Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia

Danilo Maeda Reino

Tratamento de retrações gengivais em pacientes fumantes graves através de duas técnicas cirúrgicas: estudo clínico, laboratorial e histológico

Ribeirão Preto

2010

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia

Danilo Maeda Reino

Tratamento de retrações gengivais em pacientes fumantes graves através de duas técnicas cirúrgicas: estudo clínico, laboratorial e histológico

Dissertação apresentada á Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

Ribeirão Preto

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Reino, Danilo Maeda

Tratamento de retrações gengivais em pacientes fumantes graves através de duas técnicas cirúrgicas: estudo clínico, laboratorial e histológico. Ribeirão Preto, 2010.

70p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Souza, Sérgio Luís Scombatti de

1. Retração gengival. 2. Cirurgia plástica periodontal. 3. Fumo. 4. Enxerto de tecido conjuntivo subepitelial. 5. Vascularização.

Folha de Aprovação

Danilo Maeda Reino

Tratamento de retrações gengivais em pacientes fumantes graves através de duas técnicas cirúrgicas: estudo clínico, laboratorial e histológico.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Periodontia

Aprovado em: ____ / ____ / 2010

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À minha família

*As pessoas mais importantes da minha vida, meus pais **Sidney e Marina** e meus irmãos **Diego e Felipe**. Nunca poderei retribuir tamanho amor e carinho. Agradeço pela família que são para mim, meu porto seguro, com quem quero passar todo a minha vida.*

À Minha noiva

***Joyce**, a mulher da minha vida, minha companheira nas dificuldades e nas vitórias, pelo amor incondicional, pelo seu lindo sorriso e por alegrar todos os dias da minha vida.*

Sem vocês a minha vida não teria sentido!

Agradecimentos

Aos meus pais, **Sidney** e **Marina** por todo o esforço e dedicação para me darem educação e formar meu caráter e personalidade. Por me incentivarem a seguir meus sonhos e me ajudarem a chegar até aqui, verdadeiros exemplos de pais e meus eternos ídolos.

Aos meus irmãos, **Diego** e **Felipe** pelo incentivo, pelas palavras sinceras e amigas nos momentos que precisei. Pela alegria, pelas risadas e por todos os momentos gostosos que passamos juntos. Meus melhores amigos.

A **Joyce**, minha noiva, por tolerar a distância e saudade. Por me ouvir e me incentivar. Por ser minha companheira desde o primeiro ano de graduação e persistir até hoje. Você é a minha razão de sonhar todas as noites.

Ao meu grande amigo **Milton**, um verdadeiro irmão mais velho, que através da odontologia tem me ensinado a ser uma pessoa melhor, por me estimular a continuar curioso e a estudar cada vez mais. Por toda a ajuda que me dá.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pelas palavras amigas ao me incentivar, pelas oportunidades que me ofereceu, pelo tempo dedicado a minha orientação e pela paciência com a minha empolgação.

Aos docentes do programa de Pós-graduação em Periodontia da FORP-USP. Ao **Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi** por todas as conversas sobre cirurgia plástica e por me estimular na clínica. Ao **Prof. Dr. Mário Taba Júnior** pelas conversas agradáveis sobre pesquisa e por escutar as minhas idéias. Ao **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior** pela paciência com minha curiosidade e por aguentar tantas perguntas minhas. À Prof^a. **Dr^a. Daniela Bazan Palioto** por acreditar em mim e pela ajuda desde os meus primeiros enxertos ainda na especialização.

Às minhas amigas de mestrado, **Patrícia**, **Luciana** minha dupla de clínica, **Ingrid**, **Karina** e **Dania** pela companhia e ajuda nas clínicas. Por aguentarem meu entusiasmo e estarem sempre presentes quando precisei.

Jones meu amigo pela breve companhia no mestrado, por sua alegria e discussões sobre periodontia.

Aos amigos doutorandos, **Patrícia**, **Guilherme**, **Rafael**, **Priscila**, **Adriana**, **Flávia** e **Luciana**, que sempre tiraram minhas dúvidas e estiveram dispostos a ajudar nos momentos necessários.

À **Andréa**, por todas as vezes que me escutou, pelos seus conselhos e toda ajuda que me ofertou.

Aos amigos de clínica **Carol, Glauber** e demais graduandos que compartilharam de minhas idéias, confiaram e sempre acreditaram em mim.

À **Fabíola** pela simpatia e toda ajuda com as análises salivares.

A **Adriana** pela simpatia e ajuda com análise histológica.

À **Vani** pela ajuda com a histologia.

À todos os funcionários da FORP-USP que me ajudaram durante minha estadia na FORP. **Sr. Augusto, Vera, Paulo** e **Ana** pela simpatia, amizade e confiança. **Tati** e **Dulce**, pela amizade e ajuda prestada. **Sueli** e **Zilda** pela companhia diária na clínica, obrigado por toda ajuda.

Aos funcionários do Campus. **Fátima, Rita, Sônia** e **Sr. Eurípides** colegas do restaurante universitário e companheiros diários nas refeições. **Claudemir, Mirian** e **Cidão** meus amigos da Biblioteca, pela alegria e ajuda.

Aos meus amigos que me apadrinharam em Ribeirão Preto, **Dib** e **Ana**, que me acompanharam desde a minha infância, por tudo que fizeram por mim desde a especialização e por tudo que fazem até hoje.

Às minha amigas **Li, Heloísa** e **Marceli**, pela companhia e amizade, ajudando a suportar a distância de Maringá, pelas conversas, risadas e fins de semana agradáveis.

Ao **Vanderlei**, mestre de taekwondo, por me ajudar a voltar a treinar após 9 anos, pela amizade e incentivo, pelas conversas, treinos e amizade.

Meus amigos do pensionato. A **Dona Angelina**, pelo seu esforço diário para meu bem estar, pelas conversar quando precisei, pelo carinho e todas as alegrias que me propiciou. **João, Lucas, Samuel, Letícia, Gustavo** e **Cristian**, pela amizade e companhia.

Aos meus pacientes, por confiarem em mim e pela ajuda prestada.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AM: altura da mucosa queratinizada

ANOVA: análise de variância

APD: altura da papila distal

APM: altura da papila mesial

AR: altura da retração gengival

BPD: base da papila distal

BPM: base da papila mesial

BSA: soro bovino contendo albumina

DLR: diminuição da largura da retração obtida

DVS: densidade de vasos sanguíneos

ECS: enxerto de tecido conjuntivo subepitelial

ELISA: ensaio imunoenzimático

EM: espessura da mucosa queratinizada

GC: grupo controle

GT: grupo teste

HE: eosina-hematoxilina

LR: largura da retração gengival

Mm = milímetros

NCI: nível clínico de inserção

Ng/ml: nanogramas por mililitros

PBS: solução salina tamponada fosfatada

PS: profundidade de sondagem

RR: recobrimento radicular obtido

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Justificativa	xii
Resumo.....	xvii
1 Introdução	19
2 Materiais e Métodos	23
2.1 Seleção de pacientes	23
2.2 Procedimentos clínicos e cirúrgicos	24
2.3 Análises Histológica e Histomorfométrica.....	29
2.4 Análise da cotinina na saliva	31
2.5 Análise estatística.....	31
3 Resultados	33
3.1 Resultados Clínicos.....	33
3.2 Resultados laboratoriais	38
4 Discussão	41
5 Conclusão	47
6 Referências bibliográficas.....	49
7 Artigo em Inglês	53

Justificativa

Justificativa

Estima-se que aproximadamente 90 mil jovens comecem a fumar por dia em todo o mundo ¹, resultando em uma prevalência mundial de 1,1 bilhões de fumantes ², o que equivale a praticamente 20% da população mundial. O fumo é o maior agente causador de mortes no mundo ² e também é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de periodontite ³⁻⁹ e retrações gengivais ¹⁰⁻¹³.

Retrações gengivais podem ser definidas como o deslocamento da margem gengival apicalmente à junção cimento-esmalte ¹⁴. É um problema freqüente na população, podendo acometer mais de 50% da população do Brasil ¹² e dos Estados Unidos da América ¹⁵, sendo mais prevalente e de maior extensão e severidade em fumantes do que em não fumantes ^{16, 17}. Esta condição gengival pode levar ao desenvolvimento de hiper-sensibilidade dentinária, facilitando o acúmulo de placa bacteriana e a ocorrência de cáries em raiz dentária ^{18, 19}. Além do prejuízo funcional, a crescente valorização da estética pela sociedade tem aumentado a atenção dos pacientes para as retrações gengivais, pois estas alteram a simetria e altura das margens gengivais dos elementos dentários, tornando-os mais longos e comprometendo a estética do sorriso. Por conseguinte, tem aumentado a procura por tratamentos para devolver saúde, corrigir e melhorar a beleza do sorriso ²⁰.

O tratamento de retrações gengivais é realizado através de procedimentos cirúrgicos para recobrimento radicular. Estes procedimentos têm apresentado prognóstico ruim em pacientes fumantes quando comparados a pacientes não fumantes ¹³. Frequentemente o recobrimento radicular é inferior e recidivante com o passar do tempo, quando comparado a pacientes não fumantes ²⁰⁻²⁴. Alguns estudos têm mostrado que estes resultados ruins são

causados pela capacidade do tabaco de prejudicar o periodonto do usuário, alterando a função de neutrófilos, produção de anticorpos e mediadores inflamatórios, sendo danoso à atividade de fibroblastos ⁹ e, principalmente, reduzindo a vascularização dos tecidos periodontais ²⁵⁻²⁸.

No intuito de tratar as retrações gengivais muitas técnicas cirúrgicas foram desenvolvidas. A técnica de retalho posicionado coronalmente associada ao uso de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial ²⁹ tem mostrado ser capaz de aumentar a qualidade e previsibilidade dos resultados cirúrgicos, sendo atualmente aceita como padrão ouro para o recobrimento radicular ³⁰. No entanto, quando esta técnica foi aplicada a retrações gengivais em pacientes fumantes, o recobrimento foi parcial, com baixa taxa de recobrimento completo; além disso, apresentou recidiva com o passar do tempo ^{21,24}.

Desta forma, em vista da alta prevalência mundial de fumantes, devido aos fumantes apresentarem maior prevalência, severidade e pior prognóstico no tratamento retrações gengivais, é importante que novas técnicas sejam avaliadas no tratamento destas situações clínicas nestes pacientes de risco.

Referências Bibliográficas

1. Jha P, Chaloupka FJ. Curbing the epidemic: Governments and the economics of tobacco control. No. World Bank, 1999
2. Iglesias R, Jha P, Pinto M, Silva VLC, Godinho J. Tobacco control in Brazil. No. World Bank, 2007
3. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65:260-267.
4. Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 1997;14:173-201.
5. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:356-365.
6. Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontol 2000* 2003;32:50-58.
7. Yamamoto Y, Nishida N, Tanaka M, et al. Association between passive and active smoking evaluated by salivary cotinine and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:1041-1046.
8. Preshaw PM, Hefti AF, Bradshaw MH. Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:610-616.
9. Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000* 2007;44:178-194.
10. Gunsolley JC, Quinn SM, Tew J, Gooss CM, Brooks CN, Schenkein HA. The effect of smoking on individuals with minimal periodontal destruction. *J Periodontol* 1998;69:165-170.
11. Muller HP, Stadermann S, Heinecke A. Gingival recession in smokers and non-smokers with minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29:129-136.
12. Susin C, Haas AN, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Gingival recession: epidemiology and risk indicators in a representative urban Brazilian population. *J Periodontol* 2004;75:1377-1386.
13. Ojima M, Hanioka T, Tanaka K, Inoshita E, Aoyama H. Relationship between smoking status and periodontal conditions: findings from national databases in Japan. *J Periodontol Res* 2006;41:573-579.
14. Periodontology AAo. Glossary of Periodontal Terms. In. Chicago, Illinois: The American Academy of Periodontology, 2001.
15. Albandar JM, Kingman A. Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 1999;70:30-43.
16. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol* 2001;28:283-295.

17. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000;71:1874-1881.
18. Wennstrom JL. Mucogingival therapy. *Ann Periodontol* 1996;1:671-701.
19. Oates TW, Robinson M, Gunsolley JC. Surgical therapies for the treatment of gingival recession. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:303-320.
20. Martins AG, Andia DC, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Junior FH. Smoking may affect root coverage outcome: a prospective clinical study in humans. *J Periodontol* 2004;75:586-591.
21. Erley KJ, Swiec GD, Herold R, Bisch FC, Peacock ME. Gingival recession treatment with connective tissue grafts in smokers and non-smokers. *J Periodontol* 2006;77:1148-1155.
22. Silva CO, Sallum AW, de Lima AF, Tatakis DN. Coronally positioned flap for root coverage: poorer outcomes in smokers. *J Periodontol* 2006;77:81-87.
23. Silva CO, de Lima AF, Sallum AW, Tatakis DN. Coronally positioned flap for root coverage in smokers and non-smokers: stability of outcomes between 6 months and 2 years. *J Periodontol* 2007;78:1702-1707.
24. Andia DC, Martins AG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH. Root coverage outcome may be affected by heavy smoking: a 2-year follow-up study. *J Periodontol* 2008;79:647-653.
25. Bergstrom J, Bostrom L. Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. *J Clin Periodontol* 2001;28:680-685.
26. Nair P, Sutherland G, Palmer RM, Wilson RF, Scott DA. Gingival bleeding on probing increases after quitting smoking. *J Clin Periodontol* 2003;30:435-437.
27. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 2004;31:267-272.
28. Souza SL, Macedo GO, Tunes RS, et al. Subepithelial connective tissue graft for root coverage in smokers and non-smokers: a clinical and histologic controlled study in humans. *J Periodontol* 2008;79:1014-1021.
29. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol* 1985;56:715-720.
30. Bouchard P, Malet J, Borghetti A. Decision-making in aesthetics: root coverage revisited. *Periodontol 2000* 2001;27:97-120.

Resumo

Objetivo: Este trabalho avaliou o recobrimento radicular obtido por duas técnicas de cirurgia plástica periodontal em pacientes fumantes graves, através de análises clínica, histológica e laboratorial.

Materiais e Métodos: Foram selecionados 20 pacientes fumantes graves que apresentavam ao menos duas retrações classes I ou II de Miller em dentes não molares, bilateralmente. Os parâmetros clínicos avaliados foram: profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI), altura (AR) e largura das retrações (LR), altura (AM) e espessura da mucosa queratinizada (EM) e altura e base das papilas mesiais e distais à retração. Um lado recebeu retalho posicionado coronalmente, enquanto no outro lado foi utilizada a técnica de retalho estendido. Ambos os procedimentos foram associados ao enxerto de tecido conjuntivo subepitelial. Biópsias foram feitas durante os procedimentos cirúrgicos para quantificação dos vasos sanguíneos utilizando de avaliação imunohistoquímica. Coleta de saliva foi realizada pré tratamento e após 3 e 6 meses, como forma de avaliar, por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), a exposição ao fumo durante o período completo do estudo.

Resultados: Os parâmetros clínicos avaliados não apresentaram diferença estatística entre grupos ou intra-grupos. Os pacientes mantiveram a mesma exposição ao fumo durante os 6 meses avaliados. O recobrimento radicular obtido foi baixo para ambas as técnicas estudadas (43,18% para técnica padrão e 44,52% para técnica teste). O retalho apresentou menor quantidade de vasos sanguíneos do que o tecido do enxerto ($13,49 \pm 5,48$ contra $18,69 \pm 4,87$, $p=0,0001$).

Conclusão: O fumo prejudicou intensamente os resultados de ambas as técnicas empregadas, reduzindo o recobrimento radicular, a frequência de recobrimento total e a quantidade de vasos sanguíneos nos tecidos. Não houve diferença entre as técnicas testadas.

Palavras chave: retração gengival, cirurgia plástica periodontal, fumo, enxerto de tecido conjuntivo, vascularização.

1 Introdução

Cirurgia plástica periodontal é o nome dado aos procedimentos utilizados para prevenir, corrigir ou eliminar defeitos anatômicos, de desenvolvimento, causados por trauma ou por doença induzida por placa bacteriana em gengiva ou mucosa alveolar¹. A adoção do termo plástica periodontal sugere um aumento da importância e maior preocupação com a estética dos tecidos periodontais².

Recentemente, os valores estéticos têm recebido grande atenção em nossa sociedade, o que levou a um aumento da demanda por cirurgias plásticas periodontais para devolver saúde, corrigir e melhorar a beleza do sorriso. O aumento desta demanda ocorre em grande parte por a retração gengival ser provavelmente, dos problemas gengivais estéticos, o mais comum, mais fácil de ser notado e que recebe maior atenção por conta dos pacientes, atingindo mais de 50% da população no Brasil e nos Estados Unidos da América^{3, 4}. Desta forma, dentre os procedimentos de cirurgia plástica periodontal, as técnicas que visam ao recobrimento radicular tem sido as mais procuradas⁵.

Além das razões estéticas, o recobrimento radicular também tem sido indicado para o tratamento da exposição radicular, a qual é decorrente da retração gengival, por produzir hiper-sensibilidade dentinária, dificultar a remoção de placa bacteriana e poder facilitar a ocorrência de cáries em raiz dentária^{1, 2}.

Muitos são os fatores predisponentes à retração gengival: tipo de escova dental, frequência de escovação, cerdas duras ou muito pontiagudas, trauma durante escovação, deiscência em tábua óssea alveolar, doença periodontal^{6, 7}, condições inflamatórias², posição

anormal do dente, espessura fina de gengiva inserida⁸, inserção muscular alta, freio labial⁹ e fatores iatrogênicos¹⁰. Dentre estes diversos fatores que podem aumentar a chance de desenvolvimento de retrações gengivais, o fumo tem recebido muita atenção^{3, 11-13}.

Apesar de o fumo ser a maior causa de mortes no mundo¹⁴ estima-se que aproximadamente 90 mil jovens comecem a fumar por dia¹⁵, resultando em uma prevalência mundial de 1,1 bilhões de fumantes¹⁴. O fumo tem sido aceito como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de periodontite¹⁶⁻²², por causar alterações na função de neutrófilos, interferir na produção de anticorpos, prejudicar a atividade de fibroblastos e alterar a produção de mediadores inflamatórios²². Consequentemente, os fumantes possuem maior profundidade de sondagem²³ e apresentam maior prevalência, extensão e gravidade de retração gengival quando comparados com não-fumantes^{3, 11-13, 24, 25}.

Estudos clínicos mostraram que o fumo compromete os resultados de terapias não cirúrgicas e cirúrgicas^{13, 26, 27}. Resultados recentes têm mostrado menor quantidade e estabilidade do recobrimento radicular obtido em pacientes fumantes do que em não fumantes²⁸⁻³⁰.

Segundo Oates e colaboradores², a técnica descrita por Langer e Langer em 1985³¹ para recobrimento radicular, que consiste no uso de um enxerto conjuntivo subepitelial (ECS) associado ao posicionamento coronário do retalho, apresenta o resultado mais previsível dentre as variadas técnicas existentes^{2, 32}. Entretanto, Martins e colaboradores, em 2004⁵, compararam fumantes e não fumantes para o recobrimento radicular através da técnica de ECS e tiveram piores resultados em fumantes do que em não fumantes, relatando a influência negativa do fumo sobre a previsibilidade do procedimento. Outras pesquisas utilizaram a mesma técnica de ECS para o tratamento de fumantes e não fumantes^{30, 33},

confirmando a influência negativa do fumo sobre o procedimento cirúrgico plástico periodontal.

O mecanismo pelo qual o fumo prejudica os resultados das cirurgias plásticas periodontais ainda não está claro²⁹, mas sabe-se que pode interferir em várias funções fisiológicas e celulares³⁴. A grande quantidade de toxinas do tabaco pode prejudicar a cicatrização periodontal e injuriar células periodontais⁵. O fumo também diminui o fluxo sanguíneo nos tecidos gengivais^{33, 35, 36}, o que é potencialmente comprometedor para a técnica de ECS, pois pode prejudicar a vascularização do enxerto³³.

No intuito de obter maior vascularização nos procedimentos de cirurgia plástica periodontal, especificamente para o uso da matriz dérmica acelular, um material alógeno avascular e acelular utilizado para recobrimento radicular, Barros e colaboradores, em 2004³⁷, descreveram uma nova técnica, que consistia na expansão do retalho, com incisões verticais em dentes adjacentes à retração gengival a ser recoberta. Os resultados obtidos foram superiores à técnica padrão de Langer e Langer (1985)³¹: houve maior número de vasos sanguíneos nutrindo o enxerto, melhor cicatrização e maior recobrimento radicular. Estes resultados foram avaliados em longo prazo, e novamente a técnica do retalho estendido descrita por Barros e colaboradores mostrou maiores taxas de sucesso³⁸.

Desse modo, tendo em vista os resultados negativos apresentados por técnicas convencionais de recobrimento radicular em pacientes fumantes e em face dos resultados positivos de uma nova técnica de retalho estendido, que pode aumentar a vascularização do tecido enxertado (mesmo sendo este tecido enxertado totalmente acelular e avascular), o objetivo deste trabalho foi comparar esta nova técnica com a técnica padrão, associada ao ECS, em pacientes fumantes, que reconhecidamente possuem um comprometimento do aporte sanguíneo periodontal, através de análises clínica, histológica e laboratorial.

2 Materiais e Métodos

2.1 Seleção de pacientes

O tamanho da amostra foi definido a partir do cálculo de poder (“Power Test”), com nível de significância de 5%. Para valor de poder de 80% seriam necessários 17 pacientes. Devido a possíveis desistências de pacientes no decorrer do estudo, foram selecionados 20 pacientes (10 homens e 10 mulheres), com idades entre 35 e 50 anos (média de 44 ± 6), com no mínimo 20 dentes, que fossem fumantes pesados (consumo de 20 ou mais cigarros por dia há mais de 5 anos³⁰) e que tivessem queixas estéticas relacionadas a retrações gengivais. Como critérios de inclusão, os pacientes deveriam apresentar retrações gengivais bilaterais na mesma arcada dentária, classe I ou II de Miller³⁹, de 3 mm de altura e com menos de 3 mm de faixa de tecido queratinizado, em dentes não molares, bem como ausência de bolsas periodontais associadas à retração gengival e aos dentes adjacentes. Foram critérios de exclusão: pacientes sem estabilidade oclusal, portadores do HIV, diabéticos, grávidas, com história de hepatite, com uso crônico de anti-inflamatórios, com requerimento de profilaxia antibiótica específica. Os pacientes foram informados sobre a natureza da pesquisa e aceitaram participar voluntariamente deste trabalho, após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram executados somente após a aprovação pelo Comitê de Ética para pesquisas em humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP sob o protocolo 2008.1.170.58.4. Auxílio financeiro para este estudo foi solicitado e concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2007/08591-7).

