

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO DA MATRIZ ÓSSEA  
BOVINA INORGÂNICA / P15 PARTICULADA EM LESÃO DE  
BIFURCAÇÃO GRAU III.  
ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO EM CÃES**

**Flávia Adelino Suaid**

**Ribeirão Preto**

**2008**

FLÁVIA ADELINO SUAID

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO DA MATRIZ ÓSSEA  
BOVINA INORGÂNICA / P15 PARTICULADA EM LESÃO DE  
BIFURCAÇÃO GRAU III.  
ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO EM CÃES**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi

Ribeirão Preto  
2008

Suaid, Flávia Adelino

Avaliação do potencial regenerativo da matriz óssea bovina inorgânica / P15 particulada em lesão de bifurcação grau III. Estudo histomorfométrico em cães..

93p.:il.; 30cm

Orientador: Grisi, Márcio Fernando de Moraes  
Dissertação apresentada no Departamento de Cirurgia,  
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia

1. Regeneração 2. Bifurcação 3. ABM/P15 4. Cães

***Dedicatória***

---

Aos meus pais Haylton e Marisa, que sempre me apoiaram nesta difícil e longa batalha, incentivando à luta a cada dia e momento de minha vida. A cada obstáculo encontrado não faltava amor, carinho, dedicação e amparo para que eu pudesse vencer sempre. Muito obrigada por existirem, estarem sempre ao meu lado e me tornar vencedora.

Aos meus irmãos Carla e Ricardo pelo apoio, carinho e cumplicidade em todo este tempo ajudando a tornar os momentos mais difíceis em simples passagens. .

Ao meu namorado Antônio, que é um exemplo de pessoa batalhadora e vencedora, sempre mostrando que não existem momentos difíceis para aqueles que são persistentes. Não há palavras para descrever o quanto a sua presença foi importante para mim nesta caminhada, assim como sua dedicação, seu amor e carinho foram incondicionais neste tempo.

## ***Agradecimientos***

---

Ao Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi pelo convívio profícuo, ensinamentos, confiança, disposição e paciência na orientação deste trabalho. Muito Obrigada por me enriquecer profissionalmente e pessoalmente através de seus ensinamentos e de suas virtudes.

Ao Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior pelo incentivo e confiança que me fortaleceram profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza pelo constante apoio clínico e científico que foram fundamentais para a conclusão do mestrado.

Ao Prof. Dr. Mário Taba Júnior que acreditou no meu trabalho gerando oportunidades a partir da iniciação científica que me impulsionaram para a vida acadêmica.

À Professora. Dra. Daniela Bazan Palioto pela disponibilidade e apoio clínico durante o decorrer do curso.

Ao Prof. Dr. Paulo Tambasco, pela inestimável contribuição entusiástica na análise histológica deste trabalho.

Ao meu grande amigo Guilherme que através de seu esforço, dedicação, ajuda e infinitas outras qualidades indescritíveis, foi uma das pessoas mais importantes para que este trabalho chegasse ao fim, e principalmente para que eu me tornasse uma profissional qualificada. Muito obrigada.

Às minhas amigas Germana, Adriana, Priscila Paganini, Anelissa e Pri pelo companheirismo, amizade e principalmente pela valiosa ajuda nesses dois anos de grandes emoções. Torço muito pelo sucesso de vocês.

Ao amigo Fábio, que na função de veterinário, mostrou esforço e dedicação durante a fase experimental contribuindo para o sucesso deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos do Laboratório de Histologia Sebastião e Junia, pelos ensinamentos metodológicos e valiosa ajuda.

Aos funcionários do biotério Aldo e Edson pelo apoio prestado durante a fase experimental.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Periodontia Tatiana e Dulce pela constante ajuda e pelos bons momentos durante este longo percurso.

**Muito Obrigada!**

## LISTA DE ABREVIATURAS

Mm - Milímetro

mm<sup>2</sup> – Milímetro quadrado

µm - Micrômetro

ATF: Área total furca

ANT: Área de novo tecido

AE: Área de epitélio

ATC: Área de conjuntivo

ANO: Área de novo osso

DO: densidade óssea

EF: Extensão da furca

EC: Extensão do cimento

ED: extensão do defeito

ENT: Extensão do novo tecido

EO: extensão osso

## SUMÁRIO

Justificativa .....	10
Resumo .....	19
Introdução .....	23
Proposição .....	28
Material e Métodos .....	30
Resultados .....	40
Discussão .....	50
Conclusões .....	57
Referências Bibliográficas .....	59
Artigo em Inglês .....	66

***Justificativa***

---

A regeneração dos periodonto, após episódios destrutivos das várias formas de doenças periodontais, tem sido uma formidável mudança na periodontia. No entanto, para que a verdadeira regeneração ocorra é necessário que haja a neoformação de cimento, ligamento periodontal e osso alveolar, através da migração e proliferação de células do ligamento periodontal para a lesão<sup>1</sup>. Neste âmbito, a RTG tem sido a técnica mais estudada e utilizada para o tratamento de lesões de bifurcação e defeitos infra-ósseos, podendo esta ser associada com outros biomateriais<sup>2-3</sup>.

A regeneração do periodonto em defeitos infra-ósseos apresenta maior previsibilidade quando comparada aos defeitos ósseos nas áreas de bifurcações<sup>4</sup>. As lesões de furca possuem resultados e prognósticos diferentes, quando submetidas à RTG, dependendo do grau de envolvimento. As lesões de bifurcação grau II têm sido reportadas, como aquelas que respondem favoravelmente ao processo regenerativo, principalmente as presentes nas faces livres dos molares inferiores<sup>5</sup>.

No entanto, nas lesões de bifurcação grau III, por apresentar gravidade maior, a RTG tem demonstrado resultados conflitantes, imprevisíveis e menos favoráveis em modelos animais e humanos<sup>2,3,6,7</sup>. O sucesso da RTG neste defeito crítico depende, entre outros fatores, do tamanho do defeito ou da distância da base do defeito até o teto da furca. Segundo alguns autores, defeitos ósseos maiores que 4 mm tendem a apresentar baixo índice de regeneração dos tecidos periodontais<sup>8,10</sup>. Outros estudos mostram que é possível o fechamento total ou parcial da lesão de bifurcação grau III utilizando-se somente a RTG ou a associação desta com diferentes biomateriais<sup>2,9,10,11,12,13</sup>. Pode-se notar que as lesões de furca grau III tornaram-se um grande desafio tanto para a obtenção da regeneração quanto para maximizar o potencial regenerativo dos diversos enxertos ósseos.

Os enxertos ósseos recentemente têm desenvolvido um importante papel na regeneração periodontal<sup>14,15,16</sup>. Estes biomateriais podem ser de origem bovina (xenógenos), de indivíduos da mesma espécie (alógenos) ou sintética. Em função da quantidade limitada a ser utilizada dentre outros fatores do enxerto autógeno, os materiais sintéticos, em procedimentos cirúrgicos periodontais, têm sido mais utilizados para a reconstrução de defeitos ósseos<sup>17,18</sup>.

Dentre os materiais sintéticos, o mais recentemente desenvolvido, foi um enxerto ósseo que é composto por um componente inorgânico – a matriz mineral óssea bovina – cuja função é servir como arcabouço para a migração celular, além de fonte de cálcio, essencial para a formação óssea, e um componente orgânico que é representado por uma seqüência de quinze aminoácidos derivados do colágeno primário (PepGen P15), que são responsáveis pela quimiotaxia e adesão celular, fenômenos essenciais para que haja nova formação óssea<sup>19,20,21</sup>. Este novo enxerto ósseo pode ser encontrado em forma de gel (Flow) ou sólidas (particulada), e ambas as formas estão sendo utilizadas em muitos estudos<sup>22,23,24,25</sup>.

