UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ADRIANA CORRÊA DE QUEIROZ

**Avaliação do uso de matriz óssea bovina inorgânica associada ao
peptídeo de adesão celular no tratamento de defeitos infra-ósseos
em pacientes com periodontite agressiva. Estudo clínico,
radiográfico e laboratorial em humanos.**

Ribeirão Preto

2008

ADRIANA CORRÊA DE QUEIROZ

Avaliação do uso de matriz óssea bovina inorgânica associada ao peptídeo de adesão celular no tratamento de defeitos infra-ósseos em pacientes com periodontite agressiva. Estudo clínico, radiográfico e laboratorial em humanos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

Ribeirão Preto

2008

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

Queiroz, Adriana Corrêa de

Avaliação do uso de matriz óssea bovina inorgânica associada ao peptídeo de adesão celular no tratamento de defeitos infra-ósseos em pacientes com periodontite agressiva. Estudo clínico, radiográfico e laboratorial em humanos. Ribeirão Preto, 2008.

96p.: 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.Periodontite agressiva. 2.Regeneração periodontal. 3.Enxerto ósseo.
4. Matriz óssea bovina inorgânica associada ao peptídeo de adesão celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriana Corrêa de Queiroz

Avaliação do uso de matriz óssea bovina inorgânica associada ao peptídeo de adesão celular no tratamento de defeitos infra-ósseos em pacientes com periodontite agressiva. Estudo clínico, radiográfico e laboratorial em humanos.

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: ____ / ____ / 2009

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À MINHA FAMÍLIA

PAULO E CÉLIA, meus pais, sinônimos do amor supremo, a quem, nem com todas as palavras do mundo, eu conseguiria agradecer por tanta felicidade que sempre me proporcionaram. E nem com todos os meus sentimentos poderia retribuir tanta proteção e amor.

ANA PAULA, minha referência no mundo, meu maior apoio, quem, de alguma forma, sempre desenhou as trilhas dos meus caminhos. TATIANA, grande ligação espiritual, minha saudade absoluta durante o tempo de ausência. Minhas irmãs, os mais belos e eternos amores da minha vida, com quem divido as conquistas e pra quem voltarei para sentirmos eternamente o doce sabor da infância.

AO MEU AMOR

GUSTAVO, que ao meu lado fez tudo ter uma razão especial, alegrando minha vida com seu amor. Amor que preencheu os espaços das angústias e saudades, sempre me dando segurança pra superar tudo. Mesmo quando separados, sempre estivemos juntos. Juntos, alcançamos esse nosso objetivo. Juntos, vivemos todos os momentos. E juntos, construiremos nossa felicidade.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por minha saúde, por sempre permitir que eu busque meus caminhos e pelas bênçãos infinitas.

Aos MEUS PAIS, Paulo e Célia, por me darem todas as condições de que precisei para chegar aqui, sempre com muita disposição e amor. Pelos valores que me ensinaram, maior herança que poderiam me dar.

Às MINHAS IRMÃS, Ana Paula, por abrir as portas desse trajeto, me inspirar e cuidar de mim durante os anos em Bauru, e Tatiana, por suportar os momentos em que estive ausente e que tanto nos fizeram falta.

Ao meu namorado, GUSTAVO, pela participação indispensável em todas as etapas, pelo apoio, amor, paciência, admiração e, principalmente, pelas palavras e gestos certos, nas horas certas.

Ao meu primo-irmão, MAURO e meus cunhados, FERNANDO e MARCELO, por completarem minha família e pelo carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. SÉRGIO LUÍS SCOMBATTI DE SOUZA, pela orientação, por confiar em mim em todos os momentos, pela convivência amistosa e pela grande oportunidade de aprendizado que me proporcionou.

Aos PACIENTES participantes da pesquisa, por sua paciência e disponibilidade.

Aos docentes do curso de mestrado em Periodontia da FORP-USP, Prof. Dr. ARTHUR BELÉM NOVAES JÚNIOR, Prof. Dr. MÁRCIO FERNANDO DE MORAES GRISI, Prof. Dr. MÁRIO TABA JÚNIOR e Prof. Dra. DANIELA BAZAN PALIOTO, pelo convívio, pelas oportunidades de trabalho oferecidas e pelos aprendizados transmitidos.

À Reitora da Universidade de São Paulo, Prof. Dra. SUELY VILELA SAMPAIO.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Prof. Dr. OSVALDO LUIZ BEZZON.

Ao Chefe do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial e Periodontia, Prof. Dr. LUIZ ANTÔNIO SALATA.

À presidente da Comissão de Pós-graduação da FORP-USP, Prof. Dra. LÉA ASSED BEZERRA DA SILVA

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Periodontia, Prof. Dr. ARTHUR BELÉM NOVAES JÚNIOR

Às minhas amigas, irmãs escolhidas, LUCIANA, ANDRÉA, RENATA E FERNANDA, e ao meu amigo MARCUS, por me acompanharem há muitos anos e por nunca me deixaram duvidar dos laços de amizade verdadeira que nos unem.

Aos colegas de curso, amigos conquistados, com quem dividi tudo desde o início. Compartilhar com vocês os bons e maus momentos fez tudo parecer mais simples.

PRISCILA NÓBREGA, pelo grande apoio no atendimento aos pacientes que a faz parte integrante e indispensável desse trabalho. Todos esses momentos, na pesquisa e fora dela, fortaleceram nossa amizade a cada dia. Agradeço pelo carinho e pelos muitos ensinamentos que me transmitiu. Tua estrela vai brilhar muito mais ainda e estarei onde for pra te aplaudir.

GERMANA, pela amizade instantânea e leal, que me acompanhará sempre, pelo grande afeto e por cada situação que vivemos e que guardarei com muita ternura. Sei que sentiremos saudades do que vivemos. Sei que te acompanharei, à distância. Mas sempre sentirás meu pensamento e minha torcida bem perto.

ANNELISSA, grande coração, pelo enorme carinho e cuidado que sempre me fizeram muito bem

PRISCILA PAGANINI e FLÁVIA, que aos poucos conquistaram lugar especial e que, com grande satisfação, me acompanharão na continuação desse caminho.

Família Macedo, GUILHERME, pelas “missões” que confiou a mim e pelo divertido convívio na clínica e nos “coffee breaks”, salvação nos atendimentos intermináveis aos pacientes; MÔNICA, pela preocupação, companhia agradável,

comilanças e muitas conversas e PEDRO, por sempre alegrar nossas reuniões. Família querida que me acolheu afetuosamente. Torço pela felicidade e pela harmonia, porque o sucesso virá com a competência e dedicação com que desempenham suas funções.

Aos demais amigos dos cursos de mestrado e doutorado, especialmente PATRÍCIA, RAQUEL, RAFAEL, INGRID E KARINA, pelo carinho, convívio harmonioso e trabalho conjunto.

À FABÍOLA OLIVEIRA, pela orientação e ajuda indispensáveis na realização dos ensaios imunoenzimáticos.

À ANDRÉA MARCACCINI, por sua colaboração nos procedimentos de coleta de fluido gengival.

Aos todos os funcionários e professores dos cursos de especialização em Periodontia (PROFIS) e Implantodontia (HRAC-USP), especialmente SEBASTIÃO LUIZ DE AGUIAR GREGUI, DANIEL ROMEU BENCHIMOL DE RESENDE, ANA LÚCIA POMPEIA FRAGA DE ALMEIDA E LUIZ EDUARDO MARQUES PADOVAN, pelo estímulo e por tudo que me ensinaram.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFAM, especialmente minha orientadora na iniciação científica e monografia, MARIA AUGUSTA BESSA REBELO, pelo carinho e por me apresentar à pesquisa científica.

Aos meus amigos de colégio, graduação e especialização, especialmente CAROL, JOANA, RENATA, IZABELA, GEÍSA, KIZZE, ANA, MILENA, GABRIELA, JOSÉ SÉRGIO, JOÃO, FERNANDO E WENDEL pelos muitos momentos de que me recordo com saudades.

Aos amigos emprestados de Bauru; à turma de ortodontia do Centrinho, à turma de prótese da PROFIS e da FOB e à turma de dentística da FOB. LARI, TATI, GUI, THIAGO, MARCELO, LUD, MANU, LEANDRO, OZÂNIO, PATRÍCIA, ARTHUR, AMILKAR, MONI, SANTIAGO, JEAN, ZEZO, DANIEL, PAULO, PATI, MARCELO, KARLA,

CÍNTIA, POLLI, FLÁVIA, PAULA, LU, KARIN, ANTÔNIO. A todos agradeço pela acolhida e bons momentos.

À MINHA FAMÍLIA, tios e primos, especialmente TIAS CLÉA, CLEUDA, CLOÉ, EDNA E SHEILA, pelas preces, apoio e torcida.

À FAMÍLIA PIMENTEL, por me acolherem com amor, me incentivando sempre.

Aos funcionários da FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO da Universidade de São Paulo, especialmente TATIANA, DULCE, SUELI, ZILDA, ISABEL E REGIANE por tudo que fizeram, sempre com disposição, pra me ajudar nessa jornada.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, pelo apoio financeiro e à COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR, pela bolsa de mestrado concedida.

Enumerar todos que deram alguma contribuição para que eu chegasse aqui, na minha vida e na minha profissão, é impossível. Afinal, todos que passam “deixam algo de si e levam um pouco de nós”. Mas, consigo agradecer a todos em pensamento. E como, apesar de estar atingindo um objetivo, estou apenas começando, precisarei mais ainda de quem já está comigo e de tantos outros que virão. Agradeço também a todos que, durante meu período de doença, mostraram preocupação. Esses momentos têm somente um lado bom que é sentir o carinho das pessoas. Obrigada a todos por tantas coisas! Sem vocês, nada seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
JUSTIFICATIVA	xiv
RESUMO.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Seleção de pacientes e procedimentos clínicos iniciais	29
2.2 Coleta de Fluido Gengival (FG)	30
2.3 Procedimentos radiográficos	31
2.4 Procedimentos cirúrgicos.....	32
2.5 Procedimentos Laboratoriais	34
2.6 Análise Estatística	35
3 RESULTADOS	41
3.1 Resultados clínicos.....	41
3.2 Resultados radiográficos	42
3.3 Resultados laboratoriais	46
4 DISCUSSÃO.....	50
5 CONCLUSÃO	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
7 ARTIGO EM INGLÊS	66
8 ANEXOS.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PAg: periodontite agressiva

PAg-G: periodontite agressiva generalizada

PAg-L: periodontite agressiva localizada

P-15: peptídeo 15 (peptídeo de adesão celular)

RTG: regeneração tecidual guiada

PTFEe: politetrafluoretileno expandido

MOI: matriz óssea inorgânica

DFDBA: aloenxerto ósseo desmineralizado seco e congelado

PS: profundidade de sondagem

NIR: nível de inserção relativo

RG: recessão gengival

JCE: junção cimento-esmalte

BRD: base rafiográfica do defeito

CA: crista alveolar

FG: fluido gengival

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

pH: potencial hidrogeniônico

IL-1 β : interleucina-1 beta

IL-6: interleucina-6

ELISA: ensaio imunoenzimático

rpm: rotações por minuto

mm: milímetro

nm: nanômetro

pg/ μ l: picograma por microlitro

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A periodontite é uma doença multifatorial, caracterizada pela perda de inserção periodontal e iniciada pela presença de biofilme bacteriano.^{1,2} É representada por um grupo de doenças que se diferenciam quanto à etiologia, progressão e resposta às terapias.³ De acordo com a Academia Americana de Periodontia⁴, a doença periodontal pode ser classificada em crônica e agressiva. A periodontite crônica apresenta perda de inserção lenta ou moderada, sendo mais prevalente em adultos. Já a periodontite agressiva (PAg) é caracterizada por uma rápida perda de inserção e destruição óssea, além de um padrão de agregação familiar. De acordo com o número de dentes acometidos e algumas características como presença de anticorpos específicos contra os agentes infecciosos, a periodontite agressiva pode ser classificada em localizada ou generalizada.⁴

Apesar de ser a forma menos prevalente de doença periodontal (0,1 a 5%⁵), o tratamento de pacientes com periodontite agressiva representa um grande desafio para o clínico, já que causa severa destruição dos tecidos de suporte em pacientes relativamente jovens.⁶ Por ser rara, poucos estudos avaliaram como tratar essa condição. Quase todos os procedimentos terapêuticos visam interromper o processo de inflamação através de tratamentos conservadores ou cirúrgicos que suprimam o crescimento de bactérias patogênicas.⁷ Contudo, uma vez que as lesões periodontais já tenham ocorrido, também é um objetivo restaurar os tecidos destruídos pela doença, através de terapias periodontais regenerativas.⁸

A regeneração periodontal é caracterizada pela formação de novo cemento com fibras colágenas inseridas, novo ligamento periodontal e novo osso alveolar.⁹ Muitos procedimentos e materiais, como regeneração tecidual guiada, enxertos

ósseos e fatores de crescimento, têm sido aplicados para alcançar a regeneração periodontal.¹⁰⁻¹² Uma das mais bem documentadas técnicas regenerativas é a regeneração tecidual guiada (RTG), que envolve a colocação de uma membrana sobre os defeitos periodontais e superfícies radiculares desnudas, permitindo, assim, que as células do ligamento periodontal e osso repovoem seletivamente os espaços isolados.¹³⁻¹⁵ Muitos estudos clínicos demonstraram que a RTG é uma modalidade de tratamento periodontal regenerativo que apresenta bons resultados.¹⁰

Os enxertos e substitutos ósseos têm demonstrado que levam a resolução dos defeitos periodontais ao promoverem diminuição da profundidade de sondagem, ganho no nível clínico de inserção e preenchimento dos defeitos.¹⁶ Contudo, a principal limitação associada ao uso desses materiais na regeneração periodontal é que eles não controlam os eventos celulares que levam à formação de nova inserção periodontal na cicatrização.¹⁷

Outro foco em inúmeras pesquisas têm sido identificar e sintetizar moduladores biológicos que possam potencializar a regeneração de tecidos periodontais perdidos. O primeiro e principal passo a ser alcançado na engenharia tecidual é desenvolver a habilidade das células em aderir ao biomaterial, permitindo diferenciação celular capaz de levar a produção e organização de uma matriz extracelular.¹⁸ Contudo, a principal limitação dos biomateriais é a ausência de uma cadeia quimicamente reativa que facilite essa ligação celular.¹⁹ Dessa forma, alguns pesquisadores concentraram seus estudos na adesão celular. No tecido ósseo, o colágeno do tipo I fornece um arcabouço estrutural e é indispensável na cascata de eventos que levam à formação de novo osso. Além disso, a interação de células com o colágeno modula a sua proliferação, migração, diferenciação e expressão gênica.¹⁸ Qian e colaboradores²⁰ identificaram a atividade biológica de uma

seqüência de 15 peptídeos análoga à seqüência ⁷⁶⁶GTPGPQGIAGQRGVV⁷⁸⁰ da cadeia α 1 do colágeno tipo I, com capacidade de estimular a migração, proliferação e diferenciação celulares. Assim, com a função de facilitar o início dessa cascata de eventos celulares em arcabouços biologicamente inertes, foi proposta a associação do P-15 com matriz inorgânica natural de origem bovina (MOI). Comercialmente apresentado como PepGen P-15, esse material pode atuar com um habitat biomimético para células, com funções semelhantes às exercidas pelo colágeno, servindo como um arcabouço bioativo na terapia de defeitos periodontais.²¹ Já foi observado que, *in vitro*, P-15 promove maior adesão e espraimento celulares e atividade específica de fosfatase alcalina em culturas de fibroblastos e osteoblastos.²²⁻²⁴ Em humanos, estudos clínicos demonstraram resolução de defeitos periodontais, com diminuição da profundidade de sondagem e preenchimento desses defeitos.^{21, 25-29}

Esses estudos, no entanto, foram desenvolvidos em pacientes portadores de doença periodontal crônica. A periodontite agressiva, como já mencionado, é caracterizada por destruição grave e rápida do aparato de inserção periodontal, geralmente com presença de defeitos verticais ou infra-ósseos. Dessa forma, o estudo de opções terapêuticas que proporcionem a regeneração desses tecidos precocemente perdidos e permitam a manutenção da dentição parece ser de grande valor.