2.2 Procedimentos clínicos e cirúrgicos

Os pacientes receberam instruções gerais e de higiene bucal para eliminar hábitos relacionados à etiologia da retração gengival. Em seguida, receberam raspagem, alisamento radicular e profilaxia, entrando em fase de manutenção periódica com avaliações e controles semanais. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados quando os pacientes apresentaram índice de sangramento gengival e índice de placa⁴⁰ inferiores a 20%.

Foram selecionados dois dentes da mesma arcada, bilateralmente, para serem incluídos no estudo. Nestes dentes foram avaliados clinicamente, nos exames inicial (pré-tratamento), 3 e 6 meses pós-cirurgia, os seguintes parâmetros: a) profundidade de sondagem; b) nível clínico de inserção; c) sangramento à sondagem; d) altura da retração gengival; e) largura da retração gengival; f) medida da quantidade (largura da faixa) de tecido queratinizado g) largura das papilas adjacentes à recessão; h) altura das papilas adjacentes à recessão. Os exames clínicos foram realizados sempre pelo mesmo examinador, que foi previamente calibrado (calibração intra-examinador). Foi utilizada sonda periodontal computadorizada¹ para profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, sangramento à sondagem e sangramento de margem gengival⁴¹ ou sonda periodontal manual modelo North Carolina² (demais parâmetros).

Nos mesmos exames (Inicial, 3 e 6 meses pós-operatórios) foi realizada a coleta de saliva dos pacientes, para posterior avaliação do nível de cotinina. Todas as coletas foram realizadas no período da manhã (aproximadamente às 9 horas – tolerância máxima de 15 minutos para mais ou para menos), para evitar alterações possíveis na composição salivar. Os pacientes foram instruídos a não comer 60 minutos antes da coleta de saliva, a evitar

¹ Flórida Probe Corporation, Gainesville, FL, U.S.A.

² Hu-Friedy, Chicago, IL, U.S.A.

álcool 24 horas antes da coleta, evitar o uso de produtos de higiene pessoal 30 minutos antes e a fazer bochecho com água 10 minutos antes de coletar saliva para evitar qualquer contaminação das amostras. Durante 5 minutos os pacientes expectoraram a saliva e, através da inclinação de suas cabeças, depositaram suavemente a saliva produzida em tubos plásticos estéreis, evitando-se assim a produção de bolhas. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para micro tubos 3810³ e armazenados a -80°C até o momento da análise.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo periodontista. Foram realizados dois procedimentos cirúrgicos em cada paciente: de um lado a técnica de Langer e Langer, de 1985³¹ (Grupo Controle), e no lado oposto a técnica de Barros e colaboradores, de 2004³⁷ (Grupo Teste). Ambos os procedimentos utilizaram ECS. A escolha do lado a receber determinado tipo de tratamento foi feita de forma aleatória, através do lançamento de uma moeda. A técnica utilizada no grupo controle (GC) consistiu em uma incisão intrasulcular na face vestibular do dente selecionado, uma incisão relaxante mesialmente e outra distalmente no mesmo elemento, sem incluir as papilas adjacentes, todas realizadas com lâmina 15c⁴. Um retalho dividido foi levantado, ultrapassando a junção mucogengival, e foi liberado em sua base de modo a cobrir coronalmente e passivamente a retração gengival e o enxerto (Figura 1).

³ Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil

⁴ Swann-Morton Limited, Owlerton Green, Sheffield, U.K.

Figura 1: Grupo controle – A= pré-cirurgia; B= incisões realizadas; C= enxerto posicionado e suturado; D= Sutura do retalho; E= resultado após 3 meses; F= resultado com 6 meses de pós-operatório.

No lado teste (GT) foi realizada a técnica descrita por Barros e colaboradores em 2004. Resumidamente, foi feita uma incisão intrasulcularmente à face vestibular do dente acometido pela recessão e dos dois dentes adjacentes a ele. Realizou-se então uma incisão relaxante na mesial e outra na distal dos dentes adjacentes mais próximos ao elemento a receber tratamento, sem incluir as papilas adjacentes. Um retalho dividido foi então dissecado, ultrapassando a junção mucogengival; após a liberação em sua base, o retalho deveria cobrir coronalmente e passivamente a retração gengival e o enxerto (Figura 2).

Figura 2: Grupo teste – A= pré-cirurgia; B= incisões realizadas; C= enxerto posicionado; D= Sutura do retalho; E= resultado após 3 meses; F= resultado com 6 meses.

Depois da divisão e liberação do retalho, em ambos os grupos as superfícies radiculares expostas foram aplainadas com curetas de Gracey número 5/6 e irrigadas com solução salina estéril.

O enxerto foi removido do palato do próprio paciente de acordo com a técnica descrita por Lorenzana e Allen (2000)⁴² e recortado com tesoura de Goldman-Fox para melhor se adaptar à área da retração gengival. Após a remoção do enxerto, foram feitas medidas dos seguintes parâmetros transcirúrgicos: a) espessura do retalho; b) espessura do enxerto; c)

comprimento do enxerto; d) largura do enxerto. Os parâmetros transcirúrgicos “a” e “b” foram medidos através de paquímetro digital cirúrgico com pontas esterilizáveis e removíveis⁵ e os demais com o uso de sonda milimetrada manual modelo North Carolina.

Nesta fase foram coletados tecidos da área doadora e receptora para a realização de análises histológica e histomorfométrica. O enxerto do palato foi removido com 2 mm a mais em sua largura em relação à necessidade do leito receptor: este tecido em excesso foi recortado e preparado para histologia e histomorfometria, conforme descrito na seção seguinte. Além disso, foi cuidadosamente removido, com uma lâmina 15C nova, um fragmento da porção interna do retalho da área receptora do enxerto, com dimensões mínimas de aproximadamente 3 mm X 3 mm, o qual também foi preparado para histologia e histomorfometria.

O enxerto foi então suturado ao leito receptor por meio de suturas suspensórias com uso de fio absorvível 5.0⁶; depois disso, o retalho foi tracionado coronalmente de modo a recobri-lo totalmente, sendo suturado nesta posição coronal com o mesmo tipo de suturas. O leito doador recebeu suturas com fio de seda 4.0⁷. Cimento cirúrgico foi colocado na área receptora e trocado após 7 dias, sendo removido completamente com 14 dias de pós-operatório.

Todos os pacientes receberam instruções para deixar de escovar os dentes e, ao fumar, fazê-lo de forma cuidadosa, para evitar traumas ou pressão à área operada. Solução de digluconato de clorexidina a 0,12% foi prescrita para bochecho 2 vezes ao dia por 15 dias, e após isso os pacientes foram instruídos a limpar a área operada com bastonetes de algodão saturados com a solução. Foram prescritos analgésicos por 3 dias. As suturas no

⁵ Mitutoyo Sul Americana, Suzano, SP, Brasil

⁶ Vicryl, Ethicon, Somerville, NJ, E.U.A

⁷ Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil

leito doador foram removidas depois de 7 dias, e nas áreas de recobrimento radicular, após 15 dias. Depois de 30 dias os pacientes voltaram a fazer limpeza mecânica, de forma cuidadosa, na área operada. Os pacientes foram chamados para reforço da instrução de higiene bucal, controle e profilaxia 2 e 4 semanas após a cirurgia, e depois disso mensalmente até completar 6 meses de pós operatório.

2.3 Análises Histológica e Histomorfométrica

Os tecidos removidos do palato e da parte interna do retalho (conforme descrito anteriormente) foram imediatamente fixados em solução de formol a 10% por 24 horas e depois imersos em parafina. Foram feitos cortes seriados longitudinais de 7- μ m de espessura. Dois cortes de cada região (palato e gengiva marginal) foram corados com eosina-hematoxilina (HE) e outros dois com tricrômico de Masson para cada um dos grupos avaliados (Grupos Teste e Controle).

Para histomorfometria, seis cortes não corados (três do palato e três da gengiva marginal) de cada grupo do paciente foram preparados imunohistoquimicamente com antígeno Fator-VIII, para uma melhor visualização e quantificação dos vasos sanguíneos. A parafina foi removida dos cortes selecionados com xilol e os cortes foram hidratados com soluções alcoólicas em concentrações decrescentes (3 minutos cada: 100% com xilol, 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%). Os cortes foram então lavados em água destilada (3 banhos de um 1 minuto), e a peroxidase endógena foi inibida através de H_2O_2 a 3% em metanol por 30 minutos. Depois, os cortes foram lavados em solução salina tamponada fosfatada (PBS) (3 banhos de 5 minutos cada), tratados com soro bovino contendo albumina (BSA) a 2% in PBS (10 minutos) e BSA a 1% in PBS (10 minutos). O primeiro anticorpo (antígeno anti-humano

fator VIII de Coelho⁸) foi incubado em proporção 1:1 PBS + 1% BSA for 1 hora. Os cortes foram lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos cada), e o segundo anticorpo (antígeno anti-coelho de cabra para peroxidase⁹) foi incubado a proporção 1:50 PBS for 30 minutos. Os cortes foram novamente lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos cada), incubados com uma solução reveladora de peroxidase por 10 minutos, banhadas em água corrente por 10 minutos e contra corados com hematoxilina por 30 minutos. Depois de corados, os cortes foram desidratados em uma série de banhos em soluções de concentração crescente de etanol (2 minutos para cada concentração de etanol): 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Finalmente, os cortes foram limpos com xilol (5 minutos, feito duas vezes) e montados com Permount¹⁰.

A histologia e histomorfometria foram realizadas por um único examinador, cego para os grupos de estudo. Os cortes histológicos corados com HE e tricrômico de Masson foram examinados em microscópio de campo claro para avaliação e descrição das estruturas histológicas presentes em cada região (palato e gengiva marginal) e em cada grupo (teste e controle). Para a detecção e quantificação dos vasos sanguíneos, os cortes preparados por imunohistoquímica foram analisados e fotografados com microscópio de campo claro conectado a uma câmera de vídeo¹¹. Um software de análise de imagens¹² foi usado para a histomorfometria das imagens capturadas. Dois cortes de cada biópsia foram analisados. Os vasos sanguíneos de dois campos consecutivos na porção central dos cortes foram contados, e a média obtida foi considerada a densidade de vasos sanguíneos (DVS) do corte. A média dos dois cortes foi a DVS da área em avaliação (palato ou gengiva marginal, do grupo teste

⁸ Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA

⁹ Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA

¹⁰ Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA

¹¹ Olympus BX50, Olympus Corporation, Tóquio, Japão

¹² Image ProPlus 4.5, Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA

ou controle), e foi expressa em número de vasos por campo com aumento 200 x (20× lente objetiva e 10× lente ocular). Qualquer célula endotelial corada de marrom, claramente separada de vasos sanguíneos adjacentes e de outros elementos de tecido conjuntivo foi considerada como um único vaso. Não foi necessário o lúmen do vaso para que a estrutura fosse considerada um vaso, não havendo ainda a necessidade da presença de hemácias ou outras células sanguíneas para definir um lúmen de vaso⁴³.

2.4 Análise da cotinina na saliva

A cotinina é um metabólito da nicotina e permite monitorar a exposição do paciente à nicotina³³. O nível de cotinina foi detectado através de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando o kit para análise quantitativa de cotinina presente em saliva¹³, seguindo as instruções do fabricante.

2.5 Análise estatística

Análise estatística dos resultados foi comparativa e não paramétrica (n=20). O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dados entre grupos nos períodos pré-tratamento, 3 e 6 meses de pós-operatório. O teste de análise de variância com dois critérios (ANOVA) foi usado para comparar os parâmetros clínicos em relação às técnicas cirúrgicas e aos intervalos de tempo (diferenças intra-grupos: Pré tratamento X 3 meses, Pré tratamento X 6 meses). Para todas as análises estatísticas foi selecionado $p < 0,05$.

