso, reconstituição do periodonto perdido, aumento do suporte periodontal e melhora na função, além de manutenção dos resultados clínicos a longo prazo de dentes afetados pela doença periodontal e que apresentem defeitos infra-ósseos (SCHALLHORN, 1977).

Ao longo dos anos, diversos estudos tem demonstrado que a simples remoção da etiologia bacteriana local por meio de terapias não cirúrgicas ou cirúrgicas resulta em resolução da inflamação e melhora nos sinais clínicos da doença, entretanto sem promover regeneração óssea nem tampouco nova inserção dos tecidos periodontais (CATON; ZANDER, 1976; CATON; NYMAN; ZANDER, 1980). Dessa forma, as evidências na literatura de estudos envolvendo enxertos ósseos começaram a ser descritas no final do século XIX, com a realização de tentativas de regeneração com o uso de substitutos ósseos desmineralizados (SENN, 1889).

Várias técnicas cirúrgicas tem sido realizadas com o intuito de regenerar os tecidos periodontais, como a regeneração tecidual guiada (RTG), os enxertos ósseos, o uso de proteínas da matriz de esmalte (PME), dentre outros (ESPOSITO et al., 2009). Os tratamentos mais utilizados atualmente para regeneração incluem enxertos ósseos autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos (REYNOLDS et al., 2003;

HANES, 2007). Dentre estes, o único capaz de promover osteogênese diretamente é o osso autógeno, reunindo, assim, todas as características ideais de enxertos ósseos, que seriam osteogênese, osteoindução, osteocondução e biocompatibilidade (CARULLI et al., 2013).

Após o tratamento ter sido adequadamente realizado, os pacientes devem ser submetidos a um controle rigoroso na fase de manutenção, também conhecida como tratamento periodontal de suporte (PIHLSTROM, 2001), com o objetivo de prevenir re-infecções e recorrência da doença. É essencial que o paciente seja capaz de manter a sua saúde bucal num estado saudável pelo maior tempo possível, portanto, visitas de rotina regulares devem representar um mecanismo de *feedback* positivo entre o paciente e o periodontista a fim de assegurar essa capacidade dos pacientes (LYONS; DARBY, 2017).

De acordo com o artigo de revisão, publicado por Melcher em 1976, a natureza da ligação que se formará no período de reparo após a cirurgia periodontal é determinada pelo tipo celular que recobre a superfície radicular, podendo esta ser repovoada por células epiteliais (formando um epitélio juncional longo, denominado de adaptação), células derivadas do tecido conjuntivo gengival, células derivadas do tecido ósseo ou células derivadas do ligamento periodontal, sendo estas últimas as únicas que demonstraram ter a capacidade de formar nova inserção periodontal.

Os métodos clínicos utilizados na avaliação dos resultados de um tratamento regenerativo devem incluir a avaliação da sondagem periodontal, a fim de determinar os valores de profundidade de sondagem e nível de inserção clínico. A avaliação do nível ósseo também deve ser realizada, sendo clinicamente através de procedimentos de reentrada cirúrgica ou por meio de radiografias. O método mais confiável, entretanto, para determinar a natureza do tecido neoformado resultante de procedimentos regenerativos e sua relação com a superfície radicular, ainda é a avaliação histológica (CORTELLINI; TONETTI, 2000; AAP, 2005).

Diversos são os fatores que influenciam o sucesso do tratamento regenerativo. Dentro dos fatores relacionados aos pacientes, os principais são a higiene bucal e o tabagismo. É importante que a periodontite do paciente seja controlada com sucesso antes do início de regeneração periodontal, quando se torna essencial que o paciente consiga realizar uma correta higiene oral para atingir melhores resultados com o tratamento. Tem sido sugerido, ainda, que outros fatores relacionados ao paciente, como idade, genética, doenças sistêmicas ou níveis de

estresse, possam estar associados a piores resultados regenerativos, porém sem comprovação científica até a presente momento (CORTELLINI; TONETTI, 2015). Já o tabagismo, por outro lado, tem demonstrado afetar negativamente os resultados clínicos do tratamento regenerativo (IVANOVSKI, 2009).

Fatores relacionados aos dentes incluem seu estado endodôntico e a hiper mobilidade. Dentes comprometidos endodonticamente ou tratados de forma inadequada respondem de forma inferior ao tratamento periodontal. A mobilidade dentária tem sido referida com um fator negativo, estando associada a resultados inferiores de regeneração periodontal (IVANOVSKI, 2009). A natureza do defeito periodontal também pode ter um impacto significativo no sucesso da regeneração periodontal. Sua profundidade e largura influenciam diretamente os valores do nível de inserção clínico e consequentemente do ganho de inserção, ou preenchimento ósseo. Quanto mais profundo o defeito, melhores serão os resultados clínicos obtidos após o tratamento. Já defeitos supra-ósseos (horizontais), crateras interdetais, componentes supracrestais de defeitos infra-ósseos ou lesões de furca classe III não apresentam evidência científica de que possam ser previsivelmente regenerados (CORTELLINI; TONETTI, 2000; IVANOVSKI, 2009).

E finalmente, fatores relacionados ao operador e técnica cirúrgica incluem a realização de uma avaliação pré-operatória cuidadosa, considerando a extensão do espaço interdental (a fim de fazer ou não opção pela preservação da papila), a morfologia do defeito (garantindo a melhor opção para técnica cirúrgica) e o tipo de material utilizado de acordo com a anatomia do defeito. Tem sido demonstrado que resultados regenerativos superiores podem ser obtidos quando tais cuidados são realizados, além da experiência clínica e habilidade do profissional (curva de aprendizagem) (CORTELLINI; TONETTI, 2000; IVANOVSKI, 2009).

Com base no conhecimento atual fornecido pela literatura, a terapia periodontal regenerativa tem demonstrado resultados promissores no tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos. Como há evidências das vantagens do uso de ácidos para o processo de neoformação óssea, parece ser interessante a associação de tais tratamentos. É importante ressaltar que o presente trabalho faz parte de uma linha de pesquisa inovadora que vem demonstrando resultados favoráveis a cada trabalho realizado. Nesse contexto, não são conhecidos estudos que tenham avaliado os efeitos da desmineralização de enxertos ósseos autógenos particulados em seres humanos, ressaltando a importância do presente estudo clínico.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A proposta do presente trabalho foi testar a hipótese de que a desmineralização intencional, com ácido cítrico, do enxerto ósseo autógeno particulado traz resultados tão favoráveis quanto o processo fisiológico de reparo ósseo, ou ainda melhores, no que se refere ao tempo de neoformação óssea e qualidade do osso neoformado.

Dessa forma, propôs-se:

- Comparar parâmetros clínicos após terapia periodontal regenerativa quando da desmineralização ou não, com ácido cítrico pH 1 a 10% por 30 segundos, do enxerto ósseo autógeno particulado em defeitos periodontais infra-ósseos de 2 ou 3 paredes ou ainda defeitos combinados de 2 e 3 paredes em seres humanos.
- Comparar parâmetros radiográficos após terapia periodontal regenerativa quando da desmineralização ou não, com ácido cítrico pH 1 a 10% por 30 segundos, do enxerto ósseo autógeno particulado em defeitos periodontais infra-ósseos de 2 ou 3 paredes ou ainda defeitos combinados de 2 e 3 paredes em seres humanos.

Material e
Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste estudo clínico randomizado, boca dividida, duplo-cego, quanto aos aspectos éticos, todos os participantes, voluntários, foram informados verbalmente e por escrito a respeito da importância, objetivos, benefícios esperados, riscos previsíveis, limitações e procedimentos deste estudo. Após leitura e explicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), os participantes que concordaram em participar, compreendendo a dimensão do estudo, foram convidados a assinar o TCLE, deixando seu consentimento escrito para a realização do mesmo, autorizando a realização dos procedimentos propostos e a divulgação dos resultados. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOB/USP (CEP-FOB/USP) sob o número 3.768.591, em reunião datada de 13/11/2019 (Anexo A), com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12.

4.1. Cálculo da amostra

O cálculo da amostra foi realizado por um estatístico, baseando-se nos valores médios do nível clínico de inserção inicial e do ganho de inserção encontrados na literatura, em trabalhos de regeneração de defeitos periodontais, de acordo com a revisão sistemática e metanálise publicada por Khoshkam et al. em 2015. O ganho de inserção foi considerado o desfecho primário. Os demais parâmetros e medidas avaliadas durante o estudo foram considerados desfechos secundários. Adotando o valor médio de desvio-padrão de 1,11 mm, a fim de que uma diferença clínica mínima de 1 mm fosse detectada estatisticamente e considerando um nível de significância de 5% ($\alpha=5\%$) e poder do teste de 80% ($\beta=20\%$), o número da amostra (n) deveria ser de 12 participantes. Considerando uma estimativa de perda de 20% da amostra, o cálculo final resultou em uma amostra mínima de 15 em cada grupo, para realização desse ensaio clínico de boca dividida.

4.2. Seleção da amostra

Foram selecionados participantes voluntários, sem distinção de sexo ou raça, das clínicas das Disciplinas de Periodontia e Clínica Integrada Reabilitadora dos Cursos de Graduação e Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP). Além disso, para recrutamento da amostra, houve divulgação da pesquisa em meios de telecomunicações (rádio e TV), tornando a amostra não probabilística e não aleatória por conveniência.

O recrutamento dos participantes se deu no período de março de 2018 a junho de 2019, sendo estes submetidos inicialmente ao exame clínico, ou seja, anamnese e exame físico, incluindo exame periodontal e exame radiográfico (quando necessário, para confirmação do diagnóstico clínico). Foram avaliados para inclusão 391 voluntários, dos quais foram excluídos 371 por não apresentarem os critérios de inclusão ou apresentarem um ou mais critérios de exclusão. O exame inicial dos 20 voluntários selecionados resultou na exclusão de mais 6 participantes por apresentarem um ou mais critérios de exclusão, os quais não puderam ser identificados na triagem inicial. Sendo assim, após o recrutamento de 14 participantes, estes preencheram a amostra do presente trabalho, formando dois grupos de 17 sítios cada, já que 3 destes voluntários apresentavam 4 sítios que puderam ser incluídos no estudo. O fluxograma do estudo (Figura 1) representa todo o recrutamento, alocação, acompanhamento e análise, sendo realizado baseando-se no *guideline* do CONSORT 2010 (MOHER et al., 2010). Todos procedimentos clínicos e de coleta de dados foram realizados nas Clínicas de Periodontia, de Pós-Graduação e de Radiologia da FOB/USP, no mesmo período mencionado, estendendo-se até novembro de 2020.

Os critérios de inclusão utilizados para a seleção dos participantes da pesquisa foram os seguintes: pacientes com idade entre 18 e 70 anos, com evidência radiográfica (periapical tomada pela técnica do paralelismo) de pelo menos um par de defeitos periodontais infra-ósseos de duas ou três paredes ou defeito combinados de duas e três paredes, localizados nas faces proximais, sem envolvimento de bifurcações, em dentes do mesmo tipo, no arco inferior; dentes assintomáticos clinicamente e radiograficamente sem sinais de lesões periapicais que apresentassem perda de inserção clínica igual ou superior a 5 mm e mobilidade dentária inferior a grau II. Casos em que o participante da pesquisa apresentou número ímpar de dentes

com perda óssea, apenas os “pares” de dentes que se enquadraram nos critérios de inclusão fizeram parte da amostra deste estudo. Os demais dentes foram devidamente encaminhados para tratamento na FOB/USP.

Foram excluídos da amostra os indivíduos com alterações sistêmicas que pudessem interferir no processo de cura (como Diabetes Mellitus não controlado, hipertensão arterial não controlada, hemofilia e outros distúrbios de coagulação) e aqueles submetidos a terapia com administração sistêmica de agentes antimicrobianos, antineoplásicos, anticoagulantes, imunoestimulatórios ou imunodepressivos quatro semanas antes do início do estudo. Da mesma forma foram excluídos, pacientes irradiados e/ou imunodeprimidos, com parafunção severa, que faziam uso de drogas ilícitas, etílicos, fumantes ou os que tinham abandonado o vício há menos de 6 meses, gestantes ou lactantes, indivíduos com dificuldade mental e aqueles não cooperativos com expectativas não realísticas e que não aceitaram participar do estudo.

Cada um dos 14 voluntários selecionados para participarem da pesquisa apresentavam pelo menos 2 sítios a serem incluídos no estudo (11 participantes apresentavam 2 sítios cada e 3 participantes apresentavam 4 sítios cada, totalizando 34 sítios). Dessa forma, os sítios incorporados à pesquisa constituíram os seguintes grupos de estudo: grupo controle (GC, n=17) onde os defeitos foram preenchidos por osso autógeno particulado não desmineralizado; grupo teste (GT, n=17) onde os defeitos foram preenchidos com osso autógeno particulado desmineralizado por ácido cítrico 10% pH 1 durante 30 segundos.

4.3. Randomização do estudo

Os defeitos foram aleatoriamente designados para os grupos controle ou teste (lado direito ou esquerdo) através do programa Excel 2016 (Microsoft® Corporation, Redmont, WA, EUA), sendo cada sítio sorteado para cada grupo imediatamente após o recrutamento do participante para a pesquisa.

Figura 1 – Diagrama de fluxo do estudo

4.4. Cegamento do estudo

Este foi um estudo duplo-cego, com cegamento dos participantes da pesquisa (os quais não tinham conhecimento do tipo de tratamento que seria realizado em cada dente) e do avaliador dos parâmetros clínicos e radiográficos em todos os tempos.

4.5. Calibração do operador

A calibração do operador foi realizada por meio de mensurações clínicas da profundidade de sondagem e da altura da mucosa ceratinizada em 3 pontos por dente (mesial, centro e distal) e por meio da mensuração radiográfica do comprimento radicular dos dentes incluídos no estudo (medida da junção cimento-esmalte até o ápice radicular). Para avaliar a concordância intra-examinador, foram avaliados 20 dentes de 20 pacientes diferentes, provenientes da clínica de pós-graduação de Periodontia da FOB/USP, em dois diferentes períodos de avaliação, com intervalo de reavaliação de 7 dias, previamente à realização do estudo. O cálculo do erro casual de Dahlberg e cálculo do erro sistemático pelo teste "t" pareado realizados no ensaio de calibração do operador resultaram em valores de $p > 0,05$, como demonstrado no Apêndice B, garantindo a reprodutibilidade das medidas e calibração do operador.

4.6. Padronização da amostra

No primeiro contato com os participantes da pesquisa, "baseline", foram realizadas as mensurações dos parâmetros clínicos periodontais e duas tomadas radiográficas de forma padronizada, que será descrito posteriormente. Em seguida, foi realizado o preparo inicial, com a utilização de: aparelho de ultrassom (Profi Neo, Dabi-Atlante) na boca toda do paciente, raspagem e alisamento supra e subgengivais com curetas específicas de Gracey de nºs 5-6 / 7-8 / 11-12 / 13-14 (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA) nas áreas de defeitos ósseos e

profilaxia/polimento coronário com escova Robson e pasta profilática de granulação fina supra gengival na boca toda, além de instruções e reforço de higiene oral (técnica de Bass, uso do fio dental, escovas extra-macias, escovas inter-proximais e bitufos), a fim de padronizar os grupos da amostra. Nos casos onde houve indicação, foi realizada remoção de fatores retentivos de placa bacteriana, ajuste oclusal, contenção e confecção de pontos de contatos proximais.

A quantidade e a frequência das sessões de reforço às instruções de higiene bucal e evidenciação de placa bacteriana foram estabelecidas de acordo com as dificuldades apresentadas em cada indivíduo. Decorrido este tratamento, oito semanas após a padronização da amostra, pelo menos, todos os indivíduos foram submetidos à etapa de reavaliação, na qual novas mensurações foram realizadas. Nesta etapa, foi avaliada a eficiência de cada indivíduo no controle de placa bacteriana, estabelecendo-se como aceitável, média do índice de placa menor que 20%, na medida da boca toda, segundo o índice proposto por Ainamo e Bay (1975) e, especificamente IP menor ou igual a 1, segundo o índice proposto por Silness e Løe (1964), nos dentes a serem tratados. Nos casos em que a média foi superior a este valor, foram aumentadas as sessões de reforço de instrução de higiene bucal e avaliação do controle de placa até sua redução para valor aceitável.

Após a reavaliação, os indivíduos foram então submetidos a cirurgia para regeneração dos defeitos ósseos periodontais, sendo as mensurações realizadas imediatamente antes da cirurgia (período T_0). Novas mensurações clínicas foram realizadas após 3, 6, 9 e 12 meses do procedimento cirúrgico regenerativo, períodos denominados de T_3 , T_6 , T_9 e T_{12} respectivamente. Novas radiografias padronizadas foram realizadas após 6 e 12 meses do procedimento cirúrgico, para avaliação da formação óssea, por meio da verificação do nível ósseo, presença de crista óssea e lâmina dura, como forma de comprovação do sucesso do tratamento clínico (CORTELLINI; TONETTI, 2000).

4.7. Padronização radiográfica

Para possibilitar as comparações das imagens, as tomadas radiográficas foram padronizadas, utilizando para isso radiografias digitais, adquiridas na clínica 3

(clínica de radiologia) da FOB/USP, realizadas com posicionadores adequados, padronizadas e individualizadas com registros oclusais feitos em resina acrílica do tipo Duralay (Reliance Dental Mfg., Co., USA) nos dentes selecionados para análise das medidas estabelecidas. Durante a confecção, os dentes foram vaselinados e a resina foi manipulada seguindo as instruções do fabricante.

Para cada área radiografada foi utilizado um posicionador individualizado do tipo XCP (Rinn Manufacturing Co) adaptado ao sistema XCP (radiografia periapical tomada pela técnica do paralelismo – cone longo), previamente confeccionado em resina acrílica incolor quimicamente ativada (Jet[®], Artigos Odontológicos Clássico LTDA, São Paulo, SP, Brasil) duplicando o posicionador original. O aparelho utilizado para as aquisições das radiografias sempre foi o mesmo (Modelo: SPECTRO 70 kVp / 10mA / Distância focal: 40 cm / Especificações: 127V, 10A, 60Hz) com tempo de exposição padronizado em 0,7 segundos. Os sensores eletrônicos (placas de fósforo – sistema digital indireto) com as imagens latentes foram lidas sempre no mesmo scanner (VISTASCAN, DÜRR DENTAL, com tecnologia de leitura PCS – Photon Collecting System). Todas as imagens foram armazenadas no formato *jpeg*.