Referências bibliográficas

1. Flemmig TF. Periodontitis. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:32-38.
2. Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:54-64.
3. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* 1997;14:216-248.
4. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:i, 1-112.
5. Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontology 2000* 2002;29:153-176.
6. Moreira RM, Feres-Filho EJ. Comparison between full-mouth scaling and root planing and quadrant-wise basic therapy of aggressive periodontitis: 6-month clinical results. *Journal of periodontology* 2007;78:1683-1688.
7. Miliauskaite A, Selimovic D, Hannig M. Successful management of aggressive periodontitis by regenerative therapy: a 3-year follow-up case report. *Journal of periodontology* 2007;78:2043-2050.
8. Zucchelli G, Bernardi F, Montebugnoli L, De SM. Enamel matrix proteins and guided tissue regeneration with titanium-reinforced expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of intrabony defects: a comparative controlled clinical trial. *Journal of periodontology* 2002;73:3-12.
9. Caton JG, Greenstein G. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontology 2000* 1993;1:9-15.
10. Murphy KG, Gunsolley JC. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:266-302.
11. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:227-265.
12. Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:193-204.

13. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 1982;9:290-296.
14. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *Journal of clinical periodontology* 1984;11:494-503.
15. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontology 2000* 1993;1:26-35.
16. Garrett S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1996;1:621-666.
17. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Kenney EB, Vasilic N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. *Journal of periodontology* 2001;72:583-589.
18. Yang XB, Bhatnagar RS, Li S, Oreffo RO. Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation. *Tissue engineering* 2004;10:1148-1159.
19. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue engineering* 2001;7:679-689.
20. Qian JJ, Bhatnagar RS. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res* 1996;31:545-554.
21. Barros RR, Novaes AB, Jr., Roriz VM, et al. Anorganic bovine matrix/p-15 "flow" in the treatment of periodontal defects: case series with 12 months of follow-up. *Journal of periodontology* 2006;77:1280-1287.
22. Lallier TE, Palaiologou AA, Yukna RA, Layman DL. The putative collagen-binding peptide P-15 promotes fibroblast attachment to root shavings but not hydroxyapatite. *Journal of periodontology* 2003;74:458-467.
23. Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, Li S. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;311:179-186.
24. Hole BB, Schwarz JA, Gilbert JL, Atkinson BL. A study of biologically active peptide sequences (P-15) on the surface of an ABM scaffold (PepGen P-15) using AFM and FTIR. *Journal of biomedical materials research* 2005;74:712-721.
25. Bhongade ML, Tiwari IR. A comparative evaluation of the effectiveness of an anorganic bone matrix/cell binding peptide with an open flap debridement in human infrabony defects: a clinical and radiographic study. *The journal of contemporary dental practice* 2007;8:25-34.

26. Matos SM, Guerra FA, Krauser J, Marques F, Ermida JM, Sanz M. Clinical evaluation of the combination of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P-15) in particulate and hydrogel form as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month reentry controlled clinical study. *Journal of periodontology* 2007;78:1855-1863.
27. Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, et al. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *Journal of periodontology* 1998;69:655-663.
28. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *Journal of periodontology* 2000;71:1671-1679.
29. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *Journal of periodontology* 2002;73:123-128.

RESUMO

RESUMO

Introdução: As periodontites agressivas (PAg) compõem um grupo de formas rapidamente progressivas da doença periodontal. A restauração do periodonto é um objetivo da terapia periodontal, sendo a regeneração tecidual guiada (RTG) e o uso de substitutos ósseos técnicas bem documentadas. Em pesquisas recentes, foi demonstrado o envolvimento de uma cadeia de 15 aminoácidos do colágeno (P-15) na diferenciação celular de fibroblastos e osteoblastos. A associação de matriz óssea inorgânica bovina com o P-15 (MOI/P-15) tem apresentado bons resultados. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a eficácia da MOI/P-15 no tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos em pacientes com periodontite agressiva, tendo como controle o uso de membrana de PTFEe com reforço de titânio

Metodologia: Foram selecionados 15 pacientes com PAg, com pelo menos dois defeitos periodontais infra-ósseos (profundidade de sondagem (PS) ≥ 4 mm e componente infra-ósseo ≥ 3 mm). Foi adotado o modelo boca dividida, sendo realizadas cirurgias regenerativas com MOI/P-15 (GT) de um lado e membrana de PTFEe (GC) do outro. As medidas clínicas de PS, nível de inserção relativo (NIR) e recessão gengival (RG) foram registradas no exame inicial e após 6 meses. Exames radiográficos padronizados foram feitos no exame inicial e após 3 e 6 meses e radiografias de subtração foram realizadas. Medidas lineares e de área foram registradas. Foram colhidas amostras do fluido gengival antes da cirurgia e aos 3 e 6 meses pós-operatórios e a presença de interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) foi quantificada através de ensaio imunoenzimático.

Resultados: Houve redução significativa na PS, de $2,27 \pm 0,96$ mm ($P < 0,001$) para o GT e de $2,57 \pm 1,06$ mm para o GC ($P < 0,001$); aumento significativo no NIR, de $1,87 \pm 0,94$ mm ($P < 0,001$) para o GT e $2,09 \pm 0,88$ mm ($P < 0,001$) para o GC; e aumento significativo na RG, de $0,58 \pm 0,29$ mm ($P < 0,001$) para GT e $0,64 \pm 0,47$ mm ($P < 0,001$) para o GC. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros, tanto no exame inicial quanto após 6 meses. Na análise radiográfica, as radiografias de subtração apresentaram ganho médio de área radiopaca em relação ao defeito inicial de 93,16% para o GT, contra 62,03% para o GC. O preenchimento radiográfico do defeito foi maior ($P = 0,002$) para GT (2,49 mm) que para GC (0,73 mm). Houve um aumento progressivo da densidade radiográfica para ambos os grupos, sem diferenças estatisticamente significantes. Na análise das citocinas, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações intra e entre os grupos.

Conclusão: No tratamento de defeitos infra-ósseos em pacientes com PAg-G, em um período de 6 meses, não foram observadas diferenças significantes entre as duas modalidades terapêuticas avaliadas (MOI/P-15 e RTG) quanto aos parâmetros clínicos e quantificação de citocinas. GT apresentou preenchimento radiográfico do defeito superior ao apresentado por GC.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A periodontite agressiva (PAg) afeta uma minoria dos pacientes com doença periodontal, mas é altamente significativa por ser caracterizada por severa destruição dos tecidos dentais de suporte.¹ De acordo com a classificação da Academia Americana de Periodontia², as características da PAg são rápida perda de inserção e destruição óssea, bem como um padrão de agregação familiar. A periodontite agressiva só é considerada uma classe independente de doença em pacientes clinicamente saudáveis. Aspectos secundários, como alterações na resposta do hospedeiro, proporções elevadas de patógenos específicos, relação inconsistente entre os depósitos microbianos e a severidade da doença ou destruição óssea auto-limitante, podem ou não ser observadas. A PAg pode ser classificada em (a) Periodontite Agressiva Localizada (PAg-L) quando se inicia na puberdade, apresenta anticorpos séricos contra os agentes infecciosos em quantidade significativa, é localizada em incisivos e primeiros molares com perda de inserção interproximal em pelo menos dois dentes permanentes, sendo um deles primeiro molar, envolvendo não mais que dois dentes além dos primeiros molares e incisivos; ou (b) Periodontite Agressiva Generalizada (PAg-G), geralmente afetando pacientes abaixo dos 30 anos de idade, com pobre resposta sérica de anticorpos contra os agentes infecciosos, expressiva destruição da inserção e do osso alveolar de natureza episódica, bem como perda de inserção interproximal generalizada, afetando pelo menos três dentes permanentes que não sejam primeiros molares e incisivos.²

Embora alguns fatores, como susceptibilidade do hospedeiro, possam influenciar o desenvolvimento da periodontite agressiva, é bem estabelecido que as

bactérias da placa bacteriana são o principal fator etiológico da doença. As bactérias subgengivais e seus produtos estimulam as células do hospedeiro a liberar numerosos mediadores inflamatórios como prostaglandinas e citocinas, causando inflamação periodontal.³

A periodontite agressiva é de difícil tratamento e geralmente leva a extensa destruição óssea.⁴ A destruição severa do aparato de suporte dos dentes é geralmente caracterizada por defeitos verticais infra-ósseos profundos. Nesse aspecto, um tratamento mais efetivo deveria buscar não apenas controlar o processo infeccioso-inflamatório, prevenindo a progressão da doença, mas também regenerar com sucesso as estruturas perdidas.

A restauração completa e previsível do periodonto continua sendo um objetivo crítico em Periodontia.⁵ Embora a regeneração periodontal, isto é, a formação de novos osso e cemento com ligamento periodontal inserido, seja possível após a realização de diversas modalidades periodontais terapêuticas, os resultados alcançados nem sempre são previsíveis.⁶ Entre as possibilidades de tratamento, regeneração tecidual guiada (RTG), enxertos de biomateriais e aplicação de agentes biológicos têm sido usados para alcançar regeneração periodontal, com taxas de sucesso variadas.^{5,7,8}

O princípio da RTG é baseado no uso de membranas absorvíveis ou não-absorvíveis. A técnica da RTG atrasa a migração apical do epitélio gengival, excluindo o tecido conjuntivo gengival, e permite que o tecido de granulação derivado do ligamento periodontal e do osso repovoe o espaço adjacente à superfície radicular desnuda.⁸ Muitos estudos clínicos têm demonstrado que a RTG é uma modalidade de tratamento que apresenta sucesso dentre as cirurgias periodontais reconstrutivas.⁸ O padrão-ouro para os materiais utilizados para RTG

são as membranas de politetrafluoretileno expandido (PTFEe).⁹ A habilidade de manter espaço, protegendo o coágulo e permitindo a formação de novos tecidos, é uma das principais características ideais das membranas. Nesse contexto, as membranas reforçadas por titânio são uma evolução das membranas de PTFEe, mostrando maior ganho de inserção clínica em relação àquele obtido com membranas sem reforço, podendo inclusive deslocar o nível de inserção clínica coronalmente à crista óssea interproximal.^{10,11}

Outra maneira de direcionar a regeneração periodontal é utilizando enxertos ou substitutos ósseos. Uma grande variedade de materiais têm sido aplicada e avaliada clinicamente, incluindo enxertos autógenos, aloenxertos, xenoenxertos e materiais sintéticos ou semi-sintéticos.¹² A principal limitação associada com o uso de enxertos e substitutos ósseos em regeneração periodontal é que, apesar de eles exercerem um papel positivo no crescimento ósseo, eles não controlam previsivelmente os eventos celulares que levam à formação de nova inserção.¹³

Com o objetivo de desenvolver modalidades biológicas de tratamento que possam melhorar a cicatrização tecidual, alguns investigadores têm estudado a adesão celular.¹⁴ No que diz respeito aos tecidos ósseos, uma sequência de 15 aminoácidos do colágeno tipo I responsável pela adesão celular foi identificada. Um análogo dessa sequência de aminoácidos (P-15) foi sinteticamente produzido e, em estudos *in vitro*, promoveu adesão celular com alta afinidade, espreadimento celular e atividade específica de fosfatase alcalina em culturas fibroblásticas e osteoblásticas.¹⁵⁻¹⁷ Dessa forma, a incorporação destes peptídeos sobre a microestrutura de enxerto ósseo inorgânico poderia mimetizar as propriedades do colágeno na promoção da adesão, migração e diferenciação celulares, proporcionando um ambiente que imita a microarquitetura do tecido com uma

distribuição tridimensional dos ligantes para receptores de matriz extracelular.¹⁸ O PepGen P-15 (Dentsply / Ceramed) é a apresentação comercial dessa associação de matriz óssea inorgânica (MOI) com P-15 (MOI/P-15).¹⁴ Em humanos, estudos clínicos têm demonstrado que a combinação MOI/P-15 mostrou melhor preenchimento do defeito quando comparado com defeitos tratados com aloenxerto ósseo desmineralizado liofilizado (DFDBA), debridamento do defeito e matriz óssea inorgânica.^{14,19} Evidências de regeneração periodontal já foram relatadas, e resultados favoráveis após três anos sugerem um efeito benéfico no tratamento de defeitos infra-ósseos em longo prazo.^{20,21}

Os métodos tradicionais de acompanhamento de tratamentos periodontais são as avaliações clínicas e radiográficas. Contudo, avanços nas pesquisas de diagnóstico periodontal estão direcionando os métodos para que o risco e a atividade periodontal possam ser identificados e quantificados por meio de biomarcadores, que podem ser encontrados em amostras de fluido gengival, soro e saliva.²² A interleucina-1 é uma das principais citocinas produzidas em sítios inflamados e está envolvida na iniciação e progressão da destruição de tecidos conjuntivos.²³ Ela é secretada em duas formas moleculares, IL-1 α e IL-1 β , por uma variedade de células incluindo macrófagos, células B, neutrófilos, fibroblastos e células epiteliais.²⁴ Dentre as isoformas, a IL-1 β é o agente mais potente, apresentando diversas atividades biológicas envolvidas nos processos pró-inflamatórios, degradação de matriz e cicatrização tecidual.^{24,25} A interleucina-6, produzida pela mesmas variedades de células que produzem a IL-1 β ,²⁶ é uma proteína multifuncional, que estimula a secreção de imunoglobulinas²⁷ e está associada à reabsorção óssea em conjunto com outras moléculas.^{28,29} Muitas pesquisas têm investigado a possível correlação entre a concentração dessas

citocinas no fluido gengival e tecidos gengivais e o grau de inflamação dos tecidos periodontais,^{3,25-27,30-39} principalmente em sítios sadios e doentes. Não existem, contudo, estudos que tenham quantificado as concentrações de citocinas em sítios submetidos a procedimentos regenerativos.

Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo clínico randomizado e controlado foi comparar, através de parâmetros clínicos, radiográficos e moleculares, o uso de ABM/P-15 ou membranas com reforço de titânio no tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos em pacientes com PAg-G.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção de pacientes e procedimentos clínicos iniciais

O estudo incluiu pacientes com (i) PAg-G (de acordo com os critérios da classificação internacional feita pela Academia Americana de Periodontologia, em 1999²; (ii) no mínimo 20 dentes presentes; (iii) bom estado de saúde geral e (iv) idade entre 16 a 35 anos. Foram excluídos do estudo pacientes que: (a) fossem diagnosticados com periodontite crônica²; (b) estivessem grávidas ou em período de amamentação; (c) apresentassem alguma alteração sistêmica; (d) estivessem fazendo uso crônico de anti-inflamatórios; (e) tivessem recebido tratamento periodontal nos últimos 6 meses; (f) fossem alérgicos à penicilina ou ao metronidazol. Foi obtido um termo de consentimento de todos os pacientes selecionados para o estudo e o protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Foram selecionados para o estudo 15 pacientes, com idade de variou de 21 a 33 anos, cujo plano de tratamento incluía cirurgias periodontais regenerativas em defeitos periodontais infra-ósseos bilaterais. Os pacientes inicialmente receberam instruções de higiene oral e terapia periodontal básica. Foram feitas sessões de raspagem e alisamento radicular em intervalo de até 24 horas (duas sessões de duas horas), utilizando curetas periodontais de Gracey[¶] e instrumentos ultra-sônicos[♢], sob anestesia local. Todos os pacientes receberam antibioticoterapia (Amoxicilina 500mg três vezes ao dia e Metronidazol 400mg, duas vezes ao dia, durante 10 dias, começando um dia antes da primeira sessão de instrumentação mecânica).

[¶] Hu-Friedy instruments, Chigago, IL, USA.

[♢] Cavitron, Dentsply Cavitron, Long Island, NY, USA.

O plano de tratamento adequado foi instituído para cada paciente, sendo realizadas, quando necessário, complementações das raspagens subgengivais, extrações dentárias e cirurgias periodontais de acesso. Durante esse período, controle de placa e instrução de higiene oral foram feitos semanalmente. Após toda a terapia periodontal básica ter sido concluída, nos pacientes em que havia a indicação para tratamento periodontal regenerativo em dois defeitos periodontais infra-ósseos bilaterais (com componente infra-ósseo maior ou igual a 3 mm), as cirurgias periodontais regenerativas foram programadas. No exame inicial (após tratamento periodontal não-cirúrgico e cirúrgico para a descontaminação das superfícies radiculares e antes das cirurgias regenerativas) foram mensurados os seguintes parâmetros clínicos: recessão gengival (RG); profundidade de sondagem (PS); e nível clínico de inserção relativo (NIR), com sonda periodontal eletrônica computadorizada[£]. Para padronização dos exames, uma placa acrílica individualizada foi confeccionada para cada paciente. Ranhuras verticais guiaram o posicionamento das sondas e ranhuras horizontais atuaram como ponto fixo para determinação do NIR. As medidas clínicas foram reavaliadas após 6 meses.

2.2 Coleta de Fluido Gengival (FG)

Foram obtidas amostras de FG dos sítios tratados cirurgicamente, com o objetivo de avaliar a influência do tratamento periodontal regenerativo nos biomarcadores teciduais (IL-1 β e IL-6). Para tal, os dentes foram secados e isolados com rolos de algodão, a placa supragengival foi removida e filtros de papel[¥] foram introduzidos no sulco gengival de cada sítio e deixados por 30 segundos. Os filtros de papel porventura

[£] Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA.

[¥] Periopaper, Oraflow Inc., Plainview, NY, USA.

contaminados por sangue e/ou saliva foram descartados. Foram coletados 12 filtros de papel por sítio, com intervalos de 3 minutos entre as coletas. O equipamento Periotron 6000[#] foi utilizado para determinar a quantidade de FG. Uma curva padrão correlacionando volumes conhecidos com valores obtidos pelo aparelho foi obtida e, a partir de um programa para análises estatísticas[€], uma regressão polinomial de quarta ordem foi aplicada ponto-a-ponto para determinação do volume de FGC colhido de cada sítio. Após a coleta, os filtros de papel foram imediatamente colocados em tubos *ependorf* esterilizados e armazenados a -80°C. O mesmo procedimento foi feito 3 e 6 meses após a terapia periodontal regenerativa.

2.3 Procedimentos radiográficos

Radiografias periapicais padronizadas foram obtidas no exame inicial, 3 e 6 meses após a cirurgia periodontal. As radiografias foram realizadas com a técnica do paralelismo, empregando uma unidade de raios-X e um sensor digital^{¶¶} e armazenadas no formato *tagged image file format* (TIFF). Para padronização geométrica, foi utilizado um posicionador radiográfico^{ϕϕ} conectado a um registro de mordida feito com material de moldagem^{££}. As medidas foram tomadas com auxílio de programa de computador específico^{¥¥}. Os parâmetros radiográficos lineares e de densidade foram obtidos nas radiografias convencionais. Os parâmetros de área foram obtidos na radiografia inicial e de subtração. As medidas lineares avaliadas foram: distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar (JCE-CA), definindo o preenchimento do defeito, e

[#] Oraflow Inc., Plainview, NY, USA

[€] GraphPad Prism, demo version 5.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA

^{¶¶} RVG Trophy, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA

^{ϕϕ} XCP, Rinn Corporation, Elgin, IL, USA

^{££} Optosil® Comfort Putty, Heraeus Kulzer South America Ltda., SP, Brazil

^{¥¥} Image Tool for Windows, Version 3.00, UTHSCSA, San Antonio, TX, USA.

distância entre a junção cimento-esmalte e a base radiográfica do defeito (JCE-BRD), caracterizando a reabsorção da crista óssea.⁴⁰ Para calcular as mudanças nos níveis de cinza, caracterizando a variação na densidade radiográfica, regiões de interesse padronizadas (16 pixels²) foram definidas para cada defeito. Quatro regiões foram selecionadas para cada radiografia: uma na parte mais apical do defeito; uma no centro da distância entre a base do defeito e a crista alveolar; uma logo abaixo da crista óssea; e a última em uma região distante, não-tratada, em que não deveriam ser registradas alterações na densidade, atuando como controle.⁴¹

As radiografias iniciais e as obtidas após 6 meses foram utilizadas para realização de radiografias de subtração, com auxílio de um programa de computador específico[§]. Previamente, as imagens tiveram os níveis de cinza calibrados entre si e foram alinhadas geometricamente após a determinação de quatro pontos de referência em comum. Na imagem subtraída, mudanças entre radiografias foram retratadas como uma área escura para perda densidade radiográfica, um cinza neutro para nenhuma diferença e uma área clareada para aumento da densidade radiográfica. As áreas dos defeitos (mm²) foram medidas nas radiografias iniciais, tendo como referências a crista óssea, a lâmina dura, a base do defeito e a superfície radicular; e nas radiografias de subtração, em que foram calculadas as áreas de aumento de densidade radiográfica (área mais radiopaca).

2.4 Procedimentos cirúrgicos

Após a administração de anestesia local, retalhos de espessura total foram elevados, permitindo acesso a todas as superfícies dos defeitos, que foram

[§] Emago Dental Software, Oral Diagnostics Dental Systems, Amsterdam, The Netherlands

cuidadosamente debridados; a seguir, foram realizados raspagem e alisamento radiculares. Para se obter uma efetiva descontaminação da superfície radicular, EDTA 24%, pH neutro, em 3% carbopol gel, foi aplicado durante 2 minutos, seguido de irrigação abundante com solução salina estéril e aspiração contínua. Um defeito, escolhido aleatoriamente, foi tratado com MOI/P-15 (grupo teste - GT) e o outro com RTG (grupo controle - GC). No GT, o enxerto^{##} foi colocado nos defeitos até as cristas ósseas adjacentes. No GC, uma membrana interproximal de PTFEe reforçada por titânio^{§§} foi recortada e moldada de forma a permitir a sua adaptação precisa à zona interproximal do defeito ósseo. Posteriormente, a membrana foi colocada no nível ou coronalmente à crista óssea, cobrindo completamente os defeitos, com sobreposição de pelo menos 3 mm do osso residual.⁴² Os retalhos foram então suturados, de modo a recobrir totalmente a membrana e o enxerto (quando necessário, foi realizado posicionamento coronal para garantir o completo recobrimento). Os pacientes foram orientados a enxaguar a boca duas vezes por dia com solução de digluconato de clorexidina 0,12% por 2 semanas, e antibioticoterapia sistêmica (amoxicilina 500 mg / ácido clavulânico 125 mg), foi prescrita por 10 dias, três vezes por dia, começando 24 horas antes do procedimento. nimesulida 100 mg também foi receitada, duas vezes ao dia, durante 5 dias. Profilaxias semanais foram realizadas durante o primeiro mês de pós-operatório e mensalmente a partir de então. Em casos de exposição das membranas, a partir do dia de detecção da exposição foi prescrita doxiciclina 100 mg, a cada 12 horas no primeiro dia e uma vez ao dia (a cada 24 horas) até a remoção das membranas.⁴³ Os pacientes foram orientados a limpar cuidadosamente os sítios tratados com cotonete embebido em solução de digluconato de clorexidina a 0,12% duas vezes por dia. Quatro semanas após a cirurgia, os sítios tratados com membranas PTFEe passaram por uma segunda cirurgia, a fim de removê-

^{##} PepGen P-15®, Dentsply Friadent CeraMed, Lakewood, CO, USA.

^{§§} TRI1/TRI2, Gore-Tex Regenerative Material, W.L. Gore & Associates Inc., Flagstaff, AZ, USA

las. A mesma abordagem cirúrgica descrita anteriormente foi aplicada para obter acesso à membrana, que foi delicadamente removida de modo a não perturbar os tecidos subjacentes em regeneração. Após a remoção, o retalho foi reposicionado e cuidadosamente suturado, recobrando totalmente o tecido.

2.5 Procedimentos Laboratoriais

As amostras de fluido gengival previamente absorvidas pelos filtros de papel, obtidas em cada sítio, foram eluídas em 600 µl de solução tampão (PBS - *phosphate buffered saline*) contendo 0,1% de solução Tween 20^{||} e 1 µl de coquetel de inibidores de protease^o. Os tubos foram agitados por 30 minutos e centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. A amostra foi dividida em alíquotas para a quantificação das citocinas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA - *enzymelinked immunosorbent assay*). Os biomarcadores avaliados foram a IL-1β e IL-6, através do uso de kits laboratoriais específicos^{yy}. Todos os reagentes foram levados a temperatura ambiente e a solução diluente foi adicionada em cada poço, que já apresentava o anticorpo monoclonal específico contra a citocina a ser quantificada previamente aderido. Os padrões e amostras foram adicionados aos poços, permitindo a ligação da citocina ao anticorpo imobilizado. Após um período de incubação de três horas para a IL-1β e de duas horas para a IL-6, os poços foram lavados com solução tampão fornecida pelo fabricante e um segundo anticorpo policlonal específico contra a citocina e conjugado a uma enzima (fosfatase alcalina) foi adicionado. A placa foi novamente incubada e lavada em seguida. Foi adicionado em todos os poços o substrato (NADPH), que inicia a reação colorimétrica catalisada pela fosfatase alcalina, seguido de incubação e adição de solução

^{||} USB Corpo., Cleveland, OH, USA

^o Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

^{yy} Human Quantikine HS IL-1β/IL-6, ELISA kit, HSLB00C/HS600B R&D Systems, Minneapolis,

amplificadora da reação colorimétrica, que é proporcional à quantidade da citocina adicionada no primeiro passo. Após novo período de incubação, a solução de parada foi adicionada. O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados utilizando um leitor de placas para ELISA^o, com absorvância em 490 nm. A curva padrão feita com os padrões fornecidos no kit serviram como parâmetro para a determinação das concentrações das proteínas. A diluição ótima encontrada para a IL-1 β foi de 1:140 e IL-6 não foi diluída. Sítios com níveis de citocina abaixo dos limites de detecção do teste foram estatisticamente estimadas como metade do menor valor detectado.⁴⁴

2.6 Análise Estatística

Os dados foram registrados como média e seus respectivos desvios-padrão para os parâmetros clínicos e radiográficos e como média e seus respectivos erros-padrão para a quantificação de citocinas e a unidade experimental foi o indivíduo. Como foi adotado o modelo experimental boca dividida (*split mouth*), os dados foram considerados pareados. A análise estatística foi realizada através da aplicação de testes não-paramétricos. Para a comparação entre os resultados obtidos em GC e GT e também para comparação intragrupos antes e após o tratamento foi aplicado o teste Wilcoxon. Já nas análises em que três parâmetros foram comparados simultaneamente (comparação intragrupos nos períodos inicial, 3 e 6 meses) foi aplicado o teste de Friedman. Quando detectada diferença estatisticamente significativa, o teste de comparações múltiplas de Dunn foi aplicado para identificar entre quais variáveis encontrava-se a diferença estatística. Para todas as análises estatísticas, foi adotado nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

^o μ Quant, Biotek Instruments, Vermont, USA

Figura 1. **A.** Sondagem com a ponta "stent", utilizando a marcação na placa como batente; **B.** Sondagem com a ponta "pocket"; **C** e **D.** Modificação do posicionador radiográfico com registro de mordida confeccionado com material de moldagem; **E.** Periopaper antes da coleta do FG; **F.** Periotron sendo calibrado para zero antes da coleta; **G.** Periopaper posicionado no sulco gengival; **H.** Periopaper após a coleta; **I.** Periotron marcando o valor correspondente ao volume de FG coletado; **J.** Periopaper sendo armazenado em tubos Eppendorf.

Figura 2. **A** e **B.** Aspecto clínico inicial; **C** e **D.** Defeitos infra-ósseos já debridados e com as superfícies radiculares já raspadas e tratadas com a solução de EDTA. **E.** Aplicação da MOI/P-15 (PepGen P-15) no grupo teste. **F.** Adaptação e sutura da membrana de PTFEe com reforço de titânio na região interproximal no grupo controle.

Figura 3. A e B. Sutura dos retalhos; C. Aspecto da membrana no momento da sua remoção; D. Aspecto do tecido neo-formado sob a membrana; E Aspecto clínico 6 meses após as cirurgias no grupo teste; F. Aspecto clínico 6 meses após as cirurgias no grupo controle.