Segundo Kubler et al.<sup>26</sup>, no estudo in vitro, a matriz óssea inorgânica/P15, mostrou maior índice de proliferação e diferenciação celular quando comparado ao Bio-Oss, Algipore, e Osteograf. Os resultados relativos a este novo enxerto, podem ser visualizados no trabalho de Scarano et al.<sup>27</sup>, no qual houve de 78 a 98% de preenchimento ósseo nos defeitos criados na tíbia de coelhos. Da mesma forma, estudos em cães, demonstram que a matriz óssea inorgânica/P15 promoveu resultados significativos em relação à regeneração tanto em frenestrações ósseas<sup>28</sup> como em defeitos crônicos alveolares<sup>29</sup>.

Estudos clínicos e histológicos em humanos demonstram que a matriz óssea inorgânica/P15 (particulada ou em gel), promoveu resultados satisfatórios em relação

à formação óssea em defeitos periodontais infra-ósseos, em levantamento de seios maxilares e em defeitos ósseos de rebordos<sup>24,30,31,32,33</sup>. Mostrou também superioridade no preenchimento ósseo, em comparação com outros enxertos, ou com a RTG<sup>25,34,35</sup>.

Desta forma, é possível verificar que a matriz óssea inorgânica/P15, foi utilizada em inúmeros estudos e em diversas situações, mostrando resultados satisfatórios até o momento. Porém, o potencial regenerativo deste novo enxerto ósseo, ainda não havia sido testado e comprovado em um dos defeitos periodontais mais difíceis de ser regenerado: o defeito de bifurcação grau III.

Recentemente, a forma “Flow” deste novo enxerto foi testada em lesões de bifurcações grau III, em cães. Porém devido à baixa viscosidade deste material, e ao escoamento, os resultados referentes à regeneração periodontal foram insatisfatórios<sup>36</sup>. Assim justifica-se a realização desta pesquisa, para avaliar o potencial regenerativo da matriz óssea bovina inorgânica/P15 particulada em lesões de bifurcação grau III.

## Referências Bibliográficas

1. Ripamonti U, Reddi AH. Periodontal regeneration: potencial role of bone morphogenetic proteins. *J Periodont Res* 1994; 29:225-235.
2. Palioto DB, Joly JC, De Lima AFM, Mota LF, Cafesse R. Clinical and radiographic treatment evaluation of class III furcation defects using GRT with and without inorganic bone matrix. *J Clin Periodontol* 2003; 30:1-8.
3. Fernandes JMA, Rego ROCC, Spolidório LC, Marcantonio RAC, Jr EM, Cirelli JA. Enamel matrix proteins associated with GTR and bioactive glass in the treatment of class III furcation in dogs. *Braz Oral Res* 2005; 19(3): 169-75.
4. Eickholz P, Kim TS, Steinbrenner H, Dorfer C, Holle R. Guided tissue regeneration with bioabsorbable barriers: intrabony defects and class II furcations. *J Periodontol*. 2000; 71(6): 999-1008.
5. Lindhe J, Pontoriero R, Berglundh T, Araujo M. The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 276-283.
6. Becker W, Becker BE, Berg L., Prichard J, Cafesse R. & Rosenberg E. New Attachment after treatment with root isolation procedures: report for treated class III and class II furcations and vertical osseous defects. *Int Journal Of Periodontics and Rest Dentistry* 1988; 8: 9-23.
7. Pontoriero R & Lindhe J. Guided tissue regeneration in the treatment of degree III furcation defects in maxillary molars. *Journal of Clinical Periodontology* 1995; 22: 810-812.
8. Pontoriero R, Lindhe J, Nyman S, Karring T, Rosenberg E, Sonavi F. guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. A clinical study of degree III involvements. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 170-174.

9. Anderegg CR, Martin SJ, Gray JL, Mellnig JT, Gher ME. Clinical evaluation of the use of decalcified freeze-dried bone allograft with guided tissue regeneration in the treatment of molar furcation invasions. *J Periodontol* 1991; 62(4): 264-268.
10. Mehlbauer MJ, Greenwell H, Nouneh I, Drisko C, Wittwer JW, Yancey J, Rebitski G. Improved closure rate of class III furcations using a layered GTR technique. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20(3): 285-295.
11. Yamanouchi K, Chang CY, Yamada S. A clinical evaluations of guided tissue regeneration in the treatment of classes III and class II furcation bony defects. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1995; 36(1): 9-17.
12. .Eickholz P, Hausmann E. Evidence for healing of class II and III furcations after GTR therapy: digital subtraction and clinical measurements. *J Periodontol* 1997; 68(7):636-644.
13. Eickholz P, Kim T-Sun, Holle R, Hausmann E. Long-Term of guided tissue regeneration therapy with non-resorbable and bioabsorbable barriers.I.Class II furcations. *J Periodontol.* 2001; 72: 35-42.
14. Buser D, Dula K, Belser U, et al. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993; 13:29-45.
15. Callan DP, Salkeld SL, Scarborough N. Histologic analysis of implant sites after grafting with demineralized bone matrix putty and sheets. *Implant Dentistry* 2000; 9:36-44.
16. Schopper C, Moser D, Wanschitz F, et al. Histomorphologic findings on human bone samples six months after bone augmentation of the sinus maxillary with algipore. *J Long Term Eff Med Implants.* 1999; 9: 203-213.

17. Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, et al. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (Ostertograf/N) with and without autogenous bone: a clinical , histologic, radiographic and histomorphometric analysis-part 2 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Rest Dentistry*. 1998; 18: 528-543.
18. Watzinger F, Luksch J, Millesi W, et al. Guided bone regeneration with titanium membranes: a clinical study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 14: 312-315.
19. Bhatnagar RS, Qian JJ, Gough CA. The role in cell binding of a beta-bend within the triple helical region in collagen alpha 1 chain: structural and biological evidence for conformation tautomerism on fiber surface. *J Biomol Struct Dyn* 1997; 14(5): 547-560.
20. Bhatnagar RS, Qian JJ, Wedrycowska A, et al. Design of biomimetic habits for tissue engineering with P-15, a peptide synthetic analogue of collagen. *Tissue Eng*. 1999; 5(1): 53-65.
21. 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(4): 545-54.
22. Artzi Z, Miron W, Tal H, Nemcovsky CE, Rohrer MD, Prasad HS, Kozlovsky A. Experimental intrabony and periodontal defects treated with natural mineral combined with a synthetic cell-binding peptide in the canine: morphometric evaluations. *J Periodontol* 2006; 77: 1658-1664.
23. Eto AL, Joly JC, Jeffcoat M, Araújo NS, Araújo VC, Cury PR. Use of Anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P-15) in the treatment of class II furcation defects: A clinical and radiographic study in humans. *J Periodontol* 2007; 78: 2277-2283.