Sempre após a sua utilização clínica, os registros oclusais devidamente identificados com o nome do participante da pesquisa foram acondicionados em pote plástico individual, preenchido com água para manter a estabilidade da resina. Foi adicionado hipoclorito de sódio à água para impedir a proliferação bacteriana.

4.8. Análise dos parâmetros clínicos periodontais

Todos os parâmetros foram avaliados por um único operador (APSP), previamente treinado e calibrado, utilizando: Índice de Placa (IP) (SILNESS; LÖE, 1964), Índice Gengival (IG) (LÖE, 1967), medidas clínicas de profundidade de sondagem (PS), recessão gengival (RG), nível de inserção clínico (NIC), nível de inserção relativo (NIR) e quantidade/largura da mucosa ceratinizada (MC) dos dentes incluídos sendo tomadas tais medidas na mesial ou distal da face vestibular, de acordo com o sítio que apresentava o defeito ósseo incluído no estudo.

O detalhamento dos índices e parâmetros utilizados para registro está descrito a seguir:

4.8.1. Índice de Placa (IP) (SILNESS; LÖE, 1964)

Para determinação desse índice foi utilizada uma sonda exploradora nº 5, avaliando as faces mesial e/ou distal dos dentes incluídos no estudo, de acordo com cada sítio, com os seguintes escores:

0 - Ausência de placa bacteriana;

1 - Película de placa bacteriana próxima ao sulco gengival, reconhecida apenas com a solução evidenciadora ou observada passando a sonda ao redor da superfície marginal do dente;

2 - Acúmulo moderado de placa bacteriana dentro da bolsa periodontal ou na margem gengival, vista a olho nu;

3 - Acúmulo abundante de matéria mole dentro da bolsa periodontal e próximo à margem gengival.

Para determinar a presença ou ausência de placa de todos os dentes dos indivíduos foi utilizado o índice proposto por Ainamo e Bay (1975), segundo o qual a presença de placa nas faces vestibular, lingual, mesial e distal foi registrada como 1 e a ausência como 0. Este índice serviu para avaliar a eficiência de cada indivíduo no controle de placa bacteriana, estabelecendo-se como aceitável uma média menor que 20%, na medida da boca toda (como já descrito anteriormente).

4.8.2. Índice Gengival (IG) (LÖE, 1967)

Foi verificado nas faces mesial e/ou distal dos dentes incluídos no estudo, de acordo com cada sítio incluído, de acordo com os seguintes escores:

0 - Gengiva normal;

1 - Inflamação leve: ligeira alteração na cor e edema leve, sem sangramento à sondagem;

2 - Inflamação moderada: vermelhidão, edema e tecido gengival brilhante, com sangramento à sondagem;

3 - Inflamação severa: vermelhidão marcante e edema, ulceração, tendência ao sangramento espontâneo.

4.8.3. Profundidade de Sondagem (PS)

Distância em milímetros da margem gengival ao fundo do sulco gengival/bolsa periodontal nos sítios mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesiolingual, lingual e distolingual de todos os dentes. A profundidade de sondagem foi mensurada com uma sonda periodontal milimetrada do tipo PCPUNC-15 (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA) com diâmetro da ponta de 0,5 mm. Para fins de análises estatísticas, foram utilizados os valores coletados apenas das faces mesial e/ou distal dos dentes incluídos no estudo, de acordo com cada sítio.

4.8.4. Recessão Gengival (RG)

Distância em milímetros da junção cimento-esmalte (JCE) à margem gengival em três pontos na face vestibular (mesial, centro e distal) e três pontos na face lingual (mesial, centro e distal) de todos os dentes. Para fins de análises estatísticas, foram utilizados os valores coletados apenas dos pontos mesial e/ou distal da face vestibular dos dentes incluídos no estudo, de acordo com cada sítio.

4.8.5. Nível de Inserção Clínico (NIC)

Medida em milímetros da profundidade clínica de sondagem somada à medida da recessão gengival ($NIC = PS + RG$).

4.8.6. Nível de Inserção Relativo (NIR)

O nível de inserção relativo teve como referência fixa uma placa oclusal (guia) e o fundo do sulco gengival/bolsa periodontal. Para obtenção das medidas, inicialmente foi realizada moldagem parcial com hidrocolóide irreversível (Alginate) e foram confeccionados modelos em gesso pedra, os quais foram utilizados para a

confeção de uma placa oclusal (guia) em resina acrílica estendendo-se um dente para mesial e um dente para distal do dente incluído na amostra, adaptado do trabalho de Souza (2017). Foi confeccionado um sulco vertical de referência fixo em cada guia correspondendo à região onde seria realizado o enxerto ósseo. Cada placa oclusal foi ajustada intrabucalmente para confirmar a localização do ponto de referência.

O sulco vertical na placa oclusal serviu como guia para a localização e angulação da sonda periodontal milimetrada, permitindo a padronização do posicionamento, assim como a superfície inferior da placa serviu como referência para as mensurações, padronizando as medidas do NIR utilizadas neste estudo.

A medida NIR correspondente a distância da borda inferior da placa até o fundo de sulco gengival ou da bolsa periodontal (dos dentes selecionados para o estudo) foi determinada em milímetros por meio da utilização de uma sonda periodontal milimetrada do tipo PCPUNC-15 (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA) com diâmetro da ponta de 0,5 mm. Medidas intermediárias eram arredondadas para o milímetro mais próximo.

Cada participante da pesquisa teve sua placa oclusal individualizada e esta foi utilizada em todo o transcorrer da pesquisa nos períodos de obtenção das medidas. Após cada utilização clínica, cada placa oclusal era acondicionada individualmente, em embalagem identificada e preenchida com água e hipoclorito de sódio a fim de manter a estabilidade da resina acrílica e impedir o crescimento de culturas de microrganismos.

4.8.7. Quantidade/Largura da Mucosa Ceratinizada (MC)

A faixa de mucosa ceratinizada (quantidade/largura) foi medida após a determinação da linha mucogengival (BHATIA et al., 2015) e expressa em milímetros, correspondendo a distância da margem gengival à linha da junção mucogengival, medida dos pontos mesial e/ou distal da face vestibular dos dentes incluídos no estudo com auxílio de uma sonda periodontal milimetrada PCPUNC-15 (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA).

4.9. Análise das imagens radiográficas pelo programa ImageJ

Os critérios de medida para as análises das imagens radiográficas digitais foram padronizados a partir de referências anatômicas pré-estabelecidas. Inicialmente foram identificadas as seguintes referências anatômicas: junção cimento-esmalte (JCE), ápice radicular, crista óssea alveolar (CA) e fundo do defeito periodontal (identificado como sendo a posição mais coronal ao longo da superfície radicular onde se observa normalidade do espaço do ligamento periodontal) (Figura 2).

Figura 2 - Referências anatômicas

Se a JCE não pudesse ser identificada devido a presença de algum material restaurador, a margem apical deste foi considerado como ponto fixo de referência. Tais parâmetros e medições lineares foram baseadas no trabalho de Zangrando (2010). Em seguida, as seguintes distâncias lineares puderam ser obtidas:

- Medida da junção cimento-esmalte até o ápice radicular (JCE_Ápice) (Figura 3);
- Medida da junção cimento-esmalte até o início do defeito periodontal (crista óssea alveolar) (JCE_CA) (Figura 3);
- Medida da junção cimento-esmalte até o final do defeito periodontal (JCE_Fundo) (Figura 3);

- Medida do ângulo do defeito (ângulo formado entre a superfície radicular e o defeito periodontal, tomando como referências as seguintes referências anatômicas: JCE, final do defeito ósseo e crista óssea alveolar) (Figura 4).

Figura 3 - Medidas lineares JCE_Ápice, JCE_CA e JCE_Fundo

Figura 4 – Medida do ângulo do defeito, baseada nas linhas JCE-Fundo e CA-Fundo

Todas as radiografias foram analisadas utilizando o software de análise de imagens ImageJ (NIH, USA), a fim de determinar as medidas lineares mencionadas

anteriormente e também comparar a densidade óssea. Previamente às mensurações, as imagens foram devidamente calibradas em escala pré-definida, em milímetros, de acordo com as dimensões da película digital utilizada para aquisição das imagens. As radiografias do baseline foram importadas para o programa e as áreas a serem analisadas foram determinadas individualmente para cada defeito ósseo.

Figura 5 – Determinação do polígono circundando o defeito ósseo na radiografia inicial utilizado para avaliação da densidade óssea radiográfica

Para avaliar a densidade óssea foram padronizados polígonos que circundavam cada defeito (Figura 5), sendo a quantidade de pixels estabelecida na imagem inicial (radiografia do baseline) utilizada como padrão para a mensuração nas radiografias tomadas em tempos posteriores (T₆ e T₁₂). Em seguida, através do histograma, foi obtido o delta E que serviu como parâmetro de comparação entre os grupos e intra-grupo. Essa avaliação não foi realizada em períodos anteriores por ser considerado precoce para observação de mineralização óssea e determinação de sucesso da terapia.

Para auxiliar na identificação das referências anatômicas foram utilizados ajustes de imagem como brilho e contraste, entretanto as mensurações só foram obtidas das imagens originais. As medidas foram realizadas por um único examinador (APSP) previamente treinado e calibrado para os parâmetros avaliados.

4.10. Avaliação da influência da mastigação e métodos de higienização no resultado do tratamento

Adicionalmente, como forma de resultados centrados nos pacientes, foram realizados questionamentos sobre preferência pelo lado da mastigação (lado teste ou controle) e métodos complementares utilizados pelos pacientes para higienização interproximal das regiões operadas, como uso ou não de palito e escova interdental. Tais fatores foram pesquisados a fim de verificar possíveis influências no resultado dos tratamentos.

4.11. Procedimento cirúrgico para regeneração periodontal dos defeitos infra-ósseos

Após a conclusão da terapia periodontal inicial, a amostra foi submetida à fase cirúrgica, escolhendo-se aleatoriamente pelo programa Excel 2016 (Microsoft® Corporation, Redmont, WA, EUA), em cada indivíduo, entre os defeitos selecionados, um como teste e outro como controle.

A antissepsia intra bucal foi realizada com bochecho de gluconato de clorexidina 0,12% por 60 segundos e extra bucal com digluconato de clorexidina a 0,2% em gel. Os pacientes eram cobertos com campos cirúrgicos estéreis, sendo todos os procedimentos realizados de forma a manter a cadeia asséptica. Os pacientes foram anestesiados utilizando anestésico tópico gel Benzocaína 200 mg/g (Benzotop – Nova DFL, Rio de Janeiro/RJ, Brasil), seguido por anestesia local por bloqueio do nervo alveolar inferior (anestesia troncular) com cloridrato de articaína 4% e epinefrina 1:100.000 (Articaine 100, Nova DFL, Rio de Janeiro/RJ, Brasil). Seguiu-se a incisão intra-sulcular, realizada com lâmina de bisturi nº 15c (Swann-Morton, Owlerton Green, Reino Unido), tanto na face vestibular como na face lingual, envolvendo o dente a receber o enxerto e, pelo menos, os dentes adjacentes ao defeito ósseo (um dente mesial e um dente distal). Em seguida era realizada também uma incisão relaxante até atingir o periósteo na mesial, estendendo-se além da junção muco-gengival, a fim de ampliar a área de visualização óssea. A partir destas incisões,

um retalho de espessura total era elevado com uso de descolador de Molt 2-4 para exposição do defeito ósseo e da tábua óssea vestibular, da qual era raspado e coletado osso autógeno de uma área periférica ao defeito.

Após rebatido o retalho, eram realizados raspagem e alisamento radicular com curetas específicas de Gracey nºs 7-8 / 11-12 / 13-14 (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA) e raspagem dos defeitos ósseos com curetas de Goldman Fox para remoção do tecido de granulação e debridamento ósseo. A área cirúrgica recebia abundante irrigação com solução salina durante esses procedimentos. A superfície radicular foi tratada quimicamente com condicionamento por ácido cítrico gel pH 1 a 50% associado a tetraciclina 10% (Disciplina de Bioquímica-FOB/USP) durante 90 segundos, sendo então lavada abundantemente com solução salina fisiológica.

Durante o procedimento cirúrgico era realizada medida do componente infra-ósseo do defeito com sonda periodontal milimetrada, tomando-se como referência a distância entre a crista óssea e o fundo do defeito, além da medida da distância da JCE até a crista óssea e da JCE até o fundo do defeito. Era registrado, ainda, o número de paredes de cada defeito.

A cortical óssea do defeito era perfurada com sonda exploradora nº 5, a fim de aumentar a vascularização e, conseqüentemente, o aporte sanguíneo para o enxerto. Os defeitos dos sítios testes e controles eram, então, preenchidos com seus respectivos enxertos ósseos. Para isso, o osso cortical da tábua vestibular adjacente ao defeito era coletado com cinzel Rhodes. Nos sítios teste, o material coletado era imediatamente desmineralizado por submersão em ácido cítrico pH 1 a 10% por 30 segundos (REZENDE et al., 2015) dentro de uma cuba metálica. Após transcorrido o tempo de desmineralização, o enxerto ósseo era lavado abundantemente com soro fisiológico estéril e o excesso de solução era cuidadosamente aspirada antes de ser transferido para o defeito infra-ósseo. Nos sítios controle, o material coletado era imediatamente transferido para o defeito infra-ósseo. Após o preenchimento dos defeitos até o nível da crista óssea, os tecidos moles foram reposicionados na altura da junção cimento-esmalte e suturados em colchoeiro vertical externa na região do enxerto, com suturas simples nas demais papilas e na região da incisão relaxante, com fio de sutura de nylon 5-0 (Johnson Ethicon, São José dos Campos/SP, Brasil).

Os participantes da pesquisa receberam orientações quanto aos cuidados pós-operatórios e prescrição de antibiótico (amoxicilina 500mg a cada 8 horas por 7 dias), dose de ataque de anti-inflamatório (nimesulida 100mg, sendo 2 comprimidos a cada 12 horas nos dois primeiros dias, seguidos de 1 comprimido a cada 12 horas por mais 3 dias) e colutório (bochechos suaves com 10ml de gluconato de clorexidina 0,12% durante 1 minuto, a cada 12 horas, por 14 dias). As suturas foram removidas duas semanas após a cirurgia.

Os controles das áreas operadas foram realizados nas 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 6^a semanas pós-cirúrgicas. Em cada consulta, era feita inspeção visual cuidadosa dessas áreas, observando a cicatrização tecidual, além de um controle de placa rigoroso nesse período. Sendo observada a presença de placa bacteriana (perceptível a olho nu, ou ao passar a sonda exploradora na superfície dentária), esta era removida de forma cuidadosa com raspagem supra gengival, utilizando curetas específicas de Gracey (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA) e, na sequência, as superfícies dentárias recebiam polimento com escova Robson e pasta profilática de granulação fina (sempre supra gengival); além de instruções e reforço de higiene oral. Após a 6^a semana, as consultas de retorno para controle profissional de placa bacteriana (terapia de manutenção periodontal) eram feitas mensalmente até se completarem três meses. Depois trimestralmente até se completarem 12 meses. Nenhum efeito adverso ou complicação pós-operatória foi observado. Aos três, seis, nove e doze meses, foram realizadas as medidas dos parâmetros clínicos nos sítios testes e controle (exceto aferição da profundidade de sondagem, bem como índice gengival e níveis de inserção clínico e relativo aos 3 meses, uma vez que tais mensurações são diretamente dependente da sondagem e ser considerado um período muito precoce para tal aferição). Radiografias periapicais padronizadas foram realizadas dentro dos mesmos critérios empregados na medida inicial, nos períodos de 6 e 12 meses após a cirurgia. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo operador.

4.12. Forma de análise dos resultados

4.12.1. Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram tabulados no programa Excel 2016 (Microsoft® Corporation, Redmont, WA, EUA) para serem analisados por meio do programa Statistica 7.0 for Windows (StatSoft. Inc.; Tulsa, OK, EUA). Foram analisadas as diferenças intra-grupos e inter-grupos, assim como as alterações entre os períodos experimentais (baseline, T₀, T₃, T₆, T₉ e T₁₂). Em todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5% (valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância).

A variáveis quantitativas foram registradas através de médias e desvios-padrões e, em seguida, a normalidade dos dados foi verificada através do método Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis medidas em escore foram empregadas a média, a mediana, o 1º quartil e o 3º quartil.

Para as comparações foram utilizados os seguintes testes:

- Teste “t” pareado para variáveis quantitativas inter-grupos;
- Teste não paramétrico de Wilcoxon para variáveis quantitativas não normais e variáveis qualitativas inter-grupos;
- Análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas para variáveis quantitativas intra-grupos, nos diferentes tempos de avaliação;
- Teste de Tukey para comparações individuais nos diferentes períodos do estudo, quando o resultado da análise de variância foi estatisticamente significante;
- Teste não paramétrico de Friedman para variáveis quantitativas não normais e variáveis qualitativas intra-grupos;
- Teste de correlação para verificar a influência da quantidade de mucosa ceratinizada sobre o efeito do tratamento regenerativo;
- Teste “t” de Student para grupos independentes a fim de verificar a influência de outros fatores no resultado dos tratamentos, tais como uso ou não de escova interdental na região operada, uso ou não de palito na região operada, mastigação preferencial do lado teste ou controle e faixa de mucosa ceratinizada presente.

A exatidão das observações de dados coletados, bem como a eficiência do método utilizado são os principais elementos para o sucesso de uma pesquisa. Por isso, o trabalho deve apresentar uma descrição completa e cronológica da metodologia utilizada, permitindo a compreensão e interpretação dos resultados, assim como também a reprodução do estudo ou a utilização do método por outros pesquisadores.