Figura 4. **A.** Defeito periodontal infra-ósseos antes do tratamento regenerativo no grupo teste; **B.** Defeito periodontal infra-ósseo antes do tratamento regenerativo; **C.** Radiografia tomada 3 meses após a cirurgia no grupo teste; **D.** Radiografia tomada 3 meses após a cirurgia no grupo controle; **E.** Radiografia tomada 6 meses após a cirurgia no grupo teste; **F.** Radiografia tomada 6 meses após a cirurgia no grupo teste; **G.** Radiografia digital de subtração para o grupo teste, com setas indicando área de ganho de densidade; **H.** Radiografia digital de subtração para o grupo controle, com setas indicando área de ganho de densidade

3 RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Resultados clínicos

A única intercorrência durante a cicatrização pós-operatória foi a exposição das membranas. Uma exposição das porções coronal e/ou interproximal da membrana de PTFEe foi observada entre a segunda e a quarta semanas após o procedimento cirúrgico em 11 casos, e tratada conforme o protocolo previamente descrito até a remoção das mesmas. Nenhuma outra complicação, como reações alérgicas, abscessos ou infecções foi registrada no decorrer do estudo.

A análise estatística mostrou que não havia diferenças entre os grupos quanto aos parâmetros clínicos iniciais (PS, NIR e RG). Após 6 meses, reduções significantes na PS de $5,36 \pm 1,28$ para $3,09 \pm 0,84$ mm ($P < 0,001$) e de $5,41 \pm 1,23$ para $2,85 \pm 0,50$ mm ($P < 0,001$) foram observadas para GT e GC, respectivamente. O NIR diminuiu de $10,31 \pm 1,29$ para $8,45 \pm 1,18$ mm ($P < 0,001$) no GT e de $11,15 \pm 1,28$ para $9,05 \pm 1,43$ ($P < 0,001$) no GC. Em ambos os grupos houve aumento significativo na RG, de $0,27 \pm 0,44$ para $0,86 \pm 0,54$ ($P < 0,001$) no GT e de $0,29 \pm 0,48$ para $0,92 \pm 0,71$ ($P < 0,001$) no GC. Para a comparação entre os grupos foram calculadas as diferenças entre as medidas iniciais e finais para cada grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos parâmetros. Os resultados clínicos alcançados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros clínicos iniciais e após 6 meses (média $\pm$ dp)

Parâmetro	Inicial	6 meses	Valor de P	Diferença (inicial para 6 meses)
PS (mm)				Redução na PS
GT	5,36 $\pm$ 1,28	3,09 $\pm$ 0,84	<0,001*	2,27 $\pm$ 0,96
GC	5,41 $\pm$ 1,23	2,85 $\pm$ 0,50	<0,001*	2,57 $\pm$ 1,06
Valor de P	1,00	0,476		0,408
NIR (mm)				Ganho no NIR
GT	10,31 $\pm$ 1,29	8,45 $\pm$ 1,18	<0,001*	1,87 $\pm$ 0,94
GC	11,15 $\pm$ 1,28	9,05 $\pm$ 1,43	<0,001*	2,09 $\pm$ 0,88
Valor de P	0,057	0,099		0,495
RG (mm)				Aumento na RG
GT	0,27 $\pm$ 0,44	0,86 $\pm$ 0,54	<0,001*	0,58 $\pm$ 0,29
GC	0,29 $\pm$ 0,48	0,92 $\pm$ 0,71	<0,001*	0,64 $\pm$ 0,47
Valor de P	1,00	0,910		0,629

GC: grupo controle; GT: grupo teste; PS: profundidade de sondagem; NIR: nível de inserção relativo; RG: recessão gengival

Wilcoxon Signed Ranks Test

* Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$)

3.2 Resultados radiográficos

Na avaliação das medidas lineares (JCE-CA e JCE-BRD), não havia diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nas radiografias iniciais. Observou-se um aumento da JCE-CA para os dois grupos, caracterizando a presença de reabsorção da crista óssea alveolar para ambos. Apesar de GC apresentar uma maior reabsorção ($-0,67 \pm 1,05$ mm) quando comparada com a reabsorção apresentada pelo GT ($-0,32 \pm 1,04$ mm), não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,382$). Em relação à JCE-BRD, houve uma redução estatisticamente significativa de $6,07 \pm 1,72$ para $3,58 \pm 1,45$ mm apenas para GT ($P = 0,002$). Para GC, também houve redução (de $6,22 \pm 1,59$ para $5,48 \pm 1,02$ mm), porém sem significância estatística. Quando comparadas as medidas obtidas após 6

meses, GC apresentou $5,48 \pm 1,02$ mm, distância significativamente maior ($P=0,001$) que a apresentada pelo GT ($3,58 \pm 1,45$ mm). As diferenças entre as medidas inicial e final ($2,49 \pm 1,88$ mm para GT e $0,73 \pm 1,21$ mm para GC) foram estatisticamente diferentes entre grupos ($P=0,002$). As medidas lineares obtidas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Medidas radiográficas lineares (média $\pm$ dp)

Parâmetro	Inicial	6 meses	Valor de P	Diferença (inicial para 6 meses)
JCE-CA (mm)				Reabsorção óssea
GT	$2,82 \pm 1,21$	$3,14 \pm 1,63$	$0,278$	$-0,32 \pm 1,04$
GC	$3,57 \pm 1,10$	$4,24 \pm 1,08$	$0,064$	$-0,67 \pm 1,05$
Valor de P	$0,278$	$0,221$		$0,382$
JCE-BRD (mm)				Preenchimento linear do defeito
GT	$6,07 \pm 1,72$	$3,58 \pm 1,45$	$0,002^*$	$2,49 \pm 1,88$
GC	$6,22 \pm 1,59$	$5,48 \pm 1,02$	$0,172$	$0,73 \pm 1,21$
Valor de P	$0,599$	$0,001^*$		$0,002^*$

GC: grupo controle; GT: grupo teste; JCE-CA: distância entre a junção cimento-esmalte e a crista alveolar; JCE-BRD: distância entre a junção cimento-esmalte e a base radiográfica do defeito.

Wilcoxon Signed Ranks Test

* Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$)

Em relação às medidas de área, foi observada diferença estatisticamente significativa entre a medida inicial e o defeito residual ($P < 0,001$) para os dois grupos. A área radiopaca medida nas radiografias de subtração foi estatisticamente maior ($P=0,011$) no GT ($6,20 \pm 2,52$ mm) que no GC ($3,52 \pm 1,31$ mm). As medidas radiográficas de área estão apresentadas na Tabela 3. Percentualmente, a área radiopaca na radiografia de subtração correspondia a 93,23% do defeito inicial para GT e 64,12% para GC (Figura 5).

Tabela 3. Medidas radiográficas de área (média $\pm$ dp)

Área (mm ²)	Defeito inicial (radiografia inicial)	Área radiopaca (radiografia subtração)	Valor de P	Defeito residual
GT	6,65 $\pm$ 2,87	6,20 $\pm$ 2,52	0,115	0,45 $\pm$ 1,06
<i>P</i> < 0,001*				
GC	5,49 $\pm$ 1,32	3,52 $\pm$ 1,31	0,005*	1,97 $\pm$ 1,88
<i>P</i> < 0,001*				
Valor de P	0,151	0,011*		0,054

GC: grupo controle; GT: grupo teste

Wilcoxon Signed Ranks Test

* Diferença estatisticamente significativa (*P* < 0,05)

Figura 5. Porcentagem da área radiopaca em relação ao defeito ósseo inicial

As medidas dos níveis de cinza estão apresentadas na Tabela 4 e na Figura 6. Observa-se um aumento gradativo da média dos níveis de cinza para ambos os grupos. O teste de Wilcoxon não revelou diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos tempos avaliados (*P*=0,311 para as radiografias iniciais, *P*= 0,753 para as radiografias de 3 meses e *P*=0,600 para as radiografias de 6 meses). O

teste de Friedman apontou diferenças intragrupos estatisticamente significantes ($P=0,049$ para GT e $P=0,004$ para GC), comparando-se os três tempos de monitoramento. Para identificar entre quais grupos estavam as diferenças encontradas, foi aplicado o pós-teste de Dunn, que identificou que as diferenças significativas estavam entre as radiografias iniciais e as radiografias pós-operatórias de 6 meses para os dois grupos ($P<0,05$ para GT e $P<0,01$ para GC).

Tabela 4. Média dos níveis de cinza (média $\pm$ dp)

	Inicial	3 meses	6 meses	Valor de P^a
GT	73,42 $\pm$ 34,21	86,03 $\pm$ 31,86	91,47 $\pm$ 32,38	0,049*
$P^b < 0,05^*$				
GC	66,37 $\pm$ 34,80	70,58 $\pm$ 36,74	75,64 $\pm$ 36,35	0,004*
$P^b < 0,01^*$				
Valor de P^c	0,311	0,753	0,600	

GC: grupo controle; GT: grupo teste;

^a Friedman Test

^b Dunn's Multiple Comparisons Test

^c Wilcoxon Signed Ranks Test

* Diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$)

Figura 6. Média dos níveis de cinza (GC:grupo controle; GT: grupo teste)

3.3 Resultados laboratoriais

A quantificação das citocinas está representada na Tabela 5. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das comparações intra e intergrupos. Contudo, numericamente, observou-se entre o exame inicial e o feito após 6 meses um aumento gradativo da concentração das citocinas, tanto pra IL-1 β quanto para a IL-6, para os dois grupos (Figura 7 e Figura 8).

Tabela 5. Concentração das citocinas presentes no FG (média $\pm$ epm)

[] citocinas (pg/ μ l)	Inicial	3 meses	6 meses	Valor de P ^a
IL-1 β				
GT	4,94 $\pm$ 1,09	7,25 $\pm$ 2,12	8,60 $\pm$ 3,03	0,210
GC	6,26 $\pm$ 1,77	8,51 $\pm$ 2,59	10,06 $\pm$ 3,38	0,927
Valor de P^b	0,311	0,753	0,600	
IL-6				
GT	0,34 $\pm$ 0,62	0,63 $\pm$ 0,94	0,67 $\pm$ 0,72	0,436
GC	0,26 $\pm$ 0,29	0,41 $\pm$ 0,65	0,52 $\pm$ 0,49	0,338
Valor de P^b	0,610	0,695	0,844	

GC: grupo controle; GT: grupo teste

^a Friedman Test^b Wilcoxon Signed Ranks Test Figura 7. Médias das concentrações de IL-1 β no FG (GC: grupo controle; GT: grupo teste)

Figura 8. Médias das concentrações de IL-6 no FG (GC:grupo controle; GT: grupo teste)

4 DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Os resultados clínicos deste estudo demonstraram que a RTG e a aplicação de MOI/P-15 (PepGen P-15) promoveram redução estatisticamente significativa na PS e ganho no NIR em sítios com defeitos infra-ósseos em pacientes com periodontite agressiva generalizada. Os pacientes com PAg-G apresentam alta susceptibilidade ao desenvolvimento e progressão das lesões periodontais, com destruição severa dos tecidos de suporte em idade relativamente precoce.⁴⁵ Poucos estudos avaliaram tratamentos periodontais regenerativos em pacientes com periodontite agressiva. A maioria deles são séries de casos, apresentando reduções significativas de PS e ganho no NIR após técnicas de RTG, uso de enxertos ósseos e aplicação de matriz derivada de esmalte.^{4,42,46,47} Mengel et al.⁴⁸ estudaram a eficácia da RTG e do vidro bioativo no tratamento de defeitos infra-ósseos em pacientes com PAg-G e verificaram, após 12 meses, uma redução na PS de 4 mm e 3,8 mm e ganho no NIR de 3,4 mm e de 2,8 mm para os grupos tratados com RTG e vidro bioativo, respectivamente. Zucchelli et al.⁴² alcançaram um ganho de 6,1 mm no NIR e redução de 7,1 mm na PS em pacientes com PAg tratados com RTG, após 12 meses. Os resultados alcançados no presente estudo (redução na PS de 2,27 mm e 2,57 mm e ganho no NIR de 1,87 mm e 2,09 mm para os grupos tratados com RTG e MOI/P-15, respectivamente) são mais discretos que os encontrados nos estudos anteriores. Ambos apresentavam, no entanto, maior profundidade de sondagem inicial (de 8 a 9,99 mm) quando comparados à PS inicial encontrada neste estudo (5,36 e 5,41 mm). Já foi demonstrado que melhoras mais expressivas nos parâmetros clínicos podem ser esperadas no tratamento de defeitos

periodontais mais profundos,⁴⁹ o que poderia explicar o maior ganho de inserção periodontal nos estudos prévios.

Não há relatos da comparação do uso de MOI/P-15 com técnicas de RTG. De acordo os resultados desse estudo, Yukna et al.¹⁹ observaram uma redução de 2,4 mm na PS e ganho de 1,3 mm no NIR em defeitos infra-ósseos de pacientes com periodontite crônica tratados com MOI/P-15, após 6 a 7 meses. Em outros estudos clínicos que avaliaram a MOI/P-15 também foi verificada redução na PS, variando de 2,98 mm a 4,19 mm, e ganho no NIR, de 2,2 a 2,89 mm.^{14,50,51} Não foram observadas diferenças clínicas estatisticamente significantes entre os resultados do uso da MOI/P-15 com os grupos controle desses estudos (DFDBA¹⁹, debridamento cirúrgico^{19,50} ou matriz óssea inorgânica¹⁴). Quanto à presença de um pequeno aumento na recessão gengival, revisões sistemáticas mostram que esse é um achado bastante comum após procedimentos regenerativos.^{5,8}

Na análise radiográfica, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa da JCE-BD apenas para GT, com um preenchimento radiográfico linear do defeito infra-ósseo de 2,49 mm, corroborando com os estudos de Yukna et al., que encontraram 2,8¹⁹ e 2,9¹⁴ mm de preenchimento do defeito após cirurgia de reentrada. Esse preenchimento linear do defeito foi significativamente maior que o do GC. Para esses defeitos tratados com RTG, houve um preenchimento de 0,73 mm, semelhante ao encontrado por Mayfield et al.⁵² (0,6 mm) e Eickholz et al.⁵³ (0,7 mm), e abaixo do que foi observado em outros estudos.^{9,54,55} Nos dois grupos houve uma pequena reabsorção da óssea crista alveolar, constatada radiograficamente. A reabsorção encontrada para GT(0,37 mm) concorda com aquela encontrada por Yukna et al. para defeitos tratados com MOI/P-15, que foi de 0,2 e 0,1 mm.^{14,19} Para o GC, a reabsorção de 0,67 mm também corrobora resultados prévios.^{9,53,54,56}

As radiografias de subtração retratam como uma área mais radiopaca as regiões em que houve ganho de densidade entre as duas tomadas. Em linguagem computacional, as imagens radiográficas são constituídas por pixels. Na subtração radiográfica digital, a subtração de dois pixels iguais resultaria no valor 0, gerando uma imagem preta. Para que isso não ocorra, o sistema automaticamente adiciona a cada subtração, pixel a pixel, o valor 128, o que resulta em uma imagem com um tom de cinza médio. E, para as áreas em que a subtração dos pixels não for 0, o valor pode ser acima de 128, resultando em uma área mais clara, ou abaixo de 128, resultando em uma área mais escura.⁵⁷ Dessa forma, as áreas em que houve ganho de densidade (áreas mais radiopacas) nas radiografias de subtração foram comparadas com as áreas respectivas iniciais, medidas nas radiografias do exame inicial. Verificou-se que em 93,16% da área inicial do GT houve ganho na densidade radiográfica, contra 63,03% no GC. Além disso, para os dois grupos, o aumento significativo da média dos níveis de cinza, medidos nas imagens convencionais, mostrou uma crescente formação ou mineralização do tecido ósseo. Apesar de não significante estatisticamente, observa-se uma densidade radiográfica superior no GT em comparação ao GC. O desempenho do GT foi, portanto, mais satisfatório que o do GC quando avaliados os parâmetros radiográficos lineares, de subtração e de densidade radiográfica. Deve-se considerar, no entanto, em todas essas observações radiográficas, que o período de 6 meses pode ser insuficiente para que mudanças significativas na estrutura óssea sejam observadas. Como já anteriormente observado, as radiografias de regiões tratadas com RTG, mesmo após 12 meses, podem apresentar ainda apresentar áreas translúcidas com sinais discretos do que seria um “preenchimento parcial” do defeito.⁵⁸ Além disso, no GT, o biomaterial ainda está presente no defeito, em evidente processo de absorção pelo

organismo. Análises histológicas mostram que, após 6 meses, as partículas da MOI/P-15 podem ser encontradas no tecido ósseo neo-formado em humanos,^{20, 59} além de serem visualmente identificadas em cirurgias de reentrada.^{14,19} Talvez mais tempo seja necessário para evidências radiográficas mais definitivas de maturação óssea ou para que uma verdadeira regeneração óssea seja comprovada.