¹³ Salimetrics Inc, State College, PA, EUA

3 Resultados

3.1 Resultados Clínicos

Ambas as técnicas cirúrgicas foram realizadas em todos os pacientes, em um total de 40 retrações gengivais tratadas, sendo 20% em primeiros pré-molares superiores, 50% em primeiros pré-molares inferiores, 20% em caninos superiores e 10% em caninos inferiores. Ambos os grupos apresentaram valores clínicos similares pré tratamento, não ocorrendo diferença estatisticamente significativa para profundidade de sondagem (GC: $1,36 \pm 0,48$ mm; GT: $1,31 \pm 0,43$ mm), nível clínico de inserção (GC: $4,57 \pm 1,32$ mm; GT: $4,77 \pm 0,91$ mm), altura (GC: $3,21 \pm 1,17$ mm; GT: $3,46 \pm 0,86$ mm) ou largura (GC: $3,92 \pm 0,49$ mm; GT: $3,90 \pm 0,39$ mm) das retrações gengivais, altura (GC: $2,15 \pm 1,23$ mm; GT: $1,98 \pm 0,79$ mm) e espessura (GC: $1,25 \pm 0,32$ mm; GT: $1,21 \pm 0,33$ mm) da mucosa queratinizada. Também não houve diferença estatisticamente significativa para base das papilas mesiais (GC: $3,43 \pm 0,69$ mm; GT: $3,42 \pm 0,74$ mm) ou distais (GC: $3,26 \pm 0,83$ mm; GT: $3,02 \pm 0,78$ mm), ou altura das papilas mesiais (GC: $3,36 \pm 1,01$ mm; GT: $3,38 \pm 0,61$ mm) ou distais (GC: $3,37 \pm 0,80$ mm; GT: $3,35 \pm 0,99$ mm) às retrações. Estes resultados estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1: Médias e desvio padrão dos parâmetros clínicos avaliados pré tratamento, 3 e 6 meses em relação às duas técnicas cirúrgicas executadas.

	Pré tratamento			3 meses			6 meses		
	GC	GT	p	GC	GT	p	GC	GT	p
PS	1,36 ±	1,31 ±	0,64	1,61 ±	1,99 ±	0,82	1,59 ±	2,04 ±	0,76
(mm)	0,48	0,43		0,49	0,36		0,54	0,58	
NCI	4,57 ±	4,77 ±	0,51	3,58 ±	3,44 ±	0,65	3,83 ±	4,05 ±	0,38
(mm)	1,32	0,91		1,33	1,20		1,33	1,27	
AR	3,21 ±	3,46 ±	0,35	1,97 ±	1,84 ±	0,63	1,84 ±	2,01 ±	0,40
(mm)	1,17	0,86		1,03	1,08		1,08	1,18	
LR (mm)	3,92 ±	3,90 ±	0,86	3,55 ±	3,24 ±	0,29	3,42 ±	3,27 ±	0,63
	0,49	0,39		0,87	1,01		0,95	1,38	
AM	2,15 ±	1,98 ±	0,50	2,55 ±	2,68 ±	0,56	2,26 ±	2,17 ±	0,59
(mm)	1,23	0,79		1,15	0,90		1,02	0,77	
EM	1,25 ±	1,21 ±	0,58	2,32 ±	2,38 ±	0,59	2,01 ±	2,05 ±	0,73
(mm)	0,32	0,33		0,58	0,66		0,53	0,57	
BPD	3,43 ±	3,42 ±	0,94	3,32 ±	3,23 ±	0,62	3,38 ±	3,31 ±	0,68
(mm)	0,69	0,74		3,23	0,68		0,66	0,74	
BPM	3,26 ±	3,02 ±	0,29	3,15 ±	2,77 ±	0,09	3,22 ±	2,84 ±	0,05
(mm)	0,83	0,78		0,74	0,70		0,81	0,70	
APM	3,36 ±	3,38 ±	0,91	0,62 ±	3,28 ±	0,82	3,28 ±	3,20 ±	0,64
(mm)	1,01	0,61		1,05	0,74		1,00	0,84	
APD	3,37 ± 0,8	3,35 ±	0,93	3,27 ±	3,10 ±	0,38	3,28 ±	3,14 ±	0,51
(mm)		0,99		0,8	1,02		0,80	1,03	
% RR	Na	na		38,39	47,25	0,29	43,18	44,52	0,87
% DLR	Na	na		9,79	15,99	0,41	12,88	22,91	0,68
Cotina	416 ± 283			393 ± 260			310 ± 145		0,34
(ng/ml)									

PS= profundidade de sondagem, NCI= nível clínico de inserção, AR= altura da retração gengival, LR= largura da retração gengival, AM= altura da mucosa queratinizada, EM= espessura da mucosa queratinizada, BPD= base da papila distal, BPM= base da papila mesial, APM= altura da papila mesial, APD= altura da papila distal, RR= recobrimento radicular obtido, DLR= diminuição da largura da retração obtida. Valores de p obtidos pelo teste de Mann Whitney, comparação entre grupos no mesmo tempo de avaliação. Comparação entre grupos em relação a diversos tempos através de Anova ($p>0,05$).

Em relação aos dados obtidos durante os procedimentos cirúrgicos, somente ocorreu diferença estaticamente significativa para o comprimento do enxerto de tecido conjuntivo subepitelial (GC: $11,97 \pm 1,93\text{mm}$; GT: $14,97 \pm 3,69\text{mm}$; $p=0,01$); para espessura do retalho, largura e espessura do enxerto de tecido conjuntivo, não houve diferença estatística (tabela 2).

Tabela 2: Médias e desvios-padrão para parâmetros transcirúrgicos. Valores P calculados através do teste de Mann Whitney.

	GC	GT	p
Espessura do retalho	0,86 ± 0,20	0,93 ± 0,35	0,29
Comprimento enxerto	11,97 ± 1,93	14,97 ± 3,69	0,01
Largura enxerto	9,7 ± 2,56	9,76 ± 1,41	0,81
Espessura enxerto	1,6 ± 0,27	1,63 ± 0,41	0,19

A recuperação de todos os pacientes ocorreu sem complicações e durante todo o período de acompanhamento os pacientes apresentaram índice de sangramento gengival e de placa inferiores a 20%. Os resultados obtidos em 3 e 6 meses (figuras 1 e 2), na comparação entre grupos, não demonstrou diferenças estatísticas para os parâmetros clínicos analisados (tabela 1). A cotinina não variou entre os tempos avaliados (tabela 1).

A análise de variância de dois critérios foi usada para comparar os valores das retrações residuais em relação aos tempos avaliados, comparando-se por técnicas cirúrgicas. Desta forma, a análise intra-grupos mostrou que ocorreu redução estatisticamente significativa no tamanho das retrações em 3 meses e 6 meses quando comparados com o pré tratamento ($p < 0,01$), para ambas as técnicas cirúrgicas; no entanto, a diferença entre os resultados de 3 e 6 meses não apresentou significância estatística (gráfico 1). A análise entre grupos (Langer x Barros) para 3 e 6 meses não mostrou diferença estatística (gráfico 1). A mesma análise demonstrou não ocorrer diferença significativa para redução da largura da retração gengival quando se comparou entre grupos ou intra grupos (gráfico 1). Embora os procedimentos cirúrgicos tenham aumentado a altura (gráfico 2) e espessura da mucosa queratinizada (gráfico 2), as análises intra e entre grupos não apresentaram significância estatística.

Gráfico 1: Médias de altura e largura da retração gengival, pré tratamento e após 3 e 6 meses de acompanhamento, em relação às técnicas cirúrgicas realizadas.

Gráfico 2: Médias de espessura e altura da mucosa queratinizada pré-tratamento e após 3 e 6 meses de acompanhamento, em relação às técnicas cirúrgicas realizadas.

Embora o recobrimento radicular e a diminuição da largura da retração gengival obtidos com a técnica de Barros tenham sido numericamente superiores à técnica de Langer

(gráfico 3), não houve significância estatística. A frequência de recobrimento radicular para cada técnica está mostrada no gráfico 4.

Gráfico 3: Médias de recobrimento radicular e diminuição da largura da retração gengival obtidos 3 e 6 meses após a realização das cirurgias.

Gráfico 4: Frequência de recobrimento radicular obtido em relação à técnica cirúrgica empregada e tempo de acompanhamento pós-cirúrgico.

3.2 Resultados laboratoriais

A análise da cotinina demonstrou que os pacientes apresentaram exposição similar aos componentes do tabaco durante o período de avaliação (pré tratamento: 416 ± 283 ng/ml; 3 meses: 393 ± 260 ng/ml e 6 meses: 310 ± 145 ng/ml; $p = 0,34$).

A análise histológica demonstrou ausência de infiltrado inflamatório e presença de tecido conjuntivo denso, vasos sanguíneos, células endoteliais, fibras colágenas e tecido adiposo (figura 3) nas biópsias de palato e de retalho. A histomorfometria para quantificação de vasos sanguíneos (figura 4), não demonstrou significância estatística (tabela 3) quando da comparação entre grupos. Entretanto, o retalho apresentou menos vasos do que o enxerto removido do palato ($p < 0,05$).

Tabela 3: Média e desvio padrão da contagem de vasos sanguíneos (vasos/campo com 200x de aumento) presentes nas biópsias oriundas dos enxertos e retalhos.

	Enxerto			Retalho		
	GC	GT	p	GC	GT	p
Média	$18,99 \pm 5,74$	$18,39 \pm 3,95$	0,7	$13,50 \pm 6,03$	$13,49 \pm 5,02$	1,00
Média total	$18,69 \pm 4,87$			$13,49 \pm 5,48$

Figura 3: Corte histológico de biópsia do enxerto do grupo controle. Coloração de HE (A) e Tricrômico de Masson (B), magnificação original x10. TC= tecido conjuntivo, V= vaso sanguíneo, TA= tecido adiposo.

Figura 4: Corte histológico de biópsia do grupo controle do enxerto (A) e do retalho (B), coloração antígeno Fator VIII – representando a quantificação da densidade de vasos sanguíneos. Células endoteliais estão marcadas em castanho. Magnificação original x20.

4 Discussão

O objetivo deste trabalho foi utilizar uma nova técnica de recobrimento radicular (GT - técnica de Barros)³⁷, comparando-a com a técnica padrão (GC - técnica de Langer)³¹, para o tratamento de retrações gengivais em pacientes fumantes graves. Os tratamentos propostos foram capazes de diminuir a altura das retrações (com diferença estatística intra-grupos, $p < 0,01$), mas o recobrimento radicular obtido no GC após 3 (38,39%) e 6 meses (43,18%), e no GT após 3 (47,25%) e 6 meses (44,52%) foi baixo e não apresentou diferenças estatísticas entre grupos. O mesmo ocorreu com a diminuição da largura das retrações para o GC após 3 (9,79%) e 6 meses (12,88%) e para o GT após 3 (15,99%) e 6 meses (22,91%). A literatura tem mostrado que fumantes apresentam piores resultados no tratamento de retrações gengivais do que não fumantes tanto sem o uso de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial^{28, 29} como com o uso do mesmo^{5, 33, 36}.

Os baixos valores para o recobrimento radicular obtidos para ambas as técnicas usadas neste estudo estão em acordo com os resultados de Martins e colaboradores, que em 2004⁵ trataram fumantes graves (mais de 20 cigarros por dia) e não fumantes com uso ECS e obtiveram recobrimento radicular médio de 58,84%. Posteriormente estes resultados foram reforçados por Andia e colaboradores, que em 2008³⁰ também usaram ECS em fumantes graves e após 2 anos de controle obtiveram apenas 50% de recobrimento radicular. Resultados similares foram apresentados por Souza e colaboradores³⁶, que trataram pacientes que fumavam mais de 10 cigarros ao dia e obtiveram 58,02% de recobrimento radicular após 6 meses.