Resultados

5 RESULTADOS

Foram avaliados inicialmente 391 pacientes, dos quais apenas 14 foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão deste trabalho. Dos 377 pacientes excluídos, os principais motivos foram: não apresentarem pelo menos um par de defeitos infra-ósseos (identificados durante as radiografias iniciais ou mesmo no momento cirúrgico) ou apresentarem alterações sistêmicas que os enquadrassem nos critérios de exclusão (diabetes e/ou hipertensão não controladas) ou ainda serem fumantes.

Portanto, foram incluídos no estudo e tratados 14 pacientes (oito homens e seis mulheres) com idade entre 28 e 70 anos ($41,07 \pm 12,03$ anos). Por se tratar de um estudo de boca dividida, a amostra seria composta por 28 defeitos periodontais (se cada indivíduo apresentasse apenas dois sítios a serem incluídos). Entretanto, três dos pacientes avaliados apresentavam quatro sítios a serem incluídos, o que resultou em uma amostra final composta por 17 sítios em cada grupo (GC = 17 e GT = 17). Na tabela 1 estão descritas as características gerais dos pacientes incluídos nos dois grupos, de acordo com a idade, gênero e número de sítios avaliados.

Tabela 1 - Distribuição da amostra por idade (média $\pm$ desvio padrão) e gênero.

Grupos	Idade (anos)	Gênero		Número de sítios avaliados
		Masculino (%)	Feminino (%)	
Teste (sítios)	-	8 (23,53%)	9 (26,47%)	17 (50%)
Controle (sítios)	-	8 (23,53%)	9 (26,47%)	17 (50%)
Geral (sítios)	-	16 (47,06%)	18 (52,94%)	34 (100%)
Geral (indivíduos)	41,07 $\pm$ 12,03	8 (57,14%)	6 (42,86%)	14 (100%)

No Gráfico 1 estão descritos os tipos de defeitos periodontais tratados em ambos os grupos.

Gráfico 1 – Tipos de defeitos periodontais em cada um dos grupos experimentais do estudo, identificados no T₀ (n = 17 para cada grupo).

Para realização da análise estatística dos tipos de defeitos periodontais incluídos no estudo, foi considerada a variável “tipo de defeito” como qualitativa ordinal. Assim, defeitos de 2 paredes eram representados pelo valor 1, defeitos combinados de 2 e 3 paredes eram representados pelo valor 2 e defeitos de 3 paredes eram representados pelo valor 3. Após a realização do teste não paramétrico de Wilcoxon para comparação entre os grupos o resultado de p obtido foi de 0,043115, mostrando diferença entre os grupos no início do estudo (tabela 2).

Tabela 2 - Estatística descritiva para o tipo de defeito periodontal alocado em cada grupo do estudo.

	Média	Mediana	1º quartil	3º quartil
GC	1,6 ± 0,8*	1	1	2
GT	2 ± 0,7*	2	2	2

Análise inter-grupos - teste não paramétrico de Wilcoxon / *p<0,05 para grupos.

Durante todo o estudo, foram realizadas mensurações clínicas que avaliaram a qualidade de saúde e estabilidade dos tecidos moles periodontais nos sítios tratados. Todos os valores obtidos foram tabelados para as análises estatísticas, assim como as medidas obtidas por meio das imagens radiográficas. Para os índices

medidos em escore foram empregados os valores de média, mediana, 1º quartil e 3º quartil. Para as variáveis quantitativas foram descritos os valores de médias e desvios-padrões e em seguida a normalidade dos dados foi verificada por meio do método Kolmogorov-Smirnov. A estatística descritiva de todos os dados coletados durante os períodos de avaliação do estudo nos sítios tratados pode ser observada nas tabelas 3, 4 e 5 a seguir.

Tabela 3 - Estatística descritiva para variáveis medidas em escore de ambos os grupos.

			Média	Mediana	1º quartil	3º quartil
GC	IP	Baseline	1,2	1	1	1
		T ₀	0,5	1	0	1
		T ₃	0,8	1	1	1
		T ₆	0,9	1	1	1
		T ₉	0,9	1	1	1
		T ₁₂	0,9	1	1	1
	IG	Baseline	2	2	2	2
		T ₀	1,9	2	2	2
		T ₆	1,4	2	1	2
		T ₉	1,2	1	1	2
		T ₁₂	1,5	2	1	2
GT	IP	Baseline	1,2	1	1	1
		T ₀	0,6	1	0	1
		T ₃	0,9	1	1	1
		T ₆	0,8	1	1	1
		T ₉	0,8	1	0	1
		T ₁₂	0,7	1	0	1
	IG	Baseline	1,8	2	2	2
		T ₀	1,7	2	2	2
		T ₆	1,5	2	1	2
		T ₉	1,1	1	0	2
		T ₁₂	1,5	2	1	2

Grupo controle (GC), grupo teste (GT), índice de placa (IP), índice gengival (IG), primeiro contato com os participantes da pesquisa (baseline), cirurgia (T₀), 3 meses após a cirurgia (T₃), 6 meses após a cirurgia (T₆), 9 meses após a cirurgia (T₉), 12 meses após a cirurgia (T₁₂).

Tabela 4 - Estatística descritiva para variáveis clínicas quantitativas de ambos os grupos.

Média (mm) ± desvio-padrão (mm)							
	Baseline	T₀	T₃	T₆	T₉	T₁₂	
GC	PS	7,2±1,25*	6,6 ± 1,42	-	3,4 ± 0,86	3,5 ± 0,87	3,4 ± 0,94
	RG	0,1±0,24*	0,8±1,09*	0,8 ± 0,97	0,8 ± 1,07	0,8±1,01*	0,8±1,03*
	NIC	7,3±1,31*	7,4 ± 1,37	-	4,2 ± 1,29	4,3 ± 1,36	4,2 ± 1,29
	NIR	-	11,7 ± 2,05	-	8,9 ± 2,09	8,6 ± 1,54	8,6 ± 1,54
	MC	3,9±1,2*	3,9±1,2*	3,7 ± 1,26	3,8±1,19*	3,8±1,19*	3,8±1,19*
GT	PS	7,1±1,17*	6,8 ± 1,3	-	3,5 ± 0,94	3,9 ± 0,99	3,6 ± 1,22
	RG	0,2±0,66*	0,8±1,01*	1 ± 1,27	0,9 ± 1,14	0,9 ± 1,09	0,9 ± 1,11
	NIC	7,4 ± 1,32	7,5 ± 1,18	-	4,5 ± 1,62	4,8 ± 1,59	4,5 ± 1,94
	NIR	-	11,8 ± 1,86	-	8,7 ± 2,28	8,8 ± 2,48	8,9 ± 2,57
	MC	3,7 ± 1,4	3,6 ± 1,37	3,6 ± 1,42	3,6 ± 1,37	3,6 ± 1,37	3,6 ± 1,37

Grupo controle (GC), grupo teste (GT), profundidade de sondagem (PS), recessão gengival (RG), nível de inserção clínico (NIC), nível de inserção relativo (NIR), quantidade/largura da mucosa ceratinizada (MC), primeiro contato com os participantes da pesquisa (baseline), cirurgia (T₀), 3 meses após a cirurgia (T₃), 6 meses após a cirurgia (T₆), 9 meses após a cirurgia (T₉), 12 meses após a cirurgia (T₁₂).

*variáveis não normais (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov).

Resultados

Tabela 5 - Estatística descritiva para variáveis quantitativas obtidas através das imagens radiográficas de ambos os grupos. Apenas os valores descritos para o período T₀ foram obtidos clinicamente no momento da cirurgia.

		Média ± desvio-padrão			
		Baseline	T ₀	T ₆	T ₁₂
GC	JCE_Ápice (mm)	15,4 ± 1,67	-	15,4 ± 1,67	15,4 ± 1,67
	JCE_CA (mm)	3,4 ± 1,33	3,9 ±	3,6±1,66*	3,6 ± 1,65
	JCE_Fundo (mm)	6,6 ± 2,09	7,1 ±	4,4 ± 1,82	4,1 ± 1,89
	CA_Fundo (mm)	3,2 ± 1,09	3,2 ±	0,9 ± 1,17	0,5±1,12*
	Ângulo (graus)	38,4° ± 14°	-	66,9°±27,64°	72,2°±26,8°*
	Densidade óssea (pixels)	70045,9 ±22995,77	-	85527,7 ±23288,51	108788,5 ±24050,34
GT	JCE_Ápice (mm)	15,2 ± 1,92	-	15,2 ± 1,92	15,2 ± 1,92
	JCE_CA (mm)	3,4 ± 1,22	4,1 ±	3,8 ± 1,13	3,8 ± 1,15
	JCE_Fundo (mm)	6,9 ± 1,58	7,4 ±	4,6 ± 1,66	4,2 ± 1,3
	CA_Fundo (mm)	2,8 ± 0,9	3,3 ±	0,8 ± 0,88	0,4±0,71*
	Ângulo (graus)	36,1°±11,13°	-	68,1°±20,73°	80,5°±19,98°*
	Densidade óssea (pixels)	70812,9 ±24726,75	-	90409,8 ±20708,25	117063,6 ±21201,61

Grupo controle (GC), grupo teste (GT), medida da junção cimento-esmalte até o ápice radicular (JCE_Ápice), medida da junção cimento-esmalte até o início do defeito periodontal/crista alveolar (JCE_CA), medida da junção cimento-esmalte até o final do defeito periodontal (JCE_Fundo), medida da crista alveolar/início do defeito periodontal até o final do defeito periodontal (CA_Fundo), medida do ângulo do defeito (Ângulo) e medida quantitativa da densidade óssea na região do defeito periodontal (Densidade óssea), primeiro contato com os participantes da pesquisa (baseline), cirurgia (T₀), 6 meses após a cirurgia (T₆), 12 meses após a cirurgia (T₁₂). *variáveis não normais (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov).

Após realização dos testes estatísticos, foi possível observar as diferenças existentes intra e inter-grupos. Para as variáveis qualitativas IP e IG, os resultados dos testes não paramétricos de Friedman e Wilcoxon estão apresentados na tabela 6. A porcentagem de placa e sangramento em cada sítio do estudo foi calculada de acordo com a presença ou não de placa ou sangramento em cada sítio.

Tabela 6 – Porcentagem de sítios com placa e sangramento gengival investigados nos sítios tratados em todos os períodos do estudo nos grupos experimentais.

		Baseline	T ₀	T ₃	T ₆	T ₉	T ₁₂
IP	GC	100% ^a	52,9% ^b	76,5% ^{ab}	82,4% ^a	82,4% ^a	82,4% ^a
	GT	100% ^{ac}	52,9% ^{bd}	82,4% ^{acd}	76,5% ^{abcd}	70,6% ^{bcd}	70,6% ^{bcd}
IG	GC	100% ^a	88,2% ^{ab}	-	52,9% ^b	47,1% ^{bc}	52,9% ^b
	GT	82,4% ^a	82,4% ^a	-	64,7% ^{ab}	35,3% ^b	64,7% ^{ab}

Índice de placa (IP), índice gengival (IG), grupo controle (GC), grupo teste (GT), primeiro contato com os participantes da pesquisa (baseline), cirurgia (T₀), 3 meses após a cirurgia (T₃), 6 meses após a cirurgia (T₆), 9 meses após a cirurgia (T₉), 12 meses após a cirurgia (T₁₂). Análise inter-grupos - teste não paramétrico de Wilcoxon / Análise intra-grupo - teste não paramétrico de Friedman e de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = $p < 0,05$ para tempo / Letras maiúsculas diferentes = $p < 0,05$ para grupos (não houve diferença entre grupos).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos em nenhum dos períodos experimentais para os parâmetros IP e IG. Entretanto, em ambos os grupos foi observada redução significativa do IP do Baseline para o momento da cirurgia, como resultado da terapia inicial periodontal. Tal resultado não se manteve com o passar do tempo, observando-se variações ora para mais, ora para menos na porcentagem de sítios com placa. Já para o IG, houve redução dos sítios que apresentavam sangramento, em ambos os grupos, após a intervenção cirúrgica nos períodos T₆ e T₉, porém com aumento no período final de avaliação (T₁₂). O detalhamento do IP e do IG em porcentagens para cada escore está descrito nos Gráficos 2 e 3, respectivamente.

Resultados

Gráfico 2 – Porcentagem de sítios que apresentaram placa para cada escore no exame inicial (Baseline), no momento da cirurgia (T₀) e após 3 (T₃), 6 (T₆), 9 (T₉) e 12 (T₁₂) meses, em ambos os grupos experimentais do estudo.

Gráfico 3 – Porcentagem de sítios para cada escore do índice gengival no exame inicial (Baseline), no momento da cirurgia (T₀) e após 6 (T₆), 9 (T₉) e 12 (T₁₂) meses, em ambos os grupos experimentais do estudo.

A tabela 7 apresenta os resultados das análises inter-grupos para as variáveis quantitativas PS, RG, NIC, NIR e MC, através do teste “t” pareado (para variáveis normais) e do teste não paramétrico de Wilcoxon (para variáveis não normais) e também das análises intra-grupo para as mesmas variáveis através da análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguido do teste de Tukey (para variáveis normais) e do teste não paramétrico de Friedman seguido do teste de Wilcoxon (para variáveis não normais).

Tabela 7 – Média, desvio padrão (em mm) e comparação dos grupos experimentais em relação aos parâmetros clínicos quantitativos.

Média ± desvio-padrão								
		Baseline	T₀	T₃	T₆	T₉	T₁₂	Δ
PS	GC	7,2±1,25 ^a	6,6±1,42 ^a	-	3,4±0,86 ^b	3,5±0,87 ^b	3,4±0,94 ^b	-3,18±1,47
	GT	7,1±1,17 ^a	6,8±1,3 ^a	-	3,5±0,94 ^b	3,9±0,99 ^b	3,6±1,22 ^b	-3,12±1,87
RG	GC	0,1±0,24 ^a	0,8±1,09 ^b	0,8±0,97 ^b	0,8±1,07 ^b	0,8±1,01 ^b	0,8±1,03 ^b	-0,00±0,71
	GT	0,2±0,66 ^a	0,8±1,01 ^b	1±1,27 ^b	0,9±1,14 ^b	0,9±1,09 ^b	0,9±1,11 ^b	0,06±0,56
NIC	GC	7,3±1,31 ^a	7,4±1,37 ^a	-	4,2±1,29 ^b	4,3±1,36 ^b	4,2±1,29 ^b	-3,18±1,24
	GT	7,4±1,32 ^a	7,5±1,18 ^a	-	4,5±1,62 ^b	4,8±1,59 ^b	4,5±1,94 ^b	-2,94±1,75
NIR	GC	-	11,7±2,05 ^a	-	8,9±2,09 ^b	8,6±1,54 ^b	8,6±1,54 ^b	-3,06±1,34
	GT	-	11,8±1,86 ^a	-	8,7±2,28 ^b	8,8±2,48 ^b	8,9±2,57 ^b	-2,88±1,83
MC	GC	3,9±1,2 ^a	3,9±1,2 ^a	3,7±1,26 ^a	3,8±1,19 ^a	3,8±1,19 ^a	3,8±1,19 ^a	-0,12±0,49
	GT	3,7±1,4 ^a	3,6±1,37 ^a	3,6±1,42 ^a	3,6±1,37 ^a	3,6±1,37 ^a	3,6±1,37 ^a	0,00±0,00

Profundidade de sondagem (PS), recessão gengival (RG), nível de inserção clínico (NIC), nível de inserção relativo (NIR), quantidade/largura da mucosa ceratinizada (MC), grupo controle (GC), grupo teste (GT), primeiro contato com os participantes da pesquisa (baseline), cirurgia (T₀), 3 meses após a cirurgia (T₃), 6 meses após a cirurgia (T₆), 9 meses após a cirurgia (T₉), 12 meses após a cirurgia (T₁₂), diferença entre T₁₂ e T₀ (Δ). Análise inter-grupos - teste “t” pareado e teste não paramétrico de Wilcoxon / Análise intra-grupo – análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguido do teste de Tukey e teste não paramétrico de Friedman seguido do teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = p<0,05 para tempo / Letras maiúsculas diferentes = p<0,05 para grupos (não houve diferença entre grupos).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos teste e controle em nenhum dos parâmetros descritos na tabela 7 nos diferentes períodos experimentais do estudo. Em relação às análises intra-grupos, foi observada redução significativa nos parâmetros PS, NIC e NIR do período T₀ para os períodos posteriores (T₆, T₉ e T₁₂) que se manteve sem alterações significativas ao longo do tempo, como resultado do procedimento cirúrgico regenerativo realizado em ambos os grupos. A RG aumentou significativamente após o período inicial (Baseline) onde foi realizada raspagem, mas se manteve sem alterações ao longo dos demais períodos experimentais em ambos os grupos. Já para as medidas de largura da MC, não houve diferenças intra-grupos nos tempos de avaliações do estudo.

Para as variáveis quantitativas obtidas por meio das imagens radiográficas, os resultados dos testes estatísticos estão apresentados na tabela 8. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais. Porém ambos os grupos apresentaram resultados favoráveis após o tratamento periodontal regenerativo, com diminuição significativa nas medidas que representam o preenchimento ósseo alcançado.

Tabela 8 – Média, desvio padrão (em mm) e comparação dos grupos experimentais em relação às medidas radiográficas. Apenas os valores de T₀ foram obtidos clinicamente.