Os métodos tradicionais de diagnóstico (clínicos e radiográficos) não fornecem uma visão dinâmica dos processos biológicos que acontecem nos sítios doentes ou tratados. Estudos mais recentes têm buscado identificar a presença de inúmeros biomarcadores celulares que possam auxiliar no monitoramento das lesões periodontais.²² Uma das fontes utilizadas para a coleta dessas moléculas é o FG. Neste estudo, a IL-1 β e a IL-6 foram quantificadas antes, 3 e 6 meses após o tratamento periodontal regenerativo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações observadas antes e após as cirurgias. Observou-se, no entanto, uma tendência de aumento de ambas durante o período de cicatrização. Em virtude dessas citocinas apresentarem funções pró-inflamatórias, na maioria das vezes relacionadas com a presença de doença periodontal,²⁴ esse achado poderia ser considerado controverso. Contudo, diversos estudos mostram a presença de citocinas pró-inflamatórias em sítios saudáveis.^{3,25, 33-35,37,60-65} Isso é atribuído a um pequeno número de macrófagos e células mononucleares presentes nos tecidos gengivais e/ou neutrófilos no FG,³³ além da produção de citocinas também por fibroblastos e células ósseas.⁶⁶ Além disso, a IL-1, por exemplo, participa na proliferação e diferenciação osteoblásticas e na síntese de colágeno⁶⁷ e uma maior expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, inclusive IL-1 e IL-6, foi verificada em tecidos e células provenientes de sítios submetidos a cirurgias periodontais regenerativas.^{68,69}

Para avaliação da presença de citocinas como método de diagnóstico, é preciso compreender que os mecanismos biológicos envolvidos com a cicatrização tecidual são bastante complexos. Essa cicatrização é iniciada por uma fase inflamatória na qual citocinas e outros mediadores são produzidos, seguida de uma fase de proliferação e finalizada pelo reparo ou regeneração, caracterizados pela produção e reorganização da matriz extracelular. A fase inflamatória é considerada importante no processo de cicatrização por atrair leucócitos que produzem fatores de crescimento. Por isso, um grande número de mediadores inflamatórios é estimulado durante o processo cicatricial.⁷⁰ Essas citocinas participam ativamente da fase inicial, mas podem persistir ou aparecer novamente nas fases seguintes de formação do tecido de granulação e remodelação⁷⁰, o que justificaria sua detecção nos sítios tratados nesse estudo.

Deve-se considerar, ainda, que a coleta inicial realizada nesse estudo ocorreu imediatamente após um extenso e criterioso tratamento periodontal não-cirúrgico e cirúrgico. Um estudo prévio²⁵ avaliou o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico na concentração de IL-1 β no FG de pacientes com periodontite agressiva. Inicialmente, os níveis de IL-1 β eram significativamente maiores nos sítios doentes que aqueles encontrados em sítios de pacientes saudáveis. Seis semanas após os procedimentos clínicos, não foram encontradas diferenças estatísticas entre as concentrações de citocina em pacientes tratados e pacientes saudáveis. Assim, constata-se que a terapia periodontal básica abaixa os níveis da IL-1 β a um padrão considerado de normalidade. Outros estudos realizados em pacientes com periodontite crônica também relatam uma significativa redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias após tratamento periodontal não-cirúrgico.^{34,71-73} Além disso, mais que apresentar concentrações compatíveis com pacientes saudáveis, as

concentrações iniciais encontradas nesse estudo foram menores que as relatadas na literatura para pacientes sem doença periodontal (10,23 pg/ μ l⁶⁵ a 18,1pg/ μ l⁷²) Os critérios para a seleção dos pacientes saudáveis nesses estudos foram ausência de perda óssea radiográfica e média de perda de inserção menor que 2 mm. Eles não foram submetidos, entretanto, a tratamento periodontal prévio. Dessa forma, é possível que o tratamento periodontal inicial, com realização de raspagens subgengivais, prescrição de antibióticos, cirurgias periodontais para descontaminação radicular e profilaxias profissionais semanais tenha levado as concentrações das citocinas a níveis bastante baixos. Assim, ao longo do período de cicatrização, esses níveis foram gradativamente voltando a parâmetros considerados normais, uma vez que as concentrações encontradas após 6 meses ainda estão abaixo de situações de saúde periodontal encontradas na literatura.

Desse modo, a ausência de diferenças entre os tratamentos propostos evidencia que ambos podem ser utilizados com sucesso no tratamento de defeitos infra-ósseos em pacientes com periodontite agressiva generalizada. Além disso, o preenchimento radiográfico dos defeitos foi mais efetivo para o grupo tratado com MOI/P-15. Avaliação em períodos mais longos e análise de outras citocinas envolvidas nos processos de inflamação e reparo tecidual poderão trazer novos conhecimentos no entendimento do prognóstico de sucesso do tratamento regenerativo nesse tipo de paciente.

5 CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que as duas modalidades terapêuticas avaliadas (MOI/P-15 e RTG com membrana de PTFEe e reforço de titânio) não apresentaram diferenças estatísticas no tratamento de defeitos infra-ósseos em pacientes com PAg-G, em um período de 6 meses, quanto aos parâmetros clínicos e de quantificação de citocinas. O preenchimento radiográfico do defeito foi maior no grupo tratado com MOI/P-15.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, et al. Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 2005;32:1096-1107.
2. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:i, 1-112.
3. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology* 2000 1997;14:112-143.
4. Miliauskaite A, Selimovic D, Hannig M. Successful management of aggressive periodontitis by regenerative therapy: a 3-year follow-up case report. *Journal of periodontology* 2007;78:2043-2050.
5. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:227-265.
6. Wang HL, Greenwell H, Fiorellini J, et al. Periodontal regeneration. *Journal of periodontology* 2005;76:1601-1622.
7. Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:193-204.
8. Murphy KG, Gunsolley JC. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:266-302.
9. Walters SP, Greenwell H, Hill M, Drisko C, Pickman K, Scheetz JP. Comparison of porous and non-porous teflon membranes plus a xenograft in the treatment of vertical osseous defects: a clinical reentry study. *Journal of periodontology* 2003;74:1161-1168.
10. Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human intrabony defects with titanium reinforced membranes. A controlled clinical trial. *Journal of periodontology* 1995;66:797-803.
11. Cortellini P, Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontology* 2000 2000;22:104-132.
12. Garrett S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1996;1:621-666.
13. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Kenney EB, Vasilic N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. *Journal of periodontology* 2001;72:583-589.

14. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *Journal of periodontology* 2000;71:1671-1679.
15. Lallier TE, Palaiologou AA, Yukna RA, Layman DL. The putative collagen-binding peptide P-15 promotes fibroblast attachment to root shavings but not hydroxyapatite. *Journal of periodontology* 2003;74:458-467.
16. Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, Li S. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;311:179-186.
17. Hole BB, Schwarz JA, Gilbert JL, Atkinson BL. A study of biologically active peptide sequences (P-15) on the surface of an ABM scaffold (PepGen P-15) using AFM and FTIR. *Journal of biomedical materials research* 2005;74:712-721.
18. Qian JJ, Bhatnagar RS. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res* 1996;31:545-554.
19. Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, et al. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *Journal of periodontology* 1998;69:655-663.
20. Yukna R, Salinas TJ, Carr RF. Periodontal regeneration following use of ABM/P-15: a case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2002;22:146-155.
21. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *Journal of periodontology* 2002;73:123-128.
22. Taba M, Jr., Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dental clinics of North America* 2005;49:551-571, vi.
23. Boch JA, Wara-aswapati N, Auron PE. Interleukin 1 signal transduction--current concepts and relevance to periodontitis. *Journal of dental research* 2001;80:400-407.
24. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *Journal of periodontology* 2002;73:1377-1391.
25. Toker H, Poyraz O, Eren K. Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:507-513.
26. Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, et al. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *Journal of periodontal research* 1997;32:559-569.

27. Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW, et al. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *Journal of periodontology* 1993;64:400-406.
28. Ishimi Y, Russell J, Sherwood LM. Regulation by calcium and 1,25-(OH)₂D₃ of cell proliferation and function of bovine parathyroid cells in culture. *J Bone Miner Res* 1990;5:755-760.
29. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *Journal of periodontal research* 1991;26:213-217.
30. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;160:403-409.
31. Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontology* 2000 2004;35:42-52.
32. Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *Journal of clinical periodontology* 2003;30:996-1002.
33. Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VG, Mombelli A. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *Journal of clinical periodontology* 2004;31:894-902.
34. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontal research* 1990;25:156-163.
35. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Probst L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 1991;18:548-554.
36. Bullon P, Goberna B, Guerrero JM, Segura JJ, Perez-Cano R, Martinez-Sahuquillo A. Serum, saliva, and gingival crevicular fluid osteocalcin: their relation to periodontal status and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of periodontology* 2005;76:513-519.
37. Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini NV. Estimation of interleukin-1beta levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. *Journal of periodontal research* 2003;38:111-114.
38. te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood* 1990;76:1392-1397.
39. Nowzari H, Botero JE, DeGiacomo M, Villacres MC, Rich SK. Microbiology and cytokine levels around healthy dental implants and teeth. *Clinical implant dentistry and related research* 2008;10:166-173.
40. Piemontese M, Aspriello SD, Rubini C, Ferrante L, Procaccini M. Treatment of periodontal intrabony defects with demineralized freeze-dried bone allograft in

combination with platelet-rich plasma: a comparative clinical trial. *Journal of periodontology* 2008;79:802-810.

41. Hwang YJ, Fien MJ, Lee SS, et al. Effect of scaling and root planing on alveolar bone as measured by subtraction radiography. *Journal of periodontology* 2008;79:1663-1669.
42. Zucchelli G, Bernardi F, Montebugnoli L, De SM. Enamel matrix proteins and guided tissue regeneration with titanium-reinforced expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of infrabony defects: a comparative controlled clinical trial. *Journal of periodontology* 2002;73:3-12.
43. Villaca JH, Rodrigues DC, Novaes AB, Jr., Taba M, Jr., Souza SL, Grisi MF. Root trunk concavities as a risk factor for regenerative procedures of class II furcation lesions in humans. *Journal of periodontology* 2004;75:1493-1499.
44. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *The Kaohsiung journal of medical sciences* 2007;23:1-7.
45. Guarnelli ME, Franceschetti G, Manfrini R, Trombelli L. Adjunctive effect of chlorhexidine in ultrasonic instrumentation of aggressive periodontitis patients: a pilot study. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:333-341.
46. Sirirat M, Kasetsuwan J, Jeffcoat MK. Comparison between 2 surgical techniques for the treatment of early-onset periodontitis. *Journal of periodontology* 1996;67:603-607.
47. Yilmaz S, Kuru B. A regenerative approach to the treatment of severe osseous defects: report of an early onset periodontitis case. *Periodontal Clin Investig* 1996;18:13-16.
48. Mengel R, Soffner M, Flores-de-Jacoby L. Bioabsorbable membrane and bioactive glass in the treatment of intrabony defects in patients with generalized aggressive periodontitis: results of a 12-month clinical and radiological study. *Journal of periodontology* 2003;74:899-908.
49. Cortellini P, Carnevale G, Sanz M, Tonetti MS. Treatment of deep and shallow intrabony defects. A multicenter randomized controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:981-987.
50. Bhongade ML, Tiwari IR. A comparative evaluation of the effectiveness of an anorganic bone matrix/cell binding peptide with an open flap debridement in human infrabony defects: a clinical and radiographic study. *The journal of contemporary dental practice* 2007;8:25-34.
51. Matos SM, Guerra FA, Krauser J, Marques F, Ermida JM, Sanz M. Clinical evaluation of the combination of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P-15) in particulate and hydrogel form as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month reentry controlled clinical study. *Journal of periodontology* 2007;78:1855-1863.
52. Mayfield L, Soderholm G, Hallstrom H, et al. Guided tissue regeneration for the treatment of intraosseous defects using a biabsorbable membrane. A controlled clinical study. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:585-595.

53. Eickholz P, Horr T, Klein F, Hassfeld S, Kim TS. Radiographic parameters for prognosis of periodontal healing of infrabony defects: two different definitions of defect depth. *Journal of periodontology* 2004;75:399-407.
54. Eickholz P, Kim TS, Holle R. Regenerative periodontal surgery with non-resorbable and biodegradable barriers: results after 24 months. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:666-676.
55. Kilic AR, Efeoglu E, Yilmaz S. Guided tissue regeneration in conjunction with hydroxyapatite-collagen grafts for intrabony defects. A clinical and radiological evaluation. *Journal of clinical periodontology* 1997;24:372-383.
56. Lundgren D, Slotte C. Reconstruction of anatomically complicated periodontal defects using a bioresorbable GTR barrier supported by bone mineral. A 6-month follow-up study of 6 cases. *Journal of clinical periodontology* 1999;26:56-62.
57. Bittar-Cortez JA. Aplicação do recurso de subtração radiográfica digital na avaliação da região perimplantar [dissertação] Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas; 2005.
58. Ratka-Kruger P, Neukranz E, Raetzke P. Guided tissue regeneration procedure with bioresorbable membranes versus conventional flap surgery in the treatment of infrabony periodontal defects. *Journal of clinical periodontology* 2000;27:120-127.
59. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, et al. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant dentistry* 2006;15:197-207.
60. Kabashima H, Nagata K, Hashiguchi I, et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-4 in gingival crevicular fluid of patients with inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 1996;25:449-455.
61. Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *Journal of periodontal research* 1999;34:379-386.
62. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of dental research* 2004;83:166-169.
63. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral microbiology and immunology* 2006;21:256-260.
64. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:206-214.
65. Yucel OO, Berker E, Gariboglu S, Otlı H. Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:365-370.
66. Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science (New York, NY)* 1993;260:626-627.