Grande parte dos estudos divergem em relação à quantidade de tabaco consumido pelos pacientes, gerando dificuldades na comparação de resultados. Como solução para este problema, Erley e colaboradores em 2006³³ utilizaram a análise da cotinina presente em saliva, um biomarcador para exposição à nicotina. Este exame foi feito como uma forma de verificar a veracidade das informações prestadas pelo paciente, em relação à sua condição de não fumante ou de fumante e seu consumo de tabaco diário. Foram selecionados pacientes não fumantes e pacientes que fumassem entre 10 e 20 cigarros por dia, os quais apresentaram valores médios para cotinina superiores a 40ng/ml. Os resultados mostraram haver uma alta correlação ($r=0,97$) entre a cotinina e baixo recobrimento radicular. Logo, esta condição seria do tipo dose dependente: quanto maior a exposição ao tabaco, menor seria o recobrimento radicular possível. Após 6 meses a taxa de recobrimento radicular médio em fumantes pesados foi de 76,6%. Uma das possíveis explicações para este valor mais alto em comparação ao presente estudo é que provavelmente houve menor exposição ao tabaco da amostra selecionada, pois o consumo relatado foi inferior a 20 cigarros por dia, ou ainda uma possível diminuição do consumo de tabaco após a realização das cirurgias, uma vez que não houve monitoramento da exposição ao tabaco no decorrer do tempo de acompanhamento, já que o exame de cotinina foi realizado somente no pré tratamento. Nenhum dos estudos anteriores na literatura verificou a ocorrência de variações na exposição ao fumo durante toda a cicatrização periodontal, uma vez que a cessação do fumo apresenta benefícios à cicatrização³³.

O presente estudo é o primeiro trabalho a realizar o exame da cotinina em 3 tempos distintos como forma de monitorar a exposição dos pacientes ao tabaco durante os períodos de cicatrização após procedimentos de cirurgia plástica periodontal. Os valores médios de cotinina não diferiram estatisticamente entre pré tratamento (416 ± 283 ng/ml), 3 ($393 \pm$

260 ng/ml) e 6 meses (310 ± 145 ng/ml), mas foram bem mais altos do que os relatados por Erley³³, provavelmente devido aos pacientes fumarem mais de 20 cigarros por dia. Assim, a exposição destes pacientes ao fumo foi uniforme no período estudado e a interferência do tabaco ocorreu aproximadamente na mesma intensidade e frequência durante todo o estudo. Estes altos valores de cotinina podem ser o principal fator causal do baixo recobrimento radicular obtido em ambos os grupos.

O fumo também foi capaz de limitar a ocorrência de recobrimento radicular completo: após 6 meses, isto ocorreu apenas em 2 casos (5% dos casos tratados), ambos na técnica teste e nenhum na técnica padrão (diferença sem significância estatística). Souza e colaboradores³⁶ relataram recobrimento radicular completo em 6,7% dos casos, enquanto Erley³³ obteve 25% e Andia³⁰ não obteve nenhum recobrimento completo. Estes dados são muito preocupantes para os clínicos, pois a melhora gerada na estética, através da pequena diminuição da retração gengival e na baixa previsibilidade de recobrimento de total, pode não satisfazer os pacientes fumantes. O prejuízo causado pelo fumo em fumantes graves parece ter sido intenso o suficiente para fazer com que a maior parte dos fumantes apresentassem recobrimento radicular inferior a 50% (67,5% dos casos), enquanto para Souza e colaboradores³⁶ a maior parte dos fumantes apresentou recobrimento entre 50% e 99% (60% dos casos).

Em relação aos demais parâmetros clínicos abordados, como profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, altura e largura das retrações tratadas, altura e espessura da mucosa queratinizada e altura e base das papilas mesiais e distais, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ou intra grupos. Em relação aos parâmetros transcirúrgicos, como espessura do retalho, largura e espessura do enxerto, estes também não diferiram estatisticamente entre os grupos. Apenas o comprimento do

enxerto foi maior para o GT ($14,97 \pm 3,69$) em relação ao GC ($11,97 \pm 1,93$), o que é justificável, pois a técnica padrão restringe o comprimento do enxerto por apresentar incisões relaxantes próximas à retração gengival. Estes resultados demonstram que não houve diferença estatística para estas variáveis entre as técnicas cirúrgicas empregadas.

A técnica teste que em estudos anteriores^{37, 38} aumentou a previsibilidade do recobrimento radicular por, entre outros fatores, permitir uma melhoria da vascularização do retalho, favorecendo a cicatrização mesmo de um enxerto totalmente avascular, como a matriz dérmica acelular, no presente trabalho não apresentou maior eficácia que a técnica padrão. Isto pode ser atribuído ao extremo prejuízo que anos sucessivos de alta exposição às diversas substâncias tóxicas do fumo podem causar ao periodonto e tecidos adjacentes. Souza e colaboradores³⁶ realizaram a contagem de vasos sanguíneos presentes em biópsias de tecido conjuntivo subepitelial e constataram que fumantes apresentavam uma média de $36,53 \pm 10,23$ vasos por campo verificado, correspondendo a 30% menos vasos que não fumantes. Neste trabalho as biópsias do enxerto empregado apresentaram praticamente a metade do número de vasos relatados por Souza e colaboradores³⁶ ($18,69 \pm 4,87$). Desta maneira, fumantes graves podem apresentar extremo comprometimento do aporte vascular, o que pode prejudicar intensamente a nutrição do enxerto, dificultar a cicatrização periodontal e o recobrimento radicular. A quantidade de vasos do leito receptor ($13,49 \pm 5,48$) apresentou-se ainda menor do que a presente nos enxertos ($p=0,0001$), o que sugere que o fumo reduz muito a vascularização presente no leito receptor, diminuindo o fluxo sanguíneo nestes tecidos, o que por sua vez é prejudicial à cicatrização do retalho⁴⁴. Isto pode ser um forte fator a prejudicar e diminuir o recobrimento radicular, já que os enxertos são nutridos pelos vasos oriundos do retalho. Além disso, Clarke e colaboradores⁴⁵ demonstraram que o fumo pode causar vasoconstrição e reduzir o fluxo sanguíneo gengival.

Logo, a combinação de baixo número de vasos em enxerto e retalho, vasoconstrição e diminuição do fluxo sanguíneo gengival podem ser extremamente prejudiciais ao recobrimento radicular, sendo responsável pela dificuldade em obter recobrimento radicular total e pela baixa previsibilidade e estabilidade dos resultados neste tipo de terapia.

Conclusão

5 Conclusão

Este é o primeiro estudo a verificar a exposição ao fumo em mais de um tempo de avaliação e também o primeiro a quantificar o número de vasos sanguíneos presentes no leito receptor ao enxerto de tecido conjuntivo subepitelial. Os resultados indicam que o fumo, independentemente da técnica cirúrgica testada, é um forte limitante do recobrimento radicular, diminuindo a frequência de recobrimento radicular total e aumentando a ocorrência de retrações residuais. Estes resultados devem ser levados em consideração na indicação e prognóstico destes procedimentos. Estudos futuros devem focar nos efeitos da cessação do fumo sobre a terapia e na tentativa de modulação das respostas fisiológicas dos pacientes.

Referências Bibliográficas

6 Referências bibliográficas

1. Wennstrom JL. Mucogingival therapy. *Ann Periodontol* 1996;1:671-701.
2. Oates TW, Robinson M, Gunsolley JC. Surgical therapies for the treatment of gingival recession. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:303-320.
3. Susin C, Haas AN, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Gingival recession: epidemiology and risk indicators in a representative urban Brazilian population. *J Periodontol* 2004;75:1377-1386.
4. Albandar JM, Kingman A. Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 1999;70:30-43.
5. Martins AG, Andia DC, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Junior FH. Smoking may affect root coverage outcome: a prospective clinical study in humans. *J Periodontol* 2004;75:586-591.
6. Loe H, Anerud A, Boysen H. The natural history of periodontal disease in man: prevalence, severity, and extent of gingival recession. *J Periodontol* 1992;63:489-495.
7. Khocht A, Simon G, Person P, Denepitiya JL. Gingival recession in relation to history of hard toothbrush use. *J Periodontol* 1993;64:900-905.
8. Ericsson I, Lindhe J. Recession in sites with inadequate width of the keratinized gingiva. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 1984;11:95-103.
9. Modeer T, Odenrick L. Post-treatment periodontal status of labially erupted maxillary canines. *Acta Odontol Scand* 1980;38:253-256.
10. Lindhe J, Socransky SS, Nyman S, Westfelt E. Dimensional alteration of the periodontal tissues following therapy. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1987;7:9-21.
11. Gunsolley JC, Quinn SM, Tew J, Gooss CM, Brooks CN, Schenkein HA. The effect of smoking on individuals with minimal periodontal destruction. *J Periodontol* 1998;69:165-170.
12. Muller HP, Stadermann S, Heinecke A. Gingival recession in smokers and non-smokers with minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29:129-136.
13. Ojima M, Hanioka T, Tanaka K, Inoshita E, Aoyama H. Relationship between smoking status and periodontal conditions: findings from national databases in Japan. *J Periodontol Res* 2006;41:573-579.
14. Iglesias R, Jha P, Pinto M, Silva VLC, Godinho J. Tobacco control in Brazil. No. World Bank, 2007

15. Jha P, Chaloupka FJ. Curbing the epidemic: Governments and the economics of tobacco control. No. World Bank, 1999
16. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65:260-267.
17. Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 1997;14:173-201.
18. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:356-365.
19. Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontol 2000* 2003;32:50-58.
20. Yamamoto Y, Nishida N, Tanaka M, et al. Association between passive and active smoking evaluated by salivary cotinine and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:1041-1046.
21. Preshaw PM, Hefti AF, Bradshaw MH. Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:610-616.
22. Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000* 2007;44:178-194.
23. Calsina G, Ramon JM, Echeverria JJ. Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol* 2002;29:771-776.
24. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol* 2001;28:283-295.
25. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000;71:1874-1881.
26. Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol* 1996;67:675-681.
27. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 2004;75:196-209.
28. Silva CO, Sallum AW, de Lima AF, Tatakis DN. Coronally positioned flap for root coverage: poorer outcomes in smokers. *J Periodontol* 2006;77:81-87.
29. Silva CO, de Lima AF, Sallum AW, Tatakis DN. Coronally positioned flap for root coverage in smokers and non-smokers: stability of outcomes between 6 months and 2 years. *J Periodontol* 2007;78:1702-1707.
30. Andia DC, Martins AG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH. Root coverage outcome may be affected by heavy smoking: a 2-year follow-up study. *J Periodontol* 2008;79:647-653.

31. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol* 1985;56:715-720.
32. Bouchard P, Malet J, Borghetti A. Decision-making in aesthetics: root coverage revisited. *Periodontol 2000* 2001;27:97-120.
33. Erley KJ, Swiec GD, Herold R, Bisch FC, Peacock ME. Gingival recession treatment with connective tissue grafts in smokers and non-smokers. *J Periodontol* 2006;77:1148-1155.
34. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005;32 Suppl 6:180-195.
35. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 2004;31:267-272.
36. Souza SL, Macedo GO, Tunes RS, et al. Subepithelial connective tissue graft for root coverage in smokers and non-smokers: a clinical and histologic controlled study in humans. *J Periodontol* 2008;79:1014-1021.
37. Barros RR, Novaes AB, Grisi MF, Souza SL, Taba MJ, Palioto DB. A 6-month comparative clinical study of a conventional and a new surgical approach for root coverage with acellular dermal matrix. *J Periodontol* 2004;75:1350-1356.
38. Barros R, Novaes JA, Palioto D, Souza S, Taba JM, Grisi M. A 36-month randomised controlled prospective clinical study of a conventional and a new surgical approach for root coverage with the acellular dermal matrix graft. *Perio* 2007;4:55-61.
39. Miller PD, Jr. A classification of marginal tissue recession. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1985;5:8-13.
40. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. 3. Response to local treatment. *Acta Odontol Scand* 1966;24:747-759.
41. Ainamo J, Nordblad A, Kallio P. Use of the CPITN in populations under 20 years of age. *Int Dent J* 1984;34:285-291.
42. Lorenzana ER, Allen EP. The single-incision palatal harvest technique: a strategy for esthetics and patient comfort. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:297-305.
43. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
44. Mormann W, Ciancio SG. Blood supply of human gingiva following periodontal surgery. A fluorescein angiographic study. *J Periodontol* 1977;48:681-692.
45. Clarke NG SB, Hirsch RS. . The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. . *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;52:577-582.

Artigo em Inglês

7 Artigo em Inglês

Treatment of gingival recession in severe smokers using two surgical techniques: clinical, laboratorial and histological study.

Danilo M. Reino, Graduate student of Periodontology*

Arthur B. Novaes Jr., Professor of Periodontology*

Luciana P. Maia, Graduate student of Periodontology*

Marcio F. M. Grisi, Professor of Periodontology*

Mário Taba Jr., Professor of Periodontology*

Daniela B. Palioto, Professor of Periodontology*

Sérgio L. S. Souza, Chairman of Periodontology*

* Department of Buco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Address for correspondence and reprints: Sérgio Luis Scombatti de Souza. FORP-USP – Depto. CTBMF e Periodontia. Av. do Café, s/n, Monte Alegre, CEP: 14040-904, Ribeirão Preto, SP - Brazil. Daytime Telephone: +55-16-3602-3980; Fax: +55-16-3602-4788

E-mail: scombati@forp.usp.br

Financial assistance for this study was granted by The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP 2007/08591-7). The authors report no financial relationships related to any products involved in this study.

Short running title: Root coverage in severe smokers using two techniques

Abstract

Background: The aim of this study was to evaluate the root coverage obtained by two different periodontal plastic techniques in severe smokers, analyzing clinical, laboratorial and histological parameters.

Methods: Twenty severe smokers were selected. Each patient had bilateral Miller class I or II gingival recessions in non-molar teeth. Clinical measurements of probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), recession height (RH) and recession width (RW), keratinized mucosa height (KMH) and keratinized mucosa thickness of (KMT) and height and width of the adjacent papillae were determined at baseline, 3 and 6 months. One side received coronally positioned flap, while the other side received the extended flap technique, both procedures in conjunction with the subepithelial connective tissue graft (SCTG). Biopsies from SCTGs and flaps were prepared for immunohistochemistry. Blood vessels were identified and counted by coexpression of Factor-VIII related antigen stained endothelial cells. Salivary cotinine samples were taken at baseline and after 3 and 6 months, as an indicator of the level of exposure to nicotine.

Results: Between groups or intra groups analysis showed no statistical differences for the evaluated clinical parameters. Patients maintained the same exposure to smoke during the 6 months evaluation periods. Both techniques had low root coverage (standard technique: 43.18% and test technique: 44.52%). Histomorphometry of biopsies revealed blood vessel densities of 13.49 ± 5.48 vessels/200x field for the flaps, and of 18.69 ± 4.87 vessels/200x field for the grafts ($p = 0.0001$).

Conclusion: The extend flap technique did not differ from standart technique for recession treatment of severe smoking patients.

Keywords: Gingival recession/surgery; Plastic surgery; Smoking/adverse effects; Grafts; Connective tissue.

Introduction

Periodontal plastic surgery is the name given to the procedures used to prevent, eliminate or correct anatomical, development, caused by trauma or disease induced defects in the gum or alveolar mucosa¹. The adoption of the term periodontal plastic surgery suggests an increased importance and greater concern with the aesthetics of periodontal tissues².

Aesthetic has recently received great attention in our society, which led to an increased demand for periodontal plastic surgery. Gingival recessions are the most common aesthetic gingival problems, easy to be noticed by the patients and reaching more than 50% of the population in Brazil and United States of América^{3, 4}. Thus, among the procedures of periodontal plastic surgeries, techniques that aim root coverage has been the most sought⁵.

Besides aesthetic reasons, periodontal plastic surgeries have also been indicated for the treatment of gingival recession due to dentin hypersensitivity, difficulty to remove dental plaque and occurrence of root dental caries^{1, 2}.

The predisposing factors to gingival recession are: type of tooth brush, tooth brushing frequency, stiff or very sharp bristles, traumatic brushing, alveolar bone dehiscence, periodontal disease^{6, 7}, inflammatory conditions², abnormal tooth position, thin attached gingiva⁸, high muscle attachment, labial frenum⁹ and iatrogenic factors¹⁰. Smoking is also considered a very strong factor in development of gingival recession^{3, 11-13}.

Although smoking is the leading cause of death in the world¹⁴, it is estimated that 90 thousand young people start smoking every day¹⁵, resulting in a worldwide prevalence of 1.1 billion smokers¹⁴. Smoking is one of the main risk factors for the development of periodontitis¹⁶⁻²². It affects neutrophil function, production of antibodies, fibroblasts activity and inflammatory mediators production²². When compared with non-smokers, smokers have greater pocket depth²³, higher prevalence of periodontitis and severity of gingival recession^{3, 11-13, 24, 25}.

Clinical studies have shown that smoking compromises the non-surgical and surgical therapies results^{13, 26, 27}, which results in less root coverage and stability of gingival recovery in smokers than in nonsmokers²⁸⁻³⁰. According to Oates et al², the technique described by Langer and Langer³¹ in 1985 for root coverage using subepithelial connective tissue graft

(SCTG) and coronary positioned flap (CPF), provides more predictable results among the various existing techniques^{2, 32}. However, several studies have reported a negative influence of smoking for SCTG outcomes^{5, 30, 33}.

The mechanism by which smoking affect periodontal plastic surgeries outcomes still unclear²⁹, but smoking interferes with several physiological mechanisms and cellular functions³⁴. The large amount of tobacco toxins may impair periodontal healing⁵. Smoking also decreases periodontal tissues blood flow^{33, 35, 36}, compromising the graft vascularization³³ and SCTG outcomes.

Barros et al³⁷, in 2004, described a new technique to achieve higher vascularization when using acellular dermal matrix, an avascular and acellular allograft, for root coverage. This technique consisted in enlarging the flap until the adjacent teeth of the gingival recession, and the results were superior to Langer and Langer's technique³¹: better healing and greater root coverage were achieved. Furthermore, the long-term results showed higher rates of success for the extended flap technique³⁸.

Considering the negative results of conventional root recovery techniques in smokers and the good results of the extended flap technique even for an avascular graft, the objective of this study was to compare Langer and Langer and Barros techniques, both of them associated to the SCTG, in a very severe smoker population, evaluating clinical, histological and laboratorial parameters.

Material and Methods

Patient Selection

The sample size was defined by the calculation of power test, with a significance level of 5%. For 80% of power the study would require 17 patients. Due to possible patients withdrawals, 20 patients, aged between 35 and 50 and with at least 20 teeth, were selected. All patients were heavy smokers (20 or more cigarettes per day for more than 5 years)³⁰ and had aesthetic complaints related to gingival recession. Inclusion criteria were: patients with bilateral gingival recession, Miller³⁹ class I or II, with 3 mm in height and less than 3mm of keratinized tissue in non-molar teeth. Exclusion criteria were: patients without occlusal stability, HIV patients, diabetics, pregnant women, medical history of hepatitis, chronic use of medication and periodontal pocket associated with the recession or adjacent teeth. All

patients agreed with the study protocol and signed a consent form prior to treatment. The study was approved by the Institution's Human Research Committee (protocol 2008.1.170.58.4).

Clinical and Surgical Procedures

The patients were initially submitted to oral hygiene instructions to eliminate habits related to the etiology of the recession; they also received scaling, root planing, and crown polishing. The surgical procedures were performed when biofilm and bleeding index were both below 20%⁴⁰.

Two teeth in the same arch, bilaterally, were included in the study. Clinical measurements were taken before the surgical treatment (Baseline), 3 and 6 months after surgery at the mid-buccal point of the involved tooth: a) probing pocket depth, b) clinical attachment level, c) bleeding on probing, d) gingival recession height (Figure 1A and 2A), e) gingival recession width, f) amount of keratinized tissue, g) width of the papillae adjacent to the recession, h) height of the papillae adjacent to the recession. Clinical examinations were performed by the same examiner, who was previously calibrated (intra-examiner). Computadorized force-controlled periodontal probeⁱ was used for probing depth, clinical attachment level and bleeding on probing⁴¹, and manual periodontal probe (North Carolinaⁱⁱ) was used to measure the other clinical parameters.

The patients saliva was collected at baseline, 3 and 6 months for the cotinine level evaluation. All samples were collected in the morning period, to avoid possible changes in salivary composition. Patients were instructed to avoid eating one hour before saliva collection, alcohol consumption 24 hours before and use of personal cosmetic products 30 minutes before. The patients rinsed water 10 minutes before saliva collection to prevent sample contamination. During 5 minutes the patients deposited the saliva in sterile plastic tubes, avoiding the production of bubbles. Subsequently, the contents were transferred to microtubes 3810ⁱⁱⁱ and stored at -80°C until analysis.

All surgical procedures were performed by the same surgeon. One patient side received the CPF³¹ (Control Group), and the opposite side was treated with the technique described by Barros et al³⁷ (Test Group). Both procedures used SCTG. A coin toss was used to choose the treatment for each patient side. For control group (CG) an intracrevicular incision was made in the bottom of the crevice and a partial thickness flap was elevated. Two mesial

and distal vertical releasing incisions were made without including the papillae adjacent to the area of the gingival recession (Figura 1B). The flap was divided beyond the mucogingival junction and was extended until the partial-thickness flap could be passively positioned coronally over the defect(s) without tension. Following flap elevation, the exposed root surface was gently planed with a number 5/6 Gracey curette^{iv}. The SCTG was removed previously from the palate and was sutured over the defects with 5.0 absorbable sutures^v (Figure 1C); after that, the flap was coronally positioned to completely cover the graft and sutures were made in this position (Figure 1D). The donor site received 4.0 silk sutures^{vi}.

The technique described by Barros et al³⁷ (TG) consists in an intracrevicular incision in the buccal face of the recession tooth and in the adjacent teeth to it. Releasing incisions were made in the mesial and distal teeth, without including the adjacent papillae (figure 2B). A partial-thickness flap was elevated beyond the mucogingival junction, until the flap passively cover the dental root (Figure 2). The SCTG was removed previously from the palate and was sutured over the defects with 5.0 absorbable sutures^{vii} (Figure 2C); after that, the flap was coronally positioned to completely cover the graft and sutures were made in this position (Figure 2D). The donor site received 4.0 silk sutures^{viii}.

The SCTG was removed as previously described by Lorenzana and Allen (2000)⁴², and was trimmed with Goldman-Fox scissors to fit the gingival recession area. During the surgery the following parameters were measured: a) thickness of the flap, b) graft's thickness, c) length of the graft, d) width of the graft. The "a" and "b" parameters were measured by using a digital surgical paquimeter with sterilizable removable tips^{ix}; the other parameters were measured with a manual periodontal probe (North Carolina).