Média ± desvio-padrão						
		Baseline	T ₀	T ₆	T ₁₂	Δ
JCE_Ápice (mm)	GC	15,4±1,67 ^a	-	15,4±1,67 ^a	15,4±1,67 ^a	0,00±0,00
	GT	15,2±1,92 ^a	-	15,2±1,92 ^a	15,2±1,92 ^a	0,00±0,00
JCE_CA (mm)	GC	3,4±1,33 ^a	3,9±1,65 ^a	3,6±1,66 ^a	3,6±1,65 ^a	0,26±0,56
	GT	3,4±1,22 ^a	4,1±1,83 ^a	3,8±1,13 ^a	3,8±1,15 ^a	0,41±0,62
JCE_Fundo (mm)	GC	6,6±2,09 ^a	7,1±2,38 ^a	4,4±1,82 ^b	4,1±1,89 ^b	-2,44±0,75
	GT	6,9±1,58 ^a	7,4±1,77 ^a	4,6±1,66 ^b	4,2±1,3 ^b	-2,65±1,32
CA_Fundo (mm)	GC	3,2±1,09 ^a	3,2±1,51 ^a	0,9±1,17 ^b	0,5±1,12 ^b	-2,65±0,95
	GT	2,8±0,9 ^a	3,3±1,16 ^a	0,8±0,88 ^b	0,4±0,71 ^b	-2,35±1,17
Ângulo (graus)	GC	38,4°±14° ^{oa}	-	66,9°±27,64° ^{ob}	72,2°±26,8° ^{ob}	33,82°±27,03°
	GT	36,1°±11,13° ^{oa}	-	68,1°±20,73° ^{ob}	80,5°±19,98° ^{ob}	44,41°±20,68°
Densidade óssea (pixels)	GC	70045,9 ±22995,77 ^a	-	85527,7 ± 23288,51 ^b	108788,5 ±24050,34 ^c	38742,53 ± 27593,62
	GT	70812,9 ±24726,75 ^a	-	90409,8 ± 20708,25 ^b	117063,6 ±21201,61 ^c	46250,65 ± 31393,43

Medida da junção cimento-esmalte até o ápice radicular (JCE_Ápice), medida da junção cimento-esmalte até o início do defeito periodontal/crista alveolar (JCE_CA), medida da junção cimento-esmalte até o final do defeito periodontal (JCE_Fundo), medida da crista alveolar/início do defeito periodontal até o final do defeito periodontal (CA_Fundo), medida do ângulo do defeito (Ângulo) e medida quantitativa da densidade óssea na região do defeito periodontal (Densidade óssea), grupo controle (GC), grupo teste (GT), primeiro contato com os participantes da pesquisa (baseline), cirurgia (T₀), 6 meses após a cirurgia (T₆), 12 meses após a cirurgia (T₁₂), diferença entre T₁₂ e Baseline (Δ). Análise inter-grupos - teste "t" pareado e teste não paramétrico de Wilcoxon / Análise intra-grupo – análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguido do teste de Tukey e teste não paramétrico de Friedman seguido do teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = p<0,05 para tempo / Letras maiúsculas diferentes = p<0,05 para grupos (não houve variação inter-grupos).

Separadamente, foi realizado teste de correlação para o parâmetro MC avaliado em ambos os grupos, comparando-o tanto aos parâmetros clínicos quanto radiográficos. A tabela 9 mostra os valores de r e p obtidos quando o teste de correlação foi estatisticamente significativo.

Resultados**Tabela 9** – Valores de r e p obtidos a partir do teste de correlação entre os parâmetros estudados e a quantidade/largura de mucosa ceratinizada nos sítios avaliados apenas para comparações com resultados estatisticamente significativos.

		Baseline	T ₀	T ₃	T ₆	T ₉	T ₁₂
PS x MC	GC	-	-	-	-	-	-
	GT	-	-	-	r = -0,52 p = 0,03055	-	r = -0,53 p = 0,0292
RG x MC	GC	r = -0,85 p = 0,00002	r = -0,49 p = 0,04612	r = -0,57 p = 0,0169	r = -0,52 p = 0,03364	r = -0,49 p = 0,0432	r = -0,55 p = 0,02312
	GT	-	r = -0,63 p = 0,0063	r = -0,66 p = 0,00413	r = -0,73 p = 0,0008	r = -0,73 p = 0,00089	r = -0,77 p = 0,0003
NIC x MC	GC	-	-	-	-	r = -0,59 p = 0,0133	-
	GT	-	-	-	r = -0,82 p = 0,00005	r = -0,72 p = 0,0011	r = -0,77 p = 0,00027
JCE_ CA x MC	GC	-	-	-	-	-	-
	GT	r = -0,56 p = 0,0207	-	-	r = -0,81 p = 0,00008	-	r = -0,73 p = 0,0008
JCE_ Fundo x MC	GC	-	-	-	-	-	-
	GT	-	-	-	r = -0,83 p = 0,00004	-	r = -0,76 p = 0,0004
Ângulo x MC	GC	-	-	-	-	-	-
	GT	-	-	-	r = 0,55 p = 0,0213	-	-
Tipo de defeito x MC	GC	-	-	r = 0,51 p = 0,03821	-	-	-
	GT	r = -0,52 p = 0,03139	r = -0,53 p = 0,02741	r = -0,51 p = 0,03585	r = -0,53 p = 0,02741	r = -0,53 p = 0,02741	r = -0,53 p = 0,02741

Profundidade de sondagem (PS), quantidade/largura da mucosa ceratinizada (MC), recessão gengival (RG), nível de inserção clínico (NIC), medida da junção cimento-esmalte até o início do defeito periodontal/crista alveolar (JCE_CA), medida da junção cimento-esmalte até o final do defeito periodontal (JCE_Fundo), medida do ângulo do defeito (Ângulo) e tipo de defeito ósseo (Tipo de defeito), grupo controle (GC), grupo teste (GT), primeiro contato

com os participantes da pesquisa (baseline), cirurgia (T₀), 3 meses após a cirurgia (T₃), 6 meses após a cirurgia (T₆), 9 meses após a cirurgia (T₉), 12 meses após a cirurgia (T₁₂). Teste de correlação.

A quantidade de mucosa ceratinizada apresentou correlação positiva tanto para tipo de defeito ósseo quanto para o ângulo do defeito. Já para os demais parâmetros avaliados (PS, RG, NIC, medida da JCE até a CA e da JCE até o fundo do defeito ósseo) a correlação foi negativa. Para realização da análise estatística, a variável tipo de defeito foi considerada como qualitativa ordinal, onde 1 representa defeitos de 2 paredes, 2 representa defeitos combinados e 3 representa defeitos de 3 paredes, da mesma forma como já descrito anteriormente para comparação do tipo de defeito alocado em cada grupo.

Adicionalmente, a amostra do estudo seria realocada em grupos de acordo com a faixa de mucosa ceratinizada para realização do teste “t” de Student para grupos independentes a fim de verificar e/ou reafirmar a influência da MC no resultado dos tratamentos realizados. Entretanto, dos 34 sítios tratados, 29 deles apresentavam faixa de MC > 2mm e apenas 5 sítios apresentavam faixa de MC ≤ 2mm, impossibilitando a realização adequada do teste proposto.

A fim de verificar a existência de possíveis influências sobre o resultado dos tratamentos realizados, informações sobre o uso ou não de escova interdental na região operada, uso ou não de palito na região operada e mastigação preferencial do lado teste ou controle foram coletadas. De forma descritiva, os resultados encontrados foram os seguintes: 7 indivíduos não relataram preferência mastigatória do lado direito ou esquerdo, 5 indivíduos relataram realizar a mastigação preferencialmente do lado onde se encontrava o dente pertencendo ao grupo controle e 2 indivíduos preferiam realizar a mastigação do lado onde se encontrava o dente pertencente ao grupo teste; mesmo tendo recebido orientações de higiene e estas tendo sido reforçadas ao longo do estudo, apenas 7 indivíduos relataram o uso de escovas interdentais e 2 indivíduos faziam uso de palito de dentes. Para proceder a realocação da amostra em grupos levando em consideração tais variáveis não havia quantidade de indivíduos suficientes que permitisse a realização dos testes estatísticos, portanto tais variáveis não foram consideradas no presente trabalho.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O objetivo principal do presente trabalho foi comparar parâmetros clínicos e radiográficos após terapia periodontal regenerativa quando da desmineralização ou não, com ácido cítrico, pH 1 a 10% por 30 segundos, do enxerto ósseo autógeno particulado em defeitos periodontais infra-ósseos, a fim de testar a hipótese de que a desmineralização intencional do enxerto ósseo traz resultados tão favoráveis quanto o processo fisiológico de reparo ósseo, ou ainda melhores, no que se refere ao tempo de neoformação óssea e qualidade do osso neoformado.

Sendo assim, as medidas obtidas relativas ao ganho de inserção foram consideradas desfecho primário e os demais parâmetros avaliados durante o estudo, desfechos secundários. Os resultados evidenciaram ganho de inserção periodontal e preenchimento ósseo radiográfico para ambos os grupos experimentais, porém não foram aparentemente capazes de comprovar a hipótese de que a desmineralização intencional do enxerto apresentar resultados superiores durante o processo fisiológico de reparo.

Durante o desenvolvimento de qualquer pesquisa existem diversas limitações metodológicas, principalmente em se tratando de estudos clínicos. Uma das principais limitações do presente trabalho foi na seleção da amostra, devido ao fato de terem sido adotados critérios de inclusão e exclusão que restringiram a possibilidade de selecionar indivíduos que preenchessem adequadamente tais critérios.

Por se tratar de um estudo de boca dividida, o fato de um mesmo indivíduo ser considerado controle de si mesmo na alocação da amostra reduz significativamente o “n”. Por outro lado, a dificuldade de encontrar indivíduos com defeitos infra-ósseos semelhantes bilateralmente, em dentes homólogos, aumenta. Sendo assim, mesmo tendo sido avaliados clinicamente quase 400 indivíduos para seleção da amostra, mais de 95% desses indivíduos não puderam ser selecionados, por não se enquadrarem nos critérios de inclusão ou por apresentarem um ou mais critérios de exclusão. Apenas 3,58% dos voluntários foram selecionados. Mas podemos considerar que isso contribuiu na diminuição de variáveis que pudessem influenciar de forma expressiva os resultados do presente trabalho.

A amostra final ficou composta por 14 indivíduos, 8 homens e 6 mulheres, que apresentavam 34 sítios a serem tratados, sendo 17 sítios alocados para o grupo

controle e 17 sítios para o grupo teste, possibilitando a realização dos testes estatísticos propostos que respondessem ao objetivo principal do trabalho. Realocações da amostra a fim de verificar a influência de fatores diversos sobre o resultado “cicatricial” dos tratamentos não foram possíveis, entretanto este não era o objetivo principal do trabalho, por isso o “n” não foi determinado para esta finalidade. Houve certa proporção entre a quantidade de homens e mulheres que compuseram a amostra.

Como apresentado anteriormente, existem várias opções de ácidos na literatura que poderiam ser utilizados para desmineralização dos enxertos. Além do ácido cítrico, outros agentes comumente utilizados são a tetraciclina (TERRANOVA, MARTIN, 1982; ISIK et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2000) e o EDTA (BLOMLOF, LINDSKOG, 1995; BLOMLOF, BLOMLOF, LINDSKOG, 1996). Entretanto nossa opção foi pelo uso do ácido cítrico a fim de mimetizar o que fisiologicamente ocorre na natureza. Foi descrito por Melcher (1976) que, o mecanismo de reabsorção óssea no processo fisiológico de remodelação, acontece em dois estágios. No primeiro estágio ocorre a mobilização dos cristais minerais pela ação de ácidos produzidos pelos osteoclastos, ácido láctico, ácido cítrico e ácido carbônico (WALKER, 1961; PARFITT, 1976). No segundo, há hidrólise da matriz orgânica por enzimas também produzidas pelas células clásticas. A opção pelo ácido cítrico na concentração de 10% no presente trabalho se deu tendo em vista resultados favoráveis obtidos em trabalhos anteriores da atual linha de pesquisa (REZENDE et al., 2015; MANFREDI, 2016; CARVALHO, 2017; CAETANO, 2019; MANFREDI et al., 2019; CARVALHO et al., 2020).

Inicialmente, a realização dos testes estatísticos não demonstrou diferença entre os grupos no período T_0 (após a padronização da amostra), comprovando que os grupos avaliados se apresentavam semelhantes entre si antes da realização dos tratamentos propostos, o que justifica a comparação dos demais parâmetros estudados. Clinicamente, a comparação dos valores médios tanto do NIC quanto do NIR entre os grupos resultou em valores de p maiores que 0,05 ($p = 0,651461$ e $p = 0,914409$, respectivamente).

Radiograficamente as comparações iniciais foram realizadas a partir das imagens obtidas no baseline e, da mesma forma que para os parâmetros clínicos, os valores de p obtidos foram maiores que 0,05. Em relação às medidas da JCE ao fundo

do defeito ósseo e à crista óssea, os valores de p após comparação entre os grupos foram, respectivamente, $p = 0,557415$ e $p = 1,0$. Para as medidas do ângulo dos defeitos, a comparação entre o grupo teste e o controle resultou em $p = 0,593409$. A densidade óssea também foi semelhante entre os grupos ($p = 0,874966$).

O único parâmetro verificado clinicamente em T_0 que não se apresentou semelhante entre os grupos foi o tipo de defeito tratado, visto que na amostra foram incluídos defeitos de 2 ou 3 paredes ou ainda defeitos combinados de 2 e 3 paredes. Como a alocação da amostra foi realizada de forma aleatória pelo Excel, não foi possível controlar esta variável, em relação a qual defeito seria alocado para qual dos grupos estudados. Assim, apenas durante as análises estatísticas foi verificado que no grupo controle foram tratados: 9 defeitos de 2 paredes, 5 defeitos combinados e 3 defeitos de 3 paredes; e no grupo teste foram tratados: 4 defeitos de 2 paredes, 9 defeitos combinados e 4 defeitos de 3 paredes. Após a comparação entre os grupos por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon, o resultado de p obtido foi menor que 0,05 ($p=0,043115$), revelando diferença entre grupos no início do estudo.

Independentemente do número de paredes ósseas residuais, defeitos que apresentam um componente infra-ósseo mais profundo do que 3 mm, com um ângulo radiográfico menor ou igual a 25° e com uma faixa de tecidos gengivais que apresente pelo menos 1 mm de espessura têm maiores chances de resultar em quantidades consistentes de inserção clínica e preenchimento ósseo (GARRETT et al., 1988; TONETTI; PINI-PRATO; CORTELLINI, 1993; TONETTI; PINI-PRATO; CORTELLINI, 1996; CORTELLINI et al., 1998; CORTELLINI; TONETTI, 2000; KLEIN et al., 2001; KAO; NARES; REYNOLDS, 2015). Sendo assim, tal diferença estatística encontrada no presente estudo não parece ter se mostrado relevante no decorrer do mesmo, uma vez que para as demais variáveis avaliadas, tanto clínica quanto radiograficamente, não houve diferença entre os grupos no início do estudo. Como todos os defeitos foram tratados resultando em ganho clínico de inserção e preenchimento ósseo radiográfico, independente do tipo no início do estudo, apenas os parâmetros clínicos e radiográficos que puderam ser mensurados nos diferentes períodos de avaliação do estudo foram considerados para fins de análises estatísticas, como será discutido a seguir.

Em relação aos parâmetros clínicos avaliados, os mais relevantes para o presente trabalho, a fim de responder à proposição, foram o NIC e NIR, os quais diminuiram significativamente ao logo do estudo, representando, portanto, ganho de

inserção periodontal, considerado desfecho primário. A comparação inter-grupos dos dados coletados para NIC em T₀ (no momento da cirurgia, após a padronização da amostra), não apresentou diferença significativa ($p = 0,65146$). Após o tratamento regenerativo, foi observada redução significativa nos valores de NIC intra-grupo em todos os períodos avaliados, nos dois grupos experimentais, com os valores de $p = 0,000131$ para todos os tempos em ambos os grupos. A média da diferença entre o período final e o período inicial do estudo para a variável NIC foi de $-3,18 \text{ mm} \pm 1,24 \text{ mm}$ para o GC e $-2,94 \text{ mm} \pm 1,75 \text{ mm}$ para o GT, representando ganho de inserção periodontal intra-grupos para ambos os grupos experimentais, porém sem diferença estatística entre eles ($p = 0,5872$).

Para o NIR os resultados foram semelhantes, sem diferença estatística entre os grupos em T₀ ($p = 0,91441$), mas com redução significativa intra-grupos em todos os períodos experimentais, com valor de $p = 0,000167$. A média da diferença de NIR entre T₁₂ e T₀ foi de $-3,06 \text{ mm} \pm 1,34 \text{ mm}$ para o GC e $-2,88 \text{ mm} \pm 1,83 \text{ mm}$ para o GT, também sem diferença estatística entre os grupos ($p = 0,7583$). Apesar de não ter sido observada diferença entre os grupos experimentais, a comparação dos valores do ganho de inserção obtidos tanto através do NIC (GC = $-3,18 \text{ mm} \pm 1,24 \text{ mm}$ e GT = $-2,94 \text{ mm} \pm 1,75 \text{ mm}$) quanto do NIR (GC = $-3,06 \text{ mm} \pm 1,34 \text{ mm}$ e GT = $-2,88 \text{ mm} \pm 1,83 \text{ mm}$) demonstrou ser muito semelhante ao final do estudo, enfatizando a importância de quaisquer um dos dois parâmetros na mensuração do ganho de inserção periodontal. Os achados em relação ao ganho de inserção periodontal após terapia regenerativa no presente trabalho corroboram com outros trabalhos na literatura (CORTELLINI; BOWERS, 1995; CORTELLINI et al., 1998; CORTELLINI; TONETTI, 2000; FARINA et al., 2015; KAO; NARES; REYNOLDS, 2015).