24. Barros RRM, Novaes Jr AB, Roriz VM, Oliveira RR, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr M, Palioto DB. Anorganic bovine matrix/P-15 "flow" in the treatment of periodontal defects: case series with 12 months of follow-up. *J Periodontol* 2006; 77: 1280-1287.
25. Neiva RF, Tsao Y-P, Eber R, Shotwell J, Billy E, Wang H-L. Effects of a putty-form hydroxyapatite matrix combined with the synthetic cell-binding peptide p-15 on alveolar ridge preservation. *J Periodontol* 2008; 79:291-299.
26. Kubler A, Neugebauer J, Oh J-H, Scheer M, Zoller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes. An vitro study. *Implant Dent* 2004; 13: 171-179.
27. Scarano A, Iezzi G, Petrone G, Orsini G, Degidi M, Strocchi R, Piattelli A. cortical bone regeneration with a synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric pilot study. *Implant Dent* 2003; 12(4): 318-324.
28. Vastardis S, Yukna RA, Mayer ET, Atkinson BL. Periodontal regeneration with peptide-enhanced anorganic bone matrix in particulate and putty form in dogs. *J Periodontol* 2005; 76: 1690-1696.
29. Barboza EP, Souza RO, Caúla AL, Neto LG, Caúla FO, Duarte MEG. Bone regeneration of localized chronic alveolar defects utilizing cell binding peptide associated with anorganic bovine-derived bone mineral: A clinical and histological study. *J Periodontol* 2002; 73: 1153-1159.
30. Matos SM, Guerra FA, Krauser J, Marques F, Ermida JM, Sanz M. Clinical evaluation of the combination of an anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P15) in particulate and hydrogel form as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month reentry controlled clinical study. *J Periodontol* 2007; 78: 1855-1863.

31. Yukna RA, Salinas TJ, Carr RF. Periodontal regeneration following use of ABM/P-15: A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002; 22(2): 146-155.
32. 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(P15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *J Periodontol* 2002; 73:123-128.
33. Hahn J. 8-year onlay bone graft and ridge augmentation with PepGen P15: a clinical and radiographic case study. *Implant Dent* 2004; 13: 228-231.
34. Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, Evans GH, Aichelmann-Reidy ME, Moore K, Cruz R, Scott B. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix(ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol* 1998; 69(6): 655-663.
35. 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. *J Periodontol* 2000; 71(11): 1671-1679.
36. Roriz VM, Souza SL, Taba MJr, Palioto DB, Grisi MF. Treatment of class III furcation defects with expanded polytetrafluorethylene membrane associated or not with anorganic bone matrix/synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric study in dogs. *J Periodontol.* 2006 Mar; 77(3): 490-7.

***Resumo***

---

**Introdução:** A falta de previsibilidade no tratamento periodontal regenerativo de defeito de furca grau III, têm estimulado o estudo de alternativas para melhorar os resultados, através do emprego de diferentes técnicas e biomateriais. Um novo enxerto ósseo enriquecido com peptídeos - Matriz óssea bovina inorgânica/P15 (PepGen P15) - foi desenvolvido recentemente e, segundo a literatura, mostrou resultados significantes em relação à neoformação tecidual nos defeitos infra-ósseos testados. Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar o potencial regenerativo da matriz óssea inorgânica/P15 particulada, no tratamento de defeitos de furca grau III em cães associado ou não ao uso de membrana de PTFE-e

**Material e Métodos:** Foram utilizados seis cães, nos quais defeitos de furca grau III nos pré-molares inferiores foram confeccionados, sendo que no grupo teste foi utilizado a membrana de PTFE-e e a matriz óssea inorgânica/P15, no grupo controle foi utilizada somente a membrana e no grupo controle negativo, nos 2º pré-molares, não foi colocado biomaterial. Os defeitos foram confeccionados e preenchidos com material de impressão (Impregum F) e após 21 dias foram debridados, as raízes aplainadas com cureta Gracey (Hu-friedy) e os dentes submetidos à profilaxia semanal com ultra-som e limpeza diária com digluconato de clorexidina a 0,12% durante 15 dias. Na segunda fase cirúrgica, foram realizadas marcações do nível ósseo nas raízes mesial e distal dos dentes P2, P3 e P4, colocação das membranas e do enxerto ósseo nos respectivos defeitos. Os dentes P3 e P4 foram aleatoriamente escolhidos para ser o grupo teste ou controle. Quatro semanas após a colocação das membranas, estas foram retiradas e, doze semanas após a remoção, os animais foram sacrificados. Os dentes e seus tecidos periodontais de proteção e suporte foram removidos, fixados em formalina tamponada a 10%, descalcificados em ácido tricloroacético a 10%, desidratados e

seccionados no plano mésio-distal em cortes semi-seriados com 7 $\mu$ m de espessura cada. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) ou tricrômico de Mallory (TM) sendo selecionados para a análise histomorfométrica 5 cortes representativos da porção central da bifurcação. Foram realizadas medidas da área total da bifurcação (AT), área de novos tecidos formados (ANT), área de epitélio (AE), área de tecido conjuntivo (ATC), área de novo osso (ANO) e medidas lineares da extensão representativa da altura do defeito (ED), extensão do novo tecido extensão (ENT), extensão do novo osso (EO), extensão da bifurcação (EB) e extensão do novo cimento (EC).

**Resultados:** A análise histológica demonstrou características morfológicas similares entre os grupos avaliados. Adicionalmente, o grupo teste apresentou grânulos do enxerto ósseo, envoltos por uma matriz óssea imatura, aprisionado entre os tecidos neoformados. Os resultados das médias das medidas lineares (mm) e das medidas de área (mm<sup>2</sup>) foram respectivamente os seguintes para o grupo teste: 14,11  $\pm$  1,74 (EF) e 17,62  $\pm$  2,39 (ATF); 8,61  $\pm$  3,24 (EC) e 14,66  $\pm$  3,73 (ANT); 4,71  $\pm$  0,54 (ED) e 0,90  $\pm$  0,80 (AE); 3,78  $\pm$  0,85 (ENT) e 5,36  $\pm$  2,41 (ATC); 1,77  $\pm$  1,54 (EO) e 6,52  $\pm$  5,69 (ANO); 4,82  $\pm$  2,98 (DO). As seguintes médias lineares e de área para o grupo controle respectivamente: 13,19  $\pm$  2,03 (EF) e 15,11  $\pm$  3,29 (ATF); 8,52  $\pm$  3,54 (EC) e 11,88  $\pm$  2,09 (ANT); 4,59  $\pm$  0,65 (ED) e 0,95  $\pm$  0,71 (AE); 3,54  $\pm$  0,61 (ENT) e 5,19  $\pm$  2,17 (ATC); 1,64  $\pm$  1,06 (EO) e 4,17  $\pm$  3,40 (ANO); 2,58  $\pm$  1,71 (DO). E as seguintes médias lineares e de área para o grupo controle negativo respectivamente: 13,54  $\pm$  1,41 (EF) e 14,99  $\pm$  3,13 (ATF); 6,56  $\pm$  2,11 (EC) e 11,13  $\pm$  3,25 (ANT); 4,62  $\pm$  0,47 (ED) e 0,95  $\pm$  0,78 (AE); 3,59  $\pm$  0,28 (ENT) e 5,89  $\pm$  0,87 (ATC); 0,98  $\pm$  0,48 (EO) e 2,88  $\pm$  2,49 (ANO); 2,35  $\pm$  2,00 (DO). A análise estatística dos dados, realizada através da aplicação do teste de Friedman Test ( $p <$

0,05), demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre o grupo teste e controle negativo no parâmetro referente à ANO.

**Conclusão:** Pode-se concluir que a matriz óssea inorgânica/P15 apresentou resultados semelhantes aos outros grupos em relação à regeneração periodontal do defeito. No entanto, quando a matriz óssea permaneceu no defeito, apresentou resultados satisfatórios através da formação óssea que circunscreveu as partículas.