67. Rodan GA. Bone homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:13361-13362.
68. Wakabayashi RC, Iha DK, Niu JJ, Johnson PW. Cytokine production by cells adherent to regenerative membranes. *Journal of periodontal research* 1997;32:215-224.
69. Lima LL, Goncalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. *Journal of periodontal research* 2008;43:459-464.
70. Graves DT, Nooh N, Gillen T, et al. IL-1 plays a critical role in oral, but not dermal, wound healing. *J Immunol* 2001;167:5316-5320.
71. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of periodontology* 2000;71:1535-1545.
72. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2002;29:48-53.
73. Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2004;31:475-482.

7 ARTIGO EM INGLÊS

7 ARTIGO EM INGLÊS

Treatment of Intrabony Defects with ABM/P-15 or GTR in Patients with Agressive Periodontitis: a Clinical, Radiographic and Gingival Fluid Cytokines Levels Evaluation.

Adriana C. Queiroz, Graduate student of Periodontology*

Arthur B. Novaes Jr., Chairman of Periodontology*

Mário Taba Jr, Professor of Periodontology*

Daniela B. Palioto, Professor Periodontology*

Márcio F.M. Grisi, Professor of Periodontology*

Sérgio L.S. Souza, Professor 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 Luís Scombatti de Souza

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP)

Departamento de CTBMF e Periodontia, Av. do Café, s/n, 14040-904. Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E—mail: scombati@forp.usp.br

ABSTRACT

Background: Intrabony periodontal defects present a particular treatment problem, especially in patients with Generalized Aggressive Periodontitis (G-AgP). Researches have been performed in order to improve the results of regenerative procedures.

Material and Methods: The aim of this study was to compare outcomes of intrabony periodontal defects following treatment with anorganic bone matrix/cell binding peptide (ABM/P-15) to guided tissue regeneration (GTR) in patients with G-AgP. Fifteen patients, with two intrabony defects ≥ 3 mm deep, were selected for the present study. Patients were allocated randomly to be treated with ABM/P-15 or GTR. At baseline and at 6 months after surgery, clinical and radiographic parameters and IL-1 β and IL-6 gingival fluid concentrations were recorded.

Results: There was a significant PD reduction ($P < 0.001$) for both groups (2.27 ± 0.96 mm for ABM/P-15 group and 2.57 ± 1.06 mm for GTR group) A CAL gain (1.87 ± 0.94 mm for ABM/P-15 group and 2.09 ± 0.88 mm for GTR group) was observed. In between-group comparisons, there were no statistical significant differences in clinical parameters. The radiographic bone fill was more expressive in ABM/P-15 group (2.49 mm) than in GTR group (0.73 mm). In subtraction radiographs, the areas representing gain in density were 93.16% of the baseline defect for ABM/P-15 group versus 62.03% in GRT group. There were no statistically significant differences in between and intra-group comparison with regard to IL-1 β and IL-6 quantification.

Conclusion: Treatment of intrabony periodontal defects in patients with G-AgP with ABM/P-15 and GTR significantly improved clinical outcomes. The use of ABM/P-15 promoted a better radiographic bone fill.

Keywords: periodontal diseases/surgery; cell binding peptide P-15; transplantation; heterologous; bone regeneration; guided tissue regeneration; membranes

INTRODUCTION

Aggressive periodontitis (AgP) affects a minority of periodontal patients but it is highly significant since it is characterized by severe destruction of the supporting apparatus of the teeth.¹ According to the classification of the American Academy of Periodontology², the main features of AgP are rapid attachment loss and bone destruction, as well as familial aggregation. It can be classified into (a) Localized Aggressive Periodontitis (L-AgP) or Generalized Aggressive Periodontitis (G-AgP).

Because of its less common occurrence, few studies have evaluated different treatment protocols for this condition.³ Almost all therapeutic procedures are aimed in stopping the inflammatory process by non-surgical or surgical approaches to suppress the growth of pathogenic bacteria.⁴ However, once the periodontal lesions have occurred, the aim of therapy should attempt to restore the supporting apparatus that has been destroyed by periodontal disease.⁵

The complete and predictable regeneration of the periodontium remains a critical goal in the periodontal treatment.⁶ Although periodontal regeneration, i.e., the formation of new bone and new cementum with supportive periodontal ligament, is a possible objective of several therapeutical procedures, outcomes of such treatments are not always predictable.⁷ Among treatment modalities, guided tissue regeneration (GTR), grafting with biomaterials and application of biological agents have been used to accomplish periodontal regeneration, with variable success rates.^{6,8,9}

The principle of GTR is based on the use of non-resorbable or bioabsorbables membranes that delays the apical migration of the gingival epithelium by excluding the gingival connective tissue and allowing granulation tissue derived from the periodontal ligament and bone tissues to repopulate the space adjacent to the

denuded root surface.¹⁰⁻¹² The gold standard for GTR is the expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE), a porous Teflon membrane¹³. In this context, the titanium-reinforced membrane is an modification of the ePTFE membrane, which enhances its ability to save space for regeneration and to support the gingival tissues.^{14,15}

Another way to address periodontal regeneration is using bone replacement grafts. A wide range of graft materials have been applied and evaluated clinically, including autografts, allografts, xenografts, and synthetic/semi-synthetic materials¹⁶. The results from a systematic review indicate that bone replacement grafts increase bone level, reduce crestal bone loss, increase clinical attachment level, and reduce probing depth compared to open flap debridement procedures in the treatment of intrabony defects.⁶ The fundamental limitation associated with the use of bone grafts and substitutes in periodontal regeneration is that, despite the fact they play a positive role in bone growth, they do not predictably control the cellular events in the healing of periodontal wound which lead to new attachment formation.¹⁷

In order to develop biologic modalities that may enhance wound healing, some investigators have focused on the cell-binding aspect.¹⁸ A cell-binding domain of type I collagen has been identified, and It has been shown that a 15-residue synthetic analogue (P-15) binds cells with high affinity. Incorporation of these peptides into the microstructure of anorganic bone grafting material (ABM/P-15) can be expected to emulate the properties of collagen in promoting cell attachment, migration, and differentiation.¹⁹ ABM/P-15 is a combination of anorganic bone matrix (ABM) with P-15, synthetic clone of this 15 amino acid sequence of Type I collagen.¹⁸ In vitro, P-15 promotes cell attachment, spreading and alkaline phosphatase-specific activity in fibroblastic and osteoblastic cultures.²⁰⁻²² In humans, clinical studies have

demonstrated that ABM/P-15 showed significantly higher bone defects fill when compared with defects treated with demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA), open flap debridement (DEBR) and ABM.^{18,23,24} Evidence of periodontal regeneration have already been reported²⁵ and favorable 3-year results suggest a beneficial effect in the long-term clinical management of intrabony defects.²⁶

The traditional methods of clinically monitoring periodontal treatment outcomes are clinical and radiographic parameters. However, advances in periodontal diagnosis are moving toward methods whereby periodontal activity can be identified and quantified by measuring biomarkers found in gingival crevicular fluid (GCF), serum and saliva.²⁷ Interleukin-1 (IL-1) is one of the major cytokines produced at inflamed sites and is involved in the initiation and progression of connective tissue destruction.²⁸ It occurs in two forms, as IL-1 α and IL-1 β , of which IL-1 β appears to be the most powerful agent. Another important inflammatory mediator is interleukin-6 (IL-6), a multifunctional protein, which stimulates secretion of immunoglobulins, such as IgA and IgG²⁹ and is involved in bone resorption, both by itself and in conjunction with other proteins.^{30,31} Many studies have investigated the correlation between the concentration of these cytokines in GCF and the biological status of periodontal tissues,^{29,32-44} mainly evaluating the levels in healthy and diseased sites. To the best of our knowledge, there are no data regarding GCF cytokines levels in sites where regenerative procedures had been performed.

AgP patients usually have residual vertical bone defects as a result of periodontal disease, and regenerative procedures are one of the possible treatment options. The objective of this 6-month randomized controlled clinical trial was to evaluate the response of ABM/P-15 compared to GTR procedures in treatment of periodontal defects in patients with G-AgP.

MATERIALS AND METHODS

Subject Selection and Clinical Procedures

The study included subjects with (i) G-AgP (according to the criteria of the 1999 international classification²); (ii) at least 20 teeth present; (iii) good general health and (iv) age between 16 and 35 years. Subjects were excluded from the study if they: (i) were considered to have a diagnosis of chronic periodontitis²; (ii) were pregnant or lactating females; (iii) suffered from any other systemic diseases; (iv) were taking long-term anti-inflammatory drugs; (v) had received periodontal treatment within the last 6 months; (vi) were allergic to penicillin or metronidazole. Informed consent was obtained from all the subjects to be entered in the study and the protocol was approved by the Institution's Human Research Committee (protocol number 2006.1.964.58.9, approved on September 27th, 2006)

Fifteen patients whose treatment plan included reconstructive periodontal surgical procedures to treat bilateral intrabony periodontal defects were selected for the study. The patients initially completed a biofilm control program, including oral hygiene instructions. In sequence, full-mouth scaling and root planning⁴⁵ were performed with Gracey periodontal curets* and ultrasonic instrumentation[†] under local anesthesia. All patients received systemic antibiotics (amoxicillin, 500 mg, three times a day and metronidazole, 400 mg, twice a day for 10 days starting one day before the first session of mechanical instrumentation). An individual treatment plan was defined to each patient and additional scaling and root planning, dental extractions and open flap debridement surgeries were provided throughout the

* Hu-Friedy instruments, Chicago, IL, USA

† Cavitron Select, Dentsply Cavitron, Long Island, NY, USA.

mouth, when necessary. Biofilm control and oral hygiene instruction were performed weekly. After this initial phase and when the patients demonstrated acceptable proficiency in biofilm control procedures, the regenerative procedures were scheduled and the baseline documentation was obtained. Two intrabony defects, $\geq 3\text{mm}$ deep^{18, 23} in the same arch were selected to receive the regenerative procedures. The clinical measurements included gingival recession (GR); probing depth (PD); and relative clinical attachment level (CAL), measured as the distance from a fixed point in a stent to the bottom of the pocket. An automated periodontal probe[‡] and an acrylic stent with reference marks were used to determine the same measurement site at baseline and 6 months after surgery.

Radiographic procedures

Standardized radiographs were obtained at baseline and at 3 and 6 months after periodontal surgery. The radiographs were taken with the paralleling technique employing an x-ray unit and a digital sensor[§]. The images were 768 x 512 pixels and had a 256 grayscale. Exposure time was set at 0.25 seconds. In order to standardize the geometry, a modification of holders^{||} connected to an individual silicone made bite-block with occlusal registration was used.⁴⁶ Using a software[¶], the following linear distances were measured in millimeters: distance from the cement-enamel junction (CEJ) to the base of the defect (BD) and distance from the CEJ to the alveolar crest (AC).⁴⁷ When an interproximal restoration was present, its most apical extension was used instead of the CEJ. The most coronal area where the PDL

[‡] Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA.

[§] RVG Trophy, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA

^{||} XCP, Rinn Corporation, Elgin, IL, USA

[¶] Image Tool for Windows, Version 3.00, UTHSCSA, San Antonio, TX, USA.

maintained an even width was identified to measure the most apical extension of the intrabony defect. The crossing of the silhouette of the alveolar crest with the root surface was defined as the AC. One examiner did all the radiographic measurements. The differences between the 6-month and baseline values for CEJ–BD indicated the amount of radiographic bone fill (RBF) within the osseous defect. The differences between CEJ–AC recorded at baseline and at 6 months were identified as the amount of radiographic crestal bone resorption (RBR).⁴⁸ The radiographic density values were obtained by the mean gray value of the pixels using histogram command. Standardized regions of interest (ROIs), which corresponded to 16 square pixels, were defined for each defect. The ROIs were not superimposed on any portion of the tooth surface, and all attempts were made to confine the square completely within the defect. Four ROIs were selected for each defect. The first ROI was placed in the most apical portion of the defect that could be visualized. The second ROI was placed approximately halfway between the base of the defect and the alveolar crest. The third ROI was placed just below the alveolar crest in the lateral aspect of the defect. The fourth ROI was used as a control region and was placed at a distant, untreated site - this ROI was not expected to demonstrate changes in radiographic density during the study.⁴⁹ Digital subtraction radiographs (DSR) were performed using an specific software.[#] The first step of the computer-assisted subtraction procedure was to calibrate the gray levels of all pixels in the full image between the radiographs. Four reference points were placed in areas surrounding the periodontal defect at the same positions in both images and an alignment of images was performed to correct small geometric misalignments.⁵⁰ All pairs of baseline and 6-month radiographs for each treated site were then subtracted.

[#] Emago Dental Software, Oral Diagnostics Dental Systems, Amsterdam, The Netherlands

Changes between radiographs were depicted as a darkened area for loss of alveolar bone mass, a neutral gray for no change in alveolar bone mass, and a lightened area for an increase in alveolar bone mass.⁵¹ The areas that showed gain in radiographic density (radiopaque areas) were measured (mm^2). In order to compare these areas with the baseline defects, the areas of the initial defects were measured in the conventional baseline radiographs. The percentage of areas with gain in radiographic density observed in DSR in relation to the baseline defects was calculated.

GCF Sampling Method

GCF was sampled from the sites to be treated, in the baseline examination, with the aim to evaluate the influence of the periodontal reconstructive treatments in tissue biomarkers (IL-1 β e IL-6). The samples were also collected in the same sites 3 and 6 months after the surgery. Briefly, teeth were air-dried and isolated with cotton rolls, supragingival biofilm was removed and paper strips^{**} were placed in the sulcus for 30 seconds. Twelve paper strips were collected per site and strips contaminated by blood and/or saliva were discarded. Periotron 6000^{††} was used to determine the amount of GCF. A standard curve correlating digital readout to volume was constructed for each calibration standard. Each volume was applied 3 times to a paper strip and the respective periotron units were recorded. The readings from the Periotron 6000 obtained in each sample were converted to an actual volume (μl) by reference to the standard curve applying a forth-order polynomial regression. The paper strips were placed in sterile Eppendorf tubes and stored at -80°C until the

^{**} Periopaper, Oraflow Inc., Plainview, NY, USA.

^{††} Oraflow Inc., Plainview, NY, USA

assays. The same procedure was repeated three and six months after the regenerative periodontal therapy.