Os parâmetros IP e IG foram importantes para avaliar a saúde e estabilidade dos tecidos periodontais no decorrer do trabalho. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos em nenhum dos períodos experimentais para os parâmetros IP e IG. O fato do presente trabalho ter sido conduzido com o desenho de boca dividida demonstrou ser vantajoso, uma vez que ambos os grupos experimentais, estando no mesmo indivíduo, foram afetados igualmente por eventuais fatores locais e sistêmicos (PAGE et al., 1995), comprovadamente pela falta de diferença estatística entre os grupos inicialmente. Foi observada redução significativa em relação ao IP entre o baseline e o período T₀, tanto

no GC ($p = 0,01172$) como no GT ($p = 0,01172$), como resultado da terapia inicial periodontal. Tal resultado está de acordo com diversos trabalhos na literatura, justificando a raspagem como padrão-ouro do preparo básico periodontal, uma vez que, sendo efetiva na remoção dos micro-organismos periodontais, é capaz de controlar a progressão da doença periodontal (COBB, 2002; PLESSAS, 2014; ASAD et al., 2017; BOTELHO et al., 2020). Porém, com o passar dos meses, mesmo enfatizando a importância e necessidade de se realizar uma adequada higiene para garantir os resultados pós-operatórios, observou-se um aumento no IP. Para o parâmetro IG avaliado, houve redução significativa dos sítios com sangramento, a qual se deu após a intervenção cirúrgica nos períodos T_6 (GC $p = 0,01172$), T_9 (GC $p = 0,00769$ e GT $p = 0,02493$) e T_{12} (GC $p = 0,01172$), comparando com os dados coletados no Baseline.

A manutenção de uma adequada higiene bucal por parte do paciente é considerada um fator importante para a saúde e estabilidade dos tecidos periodontais. Diversos são os fatores que podem influenciar na eficácia do controle de placa por parte dos pacientes, como características inerentes aos dentes e tecidos periodontais (posição do dente no arco, quantidade de tecido ceratinizado) e também ao próprio paciente (habilidade de realizar adequadamente a higiene bucal, o grau de comprometimento com o tratamento e a motivação para manutenção da saúde bucal) (CORTELLINI; TONETTI, 2000; PASSANEZI et al., 2011; CHIU et al., 2015).

Além disso, é importante ressaltar o quão essencial é a terapia periodontal de suporte para manutenção do sucesso alcançado pelo tratamento. Definida como parte da terapia periodontal, onde são realizados procedimentos em intervalos regulares para auxiliar o paciente periodontal na manutenção da saúde bucal (GLOSSARY OF PERIODONTAL TERMS, 2001), ela é parte integrante do tratamento periodontal e é capaz de garantir a manutenção e os efeitos benéficos da terapia a longo prazo (RAMFJORD, 1993; COHEN et al., 2003).

Em relação à PS, esta se mostrou semelhante entre os grupos para todos os períodos do estudo, com redução significativa intra-grupos após a intervenção cirúrgica. A diferença média do T_{12} para o T_0 foi de $3,18 \text{ mm} \pm 1,47 \text{ mm}$ para GC e de $3,12 \text{ mm} \pm 1,87 \text{ mm}$ para GT, sem diferença estatística entre os grupos ($p = 0,90709$). Novamente, a realização de um estudo de boca dividida facilita a comparação entre diferentes tratamentos, uma vez que ambos foram submetidos às mesmas condições

durante o processo de reparação periodontal, eliminando, assim, quaisquer variações específicas entre os pacientes (PAGE et al., 1995). O presente trabalho demonstrou que ambos os tratamentos realizados (enxerto ósseo desmineralizado ou não) foram efetivos para a redução da PS dos sítios tratados, corroborando com achados da literatura onde a terapia periodontal regenerativa resultou em diminuição da PS (CORTELLINI; BOWERS, 1995; CORTELLINI et al., 1998; CORTELLINI; TONETTI, 2000; FARINA et al., 2015; KAO; NARES; REYNOLDS, 2015).

Outro parâmetro clínico avaliado durante o estudo foi a RG, importante na determinação do NIC quando avaliado juntamente com a PS. Novamente, não foi observada diferença estatística entre os grupos, em nenhum dos períodos experimentais. Houve aumento significativo nesse parâmetro apenas comparando os dados do baseline para o T₀, como resultado da terapia periodontal inicial, com os seguintes valores médios encontrados, respectivamente, para o GC 0,1 mm ± 0,24 mm e 0,8 mm ± 1,09 mm (p = 0,00259) e para o GT 0,2 mm ± 0,66 mm e 0,8 mm ± 1,01 mm (p = 0,03436). Os valores aferidos em T₀ se mantiveram sem diferença até o período final de avaliação do estudo em ambos os grupos, demonstrando que a terapia cirúrgica não interferiu nesse parâmetro. A diferença observada nos períodos iniciais de avaliação demonstra que, como efeito da raspagem, tem-se uma melhora significativa na condição de saúde dos tecidos periodontais, entretanto a redução nos sinais clínicos de inflamação, principalmente no edema dos tecidos moles periodontais, pode resultar em maior exposição da superfície radicular, observada clinicamente como recessão gengival (COBB, 2002). Tal fato, inerente ao tratamento periodontal, deve sempre ser esclarecido junto aos pacientes, uma vez que pode resultar em hipersensibilidade dentinária pós-raspagem e até mesmo em situações antiestéticas para alguns pacientes.

Devido ao ineditismo do presente trabalho, não existem outros relatos na literatura de ensaios clínicos controlados utilizando enxerto ósseo particulado desmineralizado com ácido cítrico para preenchimento de defeitos infra-ósseos em seres humanos. Por isso, os resultados encontrados nessa amostra não podem, no presente momento, ser comparados com outros. Entretanto é possível encontrar na literatura trabalhos com metodologias semelhantes a essa, em que se buscou comparar diferentes tipos de materiais para o preenchimento de defeitos infra-ósseos,

resultando também em ganho de inserção clínica, preenchimento ósseo e redução na PS, como será discutido a seguir.

O resultado ideal do tratamento em defeitos infra-ósseos é considerado ausência de sangramento à sondagem, presença de bolsas superficiais associadas à regeneração periodontal (ou seja, formação de novo cemento radicular e novo osso alveolar com inserção de fibras do ligamento periodontal) e ausência de recessão dos tecidos moles. Diversas são as técnicas cirúrgicas que têm sido empregadas para alcançar a regeneração periodontal, muitas vezes incluindo vários tipos de enxerto ósseo e/ou substitutos ósseos, desmineralização da superfície radicular, regeneração tecidual guiada, fatores de crescimento e diferenciação, proteínas da matriz do esmalte ou várias combinações dos mesmos (Sculean et al., 2015).

Em 2002, Trombelli et al. procuraram determinar o efeito adjuvante da enxertia de biomateriais / agentes biológicos com desbridamento com retalho aberto no tratamento de defeitos infra-ósseos profundos. Foi conduzida uma revisão sistemática rigorosa de ensaios clínicos randomizados de pelo menos 6 meses de duração comparando enxerto de biomateriais / agentes biológicos (sozinhos ou em combinação) + debridamento (grupo de teste) com apenas o debridamento ou em combinação com um placebo (grupo de controle). A diferença na mudança do nível de inserção entre os grupos teste e controle variou de -1,45 mm a 1,40 mm em relação aos diferentes biomateriais / agentes biológicos. A meta-análise mostrou que a mudança no nível de inserção melhorou significativamente após o tratamento para carbonato de cálcio coralino, vidro bioativo, hidroxiapatita e proteínas da matriz do esmalte.

Reynolds e colaboradores (2003) publicaram uma revisão sistemática cujo objetivo foi avaliar a eficácia dos enxertos ósseos em defeitos periodontais em comparação com o desbridamento cirúrgico. Foram investigadas mudanças no nível ósseo, nível de inserção clínica, profundidade de sondagem, recessão gengival e reabsorção da crista óssea alveolar. Com relação ao tratamento de defeitos infra-ósseos, os resultados da meta-análise apoiaram as seguintes conclusões: enxertos ósseos aumentam o nível ósseo, reduzem a perda óssea crestal, aumentam o nível de inserção clínica e reduzem a profundidade de sondagem em comparação com procedimentos de desbridamento apenas com retalho aberto; nenhuma diferença nas medidas de resultados clínicos emergem entre o enxerto ósseo particulado e os enxertos de cerâmica com fosfato de cálcio (hidroxiapatita); e enxertos ósseos em

combinação com barreiras de membrana aumentam o nível de inserção clínica e reduzem a profundidade de sondagem em comparação com o enxerto sozinho.

Como já descrito, os grupos que compuseram a amostra do presente trabalho não receberam nenhum tipo de barreira de membrana durante o procedimento regenerativo. Apesar do conhecimento de relatos de melhores resultados, nossa opção foi pelo não uso de barreiras a fim de diminuir as variáveis que poderiam influenciar o resultado do tratamento. Caso a opção fosse pelo uso de barreira, pelo menos dois grupos adicionais deveriam ser criados (enxerto ósseo + membrana e enxerto ósseo desmineralizado + membrana), a fim de garantir que os resultados não seriam influenciados pela presença de uma barreira física entre as células de tecidos moles e duros. Isso aumentaria o “n” da amostra, bem como os custos e o tempo do estudo, portanto fica como sugestão para futuros trabalhos..

Khoshkam e colaboradores (2015) também publicaram uma revisão sistemática e meta-análise, cujo objetivo foi avaliar os efeitos do fator de crescimento derivado de plaquetas humano recombinante-BB (rhPDGF-BB) e do fator de crescimento de fibroblasto humano recombinante-2 (rhFGF-2) no tratamento de defeitos infra-ósseos periodontais, em comparação com o grupo controle. Foram calculadas, usando meta-análise, as diferenças médias ponderadas de preenchimento linear dos defeitos, redução da profundidade de sondagem, ganho no nível de inserção clínica e recessão gengival. Os autores encontraram significativamente mais ganho de preenchimento linear e no nível de inserção clínica para rhPDGF-BB enquanto rhFGF-2 resultou em porcentagem significativamente maior de preenchimento do defeito.

Resultados de outra revisão sistemática e meta-análise publicada por Matarasso e colaboradores (2015) também demonstraram ganho de inserção clínica e redução na profundidade de sondagem. O objetivo da revisão foi avaliar a eficácia clínica da cirurgia periodontal regenerativa de defeitos infra-ósseos usando uma combinação de derivado de matriz de esmalte e enxerto ósseo em comparação com uso apenas de derivado de matriz de esmalte. O ganho médio de inserção clínica totalizou $3,76 \pm 1,07$ mm após o tratamento com a combinação de derivado de matriz de esmalte e enxerto ósseo e $3,32 \pm 1,04$ mm após o tratamento apenas com derivado de matriz de esmalte. A redução média da PS foi de $4,22 \pm 1,20$ mm em locais tratados com derivado de matriz de esmalte e enxerto ósseo e de $4,12 \pm 1,07$ mm em locais tratados apenas com derivado de matriz de esmalte. O aumento médio da RG foi de

0,76 ± 0,42 mm em locais tratados com derivado de matriz de esmalte e enxerto ósseo e de 0,91 ± 0,26 mm em locais tratados com derivado de matriz de esmalte sozinho. Dentro de seus limites, os presentes resultados indicam que a combinação de derivado de matriz de esmalte e enxertos ósseos pode resultar em melhorias clínicas adicionais em termos de ganho de inserção clínica e redução na PS.

Sculean et al. (2015) demonstraram em sua revisão sistemática que a regeneração periodontal em defeitos infra-ósseos humanos pode ser alcançada em uma extensão variável usando diversos métodos e materiais, como enxertos ósseos e substitutos, regeneração tecidual guiada, fatores biológicos e suas combinações, sendo que as abordagens com combinações parecem fornecer os melhores resultados.

E por fim, o último parâmetro clínico mensurado no presente estudo, a faixa de MC, quando avaliada estatisticamente entre os grupos não demonstrou diferença significativa, nem mesmo apresentou qualquer variação significativa no decorrer do estudo. Porém ao serem realizados testes de correlação, comparando-se a faixa de MC com os demais parâmetros clínicos e radiográficos avaliados no estudo, a quantidade de MC pareceu influenciar alguns deles.

Em relação aos parâmetros clínicos avaliados, houve correlação negativa para PS, RG e NIC. Sendo assim, tem-se que tais parâmetros são inversamente proporcionais à faixa de MC, ou seja, quanto maior a faixa de MC, observa-se menor PS, menor RG e, conseqüentemente, menor NIC. Entretanto tais dados, apesar de terem sido encontrados na amostra do presente trabalho, podem não ser verdadeiros para todos os indivíduos, podendo ser considerados apenas uma casualidade. Em relação à RG pode haver sim tal correlação, mas em relação à PS, nem sempre indivíduos com maior faixa de MC apresentam menor PS, podendo acontecer exatamente o contrário. No presente estudo não foi avaliada a espessura da MC, que contribui para a definição do tipo de fenótipo periodontal. Entretanto sabe-se que quando indivíduos de fenótipo periodontal espesso desenvolvem doenças periodontais, estas resultam em formação de bolsa com aumento da profundidade de sondagem, diferentemente de indivíduos com fenótipo fino que muitas vezes apresentam maior RG e menor PS (ZWEERS et al, 2014).

Quanto aos testes de correlação entre a MC e as medidas radiográficas que também resultaram em $p < 0,05$, com correlação positiva para tipo de defeito

ósseo e correlação negativa para as medidas da JCE até a CA e da JCE até o fundo do defeito ósseo, tais resultados indicam, para a amostra do presente trabalho, que quanto maior a quantidade de MC, mais favorável seria o defeito ósseo, ou seja, apresenta maior número de paredes residuais e menor quantidade de perda óssea. Mais uma vez, tais resultados podem ser considerados apenas uma eventualidade, uma vez que a faixa de MC por si só não seria capaz de influenciar o número de paredes residuais em um defeito periodontal, bem como a quantidade de perda óssea presente (ZWEERS et al, 2014).

Segundo De Rouck et al. (2009), a quantidade de MC, a espessura gengival e a arquitetura óssea, além da forma das coroas dentárias, são fatores que, em conjunto, ajudam a determinar as características do biótipo periodontal. Assim, se propõe a existência de três biótipos, caracterizados como: “fino”, apresentando contatos interproximais próximos da borda incisal, estreita faixa de MC adjacente, gengiva clinicamente delicada e fina, coroas delgadas, triangulares e pouca convexidade cervical, e osso alveolar relativamente fino; “intermediário”, apresentando gengiva com aspecto fibroso, coroas alongadas e triangulares, faixa de MC estreita e arco altamente biselado e regular; e “espesso”, que apresenta acentuada convexidade cervical, contatos interproximais maiores e posicionados apicalmente, ampla faixa de MC adjacente, gengiva com aspecto fibroso e comparativamente mais espesso, arco gengival de bordas arredondadas e coroas dentárias quadrangulares.

Jepsen et al. (2018) reforçam que na classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares proposta pela Academia Americana de Periodontia juntamente com a Federação Europeia de Periodontia em 2017/2018, deve-se adotar a definição “fenótipo periodontal” para descrever a combinação do fenótipo gengival (volume gengival tridimensional, ou seja, espessura gengival, largura do tecido queratinizado) e a espessura da tábuia óssea vestibular (morfotipo ósseo). Assim, tem-se uma combinação multifatorial de características genéticas e fatores ambientais, indicando uma dimensão que pode mudar ao longo do tempo dependendo de fatores ambientais e intervenção clínica e pode ser específico do local. Discutindo se o desenvolvimento de recessões gengivais está associado ao fenótipo gengival, os autores relatam que fenótipos finos são mais propensos a desenvolver

lesões de recessão crescentes. O fenótipo fino é capaz, portanto, de aumentar o risco de recessão gengival.

Para Zweers e colaboradores (2014), fenótipos periodontais classificados como “finos” podem ser relacionados com recessão gengival, deiscência e fenestração ósseas, além de apresentarem menor resistência a traumas durante a escovação, menor previsibilidade pós-cirúrgica do nível tecidual resultante e maior dificuldade de formação da papila adjacente a implantes imediatos. Em contrapartida, o fenótipo “espesso” parece ser mais resistente ao trauma de escovação se comparado ao “fino”, sendo mais comum a formação de bolsas durante o processo inflamatório e apresenta melhor previsibilidade na cicatrização dos tecidos moles e duros no pós-operatório, além de estar relacionado com a formação de papilas adjacentes aos implantes imediatos.

Sabe-se da importância de uma faixa adequada de MC para manutenção da saúde e estabilidade dos tecidos periodontais, como demonstrado em diversos estudos na literatura, sejam clássicos ou atuais, que justificam a manutenção e/ou criação de faixa adequada de MC (LANG; LÖE, 1972; AINAMO; AINAMO, 1978; MAYNARD, WILSON, 1979; PASSANEZI et al., 2011; SOUZA, 2017). Porém os achados do presente estudo não podem ser extrapolados com tal ênfase. Com essa finalidade, a amostra do presente estudo deveria ter sido pensada de maneira diferente, permitindo sua realocação em função da faixa de MC, permitindo a realização de outras análises estatísticas mais pertinentes. E não apenas a faixa de MC deve ser considerada relevante, mas também sua espessura (qualidade tecidual). Cortellini e Tonetti (2000) mencionam em seu trabalho que defeitos ósseos com maiores chances de resultar em quantidades consistentes de inserção clínica e ganhos ósseos são aqueles, dentre outros fatores, com pelo menos 1 mm de espessura de MC, sendo que a espessura dos tecidos gengivais, se desfavorável, pode ser melhorada com cirurgia mucogengival.

Sendo assim, sugere-se o desenvolvimento de outro trabalho que avalie tanto a quantidade como a qualidade do tecido gengival (altura e espessura da MC) a fim de verificar sua influência sobre o resultado do tratamento periodontal regenerativo.

Para os parâmetros radiográficos avaliados durante o presente estudo, os resultados das análises estatísticas não demonstraram diferenças entre os grupos teste e controle, mas diferenças nos tempos experimentais foram encontradas e serão também discutidas. Para a medida da distância da JCE ao ápice, os valores médios encontrados foram 15,4 mm $\pm$ 1,67 mm no grupo controle e 15,2 mm $\pm$ 1,92 mm no grupo teste, em todos os períodos avaliados (baseline, T₆ e T₁₂). Esta medida foi aferida e utilizada para garantir a padronização radiográficas no presente trabalho, uma vez que o comprimento das raízes dos dentes tratados não sofre influência da terapia regenerativa periodontal. Os resultados para tais medidas, não apresentando variações ao longo do trabalho, evidenciam a padronização das imagens avaliadas, sendo apenas mais uma forma de garantir tal padronização, além das já apresentadas no capítulo de materiais e métodos.