At this stage, biopsies were collected from the donor and recipient sites for histological and histomorphometric analysis. The SCTG was removed with 2 mm more in width: this extra tissue was prepared for histology and histomorphometry, as described in the following section. With a new blade, a fragment of the inner portion of the flap area was removed, with minimum dimensions of approximately 3 mm X 3 mm, which was also prepared for histology and histomorphometry.

All patients were instructed to discontinue tooth brushing and to avoid trauma or pressure at the surgical site. A 0.12% chlorhexidine digluconate rinse was prescribed (twice

daily for 15 days). The sutures were removed after 15 days (in donor sites after 7 days) and the patients were instructed to clean the surgical sites with a cotton pellet soaked in a 0.12% chlorhexidine digluconate solution 2 times daily for 15 days. After that, the patients were instructed to resume atraumatic mechanical tooth cleaning in the treated areas. The patients were recalled to reinforce oral hygiene instructions, biofilm control and prophylaxis after 2 and 4 weeks, and monthly up to 6 months post-operatively.

Histology and Histomorphometry

The biopsies were immediately fixed in a 10% formalin solution for 24 hours, and then immersed in paraffin. Semi-serial 7- μ m thick histologic sections were made in a longitudinal direction. Two sections of each biopsy were stained with hematoxylin-eosin (HE), and two with Masson's trichrome for each of the groups evaluated (Test and Control).

For histomorphometry, the histological preparation was performed as described by Souza et al³⁶. Histology and histomorphometry were performed by a single examiner, blinded to the study groups. The histological sections, stained with HE and Masson's trichrome, were examined with a light microscope to evaluate and describe the histological structures. For detection and quantification of blood vessels, the slides stained with Factor-VIII related antigen were analyzed and photographed with a light microscope connected to a video camera. An image software was used for the histomorphometry of the captured images. Two sections of each biopsy were analyzed. The blood vessels of two consecutive fields of the central portion of the section were counted, and the average was considered the blood vessel density (BVD) of the section – the average of the two sections represents the BVD of the patient, and was expressed as number of vessels/200x field, as the vessel count was performed on a 200x field (20x objective and 10x ocular). Any brown-staining endothelial cell or endothelial cell cluster, clearly separate from adjacent blood vessels and other connective-tissue elements, was considered a single, countable vessel. Vessel lumen was not necessary for structure to be counted as a blood vessel, and red or other blood cells were not used to define a vessel lumen.^{36,43}.

Analysis of cotinine in saliva

Cotinine is a metabolite of nicotine and acts as an indicator of patient exposure to nicotine³³. The level of cotinine was detected by ELISA (enzymelinked immunosorbent

assay), by using the kit for quantitative analysis of cotinine present in saliva^x, following the manufacturer instructions.

Statistical analysis

Statistical analysis was comparative and non-parametric (n = 20). The Mann-Whitney test was used to compare data between groups in the baseline, 3 and 6 months postoperatively. The analysis of variance with two criteria (ANOVA) was used to compare the clinical parameters in relation to surgical techniques and evaluation times (intra-group differences: Baseline X 3 months, Baseline X 6 months). For all statistical analysis $p < 0.05$ was used.

Results

Clinical findings

Twenty patients, with a total of 40 gingival recessions were treated: 20% in first upper premolars, 50% in first lower premolars, 20% in upper canines and 10% lower canines. Both groups had similar clinical values before treatment (baseline) and there were no statistically significant differences in probing depth (CG: 1.36 ± 0.48 mm; TG: 1.31 ± 0.43 mm), clinical attachment level (CG: 4.57 ± 1.32 mm; TG: 4.77 ± 0.91 mm), height (CG: 3.21 ± 1.17 mm; TG: 3.46 ± 0.86 mm) or width (CG: 3.92 ± 0.49 mm; TG: 3.90 ± 0.39 mm) of gingival recession, height (CG: 2.15 ± 1.23 mm; TG: 1.98 ± 0.79 mm) and thickness (CG: 1.25 ± 0.32 mm; TG: 1.21 ± 0.33 mm) of keratinized mucosa. Similarly, no significant differences were found in mesial papillae's (CG: 3.43 ± 0.69 mm; TG: 3.42 ± 0.74 mm) or distal papillae's base (CG: 3.26 ± 0.83 mm; TG: 3.02 ± 0.78 mm), or in mesial papillae's (CG: 3.36 ± 1.01 mm; TG: 3.38 ± 0.61 mm) or distal papillae's height (CG: 3.37 ± 0.80 mm; TG: 3.35 ± 0.99 mm) (Table 1).

Regarding the data obtained during surgical procedures, only the length of the connective tissue graft had statistically significant difference between groups (CG: 11.97 ± 1.93 mm; TG: 14.97 ± 3.69 mm, $p = 0.01$); for flap thickness (CG: 0.86 ± 0.20 mm; TG: 0.93 ± 0.35 mm, $p = 0.29$), width (CG: 9.70 ± 2.56 mm; TG: 9.76 ± 1.41 mm, $p = 0.81$) and thickness (CG: 1.60 ± 0.27 mm; TG: 1.63 ± 0.41 mm, $p = 0.19$) of the connective tissue graft, no statistical differences were found.

No clinical complications occurred during the recovery of all patients and the bleeding index and plaque was kept below 20%. For 3 (Figures 1E and 2E) and 6 (Figures 1F and 2F)

months post-operative, comparisons between groups showed no statistical differences in the clinical parameters analyzed (Table 1).

The two way analysis of variance was used to compare residual recessions between surgical techniques in the evaluated times. Both surgical techniques reduced the recession size at 3 months and 6 months ($p < 0.01$) compared to baseline, but there was no difference between surgical techniques (CG versus TG) at 3 and 6 months (Table 1). The same analysis showed no differences when comparing between groups or intra groups in reducing the recession width (Table 1). Although the surgical procedures have increased the height and thickness of keratinized mucosa (Table 1), the differences intra and between groups were not statistically significant. Although the root coverage, as well the recession width reduction in TG was numerically superior to CG (Table 1), this difference was not statistically significant. The root coverage frequency is shown in Figure 3.

Laboratorial findings

The cotinine analysis showed that patients had similar exposure to the components of tobacco during the evaluation period (baseline: 416 ± 283 ng/ml, 3 months: 393 ± 260 ng/ml and 6 months: 310 ± 145 ng/ml; $p = 0.34$). Histological examination showed absence of inflammatory infiltrate and presence of dense connective tissue, blood vessels, endothelial cells, collagen and fat tissue in biopsies from palate and flap. Histomorphometry for quantification of blood vessels (Figure 4) did not demonstrate statistically significant differences (Table 2) between groups, but the flap had fewer vessels than the palate graft ($p < 0.05$).

Discussion

The objective of this study was to compare the use of a new technique for root coverage (TG – Barros' technique)³⁷, with the standard technique (CG – Langer & Langer's technique)³¹ for gingival recessions treatment in severe smokers. The proposed treatments were able to decrease the recession height (difference intra groups $p < 0.01$), but the root coverage in CG after 3 (38.39%) and 6 months (43.18 %), and in TG after 3 (47.25%) and 6 months (44.52%) was low. There were no statistically differences between groups. The same occurred with decreasing width of the recession to CG after 3 (9.79%) and 6 months (12.88%) and to TG after 3 (15.99%) and 6 months (22, 91%). These results are in agreement

with the literature, which shows that smokers have worse outcomes in gingival recession treatment than non-smokers, with^{5, 33, 36} or without the use of SCTG^{28, 29}.

The low root coverage for both techniques are in agreement with Martins et al⁵, who treated severe smokers (more than 20 cigarettes per day) and non smokers using SCTG and found 58.84% of average for root coverage of the smokers group. These results were reinforced by Andia et al³⁰, who also used SCTG in severe smokers. After 2 years, only 50% of root coverage was achieved. Similar results were presented by Souza et al³⁶, who treated smokers (more than 10 cigarettes per day) and obtained 58.02% of root coverage after 6 months.

Most of studies differ on the amount of tobacco consumed by patients, causing some difficulties in comparing the results. As a solution to this problem, Erley et al³³ analyzed salivary cotinine, a biomarker for nicotine exposure, to verify the accuracy of information provided by patients regarding their smoking habits. Non-smokers and smokers (consume of 10 to 20 cigarettes per day - average cotinine values = 40ng/ml) were select. The results showed a high correlation ($r = 0.97$) between cotinine and low root coverage. Therefore, this condition would be dose dependent: higher exposure to tobacco would lead to lower root coverage. After 6 months, Erley et al³³ reported that root coverage average in smokers was 76.6%. One possible explanation for this value (substantially higher than other studies in smokers) is that probably there was less tobacco exposure than reported (less than 20 cigarettes per day), or a possible reduction in tobacco consumption after the surgeries. This may be particularly true because there was no monitoring of tobacco exposure during the follow-up period; the cotinine level was verified only in the baseline. None of the previous studies in the literature verified the occurrence of variations in smoke exposure during periodontal healing.

This is the first study which involved cotinine examination in 3 different times, working as a monitor of patient tobacco exposure. The average cotinine did not differ ($p=0,34$) between baseline (416 ± 283 ng / ml), 3 (393 ± 260 ng / ml) and 6 months (310 ± 145 ng / ml) but were much higher than reported by Erley³³ (approximately 8 to 10 times higher), probably due to the patients smoking over 20 cigarettes per day. Thus, exposure to smoking was uniform during the study period and the interference of tobacco occurred in

same intensity and frequency. These high cotinine values may be an important causal factor for low root coverage in both groups.

Smoking also was able to limit the occurrence of complete root coverage: after 6 months, only 2 cases (5% of cases treated), both in TG, and none in the CG (difference not statistically significant). Souza et al³⁶ reported complete root coverage in 6.7% of cases, Erley³³ reported 25% and Andia et al³⁰ none. These results are very worrying to clinicians, because the improvement in aesthetics generated by small decrease of recession and low predictability of complete root coverage may not satisfy smokers. The damage caused by tobacco in severe smokers seems to be intense enough to cause less than 50% (67.5% of cases) of root coverage, while for Souza et al³⁶ most of the smokers had root coverage between 50% and 99% (60% of cases).

For all other clinical parameters, as probing depth, clinical attachment level, width and height of recessions, height and thickness of keratinized mucosa and for height and width of the mesial and distal papillae, there were no statistically significant differences between or intra groups. For transoperative parameters, such as flap thickness, width and thickness of graft, there were also no differences between groups. Only the length of the graft was higher for TG (14.97 ± 3.69) when compared to CG (11.97 ± 1.93), which is justified because the standard technique restricts the length of graft by demanding releasing incisions near the recession.

The test technique showed in previous studies^{37, 38} increase in predictability of root coverage, probably by improvement in flap vascularization, favoring the healing of a completely avascular graft, like acellular dermal matrix. In this study, Barros technique was not more efficient than standard technique. This can be attributed to the extreme damage that successive years of high exposure to various toxic substances presents in tobacco can cause to the periodontium and adjacent tissues. Souza et al³⁶ counted blood vessels present in biopsies of SCTG and found that smokers (more than 10 cigarettes a day) had an average of 36.53 ± 10.23 vessels per field observed, corresponding to 30% fewer vessels than non-smokers. In this study, graft biopsies had almost half number of vessels reported by Souza et al³⁶ ($18,69 \pm 4,87$). Thus, severe smokers may have extreme impairment of vascular volume, which can strongly affect the nutrition of the graft and difficult to periodontal healing and root coverage. Flaps had even less vessels (13.49 ± 5.48) than grafts ($p = 0.0001$), suggesting

that smoking greatly reduces the flap vascularization and blood flow in these tissues, which is detrimental to the flap healing⁴⁴. This can be a strong factor to undermine and diminish root coverage, because the grafts are nourished by vessels coming from the flap. In addition, Clarke et al⁴⁵ showed that smoking can cause vasoconstriction and reduce blood flow to the gums. Thus, the combination of low number of vessels in graft and flap, vasoconstriction and decreased blood flow to gum can be extremely harmful to root coverage, and it is responsible for the difficulty in obtaining complete root coverage and for the low predictability and stability of the results in this type of therapy.