Surgical procedures

After administration of local anesthesia, full-thickness flaps were elevated to provide access to all the surfaces of the defects. Granulomatous tissue was carefully removed, and root planning was performed. Additionally, to obtain an effective decontamination of the root surface, 24% EDTA, neutral pH, in 3% carbopol gel, was applied for 2 minutes, followed by abundant sterile saline irrigation and continuous aspiration. Randomly, one defect was treated with ABM/P-15 (test group - TG) and the other one with GTR (control group - CG). In the test group, ABM/P-15^{¶¶} was placed into the defects up to the adjacent crestal walls. In the control group, an interproximal titanium reinforced non-absorbable ePTFE membrane^{##} was reshaped to obtain precise adaptation to the interdental portion of the teeth. Afterwards, the membrane was positioned at the level of, or coronal to, the bone crest to completely cover the defects, overlapping at least 3 mm of the residual bone ⁵. Wound closure was obtained by repositioning the flaps coronally, when necessary. Patients were instructed to rinse two times a day with a 0.12% chlorhexidine digluconate solution for 2 weeks postoperatively, and amoxicillin 500 mg/clavulanate potassium 125 mg, three times a day, was prescribed for 10 days, starting 24 hours before the procedure. Nimesulid 100mg was also prescribed, twice a day, for 5 days. Weekly postoperative prophylaxis were done during the first month and monthly from then on. In cases of membrane exposure, Doxycycline 100 mg was prescribed every 12

^{¶¶} PepGen P-15®, Dentsply Friadent CeraMed, Lakewood, CO, USA.

^{##} TRI1/TRI2, Gore-Tex Regenerative Material, W.L. Gore & Associates Inc., Flagstaff, AZ, USA

hours in the first day and once a day until the membrane removal, and the patients were instructed to carefully clean the surgical sites with a cotton pellet soaked in 0.12% chlorhexidine digluconate solution two times a day. Four weeks after surgery, patients treated with ePTFE membranes underwent a second surgery in order to carefully remove it. The same surgical protocol was used to gain access to the membrane.

Cytokines quantification

On the day of the analysis, the strips of each site were eluted in 600 μ l phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20^{‡‡} and 1 μ l of protease inhibitor cocktail.^{§§} The tubes were shaken for 30 min and centrifuged at 10000 rpm for 5 min. The supernatant was divided into aliquots for the determination of each biochemical compound. The presence of cytokines in the gingival crevicular fluid samples was determined using commercial enzymelinked immunosorbent assay kits,^{||} in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, samples and standards were added in the wells of the microplate pre-coated with capture antibody. Any analyte present were bound by the immobilized antibody. After a incubation period, unbound materials were washed away. A second Alkaline Phosphatase-labeled antibody (detection antibody) were added and bound to the captured analyte. Unbound detection antibody were washed away. NADPH substrate solution was added and a color develops. Amplifier solution was added and the color deepens in proportion to the amount of analyte present in the sample. Stop solution

^{‡‡} USB Corpo., Cleveland, OH, USA

^{§§} Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

^{||} Human Quantikine HS IL-1 β /IL-6, ELISA kit, HSLB00C/HS600B, R&D Systems, Minneapolis,MN, USA

were added and the absorbance of the color at 490 nm were measured. Concentrations of the cytokines in each sample were determined by generation of a standard curve for comparison. Concentrations of cytokines were corrected for GCF volume and were defined as pg/ μ l.

Statistical analysis

Data were recorded as mean $\pm$ standard deviation for clinical and radiographic parameters and mean $\pm$ standard error of the mean for cytokines quantification. The patient was the experimental unit (n=15). Considering the normality of the data distribution and as it was a split-mouth design study, non-parametric paired tests were used. Statistical analysis was accomplished utilizing the Wilcoxon signed-rank test and Friedman test with Dunn's post-test, with significance determined at the 0.05 level.

RESULTS

Membranes exposures were the only complication during postoperative healing. Minor exposure of the coronal and interproximal portion of the ePTFE membrane occurred from weeks two to four in 11 cases. All the exposures were treated in accordance with the previously described protocol until membrane removal. No other healing problems or inflammatory reactions, such as allergic reactions, abscesses or infections were observed.

Table 1 presents clinical and radiographic data. The baseline clinical parameters were comparable in both groups, with no significant differences. After 6

months, a statistically significant reduction in PD ($P<0.001$), CAL gain ($P<0.001$) and increase in GR ($P<0.001$) were observed in both groups. The comparison of the changes in clinical measurements throughout the study revealed no significant differences between groups. Regarding radiographic results, for between-group comparisons at baseline, CEJ-BD and CEJ-AC demonstrated no statistically significant differences ($P=0.278$; $P=0.599$, respectively). After 6 months, a crestal bone resorption was detected for both groups ($GTR=-0.32 \pm 1.05$ mm ; $ABM/P-15=-0.67 \pm 1.05$ mm). Although it was more expressive in GTR group, the difference was not statistically significant. After 6 months, there was a significant RBF (2.49 mm) only for ABM/P-15 group. At 6 months, the GTR group presented a statistically significant higher CEJ-BD than ABM/P-15 group.

The baseline defect areas were comparable between groups, as well as the residual defects after 6 months (Table 2). There were statistically significant differences between baseline and residual defects after 6 months for both groups. The radiopaque areas, which revealed gain in density in DSR, were statistically larger in ABM/P-15 group than in GTR group. These areas corresponded to 92.23% of the baseline defect in ABM/P-15 and 64.12% in GTR group.

The radiographic density, verified by mean gray levels in each ROI, is presented in Figure X. The baseline density was 73.42 ± 34.21 for ABM/P-15 group and 66.37 ± 34.80 for GTR group, with no significant difference between groups ($P=0,311$). After 3 months, a density of 86.03 ± 31.00 and 70.58 ± 36.74 was found in ABM/P-15 and GTR groups, respectively, with no significant differences ($P=0,311$). In the 6-months radiographs there was a significant increase ($P<0.05$ for ABM/P-15 group and $P<0.01$ for GTR group) in density when compared with baseline densities, for both groups (91.47 ± 32.38 for ABM/P15 and 75.64 ± 36.35 for GTR group).

The cytokines quantification is summarized in Table 3. The statistical analysis demonstrated no significant differences in any of the evaluated parameters, neither in between nor in intra-groups comparisons.

DISCUSSION

The clinical results of this study demonstrated that the use of ABM/P-15 and GTR may lead to statistically significant PD reduction and CAL gain compared to baseline values in patients with Generalized Aggressive Periodontitis. The rationale to use G-AgP patients as the study population is based on the high susceptibility of these individuals to the development and progression of periodontal lesions due to bacterial challenge, with severe destruction of the supporting apparatus of teeth in relatively young subjects.⁵² Very few studies analyzed periodontal regenerative treatment in patients affected by G-AgP. Most of them are case series, presenting significantly probing pocket depth reduction and clinical attachment gain after treatment with GTR, bone grafts and enamel matrix proteins^{4,5,53,54}. Mengel et al.⁵⁵ evaluated the effectiveness of bioabsorbable membrane and bioactive glass (BA) in the treatment of intrabony defects in patients with generalized aggressive periodontitis and presented, after 6 months, a PD reduction of 4 mm and CAL gain of 3,1 mm for the GTR group and PD reduction of 3,8 mm and CAL gain of 2,9 mm for BA group. Zuchelli et al.⁵ reported a CAL gain of 6.1 mm and a PD reduction of 7.1 mm in patients with AgP treated with GTR, after 12 months. These improvements are greater than the results observed in this study, but a comparatively higher preoperative pocket probing depth (8 mm to 9 mm) were reported in the previous

studies - it has been shown that a greater amount of CAL gain and PD reduction can be expected in deeper defects.⁵⁶

Currently there are no studies comparing the outcomes of ABM/P-15 and GTR in the treatment of intrabony defects. In agreement with the results of the present study, Yukna et al.²³ observed a PD reduction of 2.4 mm and CAL gain of 1.3 mm in intrabony defects in patients with chronic periodontitis treated with ABM/P-15, after 6 to 7 months. In other clinical studies that evaluated ABM/P-15 was also verified a PD reduction, ranging from 2.98 mm to 4.19 mm, and CAL gain, from 2.2 mm to 2.89 mm.^{18,24,57} There were no statistically significant clinical differences between the results of the use of ABM/P-15 groups with the control groups of these studies (DFDBA²³, open flap debridement^{23,24} or anorganic bone matrix¹⁸). With regard to the small increase in gingival recession, systematic reviews show that this is a fairly common finding after regenerative procedures.^{6,9}

On radiographic analysis, a statistically significant reduction of the CEJ-BD was observed only for ABM/P-15 group, with a RBF of 2.49 mm, corroborating the studies of Yukna et al., who verified a RBF of 2.8 mm^{23 57} and 2.9 mm^{18 58} after re-entry surgeries. This RBF was significantly higher than the one observed in GTR group. For these defects treated with GTR, there was a RBF of 0.73 mm, similar to that of Mayfield et al.⁵⁸ (0.6 mm) and Eickholz et al.⁵⁹ (0.7 mm), but lower than the RBF observed in other studies.^{13,60,61} The crestal bone resorption (RBR) observed in both groups are consistent with previous studies, which showed some amount of RBR for defects treated with ABM/P-15^{18,23} and GTR^{13,59,60,62}

Both groups presented a progressive gain in radiographic density when the mean gray level was compared between baseline, 3 and 6-months radiographs. The statistical analysis revealed that the mean gray level observed in 6-months

radiographs was statistically higher than baseline radiographs in both groups. Even though significant differences were not observed between groups, the changes in gray levels were more pronounced in ABM/P-15 group than in GTR group. In the DSR, the areas where there was a gain of density displayed a brighter image. Therefore, these brighter areas were measured in DSR and compared with the baseline defects areas. It was observed that in 93.16% of the baseline defects in ABM/P-15 group there was gain in radiographic density, while in the GTR group this improvement was observed in 62.03% of the defects. These radiographic outcomes demonstrated that the ABM/P-15 group presented a better radiographic filling of the defects, with higher radiographic density. However, it should be noticed, as previously reported, that translucent areas representing bony defects can show discrete signs of what would constitute partial “filling” of new bone in areas treated with GTR. Besides, since the resorption rate of the bovine bone mineral is very slow, “bone fill” of the defect consisted of a combination of bovine bone particles and regenerating vital human bone.⁶³ Therefore, a longer healing period can be required for more definitive radiographic evidence of bone maturation or for true bone regeneration to become visible.

In the present study, the levels of IL-1 β and IL-6 were quantified in GCF samples collected from the treated sites. The results showed no statistical significant difference between cytokines concentrations found in baseline, 3 and 6-months evaluations. It was observed, however, a tendency of increase in concentration of both cytokines. Since they are pro-inflammatory, most of times related with periodontal disease activity, this finding could be considered controversial. Nevertheless, many studies showed that pro-inflammatory cytokines are present in health sites.^{35,36,38,39,42,44,64-69} This is attributable to the presence of a small number of

macrophages and mononuclear cells in the gingival tissues and/or to the neutrophils of GCF,³⁸ in addition to the fact that these cytokines can be produced by fibroblasts and bone cells.⁷⁰ Moreover, IL-1 also has been shown to participate in osteoblast proliferation, differentiation, and collagen synthesis in cooperation with other factors⁷¹ and an expression of IL-1 and IL-6 genes was verified in tissues and cells from sites treated with periodontal regenerative procedures.^{72,73}

Besides, wound healing is initiated by an inflammatory phase in which cytokines and other inflammatory mediators are generated. A number of inflammatory mediators are up-regulated during the healing process.⁷⁴ They take part in initial phase, but they might persist or appear again in the two following phases (formation of granulation tissue and remodelling), which could explain the presence of pro-inflammatory cytokines in this study. Furthermore, it should be considered that the baseline examination was performed immediately after an extensive and meticulous non-surgical and surgical periodontal treatment. A previous study⁴⁴ revealed that after non-surgical periodontal treatment the GCF concentration of IL-1 β decreased to normal levels in patients with aggressive periodontitis. Other studies in patients with chronic periodontitis also reported a significant reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines after non-surgical periodontal treatment.^{39,75,76,77} In addition, more than concentrations compatible with healthy patients, the initial concentrations found in the present study were lower than those reported in the literature for healthy sites (10.23 pg/ μ l⁶⁹ to 18,1 pg/ μ l⁷⁶). These very low concentrations could be explained because the inclusion criteria used for healthy patients in previous studies was absence of bone and attachment loss -they were not submitted to previous periodontal treatment. Thus, it is possible that the periodontal therapy, with prescription of antibiotics, open flap debridement and weekly

professional prophylaxis could have leaded the cytokines levels to very low patterns. Thus, throughout the healing period, these levels were gradually returning to parameters considered normal, since the concentrations found after 6 months are still in accordance with periodontal health.

This study showed that there were no differences in clinical and laboratorial parameters between the treatments proposed (ABM/P-15 or GTR) for patients with generalized aggressive periodontitis in a 6-months postoperative period. ABM/P-15 group presented superior results regarding radiographic bone fill than GTR group. Longer follow-up periods and analysis of other cytokines involved in inflammation and tissue repair may elucidate other processes which could help understanding the prognosis and success of regenerative treatments in this kind of patients.

TABLES

Table 1. Clinical and radiographic parameters at baseline and after 6 months (mean $\pm$ dp)

Parameter	Baseline	6 months	P value	Change
PD (mm)				PD reduction
ABM/P-15	5.36 $\pm$ 1.28	3.09 $\pm$ 0.84	$<0.001^*$	2.27 $\pm$ 0.96
GTR	5.41 $\pm$ 1.23	2.85 $\pm$ 0.50	$<0.001^*$	2.57 $\pm$ 1.06
P value	1.00	0.476		0.408
CAL (mm)				CAL gain
ABM/P-15	10.31 $\pm$ 1.29	8.45 $\pm$ 1.18	$<0.001^*$	1.87 $\pm$ 0.94
GTR	11.15 $\pm$ 1.28	9.05 $\pm$ 1.43	$<0.001^*$	2.09 $\pm$ 0.88
P value	0.057	0.099		0.495
GR (mm)				GR increase
ABM/P-15	0.27 $\pm$ 0.44	0.86 $\pm$ 0.54	$<0.001^*$	0.58 $\pm$ 0.29
GTR	0.29 $\pm$ 0.48	0.92 $\pm$ 0.71	$<0.001^*$	0.64 $\pm$ 0.47
P value	1.00	0.910		0.629
CEJ-AC (mm)				RBR
ABM/P-15	2.82 $\pm$ 1.21	3.14 $\pm$ 1.63	0.278	-0.32 $\pm$ 1.05
GTR	3.57 $\pm$ 1.10	4.24 $\pm$ 1.08	0.064	-0.67 $\pm$ 1.05
P value	0.278	0.221		0.382
CEJ-BD (mm)				RBF
ABM/P-15	6.07 $\pm$ 1.72	3.58 $\pm$ 1.45	0.002 [*]	2.49 $\pm$ 1.88
GTR	6.22 $\pm$ 1.59	5.48 $\pm$ 1.02	0.172	0.73 $\pm$ 1.21
P value	0.599	0.001 [*]		0.002 [*]

Wilcoxon Signed Ranks Test

* Statistically significant difference ($P < 0.05$)

Table 2. Radiographic area measures (mean $\pm$ dp)

Area (mm ²)	Baseline defect	Radiopaque area	P value	Residual defect
ABM/P-15	6.65 $\pm$ 2.87	6.20 $\pm$ 2.52	0.115	0.45 $\pm$ 1.06
<i>P</i> < 0.001*				
GTR	5.49 $\pm$ 1.32	3.52 $\pm$ 1.31	0.005*	1.97 $\pm$ 1.88
<i>P</i> < 0.001*				
P value	0.151	0.011*		0.054

Wilcoxon Signed Ranks Test

* Statistically significant difference (*P* < 0.05)**Table 3. CGF cytokines concentrations**

[] cytokines (pg/ μ l)	Baseline	3 months	6 months	P value ^a
IL-1 β				
ABM/P-15	4.94 $\pm$ 1.09	7.25 $\pm$ 2.12	8.60 $\pm$ 3.03	0.210
GTR	6.26 $\pm$ 1.77	8.51 $\pm$ 2.59	10.05 $\pm$ 3.38	0.927
P value^b	0.311	0.753	0.600	
IL-6				
ABM/P-15	0.34 $\pm$ 0.16	0.63 $\pm$ 0.24	0.67 $\pm$ 0.19	0.436
GTR	0.26 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.17	0.52 $\pm$ 0.13	0.338
P value^b	0.610	0.695	0.844	

^a Friedman Test^b Wilcoxon Signed Ranks Test

FIGURES LEGENDS

Figure 1. **A** and **B.** Baseline view; **C** and **D.** Intrabony defects; **E.** ABM/P-15 (PepGen P-15) placed; **F.** Membrane positioned and sutured. **G** and **H.** Wound closure sutures. **I** and **J.** 6-months view

Figure 2. **A** and **B.** Baseline radiographs; **C.** 3-months radiograph in ABM/P-15 group; **D.** 3-months radiograph in GTR group; **E.** 6-months radiograph in ABM/P-15 group; **F.** 6-months radiograph in GTR group; **G.** Subtraction radiographs in ABM/P-15 group, with a brighter area showing the region which there was gain in density (arrows); **H.** Subtraction radiographs in GTR group, with a brighter area showing the region which there was gain in density (arrows).