Tomando como referência anatômica nas imagens radiográficas a JCE dos dentes tratados, medidas foram realizadas até a crista óssea alveolar (representando o início do defeito periodontal) e até o fundo do defeito. Para as medidas JCE_CA, os valores encontrados no GC foram 3,4 mm $\pm$ 1,33 mm (baseline), 3,6 mm $\pm$ 1,66 mm (T₆) e 3,6 mm $\pm$ 1,65 mm (T₁₂) e no GT foram 3,4 mm $\pm$ 1,22 mm (baseline), 3,8 mm $\pm$ 1,13 mm (T₆) e 3,8 mm $\pm$ 1,15 mm (T₁₂), sem diferença estatística entre os grupos ($p = 0,50886$) bem como nos diferentes períodos do estudo. É possível observar que, em relação aos números absolutos encontrados, houve discreto aumento das medidas JCE_CA após a intervenção cirúrgica, representando perda óssea da crista alveolar em ambos os grupos, o que é esperado clinicamente e, de acordo com os resultados do presente trabalho, parece não ter significado clínico relevante.

Toda cirurgia periodontal com elevação de retalho total e, consequentemente, exposição do tecido ósseo implica em dano vascular provocado pela separação do periósteo da superfície óssea. O que se observa, com isso, é uma resposta inflamatória aguda que, por sua vez, resulta em reabsorção da superfície óssea exposta. Sugere-se que a ruptura do suprimento vascular do tecido ósseo seja um fator contribuinte para a perda óssea (BLANCO et al., 2008). Outros estudos que avaliaram radiograficamente a distância linear entre a JCE e a CA também encontraram reabsorção óssea da crista alveolar após a intervenção cirúrgica para regeneração periodontal de defeitos infra-ósseos. Pasin (2006) verificou, comparativamente, através da subtração radiográfica digital linear o efeito do

tratamento de defeitos infra-ósseos de 2 ou 3 paredes por meio de retalho de espessura total repostado associado (GT) ou não (GC) à proteína derivada da matriz do esmalte e observou que a distância entre a JCE e a CA aumentou durante o período de 12 meses em ambos os grupos (GT: 8,6 mm $\pm$ 3,9 mm no Baseline e 10,4 mm $\pm$ 3,4 mm em T₁₂ e GC: 8,4 mm $\pm$ 4,6 mm em T₀ e 9,3 mm $\pm$ 5,9 mm em T₁₂). Utilizando a mesma amostra e metodologia, Zangrando (2010) conduziu um estudo com análise radiográfica aos 24 meses, observando resultados semelhantes (GT: 5,13 mm $\pm$ 2,59 mm em T₀ e 6,14 mm $\pm$ 2,47 mm aos 24 meses e GC: 5,1 mm $\pm$ 2,31 mm no Baseline e 5,24 mm $\pm$ 2,73 mm aos 24 meses). Achados da literatura corroboram com os resultados do presente trabalho.

Para as medidas JCE_Fundo, os resultados médios para o GC foram de 6,6 mm $\pm$ 2,09 mm (baseline), 4,4 mm $\pm$ 1,82 mm (T₆) e 4,1 mm $\pm$ 1,89 mm (T₁₂) e para o GT foram de 6,9 mm $\pm$ 1,58 mm (baseline), 4,6 mm $\pm$ 1,66 mm (T₆) e 4,2 mm $\pm$ 1,3 mm (T₁₂). Não houve diferença entre os grupos ($p = 0,58706$) nem entre os tempos de avaliação. O que é possível notar quando analisados os valores médios encontrados, é um ganho ósseo maior no GT quando comparado ao GC, porém sem diferença estatística significativa. A média da diferença entre T₁₂ e T₀ para o GC foi de -2,91 mm $\pm$ 0,87 mm e para o GT foi de -3,12 mm $\pm$ 1,62 mm, representando ganho ósseo ligeiramente maior para o GT. Tais dados, porém, não apresentaram relevância clínica para os resultados da terapia periodontal regenerativa no presente trabalho.

As medidas transcirúrgicas JCE_CA, JCE_Fundo e CA_Fundo (aferidas clinicamente em T₀) foram de 3,9 mm $\pm$ 1,65 mm para o GC e de 4,1 mm $\pm$ 1,83 mm para o GT, de 7,1 mm $\pm$ 2,38 mm para o GC e de 7,4 mm $\pm$ 1,77 mm para o GT e de 3,2 mm $\pm$ 1,51 mm para o GC e de 3,3 mm $\pm$ 1,16 mm para o GT, respectivamente. Mesmo não havendo diferença estatística das aferições transcirúrgicas obtidas com a sonda para as medidas realizadas na imagem radiográfica do baseline, nota-se certa subestimação das medidas radiográficas quando comparados os números absolutos obtidos. Geralmente, observa-se uma tendência de as medidas radiográficas serem ligeiramente menores do que as medidas diretas transcirúrgicas (HAUSMANN, 2000).

Tais achados também estão de acordo com o relatado por Grimard e colaboradores (2009) que, ao comparar as medidas transcirúrgicas às medidas realizadas por meio de radiografias intraorais e de imagens de tomografia computadorizada volumétrica de feixe cônico, observaram mensurações

subestimadas nas imagens radiográficas de $0,6 \text{ mm} \pm 2,3 \text{ mm}$ a $1,5 \text{ mm} \pm 2,3 \text{ mm}$. Os autores concluíram que para as comparações entre as medidas transcirúrgicas diretas e das imagens estudadas, as medidas aferidas das imagens tomográficas foram significativamente mais precisas e exatas do que àquelas das imagens radiográficas.

Albandar (1989) avaliou a confiabilidade das mensurações da JCE à CA em radiografias periapicais padronizadas e não-padronizadas comparadas às medidas diretas em crânios secos. Verificou-se que ambos os métodos radiográficos subestimaram significativamente o nível ósseo interproximal, porém com pouco impacto nos estudos longitudinais que monitoram alterações do nível ósseo alveolar, concluindo que a validade e a confiabilidade de ambos os métodos radiográficos foram satisfatórios.

A morfologia do componente infra-ósseo dos defeitos periodontais desempenha importante papel no resultado “cicatricial” dos tratamentos regenerativos (CORTELLINI; TONETTI, 2000). Uma das características morfológicas relevantes durante o processo de reparo ósseo é a largura do componente infra-ósseo dos defeitos, medida através do ângulo formado entre a superfície radicular e a parede óssea do defeito periodontal (STEFFENSEN; WEBER, 1989). Defeitos mais amplos estão associados a menores ganhos de inserção e preenchimento ósseo, defeitos ósseos com ângulos inferiores a 45° apresentam maior potencial de preenchimento ósseo radiográfico comparados aos defeitos com ângulos acima de 45° , nesses casos há uma tendência de menor ganho (STEFFENSEN; WEBER, 1989). Assim, as medidas iniciais dos ângulos dos defeitos podem ser utilizadas como um indicador no prognóstico dos tratamentos regenerativos (KLEIN et al., 2001; TSITOURA et al., 2004).

Segundo Francetti e colaboradores (2004) há uma tendência de aumento do ângulo do defeito com o preenchimento ósseo do mesmo, permitindo assim mais uma forma de avaliação do componente ósseo representando melhora das condições ósseas. No presente trabalho, os valores médios para os ângulos dos defeitos encontrados no início do tratamento foram de $38,4^\circ \pm 14^\circ$ para o grupo controle e de $36,1^\circ \pm 11,13^\circ$ para o grupo teste. Decorridos 6 meses do tratamento cirúrgico regenerativo, o grupo controle apresentou um aumento significativo para $66,9^\circ \pm 27,64^\circ$ ($p = 0,000355$), assim como o grupo teste $68,1^\circ \pm 20,73^\circ$ ($p = 0,000126$). Ao final do trabalho, aos 12 meses de acompanhamento, houve ligeiro aumento em

ambos os grupos ($GC = 72,2^\circ \pm 26,8^\circ$ e $GT = 80,5^\circ \pm 19,98^\circ$), não significativo em relação ao período de 6 meses ($GC p = 0,692399$ e $GT p = 0,075003$), mas significativo em relação ao início do trabalho ($GC p = 0,000141$ e $GT p = 0,000123$). Ambos os grupos apresentaram, portanto, resultados favoráveis de preenchimento ósseo radiográfico após os tratamentos. Mesmo não sendo detectadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais, é possível observar que em relação aos números absolutos da média dos ângulos dos defeitos, no grupo controle inicialmente os defeitos apresentavam ângulos maiores que os do grupo teste e ao final do estudo esse fato se inverte, com o grupo teste apresentando os maiores ângulos, o que poderia indicar uma tendência a um maior preenchimento ósseo no grupo teste.

A densidade óssea avaliada no presente estudo resultou em valores médios (em pixels) que aumentaram significativamente nos períodos de avaliação, tanto do baseline para o T_6 ($GC p = 0,03048$ e $GT p = 0,00939$) como do T_6 para o T_{12} ($GC p = 0,00104$ e $GT p = 0,00053$), porém sem diferença entre os grupos ($p = 0,35017$). Com a cirurgia regenerativa e o preenchimento ósseo, é esperado que as imagens radiográficas apresentem melhora na densidade óssea periodontal ao longo do tempo, entretanto o presente estudo não foi capaz de mostrar diferença entre os grupos controle e teste em relação à qualidade do osso neoformado. Como a desmineralização óssea é capaz de acelerar o processo de neoformação, e nos resultados encontrados para ambos os grupos já no período T_6 foi observada tal mudança radiográfica, talvez avaliações mais precoces pudessem evidenciar melhor essa diferença entre os grupos do estudo. Além disso, deve-se considerar a sensibilidade do método, uma vez que a visualização tradicional de radiografias convencionais requer uma mudança de ao menos 30% na massa mineral para detectar mudanças na densidade óssea radiográfica (REDDY 1992; HAUSMANN, 2000).

Ao comparar parâmetros clínicos e radiográficos após terapia periodontal regenerativa em defeitos infra-ósseos quando da desmineralização ou não com ácido cítrico do enxerto ósseo, a presente pesquisa não pôde comprovar a hipótese de que a desmineralização intencional do enxerto traz resultados tão favoráveis quanto o processo fisiológico de reparo ósseo, ou ainda melhores, no que se refere ao tempo de neoformação óssea e qualidade do osso neoformado.

Estudos prévios que demonstraram resultados favoráveis para o grupo teste onde foi realizada a desmineralização dos enxertos (REZENDE, 2008; COESTA, 2011; RODRIGUES et al., 2012; DOMINGUES, 2013; REZENDE et al., 2014; REZENDE et al., 2015; SALMERON, 2015; MANFREDI, 2016; ROJAS-PAULÚS, 2016; CARVALHO, 2017; CAETANO, 2019; MANFREDI et al., 2019; CARVALHO et al., 2020; ROJAS-PAULÚS et al., 2021) foram todos realizados em ambientes fechados, seja em animais ou em humanos, o enxerto era acomodado em regiões sem contato direto com micro-organismos patogênicos, em ambiente semi-aberto (como é o caso da bolsa e/ou sulco periodontal, que representam os sítios tratados no presente estudo). Este talvez possa ser um dos fatores que influenciaram os resultados observados neste trabalho.

Os tipos de análises realizadas nos mesmos estudos prévios mencionados também foram bastante distintas das utilizadas no presente trabalho. Análises histológicas, biomecânicas, em microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal, microscópicas, microtomográficas, histomorfométricas e imuno-histoquímicas, realizadas previamente, são capazes de detectar diferenças mínimas, as quais podem não ser detectadas ou ainda não apresentar relevância significativa clínica e/ou radiograficamente. No presente trabalho foram realizados testes estatísticos que pudessem detectar uma diferença clínica mínima de 1 mm, uma vez que valores menores são considerados margem de erro. As análises realizadas visaram se assemelhar ao máximo possível à realidade clínica encontrada pelos profissionais durante os tratamentos odontológicos periodontais, a fim de trazer resultados que pudessem contribuir para os mesmos.

Além disso, os estudos prévios mencionados realizaram diferentes períodos de avaliação e foram capazes de detectar mudanças no tecido ósseo mais precocemente com 24, 48 e 72h (COESTA, 2011; SALMERON, 2015; MANFREDI, 2016; MANFREDI et al., 2019), aos 7, 30 e 60 dias (REZENDE, 2008; REZENDE et al., 2014; de REZENDE et al., 2015; ROJAS-PAULÚS, 2016; CARVALHO, 2017; CARVALHO et al., 2020; ROJAS-PAULÚS et al., 2021) e aos 30 e 45 dias (DOMINGUES, 2013).

Outras formas de análises poderiam ter sido adotadas e possivelmente pudessem resultar em achados favoráveis para os enxertos desmineralizados no presente estudo, sugerindo-se assim que novos ensaios clínicos sejam realizados a

fim de comprovar os achados dos trabalhos anteriores a este pertencentes a esta linha de pesquisa.

Assim, baseado nos aspectos discutidos anteriormente cabem, portanto, algumas especulações:

a - uma análise mais precoce por imagem teria sido útil para verificar se a desmineralização do enxerto teria acelerado o processo regenerativo em relação ao grupo controle?

b - valores médios encontrados de ganho ósseo maior no GT quando comparado ao GC, porém sem diferença estatística significativa, poderia indicar melhor tendência regenerativa nesse grupo?

c - em relação aos números absolutos da média dos ângulos dos defeitos, GC apresentava inicialmente os defeitos com ângulos maiores que GT, mas no final do estudo esse fato se inverteu, isso poderia indicar uma tendência a um maior preenchimento ósseo no GT?

d - se fossem tratados apenas defeitos mais críticos, quanto ao número de paredes, para ambos os grupos, poderiam ter sido encontradas diferenças entre GC e GT?

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando as limitações inerentes a este, trabalho e a quaisquer pesquisas, foi possível concluir que:

- O enxerto ósseo autógeno particulado, desmineralizado ou não, foi eficaz para o tratamento de defeitos infra-ósseos, resultando em ganho de inserção periodontal e preenchimento ósseo radiográfico;
- A desmineralização intencional do enxerto ósseo autógeno particulado com ácido cítrico pH 1 a 10% não apresentou resultados clínicos ou radiográficos superiores no presente estudo;
- Novos estudos são necessários considerando as especulações apontadas.

Referências

REFERÊNCIAS

Accorsi-Mendonca T, Paiva KB, Zambuzzi WF, Cestari TM, Lara VS, Sogayar MC, Taga R, Granjeiro JM. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **J Mol Histol**. 2008 Apr;39(2):201-08.

Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone replacement grafts. The bone substitutes. **Dent Clin North Am**. 1998 Jul;42(3):491-503.

Ainamo A, Ainamo J. The width of attached gingiva on supraerupted teeth. **J Periodontol Res**. 1978 May; 13(3):194-8.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**. 1975 Dec;25(4):229-235.

Albandar JM. Validity and reliability of alveolar bone level measurements made on dry skulls. **J Clin Periodontol**. 1989 Oct;16(9):575-9.

Al-Fotawei R, Ayoub AF, Heath N, Naudi KB, Tanner KE, Dalby MJ, McMahon J. Radiological assessment of bioengineered bone in a muscle flap for the reconstruction of critical-size mandibular defect. **PLoS One**. 2014 Sep 16;9(9):e107403.

Amaral NG, Rezende ML, Hirata F, Rodrigues MG, Sant'ana AC, Gregghi SL, Passanezi E. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. **J Appl Oral Sci**. 2011 Oct;19(5):469-75.

American Academy of Periodontology. Position paper: Periodontal regeneration. **J Periodontol**. 2005;76(9):1601-1622.

Asad M, Aziz AWA, Raman RPC, Harun HAW, Ali TBT, Chinna K, Vaithilingam RD. Comparison of nonsurgical periodontal therapy with oral hygiene instruction alone for chronic periodontitis. **J Oral Sci**. 2017;59(1):111-20.

Avila G, Galindo-Moreno P, Soehren S, Misch CE, Morelli T, Wang HL. A novel decision-making process for tooth retention or extraction. **J Periodontol**. 2009 Mar;80(3):476-91.

Bal B, Eren K, Balos K. Effects of various root surface treatments on initial clot formation: a scanning electron microscope study. **J Nihon Univ Sch Dent**. 1990 Dec;32(4):281-93.

Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **Int J Nanomedicine**. 2006;1(3):317-32.

Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. **Periodontol 2000**. 2006;40:164-172.

- Bhatia G, Kumar A, Khatri M, Bansal M, Saxena S. Assessment of the width of attached gingiva using different methods in various age groups: A clinical study. **J Indian Soc Periodontol**. 2015 Mar-Apr;19(2):199-202.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. **Calcif Tissue Int**. 1991 Dec;49(6):421-6.
- Blanco J, Nuñez V, Aracil L, Muñoz F, Ramos I. Ridge alterations following immediate implant placement in the dog: flap versus flapless surgery. **J Clin Periodontol**. 2008 Jul;35(7):640-8.
- Blomlöf J, Lindskog S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. **Eur J Oral Sci**. 1995 Feb;103(1):17-24.
- Blomlöf JP, Blomöf LB, Linskog SF. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. **J Periodontol**. 1996 Sep;67(9):841-5.
- Botelho J, Machado V, Proença L, Bellini DH, Chambrone L, Alcoforado G, Mendes JJ. The impact of nonsurgical periodontal treatment on oral health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Investig**. 2020 Feb;24(2):585-96.
- Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. **J Dent Res**. 1955 Dec;34(6):849-53.
- Caetano AS. Efeito da desmineralização por ácido cítrico na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco: análise qualitativa, quantitativa e imuno-histoquímica em humanos [tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2019.
- Caffesse RG, Quiñones CR. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. **Periodontol 2000**. 1993 Feb;1(1):69-79.
- Carvalho EBS. Efeito da desmineralização óssea superficial na consolidação de enxertos ósseos autógenos. Estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em calvária de ratos [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2017.
- Carvalho ÉBS, Veronesi GF, Manfredi GGP, Damante CA, Sant'Ana ACP, Gregghi SLA, Zangrando MSR, Consolaro A, Rezende MLR. Bone demineralization improves onlay graft consolidation: A histological study in rat calvaria. **J Periodontol**. 2020 Sep;30.
- Carulli C, Matassi F, Civinini R, Innocenti M. Tissue engineering applications in the management of bone loss. **Clin Cases Miner Bone Metab**. 2013 Jan;10(1):22-5.