**Palavras-chave:** Membrana de politetrafluoretileno expandido, lesão de bifurcação grau III, Matriz óssea bovina inorgânica/P15, regeneração periodontal.

## ***Introdução***

---

Um dos principais objetivos da terapia periodontal é o de possibilitar a regeneração dos tecidos<sup>1</sup> e o restabelecimento da função e arquitetura em um periodonto acometido por doenças periodontais inflamatórias<sup>2,3</sup>.

O processo de regeneração periodontal requer nova formação de osso, cemento e ligamento periodontal, através da migração, proliferação e diferenciação de células do ligamento periodontal (cementoblastos, fibroblastos e osteoblastos)<sup>1</sup> e células mesenquimais indiferenciadas<sup>4,5,6</sup> para a área do coágulo formado após as diferentes terapias periodontais<sup>5</sup>.

Na tentativa de reparação dos tecidos lesionados no processo inflamatório, as células da lâmina própria do tecido gengival migram para o defeito levando à formação de epitélio juncional longo<sup>4,7</sup>. Adicionalmente, as células derivadas do tecido conjuntivo também migram e podem acarretar a reabsorção óssea e provocar como consequência a anquilose, desta forma impedindo o processo de regeneração periodontal<sup>8</sup>. Com exceção, as células do ligamento periodontal representam a população celular que levam à formação de nova inserção e favorecem a nova formação tecidual<sup>8</sup>.

A utilização de barreiras físicas como as membranas, absorvíveis ou não, na técnica de regeneração tecidual guiada (RTG), tem sido a técnica mais utilizada para o alcance da regeneração periodontal. Quando interposta entre a ferida cirúrgica e o tecido gengival conjuntivo, impede a migração das células do tecido epitelial e do conjuntivo para a superfície radicular, permitindo, como consequência, o repovoamento desta e do coágulo formado pelas células do ligamento periodontal e do endóstio<sup>9,10,11</sup> tornando possível a neoformação de cemento, ligamento periodontal e osso<sup>3,6,12</sup>. Dentre os variáveis tipos de barreiras testados, a membrana

de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), é um material não absorvível semipermeável que atinge estes requisitos. O seu comportamento biológico já foi amplamente avaliado em estudos clínicos e histológicos<sup>6-11</sup>.

Muitos trabalhos, utilizando membranas de PTFE-e demonstram a formação de novas inserções e ganho ósseo no tratamento de lesões de furca grau II e defeitos infra-ósseos verticais ou angulares<sup>6,13,14,15,16</sup>.

A obtenção de resultados consistentes, em relação à aplicação da RTG, nos tratamentos de defeitos de bifurcação, são muito mais difíceis que os defeitos infra-ósseos segundo Mehlbauer et al<sup>22</sup>. Dentre os defeitos de bifurcação, aqueles considerados grau II são mais favoráveis ao tratamento regenerativo, principalmente os presentes nas faces livres dos molares inferiores<sup>17,20</sup>.

Os defeitos de bifurcação grau III são menos previsíveis e não promovem resultados satisfatórios<sup>18</sup>, devido à sua morfologia, altura (maior que 4 mm) e largura do defeito, dificuldade de descontaminação das superfícies radiculares, quantidade de células do ligamento periodontal disponíveis, provindas das paredes ósseas remanescentes, entre outros fatores, diminuindo a chance de ocorrência de completa regeneração<sup>14,19</sup>. No entanto, existem estudos que mostram resultados significativos, através do fechamento parcial ou total da lesão de bifurcação grau III utilizando-se somente a RTG ou a associação desta com diferentes biomateriais<sup>19,21,22</sup>. Outros trabalhos mostram o fechamento parcial da lesão de furca III frente a diferentes terapias regenerativas e salientam que a taxa de sucesso é reduzida<sup>3,17,23,24,25</sup>. Por estas razões muitos trabalhos têm utilizado modelos experimentais de furca grau III para testar o potencial de novos biomateriais<sup>2,20,27</sup>.

Vários biomateriais estão sendo empregados na técnica de RTG, principalmente em defeitos de furca grau III, o qual tem representado um grande

desafio<sup>21</sup>. Funcionando como materiais de preenchimento e mantenedores de espaço,<sup>9</sup> os enxertos ósseos possuem potencial osteogênico através da osteoindução ou osteocondução<sup>22,11,12</sup> e podem contribuir para o fechamento dos defeitos de bifurcação grau III, porém os resultados são diversos e imprevisíveis.

Mais recentemente tem sido realizadas pesquisas com um novo enxerto ósseo, o qual é a combinação de uma parte inorgânica (matriz óssea mineral bovina inorgânica-MOMBI) que contém cálcio, essencial para a formação óssea e de uma parte orgânica que é uma seqüência sintética de 15 aminoácidos do colágeno tipo I (P15), responsável pela adesão celular e iniciação de outros eventos celulares (migração, proliferação e diferenciação) necessários para o reparo ósseo<sup>26,27,28,29</sup>.

Este enxerto ósseo mostra ser bastante seguro quanto à imunogenicidade e a transmissibilidade de doenças, sendo que a matriz óssea mineral bovina inorgânica é processada de forma que elimina toda matéria orgânica. O P15 é produzido sinteticamente e, portanto exclui qualquer associação com derivados naturais do colágeno<sup>30,31</sup>.

A matriz óssea inorgânica/P15 aumenta a ligação dos fibroblastos e a migração, proliferação e diferenciação de células do ligamento periodontal para as superfícies radiculares, as quais promovem o aumento da formação da matriz óssea<sup>25,26,29,30,31,32</sup> indicando o potencial osteogênico deste material simulando biologicamente o osso autógeno. Este novo enxerto tem sido citado como um biomaterial que leva à verdadeira regeneração periodontal<sup>28,32,33</sup>.

A matriz óssea inorgânica/P15 pode ser encontrada no mercado na forma particulada (seco) ou em gel. Ambas as formas, quando utilizadas, proporcionam aumento significativo de nova formação óssea no defeito<sup>28,29</sup>. Há relatos de que o P15 flow (gel) quando utilizado em alvéolos frescos e defeitos infra-ósseos em

humanos, promoveu formação óssea comprovada por análise histomorfométrica e radiografias respectivamente<sup>34,35</sup>. Porém, a baixa viscosidade do P15 flow, e a chance de escoamento, podem levar à resultados insatisfatórios quando utilizados em defeitos críticos<sup>36</sup>. A matriz óssea inorgânica/P15 particulada, não apresenta esta desvantagem e tem as mesmas propriedades do flow.

Estudos in vitro relatam que a matriz óssea inorgânica/P15 particulada promoveu maior índice de proliferação e migração de células do ligamento periodontal, quando analisado isoladamente ou comparativamente à outros enxertos ósseos empregados<sup>27,31,33,37</sup>. Esta propriedade da matriz óssea inorgânica/P15 pode ser demonstrada clinicamente, através do alcance de um maior preenchimento do defeito ósseo, se comparado ao tratamento com o enxerto ósseo desmineralizado e liofilizado (DFDBA) e ao uso da hidroxiapatita derivada de matriz bovina inorgânica<sup>26,38</sup>. Em um estudo, no qual a matriz óssea inorgânica/P15 particulada foi empregado em um defeito infra-ósseo e foi realizada análise histológica, pode ser observada regeneração periodontal<sup>32</sup>. Portanto, de acordo com Yukna<sup>32</sup>, matriz óssea inorgânica/P15 resulta na regeneração periodontal em uma superfície radicular humana previamente contaminada.