Figure 3. Radiographic density (mean gray levels)

REFERENCES

1. Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, et al. Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 2005;32:1096-1107.
2. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:i, 1-112.
3. Moreira RM, Feres-Filho EJ. Comparison between full-mouth scaling and root planing and quadrant-wise basic therapy of aggressive periodontitis: 6-month clinical results. *Journal of periodontology* 2007;78:1683-1688.
4. Miliauskaite A, Selimovic D, Hannig M. Successful management of aggressive periodontitis by regenerative therapy: a 3-year follow-up case report. *Journal of periodontology* 2007;78:2043-2050.
5. Zucchelli G, Bernardi F, Montebugnoli L, De SM. Enamel matrix proteins and guided tissue regeneration with titanium-reinforced expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of infrabony defects: a comparative controlled clinical trial. *Journal of periodontology* 2002;73:3-12.
6. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:227-265.
7. Wang HL, Greenwell H, Fiorellini J, et al. Periodontal regeneration. *Journal of periodontology* 2005;76:1601-1622.
8. Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:193-204.
9. Murphy KG, Gunsolley JC. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:266-302.
10. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *Journal of clinical periodontology* 1984;11:494-503.
11. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontology 2000* 1993;1:26-35.

12. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 1982;9:290-296.
13. Walters SP, Greenwell H, Hill M, Drisko C, Pickman K, Scheetz JP. Comparison of porous and non-porous teflon membranes plus a xenograft in the treatment of vertical osseous defects: a clinical reentry study. *Journal of periodontology* 2003;74:1161-1168.
14. Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human intrabony defects with titanium reinforced membranes. A controlled clinical trial. *Journal of periodontology* 1995;66:797-803.
15. Cortellini P, Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontology 2000* 2000;22:104-132.
16. Garrett S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1996;1:621-666.
17. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Kenney EB, Vasilic N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. *Journal of periodontology* 2001;72:583-589.
18. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *Journal of periodontology* 2000;71:1671-1679.
19. Qian JJ, Bhatnagar RS. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res* 1996;31:545-554.
20. Lallier TE, Palaiologou AA, Yukna RA, Layman DL. The putative collagen-binding peptide P-15 promotes fibroblast attachment to root shavings but not hydroxyapatite. *Journal of periodontology* 2003;74:458-467.
21. Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, Li S. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;311:179-186.
22. Hole BB, Schwarz JA, Gilbert JL, Atkinson BL. A study of biologically active peptide sequences (P-15) on the surface of an ABM scaffold (PepGen P-15) using AFM and FTIR. *Journal of biomedical materials research* 2005;74:712-721.
23. Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, et al. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human

- periodontal osseous defects. 6-month results. *Journal of periodontology* 1998;69:655-663.
24. Bhongade ML, Tiwari IR. A comparative evaluation of the effectiveness of an anorganic bone matrix/cell binding peptide with an open flap debridement in human infrabony defects: a clinical and radiographic study. *The journal of contemporary dental practice* 2007;8:25-34.
 25. Yukna R, Salinas TJ, Carr RF. Periodontal regeneration following use of ABM/P-1 5: a case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2002;22:146-155.
 26. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *Journal of periodontology* 2002;73:123-128.
 27. Taba M, Jr., Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dental clinics of North America* 2005;49:551-571, vi.
 28. Boch JA, Wara-aswapati N, Auron PE. Interleukin 1 signal transduction--current concepts and relevance to periodontitis. *Journal of dental research* 2001;80:400-407.
 29. Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW, et al. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *Journal of periodontology* 1993;64:400-406.
 30. Ishimi Y, Russell J, Sherwood LM. Regulation by calcium and 1,25-(OH)₂D₃ of cell proliferation and function of bovine parathyroid cells in culture. *J Bone Miner Res* 1990;5:755-760.
 31. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *Journal of periodontal research* 1991;26:213-217.
 32. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;160:403-409.
 33. Bullon P, Goberna B, Guerrero JM, Segura JJ, Perez-Cano R, Martinez-Sahuquillo A. Serum, saliva, and gingival crevicular fluid osteocalcin: their relation to periodontal status and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of periodontology* 2005;76:513-519.
 34. Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontology 2000* 2004;35:42-52.
 35. Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini NV. Estimation of interleukin-1beta levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. *Journal of periodontal research* 2003;38:111-114.

36. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000* 1997;14:112-143.
37. Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *Journal of clinical periodontology* 2003;30:996-1002.
38. Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VG, Mombelli A. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *Journal of clinical periodontology* 2004;31:894-902.
39. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontal research* 1990;25:156-163.
40. Nowzari H, Botero JE, DeGiacomo M, Villacres MC, Rich SK. Microbiology and cytokine levels around healthy dental implants and teeth. *Clinical implant dentistry and related research* 2008;10:166-173.
41. Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, et al. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *Journal of periodontal research* 1997;32:559-569.
42. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Probst L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 1991;18:548-554.
43. te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood* 1990;76:1392-1397.
44. Toker H, Poyraz O, Eren K. Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:507-513.
45. Quirynen M, Bollen CM, Vandekerckhove BN, Dekeyser C, Papaioannou W, Eyssen H. Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *Journal of dental research* 1995;74:1459-1467.
46. Cury PR, Araujo NS, Bowie J, Sallum EA, Jeffcoat MK. Comparison between subtraction radiography and conventional radiographic interpretation during long-term evaluation of periodontal therapy in Class II furcation defects. *Journal of periodontology* 2004;75:1145-1149.
47. Bender SA, Rogalski JB, Mills MP, Arnold RM, Cochran DL, Mellonig JT. Evaluation of demineralized bone matrix paste and putty in periodontal intraosseous defects. *Journal of periodontology* 2005;76:768-777.

48. Piemontese M, Aspriello SD, Rubini C, Ferrante L, Procaccini M. Treatment of periodontal intrabony defects with demineralized freeze-dried bone allograft in combination with platelet-rich plasma: a comparative clinical trial. *Journal of periodontology* 2008;79:802-810.
49. Hwang YJ, Fien MJ, Lee SS, et al. Effect of scaling and root planing on alveolar bone as measured by subtraction radiography. *Journal of periodontology* 2008;79:1663-1669.
50. Bittar-Cortez JA, Passeri LA, Boscolo FN, Haiter-Neto F. Comparison of hard tissue density changes around implants assessed in digitized conventional radiographs and subtraction images. *Clinical oral implants research* 2006;17:560-564.
51. Danesh-Meyer MJ, Chen ST, Rams TE. Digital subtraction radiographic analysis of GTR in human intrabony defects. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2002;22:441-449.
52. Guarnelli ME, Franceschetti G, Manfrini R, Trombelli L. Adjunctive effect of chlorhexidine in ultrasonic instrumentation of aggressive periodontitis patients: a pilot study. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:333-341.
53. Sirirat M, Kasetsuwan J, Jeffcoat MK. Comparison between 2 surgical techniques for the treatment of early-onset periodontitis. *Journal of periodontology* 1996;67:603-607.
54. Yilmaz S, Kuru B. A regenerative approach to the treatment of severe osseous defects: report of an early onset periodontitis case. *Periodontal Clin Investig* 1996;18:13-16.
55. Mengel R, Soffner M, Flores-de-Jacoby L. Bioabsorbable membrane and bioactive glass in the treatment of intrabony defects in patients with generalized aggressive periodontitis: results of a 12-month clinical and radiological study. *Journal of periodontology* 2003;74:899-908.
56. Cortellini P, Carnevale G, Sanz M, Tonetti MS. Treatment of deep and shallow intrabony defects. A multicenter randomized controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:981-987.
57. Matos SM, Guerra FA, Krauser J, Marques F, Ermida JM, Sanz M. Clinical evaluation of the combination of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P-15) in particulate and hydrogel form as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month reentry controlled clinical study. *Journal of periodontology* 2007;78:1855-1863.
58. Mayfield L, Soderholm G, Hallstrom H, et al. Guided tissue regeneration for the treatment of intraosseous defects using a bioabsorbable membrane. A controlled clinical study. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:585-595.

59. Eickholz P, Horr T, Klein F, Hassfeld S, Kim TS. Radiographic parameters for prognosis of periodontal healing of infrabony defects: two different definitions of defect depth. *Journal of periodontology* 2004;75:399-407.
60. Eickholz P, Kim TS, Holle R. Regenerative periodontal surgery with non-resorbable and biodegradable barriers: results after 24 months. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:666-676.
61. Kilic AR, Efeoglu E, Yilmaz S. Guided tissue regeneration in conjunction with hydroxyapatite-collagen grafts for intrabony defects. A clinical and radiological evaluation. *Journal of clinical periodontology* 1997;24:372-383.
62. Lundgren D, Slotte C. Reconstruction of anatomically complicated periodontal defects using a bioresorbable GTR barrier supported by bone mineral. A 6-month follow-up study of 6 cases. *Journal of clinical periodontology* 1999;26:56-62.
63. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clinical oral implants research* 1997;8:117-124.
64. Kabashima H, Nagata K, Hashiguchi I, et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-4 in gingival crevicular fluid of patients with inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 1996;25:449-455.
65. Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *Journal of periodontal research* 1999;34:379-386.
66. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of dental research* 2004;83:166-169.
67. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral microbiology and immunology* 2006;21:256-260.
68. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:206-214.
69. Yucel OO, Berker E, Gariboglu S, Otlu H. Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:365-370.
70. Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science (New York, NY)* 1993;260:626-627.
71. Rodan GA. Bone homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:13361-13362.

72. Wakabayashi RC, Iha DK, Niu JJ, Johnson PW. Cytokine production by cells adherent to regenerative membranes. *Journal of periodontal research* 1997;32:215-224.
73. Lima LL, Goncalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. *Journal of periodontal research* 2008;43:459-464.
74. Graves DT, Nooh N, Gillen T, et al. IL-1 plays a critical role in oral, but not dermal, wound healing. *J Immunol* 2001;167:5316-5320.
75. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of periodontology* 2000;71:1535-1545.
76. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2002;29:48-53.
77. Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2004;31:475-482.

8 ANEXOS

ANEXO A. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/333/FORP/270982006

Prezado(a) Professor(a),

Ref.: Processo n. 2006.1.964.58.9
Caae n. 0044.0.138.000-06

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 71ª Sessão realizada no dia 27 de setembro de 2006, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Avaliação no uso de PepGen P-15 no tratamento de defeitos infra-ósseos em pacientes com periodontite agressiva. Estudo clínico, radiográfico e laboratorial em humanos"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final, ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Parcial** até o dia **30 de setembro de 2007**, e o **Relatório Final** até o dia **30 de setembro de 2008**.

Atenciosamente,

Glaucete Della Rosa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. SÉRGIO LUIS SCOMBATTI DE SOUZA

Professor Associado do Departamento Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia – FORP/USP

GDR/bgcp

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa - Glaucete Della Rosa - e-mail: glaucete@forp.usp.br

ANEXO B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Termo de consentimento

Eu, _____
RG _____, CPF _____, fui convidado para participar da pesquisa “Avaliação do uso de PepGen P-15 no tratamento de defeitos infra-ósseos em pacientes com periodontite agressiva. Estudo clínico, radiográfico e laboratorial em humanos” e assino este Termo de Consentimento com a finalidade de autorizar minha participação como sujeito desta pesquisa, que será realizada sob a responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza e da mestrandia Adriana Corrêa de Queiroz, e afirmo que todas as implicações abaixo relacionadas me foram devidamente esclarecidas, inclusive verbalmente, através de questões levantadas junto aos pesquisadores, não restando qualquer dúvida que possa sugerir que tal consentimento não tenha sido feito de livre e espontânea vontade. Estou ainda ciente de que:

- 1) O objetivo desta pesquisa é realizar uma avaliação clínica da eficácia do uso do PepGen P-15, um material de enxerto usado no tratamento de defeitos ósseos em pacientes portadores de periodontite agressiva (um tipo de doença que destrói rapidamente o osso em volta dos dentes).
- 2) O paciente será submetido a um exame clínico computadorizado para a obtenção dos dados clínicos antes do tratamento periodontal básico, bem como 1, 6 e 12 meses após este.
- 3) O paciente receberá o tratamento periodontal básico composto por raspagem do tártaro e placa subgengival em uma única sessão, associado à utilização de antibióticos (amoxicilina e metronidazol) por 10 dias, como forma de tratamento de doença periodontal agressiva.
- 4) O paciente será submetido também a tratamento periodontal cirúrgico para tentar recuperar os tecidos perdidos devido à doença periodontal agressiva.
- 5) Os procedimentos que poderão causar desconforto para o paciente são os do exame clínico, da anestesia local, das cirurgias e do pós-operatório (controles e exames do resultado do tratamento).
- 6) Sei que tenho liberdade de me recusar a participar ou de me retirar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma represália ou negligência em meu tratamento.
- 7) Sei também que todos os dados que forem relatados ao pesquisador em confidência serão mantidos sigilosos, garantindo minha privacidade.
- 8) Tenho consciência de que qualquer dano à minha saúde que seja decorrente da minha participação nesta pesquisa será reparado sem que eu necessite fazer qualquer despesa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200 ____.

Paciente ou responsável

Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza (9705-0802)

Mestranda Adriana Corrêa de Queiroz (9204-2882)