- Caton J, Zander HA. Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. **J Clin Periodontol**. 1976;3(1):54-58.
- Caton J, Nyman S, Zander H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. **J Clin Periodontol**. 1980;7(3):224-231.
- Chiu YW, Lee SY, Lin YC, Lai YL. Significance of the width of keratinized mucosa on peri-implant health. **J Chin Med Assoc**. 2015 Jul;78(7):389-94.
- Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planning. **J Clin Periodontol**. 2002 May;29(Suppl 2):6-16.
- Cohen RE; Research, Science and Therapy Committee, American Academy of Periodontology. Position paper: periodontal maintenance. **J Periodontol**. 2003 Sep;74(9):1395-401.
- Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. **J Bone Joint Surg Am**. 1995 May;77(5):734-50.
- Cortellini P, Bowers GM. Periodontal regeneration of infrabony defects: An evidence-based treatment approach. **Int J Periodontics Restorative Dent**. 1995 Apr; 15(2):128-45.
- Cortellini P, Buti J, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration compared with access flap surgery in human intra-bony defects 20-year follow-up of a randomized clinical trial: Tooth retention, periodontitis recurrence and costs. **J Clin Periodontol**. 2017;44(1):58-66.
- Cortellini P, Carnevale G, Sanz M, Tonetti MS. Treatment of deep and shallow intrabony defects. A multicenter randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**. 1998 Dec;25(12):981-7.
- Cortellini P, Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. **Periodontol 2000**. 2000 Feb;22:104-32.
- De Rouck T, Eghbali R, Collys K, De Bruyn H, Cosyn J. The gingival biotype revisited: transparency of the periodontal probe through the gingival margin as a method to discriminate thin from thick gingiva. **J Clin Periodontol**. 2009 May;36(5):428-33.
- Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, Gowen M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. **J Bone Miner Res**. 1995 Nov;10(11):1666-80.

-
- Domingues RS. Efeito da desmineralização ácida da interface enxerto-leito na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.
- Eldesoqi K, Henrich D, El-Kady AM, Arbid MS, Abd El-Hady BM, Marzi I, Seebach C. Safety evaluation of a bioglass-polylactic acid composite scaffold seeded with progenitor cells in a rat skull critical-size bone defect. **PLoS One**. 2014 Feb 3;9(2):e87642.
- Esposito M, Grusovin MG, Papanikolaou N, Coulthard P, Worthington HV. Enamel matrix derivative (Emdogain®) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. **Cochrane Database Syst Rev**. 2009 Oct 7;(4):CD003875.
- Francetti L, Del Fabbro M, Basso M, Testori R, Weinstein R. Enamel matrix proteins in the treatment of intra-bony defects. A prospective 24-month clinical trial. **J Clin Periodontol**. 2004 Jan;31(1):52-9.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. **Crit Rev Oral Biol Med**. 1999;10(1):79-98.
- Garrett JS, Crigger M, Egelberg J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. **J Periodontal Res**. 1978 Mar;13(2):155-63.
- Garrett S, Loos B, Chamberlain D, Egelberg J. Treatment of intraosseous periodontal defects with a combined adjunctive therapy of citric acid conditioning, bone grafting, and placement of collagenous membranes. **J Clin Periodontol**. 1988 Jul;15(6):383-9.
- Glossary of periodontal terms. **American Association of Periodontology**, 4th edition, 2001.
- Graves DT, Cochran DL. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. **Curr Opin Periodontol**. 1994:178-86.
- Grimard BA, Hoidal MJ, Mills MP, Mellonig JT, Nummikoski PV, Mealey BL. Comparison of clinical, periapical radiograph, and cone-beam volume tomography measurement techniques for assessing bone level changes following regenerative periodontal therapy. **J Periodontol**. 2009 Jan;80(1):48-55.
- Hanes PJ. Bone Replacement Grafts for the Treatment os Periodontal Intrabony Defects. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**. 2007;19(4):499-512.
- Hausmann E. Radiographic and digital imaging in periodontal practice. **J Periodontol**. 2000 Mar;71(3):497-503.
- Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. **Biochim Biophys Acta**. 1984 Nov;802(1):151-4.

Heritier M. Ultrastructural study of new connective tissue attachment following phosphoric acid application on human root dentin. **J Periodontol**. 1983 Sep;54(9):515-21.

Hsiong SX, Mooney DJ. Regeneration of vascularized bone. **Periodontol** 2000. 2006;41:109-22.

Hu Y, Tang XX, He HY. Gene expression during induced differentiation of sheep bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts. **Genet Mol Res**. 2013 Dec 11;12(4):6527-34.

Isik AG, Tarim B, Hafez AA, Yalçın FS, Onan U, Cox CF. A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCl concentrations and application times. **J Periodontol**. 2000 Feb;71(2):219-25.

Ivanovski S. Periodontal regeneration. **Aust Dent J**. 2009 Sep;54 Suppl 1:S118-28.

Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, Demirel K, de Sanctis M, Ercoli C, Fan J, Geurs NC, Hughes FJ, Jin L, Kantarci A, Lalla E, Madianos PN, Matthews D, McGuire MK, Mills MP, Preshaw PM, Reynolds MA, Sculean A, Susin C, West NX, Yamazaki K. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Periodontol**. 2018 Jun;89 Suppl 1:S237-S248.

Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal Regeneration – Intrabony Defects: A Systematic Review From the AAP Regeneration Workshop. **J Periodontol**. 2015 Feb;86(2 Suppl):S77-104.

Khojasteh A, Behnia H, Naghdi N, Esmaeelinejad M, Alikhassy Z, Stevens M. Effect of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2013 Dec;116(6):405-23.

Khoskam V, Chan HL, Lin GH, Mailoa J, Giannobile WV, Wang HL, Oh TJ. Outcomes of regenerative treatment with rhPDGF-BB and rhFGF-2 for periodontal intra-bony defects: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Periodontol**. 2015 Mar;42(3):272-80.

Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. **Odontology**. 2006 Sep;94(1):10-21.

Kim HJ, Minashima T, McCarthy EF, Winkles JA, Kirsch T. Progressive ankylosis protein (ANK) in osteoblasts and osteoclasts controls bone formation and bone remodeling. **J Bone Miner Res**. 2010 Aug;25(8):1771-83.

Kim HJ, Park SS, Oh SY, Kim H, Kweon OK, Woo HM, Kim WH. Effect of acellular dermal matrix as a delivery carrier of adipose-derived mesenchymal stem cells on

bone regeneration. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. 2012 Aug;100(6):1645-53.

Klein F, Kim TS, Hassfeld S, et al. Radiographic defect depth and width for prognosis and description of periodontal healing of infrabony defects. **J Periodontol**. 2001 Dec;72(12):1639-46.

Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM, Lie T, Adams DF. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. **J Periodontol**. 1992 Apr;63(4):303-9.

Lang NP, Löe H. The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. **J Periodontol**. 1972; 43:623-27.

Lewandrowski K, Tomford WW, Michaud NA, Schomacker KT, Deutsch TF. An electron microscopic study on the process of acid demineralization of cortical bone. **Calcif Tissue Int**. 1997a Oct;61(4):294-7.

Lewandrowski KU, Tomford WW, Schomacker KT, Deutsch TF, Mankin HJ. Improved osteoinduction of cortical bone allografts: a study of the effects of laser perforation and partial demineralization. **J Orthop Res**. 1997b Sep;15(5):748-56.

Li J, Zhang YP, Kirners RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc Res Tech**. 2003 Jan 1;60(1):107-14.

Libin BM, Ward HL, Fishman L. Decalcified, lyophilized bone allografts for use in human periodontal defects. **J Periodontol**. 1975 Jan;46(1):51-6.

Löe H. The gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. **J Periodont**. 1967 Nov-Dec;38(6):Suppl:610-6.

Lorenzo JA, Pilbeam CC, Kalinowski JF, Hibbs MS. Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells. **Matrix**. 1992 Aug;12(4):282-90.

Lyons KM, Darby I. Interdisciplinary periodontics: the multidisciplinary approach to the planning and treatment of complex cases. **Periodontol 2000**. 2017 Jun;74:7-10.

Maia FR, Bidarra SJ, Granja PL, Barrias CC. Functionalization of biomaterials with small osteoinductive moieties. **Acta Biomaterials**. 2013 Nov;9(11):8773-89.

Manfredi GGP. Efeito da desmineralização óssea por tetraciclina e ácido cítrico sobre a composição química superficial e sobre o comportamento de pré-osteoblastos cultivados em osso da calvária de ratos [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2016.

Manfredi GGDP, Tokuhara CK, Salmeron S, de Carvalho ÉBS, Liboa-Filho PN, Damante CA, Sant'Ana ACP, Zangrando MSR, Greggi SLA, de Rezende MLR. Bone demineralization promotes superior spread of preosteoblast in culture. **Microsc Res Tech** 2019 Jul;82(7):1004-1011.

-
- Mariotti A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. **Ann Periodontol**. 2003 Dec;8(1):205-26.
- Matarasso M, Iorio-Siciliano V, Blasi A, Ramaglia L, Salvi GE, Sculean A. Enamel matrix derivative and bone grafts for periodontal regeneration of intrabony defects. A systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Investig**. 2015 Sep;19(7):1581-93.
- Maynard JG Jr, Wilson RD. Physiologic dimensions of the periodontium significant to the restorative dentist. **J Periodontol**. 1979 Apr;50(4):170-4.
- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol**. 1976 May;47(5):256-60.
- Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V et al. CONSORT 2010 Explanation and Elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. **J Clin Epidemiol**, 2010 Aug;63(8):e1-37.
- Needleman I, Tucker R, Giedrys-Leeper E, Worthington H. Guided tissue regeneration for periodontal intrabony defects -- a Cochrane Systematic Review. **Periodontol 2000**. 2005;37:106-23.
- Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. **J Periodont Res**. 2008 Apr;43(2):127-35.
- Page RC, Armitage GC, DeRouen TA, et al. Design and conduct of clinical trials of products designed for the prevention, diagnosis, and therapy of periodontitis. Chicago: The American Academy of Periodontology. 1995;1-54.
- Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH et al. Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Periodontol**. 2018;89 Suppl1:S173-S182.
- Parfitt AM. The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone diseases. II. PTH and bone cells: bone turnover and plasma calcium regulation. **Metabolism**. 1976 Aug;25(8):909-55.
- Passanezi E, Sant'Ana ACP, Rezende MLR, Greggi SLA, Janson WA. Distâncias Biológicas Periodontais. Artes Médicas, São Paulo, 2011, 304 p.
- Pihlstrom BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. **Periodontol 2000**. 2001;25:37-58.
- Pietrzak WS, Dow M, Gomez J, Soulvie M, Tsiagalis G. The in vitro elution of BMP-7 from demineralized bone matrix. **Cell Tissue Bank**. 2012 Dec;13(4):653-61.
- Plessas A. Nonsurgical periodontal treatment: review of the evidence. **Oral Health Dent Manag**. 2014 Mar;13(1):71-80.

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

Pasin IM. Análise por subtração radiográfica digital linear do tratamento de defeitos infra-ósseos humanos de 2 ou 3 paredes por meio de retalho de espessura total repostado associado ou não à proteína derivada da matriz do esmalte [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2006.

Ramfjord SP. Maintenance care and supportive periodontal therapy. **Quintessence Int.** 1993 Jul;24(7):465-71.

Reddy MS. Radiographic methods in the evaluation of periodontal therapy. **J Periodontol.** 1992 Dec;63(12 Suppl):1078-84.

Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range. **J Periodontol.** 1975 Nov;46(11):646-55.

Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. **Ann Periodontol.** 2003;8(1):227-265.

Rezende MLR. Efeito da desmineralização das superfícies ósseas de contato na consolidação de enxertos autógenos em cobaias [tese - livre docência]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2008.

Rezende ML, Consolaro A, Sant'ana AC, Damante CA, Gregghi SL, Passanezi E. Demineralization of the contacting surfaces in autologous onlay bone grafts improves bone formation and bone consolidation. **J Periodontol.** 2014 May;85(5):e121-9.

de Rezende MLR, Coesta PT, de Oliveira RC, Salmeron S, Sant'Ana AC, Damante CA, Gregghi SL, Consolaro A. Bone demineralization with citric acid enhances adhesion and spreading of preosteoblasts. **J Periodontol.** 2015 Jan;86(1):146-54.

Rodrigues MGS, Rezende MLR, Santana ACP, Gregghi SLA, Domingues RS, Damante CA, Passanezi E. A desmineralização de enxertos ósseos autógenos onlay pode melhorar suas propriedades mecânicas: estudo biomecânico e por MEV. *Implant News*, v. 9, p. 329-336, 2012.

Rojas-Paulús JE. Efeito da desmineralização do enxerto ósseo autógeno particulado no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos. Estudo microscópico e microtomográfico [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2016.

Rojas-Paulús JE, Manfredi GGP, Salmeron S, Consolaro A, Sant'Ana ACP, Zangrando MSR, Damante CA, Gregghi SLA, Rezende MLR. Citric acid, but not tetracycline, improves the microscopic pattern of healing of particulate autogenous bone grafts in critical-size defects. **J Periodontol** 2021 May;92(5):678-688.

Salmeron S. Efeito da desmineralização óssea sobre parâmetros de superfície e sobre o comportamento de pré-osteoblastos em cultura: estudo em microscopia eletrônica de varredura e confocal [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2015.

Schallhorn RG. Present status of osseous grafting procedures. **J Periodontol**. 1977 Sep;48(9):570-6.

Schwartz Z, Lohmann CH, Wieland M, Cochran DL, Dean DD, Textor M, Bonewald LF, Boyan BD. Osteoblast proliferation and differentiation on dentin slices are modulated by pretreatment of the surface with tetracycline or osteoclasts. **J Periodontol**. 2000 Apr;71(4):586-97.

Schwarz F, Ferrari D, Sager M, Herten M, Hartig B, Becker J. Guided bone regeneration using rhGDF-5- and rhBMP-2-coated natural bone mineral in rat calvarial defects. **Clin Oral Impl Res**. 2009 Nov;20(11):1219-30.

Sculean A, Nikolidakis D, Nikou G, Ivanovic A, Chapple IL, Stavropoulos A. Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. **Periodontol 2000**. 2015 Jun;68(1):182-216.

Senn N. Senn on the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. **Ann Surg**. 1889;10(5): 352-368.

Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. **Acta Odontol Scand**. 1964 Feb;22:121-35.

Silva AC, Moura CC, Ferreira JA, Magalhães Dd, Dechichi P, Soares PB. Biological Effects of a Root Conditioning Treatment on Periodontally Affected Teeth - An In Vitro Analysis. **Braz Dent J**. 2016 Mar-Apr;27(2):160-8.

Souza AP. Análise clínica e de marcadores biológicos no fluido do sulco peri-implantar correlacionando-os à mucosa ceratinizada ao redor de implantes dentários [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2017.

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

Sterret JD, Bankey T, Murphy HJ. Dentin demineralization. The effects of citric acid concentration and application time. **J Clin Periodontol**. 1993 May;20(5):366-70.

Stewart HT. Partial removal of cementum and decalcification of tooth in the treatment of pyorrhea alveolaris. *Dent Cosmos* 1899 July;41(7):617-26.

Terranova VP, Martin GR. Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. **J Periodontal Res**. 1982 Sep;17(5):530-3.

Tonetti MS, Christiansen AL, Cortellini P. Vertical subclassification predicts survival of molars with class II furcation involvement during supportive periodontal care. **J Clin Periodontol**. 2017;44(11):1140-1144.

Tonetti MS, Pini-Prato G, Cortellini P. Periodontal regeneration of human intrabony defects. IV. Determinants of healing response. **J Periodontol**. 1993 Oct;64(10):934-40.

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

Trombelli L, Heitz-Mayfield LJ, Needleman I, Moles D, Scabbia A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. **J Clin Periodontol**. 2002;29 Suppl 3:117-35; discussion 160-2.

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

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. **Science**. 1965 Nov 12;150(3698):893-9.

Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. **Science**. 1983 May 13;220(4598):680-6.

Urist MR, Dowell TA. Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. **Clin Orthop Relat Res**. 1968 Nov-Dec;61:61-78.

Urist MR, Dowell TA, Hay PH, Strates BS. Inductive substrates for bone formation. **Clin Orthop Relat Res**. 1968 Jul-Aug;59:59-96.

Wallace JM. Effects of fixation and demineralization on bone collagen D-spacing as analyzed by atomic force microscopy. **Connect Tissue Res**. 2015 Apr;56(2):68-75.

Walker DG. Citric acid cycle in osteoblasts and osteoclasts. A histochemical study of normal and parathor-mone-treated rats. **Bull Johns Hopkins Hosp**. 1961 Feb;108:80-99.

Wikesjö UM, Nilvéus RE, Selvig KA. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. **J Periodontol**. 1992 Mar;63(3):158-65.

Zangrando MSR. Análise radiográfica do tratamento de defeitos infra-ósseos humanos por meio de retalho de espessura total repostado associado ou não à proteína da matriz do esmalte: resultados após dois anos [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2010.

Referências

Zweers J, Thomas RZ, Slot DE, Weisgold AS, Van der Weijden FG. Characteristics of periodontal biotype, its dimensions, associations and prevalence: a systematic review. **J Clin Periodontol**. 2014 Oct;41(10):958-71.