Devido ao potencial da matriz óssea bovina inorgânica/P15 e considerando o fato do defeito de furca grau III ser o modelo experimental que apresenta maior dificuldade em se obter a regeneração é que se baseia o fundamento deste estudo.

***Proposição***

---

O presente trabalho teve como objetivo avaliar histomorfometricamente em cães o potencial regenerativo da matriz óssea bovina inorgânica/P15 particulada na regeneração periodontal de lesões de bifurcação grau III mandibulares.

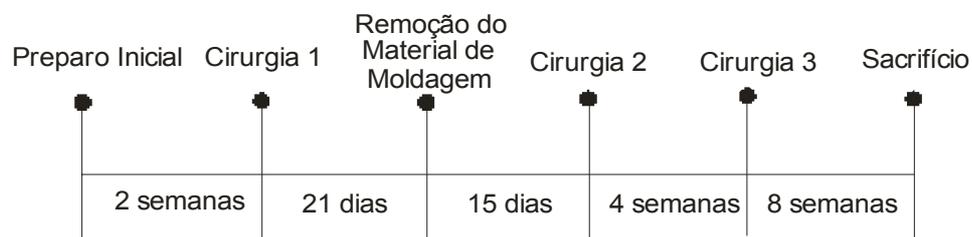
## ***Material e Métodos***

---

## SELEÇÃO DO ANIMAL:

Neste estudo foram utilizados seis (6) cães adultos de raça indefinida com peso médio de 20 Kg cada. Os animais gozavam de boa saúde geral, possuindo dentes maxilares e mandibulares intactos e sem traumas oclusais primários ou lesões bucais de natureza viral ou fúngica avaliadas clinicamente.

A parte experimental clínica seguiu o seguinte cronograma:



Onde:

- Cirurgia 1 - Confeção dos defeitos
- Cirurgia 2 – Colocação da membrana e da matriz óssea inorgânica/P15 nos grupos Controle e Teste
- Cirurgia 3 - Remoção das membranas 4 semanas após sua colocação -

A seguir, será feita a descrição dos procedimentos realizados.

## PREPARO INICIAL: Tratamento pré-cirúrgico

Quinze dias antes da primeira cirurgia, os animais receberam complexos vitamínicos na dose estipulada para a necessidade de cada cão, vacinas e tratamento antiparasitário e foram submetidos à limpeza de seus dentes com o uso do ultra-som<sup>Φ</sup> para remoção de placa e cálculo dentários.

<sup>Φ</sup> Cavitron 3000, Dentsply Mfg. Co, USA.

### **CIRURGIA 1:** Confecção dos defeitos ósseos.

Os animais foram mantidos em jejum desde a noite anterior ao ato cirúrgico. Receberam injeção intramuscular do pré-anestésico Zolazepan a 0,10 ml/kg e Acepromazina a 0,10ml/kg. A manutenção anestésica foi realizada com anestésico volátil diluído em oxigênio- Isoflurano<sup>ð</sup>- até o fim do ato cirúrgico.

Para a confecção dos defeitos de furca grau III, foram realizadas incisões intrasulculares, com lâmina de bisturi número 15C<sup>θ</sup> colocada em cabo próprio, nas faces vestibular e lingual dos dentes P2, P3 e P4 mandibulares e retalhos mucoperiosteais foram rebatidos. Após o deslocamento do retalho, sob irrigação com solução salina, foi realizado osteotomia na área da bifurcação com brocas cirúrgicas<sup>€</sup> (números 1014 e 1016) diamantadas em alta rotação com irrigação e cinzéis de Ochsenbein<sup>β</sup> (números 1 e 2).

Os defeitos de bifurcação preparados, nos pré-molares, apresentaram 3 mm de remoção de tecido ósseo no sentido ápico-oclusal, padronizados com o auxílio de sonda periodontal graduada milímetro a milímetro<sup>¥</sup>. No sentido méσιο/distal foram feitas remoções uniformes de osso no lado vestibular e lingual. No sentido vestibulo/lingual, a remoção óssea foi feita até ocorrer a comunicação vestibulo- lingual entre as raízes.

Após o preparo das cavidades ósseas, as mesmas foram preenchidas com material de moldagem tipo poliéter<sup>¥</sup> (Impregum F), com a finalidade de induzir uma resposta inflamatória e dificultar a reparação espontânea do defeito, além de favorecer o acúmulo de placa bacteriana. Os retalhos foram reposicionados e suturados através sutura interrompida, com fio seda 4.0<sup>&</sup>. A remoção da sutura foi feita após 10 dias.

---

<sup>ð</sup> Isoflurano, Instituto Bioquímico, Atibaia-SP.

<sup>θ</sup> Becton Dickinson, Juiz de Fora-MG, Brasil.

<sup>€</sup> KG Sorensen, São Paulo, Brasil.

<sup>β</sup> Hu-Friedy MFG. Co.Inc., Chicago, USA.

<sup>¥</sup> PCPUNC15, Hu-Friedy MFG. Co.Inc., Chicago, USA.

<sup>¥</sup> Impregum F, 3M do Brasil LTDA, Sumaré-SP, Brasil

<sup>&</sup> Seda, ethicon Inc., Johnson & Johnson Company, São José dos Campos – SP, Brasil.

## REMOÇÃO DO MATERIAL DE MOLDAGEM E DESCONTAMINAÇÃO RADICULAR

O material de impressão permaneceu na área da furca por 21 dias e após este período, o Impregum através de raspagem e alisamento radicular com curetas tipo Gracey<sup>§</sup> (Hu-friedy), em campo fechado. Os dentes foram submetidos a profilaxia com ultra-som semanalmente e, aplicação da solução de digluconato de clorexidina a 0,12%<sup>¶</sup>, com gaze diariamente durante 15 dias.

### CIRURGIA 2: Realização dos grupos experimentais

Duas semanas após o regime de controle de placa, foram iniciadas as cirurgias para a realização dos tratamentos. Foi efetuado o mesmo procedimento de sedação e anestesia idêntica à primeira cirurgia. Este segundo procedimento cirúrgico, foi precedido por profilaxia com ultra-som e aplicação de digluconato de clorexidina com gaze. Em seguida, as incisões intrasulculares foram realizadas tanto por vestibular como por lingual permitindo desta forma a exposição dos defeitos de bifurcação bilateralmente. Após o deslocamento dos retalhos mucoperiosteais, os defeitos e as raízes foram raspados e alisados com curetas tipo Gracey (Hu-Friedy) e os defeitos ósseos medidos no sentido ápico-oclusal, méso-distal e vestibulo-lingual com sonda milimetrada padronizada. Para a análise histomorfométrica, foram realizados os notches (marcações) com broca esférica 33 e 1/2<sup>º</sup> sob abundante irrigação com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril.

Foram realizados três grupos experimentais: grupo teste, controle e controle negativo e estes foram aleatorizados em sorteios selecionando o lado da mandíbula

---

<sup>§</sup> Hu-Friedy Mfg. Co. Inc., Chicago-IL, EUA.

<sup>¶</sup> Periogard, Colgate-Palmolive Company, New York, EUA.

<sup>º</sup> KG Sorensen, São Paulo, Brasil.

e os dentes, P3 e P4, que receberam os respectivos grupos sorteados, com exceção do P2.

#### Grupos Experimentais:

Os grupos experimentais e os tratamentos realizados foram os seguintes:

-Grupo Teste (T): foi utilizada a matriz óssea inorgânica/P15 (Pepgen P15)<sup>b</sup> particulada e a membrana de politetrafluoretileno – PTFE-e tipo GTW2<sup>F</sup> (Gore-tex), sendo uma membrana por vestibular e outra por lingual, no defeito de furca grau III do dente sorteado.