Conclusion

This is the first study to evaluated exposure to smoking in more than one assessment time and also the first to quantify the number of blood vessels present in the recipient bed of the connective tissue graft. The results indicate that severe smoking, regardless of surgical technique tested, is a strong limitation for root coverage, reducing the frequency of complete root coverage and increasing the occurrence of residual recession. These results should be taken into account in the indication and prognosis of these procedures. Future studies should focus on the effects of smoking cessation on therapy and in an attempt to modulate patient physiological response.

Acknowledgements

The authors thank the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP, protocol number 2007/08591-7) and the Brazilian Foundation for the Improvement of Higher Education (CAPES) for the financial support to this study. The authors also thank the laboratory technicians Fabíola Singaretti de Oliveira e Vani Correa.

Conflict of Interest Statement

The authors report no financial relationships related to any products involved in this study.

References

1. Wennstrom JL. Mucogingival therapy. *Ann Periodontol* 1996;1:671-701.
2. Oates TW, Robinson M, Gunsolley JC. Surgical therapies for the treatment of gingival recession. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:303-320.
3. Susin C, Haas AN, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Gingival recession: epidemiology and risk indicators in a representative urban Brazilian population. *J Periodontol* 2004;75:1377-1386.
4. Albandar JM, Kingman A. Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 1999;70:30-43.
5. Martins AG, Andia DC, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Junior FH. Smoking may affect root coverage outcome: a prospective clinical study in humans. *J Periodontol* 2004;75:586-591.
6. Loe H, Anerud A, Boysen H. The natural history of periodontal disease in man: prevalence, severity, and extent of gingival recession. *J Periodontol* 1992;63:489-495.
7. Khocht A, Simon G, Person P, Denepitiya JL. Gingival recession in relation to history of hard toothbrush use. *J Periodontol* 1993;64:900-905.
8. Ericsson I, Lindhe J. Recession in sites with inadequate width of the keratinized gingiva. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 1984;11:95-103.
9. Modeer T, Odenrick L. Post-treatment periodontal status of labially erupted maxillary canines. *Acta Odontol Scand* 1980;38:253-256.
10. Lindhe J, Socransky SS, Nyman S, Westfelt E. Dimensional alteration of the periodontal tissues following therapy. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1987;7:9-21.
11. Gunsolley JC, Quinn SM, Tew J, Gooss CM, Brooks CN, Schenkein HA. The effect of smoking on individuals with minimal periodontal destruction. *J Periodontol* 1998;69:165-170.
12. Muller HP, Stadermann S, Heinecke A. Gingival recession in smokers and non-smokers with minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29:129-136.
13. Ojima M, Hanioka T, Tanaka K, Inoshita E, Aoyama H. Relationship between smoking status and periodontal conditions: findings from national databases in Japan. *J Periodontol Res* 2006;41:573-579.
14. Iglesias R, Jha P, Pinto M, Silva VLC, Godinho J. Tobacco control in Brazil. No. World Bank, 2007
15. Jha P, Chaloupka FJ. Curbing the epidemic: Governments and the economics of tobacco control. No. World Bank, 1999

16. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65:260-267.
17. Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 1997;14:173-201.
18. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:356-365.
19. Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontol 2000* 2003;32:50-58.
20. Yamamoto Y, Nishida N, Tanaka M, et al. Association between passive and active smoking evaluated by salivary cotinine and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:1041-1046.
21. Preshaw PM, Hefti AF, Bradshaw MH. Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:610-616.
22. Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000* 2007;44:178-194.
23. Calsina G, Ramon JM, Echeverria JJ. Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol* 2002;29:771-776.
24. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol* 2001;28:283-295.
25. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000;71:1874-1881.
26. Kaldahl WB, Johnson GK, Patil KD, Kalkwarf KL. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol* 1996;67:675-681.
27. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 2004;75:196-209.
28. Silva CO, Sallum AW, de Lima AF, Tatakis DN. Coronally positioned flap for root coverage: poorer outcomes in smokers. *J Periodontol* 2006;77:81-87.
29. Silva CO, de Lima AF, Sallum AW, Tatakis DN. Coronally positioned flap for root coverage in smokers and non-smokers: stability of outcomes between 6 months and 2 years. *J Periodontol* 2007;78:1702-1707.
30. Andia DC, Martins AG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH. Root coverage outcome may be affected by heavy smoking: a 2-year follow-up study. *J Periodontol* 2008;79:647-653.
31. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol* 1985;56:715-720.

32. Bouchard P, Malet J, Borghetti A. Decision-making in aesthetics: root coverage revisited. *Periodontol 2000* 2001;27:97-120.
33. Erley KJ, Swiec GD, Herold R, Bisch FC, Peacock ME. Gingival recession treatment with connective tissue grafts in smokers and non-smokers. *J Periodontol* 2006;77:1148-1155.
34. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005;32 Suppl 6:180-195.
35. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 2004;31:267-272.
36. Souza SL, Macedo GO, Tunes RS, et al. Subepithelial connective tissue graft for root coverage in smokers and non-smokers: a clinical and histologic controlled study in humans. *J Periodontol* 2008;79:1014-1021.
37. Barros RR, Novaes AB, Grisi MF, Souza SL, Taba MJ, Palioto DB. A 6-month comparative clinical study of a conventional and a new surgical approach for root coverage with acellular dermal matrix. *J Periodontol* 2004;75:1350-1356.
38. Barros R, Novaes JA, Palioto D, Souza S, Taba JM, Grisi M. A 36-month randomised controlled prospective clinical study of a conventional and a new surgical approach for root coverage with the acellular dermal matrix graft. *Perio* 2007;4:55-61.
39. Miller PD, Jr. A classification of marginal tissue recession. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1985;5:8-13.
40. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. 3. Response to local treatment. *Acta Odontol Scand* 1966;24:747-759.
41. Ainamo J, Nordblad A, Kallio P. Use of the CPITN in populations under 20 years of age. *Int Dent J* 1984;34:285-291.
42. Lorenzana ER, Allen EP. The single-incision palatal harvest technique: a strategy for esthetics and patient comfort. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:297-305.
43. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
44. Mormann W, Ciancio SG. Blood supply of human gingiva following periodontal surgery. A fluorescein angiographic study. *J Periodontol* 1977;48:681-692.
45. Clarke NG SB, Hirsch RS. . The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. . *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;52:577-582.

Figure Legends:

Figure 1: Control group - A = baseline, B = incisions performed, C = graft positioned and sutured, D = sutures of the flap, E = result after 3 months, F = result after 6 months.

Figure 2: Barros technique- A = baseline, B = incisions, C = graft positioned, D = sutures of the flap, E = result after 3 months, F = result after 6 months.

Figure 3: Frequency of root coverage obtained in Test Group and Control Group.

Figure 4: Histological biopsies from CG. Representative examples of blood vessel density: Graft (A) and Flap (B). Endothelial cells are marked in brown. Factor VIII related antigen staining, original magnification x20.

Table 1: Average and standard deviations of clinical parameters and cotinine assessed at baseline, 3 and 6 months for Test and Control Groups.

	baseline			3 months			6 months		
	CG	TG	p	CG	TG	p	CG	TG	p
PPD	1,36 ±	1,31 ±	0,64	1,61 ±	1,99 ±	0,82	1,59 ±	2,04 ±	0,76
(mm)	0,48	0,43		0,49	0,36		0,54	0,58	
CAL	4,57 ±	4,77 ±	0,51	3,58 ±	3,44 ±	0,65	3,83 ±	4,05 ±	0,38
(mm)	1,32	0,91		1,33	1,20		1,33	1,27	
HR	3,21 ±	3,46 ±	0,35	1,97 ±	1,84 ±	0,63	1,84 ±	2,01 ±	0,40
(mm)	1,17	0,86		1,03	1,08		1,08	1,18	
WR	3,92 ±	3,90 ±	0,86	3,55 ±	3,24 ±	0,29	3,42 ±	3,27 ±	0,63
(mm)	0,49	0,39		0,87	1,01		0,95	1,38	
KMH	2,15 ±	1,98 ±	0,50	2,55 ±	2,68 ±	0,56	2,26 ±	2,17 ±	0,59
(mm)	1,23	0,79		1,15	0,90		1,02	0,77	
KMT	1,25 ±	1,21 ±	0,58	2,32 ±	2,38 ±	0,59	2,01 ±	2,05 ±	0,73
(mm)	0,32	0,33		0,58	0,66		0,53	0,57	
DPW	3,43 ±	3,42 ±	0,94	3,32 ±	3,23 ±	0,62	3,38 ±	3,31 ±	0,68
(mm)	0,69	0,74		3,23	0,68		0,66	0,74	
MPW	3,26 ±	3,02 ±	0,29	3,15 ±	2,77 ±	0,09	3,22 ±	2,84 ±	0,05
(mm)	0,83	0,78		0,74	0,70		0,81	0,70	
MPH	3,36 ±	3,38 ±	0,91	0,62 ±	3,28 ±	0,82	3,28 ±	3,20 ±	0,64
(mm)	1,01	0,61		1,05	0,74		1,00	0,84	
DPH	3,37 ±	3,35 ±	0,93	3,27 ±	3,10 ±	0,38	3,28 ±	3,14 ±	0,51
(mm)	0,8	0,99		0,8	1,02		0,80	1,03	
% RC	na	na		38,39	47,25	0,29	43,18	44,52	0,87
% DRW	na	na		9,79	15,99	0,41	12,88	22,91	0,68
Cotinine	416 ± 283			393 ± 260			310 ± 145		

PPD = probing pocket depth, CAL = clinical attachment level, RH = recession height, WR = recession width, KMH = keratinized mucosa height, KMT = keratinized mucosa thickness, DPW = base of the distal papilla, MPW = base of the mesial papilla, MPH = mesial papilla height, DPH = distal papilla height, RR = root coverage, DRW = decrease in width gingival recession. P values obtained by Mann Whitney test, comparison between groups at the same time of evaluation. Comparison between groups for several time by ANOVA, p values> 0.05.

Table 2: Average and standard deviation of blood vessels count (vessels per 200x field) in biopsies from grafts and flaps.

	Graft			Flap		
	CG	TG	p	CG	TG	p
Average	18,99 ± 5,74	18,39 ± 3,95	0,7	13,50 ± 6,03	13,49 ± 5,02	1,00
Total average	18,69 ± 4,87			13,49 ± 5,48		0,0001

P values obtained by Mann Whitney test.

Figure 3

ⁱ Flórida Probe Corporation, Gainesville, FL, U.S.A.

ⁱⁱ Hu-Friedy, Chicago, IL, U.S.A.

ⁱⁱⁱ Eppendorf do Brasil Ltda, Sao Paulo, SP, Brasil

^{iv} Hu-Friedy, Chicago, IL, U.S.A.

^v Vicryl, Ethicon, Somerville, NJ, E.U.A

^{vi} Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil

^{vii} Vicryl, Ethicon, Somerville, NJ, E.U.A

^{viii} Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil

^{ix} Mitutoyo Sul Americana, Suzano, SP, Brasil

^x Salimetrics Inc, State College, PA, EUA