Apêndices

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Página 1 de 3

Departamento de Prótese e Periodontia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro participante da pesquisa:

Você está convidado(a) a participar desta pesquisa, intitulada “Efeito da desmineralização por ácido cítrico do enxerto ósseo autógeno particulado no reparo de defeitos infra-ósseos em seres humanos. Estudo clínico”. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar, em seres humanos, se a utilização do ácido cítrico nos enxertos ósseos autógenos (enxertos de osso raspado do próprio indivíduo) é vantajosa quando comparada aos mesmos enxertos sem a utilização deste ácido. Em estudos anteriores foram observadas as vantagens da utilização do ácido cítrico em animais, porém ainda não foram comprovados estes resultados em seres humanos. Para isso, serão avaliados o osso e a gengiva ao redor de todos os seus dentes e, sendo encontradas regiões que necessitam de enxerto ósseo, este será realizado, como forma de tratamento cirúrgico.

De acordo com esta pesquisa, se forem observados pelo menos dois dentes com perda óssea onde for possível realizar enxerto, você poderá participar da pesquisa. Assim, se você for selecionado para participar, você (sujeito da pesquisa) será atendido em pelo menos 12 consultas. Na primeira consulta serão realizadas medidas da gengiva, avaliação da higiene (presença de placa bacteriana) e duas radiografias (para verificar a saúde do osso dos dois dentes que necessitarem de enxerto). Nessa consulta também será realizada limpeza em todos os seus dentes e você receberá instruções de higiene bucal. Depois, realizaremos consultas para avaliar sua higiene bucal e estas serão marcadas de acordo com as suas necessidades individuais. Quando a higiene estiver adequada e decorridos pelo menos dois meses após a limpeza, realizaremos a(s) cirurgia(s). Em um dos dentes será realizado o enxerto sem a utilização do ácido cítrico (grupo controle) e no outro dente será realizado o enxerto tratado com o ácido cítrico (grupo teste). Estes dois enxertos poderão ser realizados uma mesma consulta (uma cirurgia) ou em duas consultas (duas cirurgias), de acordo com a disponibilidade de tempo, tolerância e sua colaboração. Os controles depois da(s) cirurgia(s) serão realizados semanalmente no primeiro mês, depois a cada quinze dias (no segundo mês), depois mensalmente até se completarem três meses de pós-operatório e depois a cada três meses até se completarem doze meses da(s) cirurgia(s). Nos períodos correspondentes a três, seis, nove e doze meses após a(s) cirurgia(s), serão realizadas novamente as medidas da gengiva e avaliação da higiene (presença de placa bacteriana), como no início da pesquisa. Novas radiografias serão realizadas após 6 e 12 meses da cirurgia, para avaliação e controle do enxerto ósseo. O tempo de todas as consultas dependerá da sua colaboração, mas geralmente não passará de 1h de atendimento, com exceção da consulta em que será realizada a cirurgia, que poderá durar até no máximo 4h.

Rubrica da Pesquisadora Responsável:

A(s) cirurgia(s) será(ão) realizada(s) em clínica odontológica, na Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), sob anestesia local e seguindo todos os critérios de Biossegurança estabelecidos por esta Instituição, a fim de garantir a segurança de todos os envolvidos. Este procedimento não causará prejuízo algum a você, pois se trata de um procedimento de rotina realizado durante o tratamento periodontal, sempre que indicado. Você também receberá, por escrito, as instruções pós-operatórias e receita com os medicamentos para controle da dor e desconforto. Desta forma, seguindo nossas orientações e cuidados, o risco de complicações será baixo. Todos os demais procedimentos (radiografias e medidas clínicas) fazem parte das consultas de rotina da clínica de periodontia. Os procedimentos realizados poderão ser fotografados durante as consultas. O profissional que irá te atender se preocupa com cuidados em relação à esterilização dos materiais, atenção à saúde da sua boca e responsabilidade com o tratamento. Mesmo assim, caso haja algum dano eventual decorrente dos procedimentos da pesquisa, você poderá procurar seus direitos de indenização de danos. Após o encerramento da pesquisa, se houver necessidade, você será encaminhado para continuar seu tratamento nas outras clínicas da faculdade, seguindo o protocolo de encaminhamento estabelecido pela FOB/USP.

Rubrica do Participante da Pesquisa:

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Prótese e Periodontia

Os riscos a que você estará sujeito são os mesmos de todo procedimento cirúrgico, que são: edemas (inchaço), hemorragias (sangramento), exposição da área cirúrgica e possibilidade de infecções. Tais riscos são minimizados pela cuidadosa seleção dos participantes, habilidade técnica do profissional, avaliações radiográficas, avaliações de saúde, condições de assepsia, esterilização e orientações sobre medicações e cuidados após a(s) cirurgia(s).

Todos os participantes desta pesquisa obterão como benefícios o acompanhamento profissional com orientações quanto aos cuidados e correta higienização bucal, limpeza profissional, tratamento periodontal (enxerto ósseo autólogo) nos dentes que necessitarem e fizerem parte dos grupos da pesquisa, além do acompanhamento da saúde dos seus dentes (controle periodontal), prolongando a vida dos dentes, o que resultará em melhor qualidade de vida aos mesmos. Além disso, os demais dentes e tratamentos que forem necessários serão devidamente encaminhados para tratamento na FOB/USP.

Os custos dos procedimentos que serão realizados são de responsabilidade do profissional, através do orçamento da pesquisa, não havendo necessidade de serem pagos por você, nem havendo necessidade de ressarcimento caso haja qualquer outra despesa adicional decorrente de sua participação na pesquisa. Ou seja, você não terá nenhum gasto por participar da pesquisa, exceto com o transporte para se dirigir às clínicas da FOB/USP durante o período da pesquisa e com medicamentos que serão prescritos no período pós-cirúrgico, o que é comum a qualquer paciente tratado nesta Faculdade.

Para o esclarecimento de quaisquer dúvidas sobre sua participação na pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável (**Dra. Andréia Pereira de Souza Pavaní**) pelo endereço institucional (**Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru/SP – Departamento de Periodontia**), telefone celular (**(14) 9 9136-5816**) ou e-mail (**andrea.xlvi@usp.br**) e para denúncias e/ou reclamações entrar em contato com o CEP-FOB/USP (**Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo**) pelo endereço: **Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, Bauru/SP – CEP 17012-901 – Prédio da Pós-Graduação (bloco E – pavimento superior)**, ou pelo telefone (**(14) 3235-8356**) de segunda à sexta-feira, no horário das **14hs às 17 horas**, em dias úteis, ou e-mail: **cep@fob.usp.br**.

Esclarecemos ainda que se for seu desejo você poderá retirar-se da pesquisa a qualquer momento e deixar de participar do estudo. Vale também enfatizar que manteremos o caráter confidencial das informações relacionadas com sua privacidade, e o manteremos constantemente atualizado quanto ao seu resultado. Lembramos que todas as informações e registros relacionados ao planejamento e/ou tratamento poderão ser utilizadas por esta Faculdade (FOB/USP), para fins de pesquisa, ensino e de divulgação em jornais e/ou revistas nacionais e internacionais, desde que seja mantido sigilo com relação à identidade do sujeito da pesquisa.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, DECLARA e FIRMA seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Cap. III, Art. 9º do Código de Ética Odontológica (Res. CFO-118/2012)).

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73

e-mail: periodontia@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8366

<http://www.fob.usp.br>

Rubrica da Pesquisadora Responsável:

Rubrica do Participante da Pesquisa:

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Prótese e Periodontia

Por fim, como pesquisador(a) responsável pela pesquisa, DECLARO o cumprimento do disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, contidos nos itens IV.3 e IV.5.a e na íntegra com a resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias igualmente válidas (uma via para o participante da pesquisa e outra para o pesquisador) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Andréia Pereira de Souza Pavan
Responsável Principal

O **Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**, organizado e criado pela **FOB-USP**, em 29/06/98 (**Portaria GD/0698/FOB**), previsto no item VII da Resolução CNS nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (publicada no DOU de 13/06/2013), é um Colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Qualquer denúncia e/ou reclamação sobre sua participação na pesquisa poderá ser reportada a este CEP:

Horário e local de funcionamento:

Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia de Bauru-USP - Prédio da Pós-Graduação (bloco E - pavimento superior), de segunda à sexta-feira, no horário das **14hs às 17 horas**, em dias úteis.

Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75

Vila Universitária – Bauru – SP – CEP 17012-901

Telefone/FAX (14) 3235-8356

e-mail: cep@fob.usp.br

APÊNDICE B - Tabela descritiva com o cálculo do erro casual de Dahlberg e cálculo do erro sistemático pelo teste "t" pareado. Parâmetros avaliados: profundidade de sondagem méso-vestibular (PSM), profundidade de sondagem no centro da face vestibular (PSC), profundidade de sondagem disto-vestibular (PSD), altura da mucosa ceratinizada méso-vestibular (MCM), altura da mucosa ceratinizada no centro da face vestibular (MCC), altura da mucosa ceratinizada disto-vestibular (MCD), comprimento radicular (JCE-Ápice).

MEDIDA					ERRO SISTEMÁTICO		ERRO CASUAL
	1ª Medição		2ª Medição		T	P	Erro
	Média	DP	Média	DP			
PSM	6,10	2,25	6,05	2,24	1,000	0,330	0,11
PSC	2,85	0,88	2,90	0,91	0,567	0,577	0,19
PSD	5,75	1,80	5,60	1,70	1,371	0,186	0,25
MCM	3,00	1,49	3,10	1,45	1,453	0,163	0,16
MCC	1,95	1,00	1,90	1,02	1,000	0,330	0,11
MCD	2,80	1,24	2,70	1,17	1,453	0,163	0,16
JCE-Ápice	15,30	1,63	15,30	1,72	0,000	1,000	0,22

Anexo(s)

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito da desmineralização por ácido cítrico do enxerto ósseo autólogo particulado no reparo de defeitos infra-ósseos em seres humanos. Estudo clínico

Pesquisador: Andréia Pereira de Souza Pavani

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 84321318.2.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.768.591

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda de um projeto de doutorado intitulado "Efeito da desmineralização por ácido cítrico do enxerto ósseo autólogo particulado no reparo de defeitos infra-ósseos em seres humanos. Estudo clínico", da pesquisadora Andréia Pereira de Souza Pavani, sob a orientação do prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi e co-orientação da Profª. Drª. Maria Lúcia Rubo de Rezende. A desmineralização óssea tem se mostrado vantajosa em procedimentos de enxertia óssea. Dados recentes revelam que esse processo realizado in situ pode promover a consolidação de enxertos e a proliferação e diferenciação celular. Resultados apresentados em culturas de células e em estudos em animais se mostraram vantajosos. A presente pesquisa pretende investigar, em defeitos periodontais infra-ósseos em seres humanos, os efeitos da desmineralização óssea de enxertos ósseos autógenos particulados sobre o reparo. O osso particulado será submetido à desmineralização por ácido cítrico 10% pH 1 por 30 segundos nas amostras do grupo teste, sendo utilizado enxerto autólogo particulado sem passar pelo processo de desmineralização nas amostras do grupo controle. Serão realizadas análises clínicas, nos períodos pré, trans e pós-operatórios (3, 6, 9 e 12 meses). Avaliações radiográficas serão realizadas para diagnóstico (período pré-operatório) e comprovação da formação óssea após 6 meses da realização dos enxertos. Análises estatísticas apropriadas para cada tipo de avaliação serão realizadas aplicando nível de significância de 5%. Espera-se que a desmineralização óssea com o ácido cítrico melhore

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

Continuação do Parecer: 3.768.591

os parâmetros de reparo ósseo. Para o desenvolvimento desta pesquisa serão selecionados 15 participantes voluntários, sem distinção de sexo ou raça, das clínicas das Disciplinas de Periodontia e Clínica Integrada Reabilitadora dos Cursos de Graduação e Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

A proposta do presente trabalho é testar a hipótese de que a desmineralização intencional do enxerto ósseo autógeno particulado com ácido cítrico resulta em comportamento celular tão favorável quanto ao produzido pelas células clásticas, ou ainda melhor, no processo fisiológico de reparo ósseo, tanto em relação ao tempo de neoformação óssea quanto à qualidade do osso neoformado.

Objetivo Primário:

Comparar clinicamente o resultado cicatricial da terapia periodontal regenerativa quando da desmineralização ou não, com ácido cítrico pH 1 a 10%, do enxerto ósseo autógeno particulado em defeitos periodontais infra-ósseos em seres humanos.

Objetivo Secundário:

Comparar radiograficamente o resultado cicatricial da terapia periodontal regenerativa quando da desmineralização ou não, com ácido cítrico pH 1 a 10%, do enxerto ósseo autógeno particulado em defeitos periodontais infra-ósseos em seres humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos a que os pacientes estarão sujeitos são os mesmos de todo procedimento cirúrgico, que são: edemas, hemorragias, exposição da área cirúrgica e possibilidade de infecções. Tais riscos são minimizados pela cuidadosa seleção dos pacientes, habilidade técnica do profissional, avaliações radiográficas, avaliações de saúde, condições de assepsia, esterilização e orientações sobre medicações e cuidados após a(s) cirurgia(s).

Benefícios:

Todos os pacientes que participarem obterão como benefícios desta pesquisa o acompanhamento profissional com orientações quanto aos cuidados e correta higienização bucal, limpeza profissional, tratamento regenerativo periodontal (enxerto ósseo autógeno) nos dentes que necessitarem e fizerem parte dos grupos da pesquisa, além do acompanhamento da saúde dos seus dentes (controle periodontal), prolongando a vida dos dentes, o que resultará em melhor qualidade de

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

Continuação do Parecer: 3.768.591

vida aos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa bem interessante em que, com os resultados obtidos, possa se observar que a desmineralização óssea com o ácido cítrico de enxertos ósseos autógenos particulados melhore os parâmetros clínicos no processo fisiológico de reparo ósseo, tanto em relação ao tempo de neoformação óssea quanto à qualidade do osso neoformado. Os participantes da pesquisa sendo bem informados de todos os procedimentos aos quais serão submetidos, com clareza dos riscos e benefícios e da rotina que deverão se submeter por participarem da pesquisa, não existem problemas éticos que tornem a pesquisa inviável.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos necessários para que seja avaliada a emenda solicitada. Ou seja: O projeto, carta de encaminhamento, cronograma, e um novo TCLE.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A presente pesquisa foi analisada e aprovada por este CEP na data de 10 de abril de 2018. Agora a pesquisadora retorna a pesquisa para este CEP solicitando por emenda algumas modificações. Vejamos a exposição da pesquisadora apresentando seus motivos: "Após avaliação do projeto por banca julgadora durante Exame de Qualificação, foram propostas modificações pontuais ao projeto original, a fim de contribuir para as análises comparativas a que se propõe o projeto.

As partes do protocolo a serem modificadas estão ordenadamente dispostas a seguir:

1. Na redação do Projeto e do TCLE foi acrescentado o período de avaliação de 12 meses dos sítios operados, no qual serão realizadas novamente as medidas dos parâmetros clínicos de interesse descritos no Projeto, bem como nova tomada radiográfica padronizada, tendo em vista melhores resultados relatados na literatura após 12 meses de pós-operatório comparados aos 9 meses. (Cortellini P, Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. Periodontol 2000. 2000 Feb;22:104-32.)
2. Em relação ao método de obtenção das radiografias, optou-se pela substituição da técnica de realização das mesmas, utilizando portanto radiografias periapicais pela técnica do paralelismo (cone longo) por mostrar-se mais fidedigna às estruturas e dimensões originais quando comparada à tomada radiográfica do tipo bite-wing com longo eixo do sensor radiográfico na

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**

Continuação do Parecer: 3.768.591

vertical (quando se observa distorção nas imagens radiográficas em sua porção mais apical). Assim ressaltamos que nenhuma tomada radiográfica adicional foi realizada nos tempos T0 e T6, apenas foi substituída a técnica de obtenção.

3. O cronograma foi alterado, tendo em vista a necessidade de maior tempo dispensado para a seleção da amostra e por ter se postergado a coleta de dados."

Mediante o exposto observa-se que aumentará mais uma tomada radiográfica (12 meses); entretanto, a pesquisadora justifica essa nova tomada radiográfica alegando que com essa última radiografia se obterá a confirmação dos 'melhores resultados relatados na literatura após 12 meses de pós-operatório comparados aos 9 meses.' Todas as alterações foram realizadas tanto na Plataforma Brasil (gerando um novo formulário de Informações Básicas do Projeto) como no Projeto de Pesquisa e no TCLE apresentados para análise, razão pela qual podemos aprovar a emenda proposta.

Considerações Finais a critério do CEP:

A emenda apresentada pelo(a) pesquisador(a) foi considerada APROVADA na reunião ordinária do CEP de 13/11/2019, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1475403_E1.pdf	21/11/2019 15:33:02		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1475403_E1.pdf	21/11/2019 15:10:14		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1475403_E1.pdf	21/11/2019 15:01:06		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1475403_E1.pdf	21/11/2019 14:57:12		Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_Andreia_Emenda.pdf	20/11/2019	Andréia Pereira de	Aceito

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

Anexos

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**

Continuação do Parecer: 3.768.591

/ Brochura Investigador	Projeto_Andreia_Emenda.pdf	13:30:57	Souza Pavani	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Emenda.pdf	20/11/2019 13:30:31	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Outros	Oficio_Emenda.pdf	20/11/2019 13:30:05	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_oficio_pendencias.pdf	09/04/2018 08:07:57	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Correcoes_Pendencias.pdf	09/04/2018 08:07:26	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Andreia_Correcoes_Pendencias.pdf	09/04/2018 08:07:07	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Outros	Termo_Aquiescencia_ClinicaPosGrad.pdf	22/02/2018 20:35:09	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Outros	Termo_Aquiescencia_Clinica3.pdf	22/02/2018 20:34:45	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Outros	Termo_Aquiescencia_Clinica2.pdf	22/02/2018 20:34:21	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Outros	Carta_Encaminhamento.pdf	22/02/2018 20:33:07	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Outros	QuestionarioTecnicoPesquisadorAssinado.pdf	22/02/2018 20:31:51	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	22/02/2018 20:27:05	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Compromisso_Pesquisador Resultados.pdf	22/02/2018 20:26:43	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	22/02/2018 19:47:33	Andréia Pereira de Souza Pavani	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

Continuação do Parecer: 3.768.591

BAURU, 13 de Dezembro de 2019

Assinado por:
Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br