-Grupo Controle (C): foi utilizada somente a membrana de PTFE-e tipo GTW2 no lado vestibular e lingual no defeito de furca grau III do dente sorteado.

-Grupo Controle Negativo (CN): realizado somente no P2 e não foi utilizado biomaterial e membrana no defeito de furca grau III.

Após a realização dos tratamentos descritos acima, os retalhos foram reposicionados e suturados com fio 5.0 de PTFEe<sup>β</sup>.

#### Tratamento Pós-Cirúrgico:

As suturas foram removidas 10 dias após o ato cirúrgico e neste período os cães foram alimentados com ração pastosa. Foi administrado antibiótico Espiramicina (Stomorgyl 10)<sup>H</sup> na proporção de 1 comprimido /10 Kg durante 10 dias e antiinflamatório (Ketofen 20)<sup>Θ</sup> na proporção de 1 comprimido /20 Kg durante 3 dias.

---

<sup>b</sup> PepGen P15 (Particulada), Dentsply, Friadent-Ceramed, Lakewood, CO, USA.

<sup>F</sup> Gore-Tex, W.L.Gore and Associates. Inc., Flagstaff, AZ, USA.

<sup>β</sup> Gore-Tex, Periodontal Material, AZ, USA.

<sup>H</sup> Stomorgyl 10, Merial Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP.

<sup>Θ</sup> Ketofen, Merial Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP.

O controle da cicatrização foi periódico: os animais foram submetidos a aplicações diárias de digluconato de clorexidina a 0,12% e, semanalmente, sob sedação, receberam profilaxia com ultra-som para a remoção de resíduos supragengivais, evitando as áreas das membranas.

### **CIRURGIA 3: Remoção das membranas quatro semanas após a colocação**

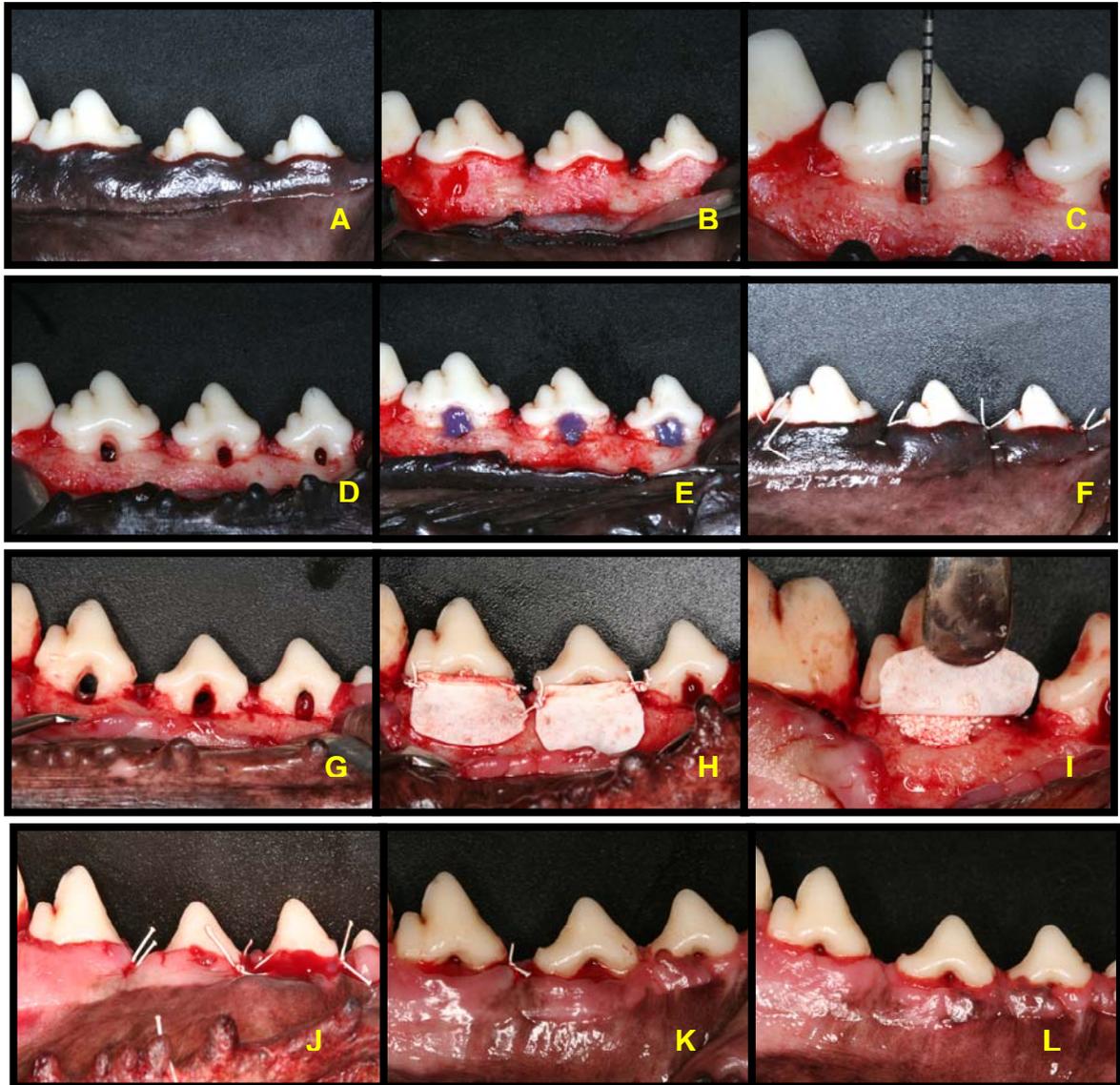
Este terceiro procedimento cirúrgico foi precedido por profilaxia com ultra-som e aplicação de digluconato de clorexidina com gaze. Foi efetuada a mesma sequência de sedação e anestesia idêntica à primeira cirurgia. Em seguida, através de pequenas incisões intrasulculares nos dentes P3 e P4, as membranas foram removidas, tanto do grupo teste como do grupo controle e suturados com fio seda 4.0.

#### Controle pós-operatório

Após a Cirurgia 3 e até o sacrifício, os animais receberam controle de placa bacteriana diário, através de escovação e aplicação de digluconato de clorexidina a 0,12%, e semanal, através de profilaxia com ultra-som (sob sedação).

### **SACRIFÍCIO DOS CÃES**

Os animais foram sacrificados 12 semanas após a Cirurgia 2 – colocação das membranas- com uma dose letal de tiopental sódico.



**Figura 1 A-L:** **A** - Aspecto inicial mucosa; **B** - Retalho mucoperiosteio; **C** - Medida da altura do defeito; **D** - Defeitos criados; **E** - Colocação do Impregum; **F** - Reposicionamento do retalho e sutura; **G** - Aspectos dos defeitos na reabertura do retalho para a cirurgia 2; **H** - Posicionamento das membranas; **I** - Colocação do enxerto ósseo (PepGen P15); **J** - Reposicionamento do retalho e sutura; **K** - Aspecto da mucosa após a remoção das membranas; **L** - Pós-operatório na data do sacrifício.

## **PROCESSAMENTO DAS PEÇAS:**

Imediatamente após o sacrifício, foi realizada a dissecação das mandíbulas e redução das peças para se remover os dentes e os tecidos circunvizinhos envolvidos na pesquisa. As peças foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% em pH 7 por um período de 48 horas e, em seguida, lavadas em água corrente. A seguir, cada peça foi amarrada separadamente por uma gaze e colocada suspensa num recipiente contendo ácido tricloroacético a 10%, a fim de ser descalcificada por múltiplos banhos. Foi usado um volume de solução 10 vezes maior que o da peça, trocando-se o líquido a cada 2 dias. O período de descalcificação foi de 30 dias. Em seguida, as peças foram colocadas em uma solução de sulfato de sódio a 5%, para realizar a neutralização do ácido. O passo seguinte foi desidratação em concentrações crescentes de álcool: 70% durante a noite, 80% por duas horas, 85% por duas horas, 90% por duas horas, 95% por duas horas, 100% durante a noite. Após isso, as peças foram diafanizadas em Xilol com três trocas de solução a cada duas horas. Por fim, as peças foram incluídas em parafina aquecida a 60°C.

Com o auxílio de um micrótomo, foram feitos cortes semi-seriados (intervalo de 70 µm entre os cortes) no plano méso-distal, com 7µm de espessura cada, até que fosse atingido o fim do defeito. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou tricrômico de Mallory (TM): a cada dez lâminas, cinco foram coradas com HE, e cinco com TM.

## **ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA**

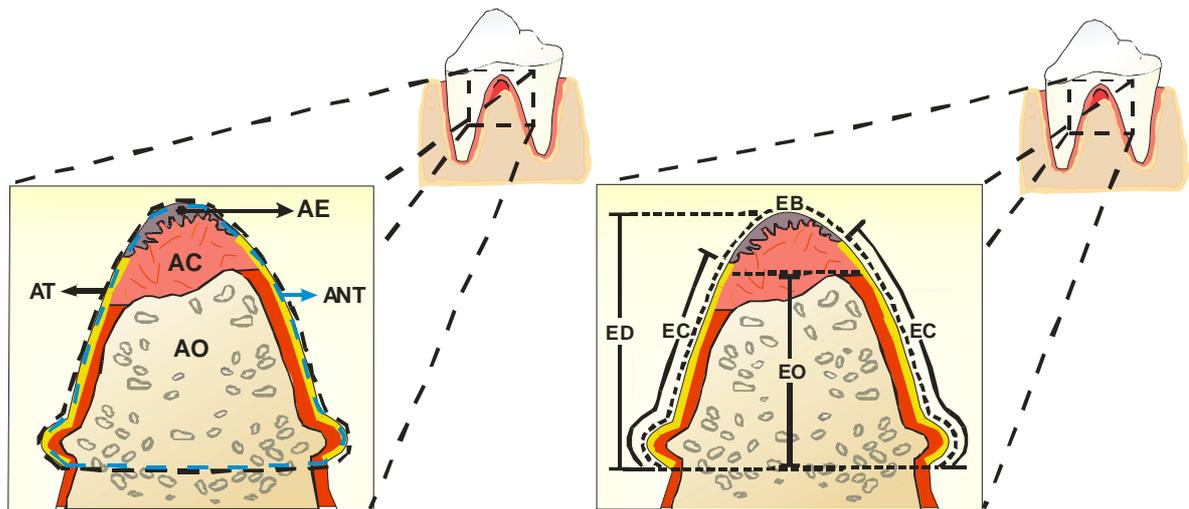
Para a análise microscópica foram selecionados 5 cortes representativos da porção central da bifurcação<sup>35</sup>. Um microscópio óptico<sup>1</sup> acoplado a uma câmera<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Leica DM R, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberger, Nussloch, Germany.

<sup>2</sup> Leica DC-100, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberger, Nussloch, Germany.

para digitalização e posterior análise foi utilizado para a análise histomorfométrica, na qual foram obtidas medidas de área, em milímetros quadrados ( $\text{mm}^2$ ), e medidas lineares em milímetros (mm). Como medidas de área foram avaliadas: área total da bifurcação (AT), área de novo tecido formado (ANT), área de epitélio (AE), área de tecido conjuntivo (ATC), área de novo osso (ANO) e densidade óssea (Figura 2 A). Como medidas lineares foram analisadas: extensão representativa da altura do defeito (ED); extensão do novo osso (EO), extensão da bifurcação (EB) e extensão do novo cimento (EC) e extensão do novo tecido (ENT) (Figura 2 B). Para a obtenção das medidas, o término das marcações das raízes representou a referência do limite apical dos defeitos. Foi realizada também a análise histológica descritiva dos tecidos formados em ambos os grupos. A histomorfometria foi realizada com o auxílio de programa de computador apropriado<sup>3</sup>. A representação do valor das estruturas descritas foi obtida a partir da média dos cinco cortes de cada dente.



**Figura 2 A, B:** **A** - Esquema representativo das medidas de área; **B** - Esquema representativo das medidas lineares.

<sup>3</sup> Image-Pro Plus, Media Cybernetics, LP, Silver Spring, USA.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi realizada através da aplicação de teste Friedman, verificando a existência ou não de diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) na regeneração do periodonto entre os grupos teste, controle e controle negativo.

## ***Resultados***

---

## **OBSERVAÇÕES CLÍNICAS**

Todos os animais toleraram bem os procedimentos cirúrgicos, não apresentando complicações pós-operatórias. Entretanto, em quatro dos seis animais da pesquisa, houve exposição das membranas a partir do décimo quinto dia da colocação destas, tanto no grupo controle como no teste. Em dois cães apenas, não houve exposição das membranas.

No período final da permanência das membranas, observou-se uma retração da margem gengival colaborando este fato para a exposição da membrana previamente descrita.

Durante a fase do controle de placa, após a remoção das membranas, verificou-se que em quatro animais houve recessão gengival e constatou-se exposição de parte da bifurcação. Nestes dentes observou-se a comunicação da face vestibular com a lingual, constituindo-se em um defeito clínico de bifurcação classe III, constatada pela utilização da sonda Nabers, tanto no grupo teste como no grupo controle e controle negativo.

## **AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA**

No grupo controle e controle negativo foram avaliados 12 dentes em cada grupo, tendo sido observada a formação de novos tecidos periodontais (osso, ligamento periodontal e cimento) acima do limite apical da marcação radicular (figura 3 A, B). Em todos os espécimes houve a presença de um tecido epitelial pavimentoso estratificado na porção mais coronal da formação tecidual na área (figura 3 A, B). O tecido conjuntivo mostrou-se denso, de feixes de fibras colágenas inseridos em novo cimento (figura 3 A, B), havendo freqüentemente fibras de

Sharpey ao longo da extensão de bifurcação e sem células inflamatórias mononucleares.

O osso formado foi do tipo imaturo (woven bone), apresentando uma matriz com aspecto entrelaçado e fibras de Sharpey inseridas (figura 3 E, F). Em algumas áreas a matriz óssea também se encontrava organizada de maneira concêntrica ao redor de algumas lamelas (figura 3 E). Foi observada a pavimentação de osteoblastos tanto na superfície interna das lamelas quanto na superfície externa do osso formado (figura 3 F). Também pôde ser observada a presença de matriz osteóide na superfície externa do novo osso (figura 3 E, F).

Foi formado um novo cemento do tipo celular de fibras mistas em toda a extensão do defeito, exceto em áreas onde houve a presença do tecido epitelial (figura 3 C, D), Foram observadas linhas incrementais entre o cemento novo e a dentina. Este tecido, freqüentemente foi depositado sobre áreas irregulares indicativas de reabsorção da superfície dentinária.

As fibras do ligamento periodontal apresentaram-se orientadas num sentido oblíquo e orientadas em direção às raízes (figura 3 C, D). Houve neste ligamento a presença de fibras de Sharpey tanto em novo osso quanto em novo cemento (figura 3 D).

No grupo teste foram avaliados 12 dentes observando-se também a formação de novos tecidos periodontais (osso, cemento e ligamento periodontal) acima do limite apical da marcação da raiz (figura 4 A, B). Houve formação de epitélio pavimentoso estratificado na parte mais coronal da formação tecidual na área em 10 dentes (figura 4 A). O tecido conjuntivo apresentou-se denso, com fibras colágenas inseridas em um novo cemento, havendo freqüentemente fibras de Sharpey ao longo da extensão da bifurcação (figura 4 A).

O osso formado foi considerado do tipo imaturo (Woven bone), apresentando uma matriz com aspecto predominantemente entrelaçado e fibras de Sharpey inseridas (figuras 5 C, D, E, F). Contudo em algumas áreas pôde ser observada a presença de lamelas circundadas por uma matriz óssea concêntrica (figura 5 C). Foi observada a pavimentação de osteoblastos tanto na superfície interna das lamelas quanto na superfície externa do osso formado (figura 4 B).

Em meio à formação do novo tecido ósseo foi possível observar a presença de grânulos do enxerto ósseo (figura 4 C). Estas partículas encontravam-se dispersas na região correspondente à nova formação óssea, à parte mais apical do tecido conjuntivo e/ou no ligamento periodontal (figuras 4 D, F). Observou-se que ao redor do grânulo houve formação de uma matriz óssea imatura com características próprias (figuras 4 D, E, F). Adicionalmente, pôde ser observado que o grânulo envolto por matriz óssea estava “anquilosado” à superfície do cimento, com a união entre ambas as estruturas (figura 4 E).

O tipo de cimento formado foi predominantemente celular de fibras mistas (figuras 5 A, B), sendo gradualmente menos espesso em direção do teto da bifurcação e presente ao longo de todo o defeito, havendo interrupção deste nas áreas de formação epitelial. Este tecido foi freqüentemente depositado sobre áreas irregulares indicativas de reabsorção da superfície dentinária (figura 4 B).

As fibras do ligamento periodontal apresentaram-se predominantemente orientadas em um sentido oblíquo (figuras 5 A, B, E). Houve neste ligamento a presença de fibras de Sharpey tanto em novo osso (figuras 5 E, F) quanto em novo cimento (figuras 5 A, B).

## HISTOMETRIA

Os resultados da análise histomorfométrica estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Os valores percentuais da densidade óssea (DO) em relação à área total óssea (ANO), das áreas ocupadas pelos novos tecidos formados (ANT), pelo osso (ANO), tecido conjuntivo (ATC) e epitélio (AE) em relação à área total da bifurcação (ATF), da extensão do novo osso (EO) e do novo tecido (ENT) em relação à extensão representativa da altura do defeito (ED) e da extensão do cimento (EC) em relação à extensão da bifurcação (EB) estão demonstrados na Tabela 3. Houve diferença estatisticamente significativa (Friedman Test,  $p < 0,05$ ) entre os grupos teste e controle negativo em relação à área novo osso (tabela 2). Comparando-se os outros parâmetros, foi constatado que não houve diferenças estatisticamente significante (Friedman Test  $p < 0,05$ ) entre os grupos controle negativo, controle e teste (tabelas 1 e 2).

No grupo controle negativo o tecido epitelial ocupou uma área (AE) de  $0,95 \pm 0,78 \text{ mm}^2$  representando 7% da área total da bifurcação (AT). O tecido conjuntivo (ATC) apresentou uma formação média de  $5,89 \pm 0,87 \text{ mm}^2$ , preenchendo cerca de 40% da área total dos defeitos (Tabelas 2 e 3). A média de formação do tecido ósseo (ANO) foi de  $2,88 \pm 2,49 \text{ mm}^2$ , representando 20% da AT, ocupando uma extensão (EO) de  $0,98 \pm 0,48 \text{ mm}^2$  (21% da extensão representativa da altura do defeito). A densidade deste novo tecido ósseo foi de  $2,35 \pm 2,00$  (81,5% em relação à área total óssea). O novo cimento ocupou uma extensão (EC) de  $6,56 \pm 2,11 \text{ mm}$  representando 48,4% da extensão da bifurcação (EB) (tabelas 1 e 3).

No grupo controle, o tecido epitelal (AE) ocupou uma média de  $0,95 \pm 0,71 \text{ mm}^2$  representando 7% da área total da bifurcação (AT). O tecido conjuntivo (ATC) apresentou uma formação média de  $5,19 \pm 2,17 \text{ mm}^2$ , preenchendo cerca de 35%

da área total dos defeitos. O novo osso (ANO) apresentou uma formação média de  $4,17 \pm 3,40 \text{ mm}^2$ , representando 28% da AT, e uma extensão (EO) de  $1,64 \pm 1,06 \text{ mm}$  (35% da extensão representativa da altura do defeito). A densidade deste novo tecido ósseo foi de  $2,58 \pm 1,71$  (61,8% em relação à área total óssea). O novo cimento ocupou uma extensão (EC) de  $8,52 \pm 3,54 \text{ mm}$  representando 65% da extensão da bifurcação (EB) (tabelas 1 e 3).

No grupo teste o tecido epitelial ocupou uma área (AE) de  $0,90 \pm 0,80 \text{ mm}^2$  representando 5% da área total da bifurcação (AT). O tecido conjuntivo (ATC) apresentou uma formação média de  $5,36 \pm 2,41 \text{ mm}^2$ , preenchendo cerca de 31% da área total dos defeitos (Tabelas 2 e 3). A média de formação do tecido ósseo (ANO) foi de  $6,52 \pm 5,69 \text{ mm}^2$ , representando 37% da AT, ocupando uma extensão (EO) de  $1,77 \pm 1,54 \text{ mm}^2$  (37,5% da extensão representativa da altura do defeito). A densidade deste novo tecido ósseo foi de  $4,82 \pm 2,98 \text{ mm}^2$  em (80% em relação à área total óssea) O novo cimento ocupou uma extensão (EC) de  $8,61 \pm 3,24 \text{ mm}$  representando 61% da extensão da bifurcação (EB) (tabelas 1 e 3).

**Tabela 1** – Média e desvio-padrão das medidas lineares (mm), para os grupos controle negativo (CN), controle (C) teste (T).

	<i>EF</i>	<i>EC</i>	<i>ED</i>	<i>ENT</i>	<i>EO</i>
CN	$13,54 \pm 1,41$	$6,56 \pm 2,11$	$4,62 \pm 0,47$	$3,59 \pm 0,28$	$0,98 \pm 0,48$
C	$13,19 \pm 2,03$	$8,52 \pm 3,54$	$4,59 \pm 0,65$	$3,54 \pm 0,61$	$1,64 \pm 1,06$
T	$14,11 \pm 1,74$	$8,61 \pm 3,24$	$4,71 \pm 0,54$	$3,78 \pm 0,85$	$1,77 \pm 1,54$
$\rho$	0,31	0,31	0,31	0,85	0,31

EF: Extensão da furca; EC: Extensão do cimento; ED: extensão do defeito; ENT: Extensão do novo tecido; EO: extensão osso  
(Friedman Test,  $p < 0,05$ )

**Tabela 2** - Média e desvio-padrão dos parâmetros medidos em área (mm<sup>2</sup>) para os grupos controle negativo (CN), controle (C) teste (T).

	<b>ATF</b>	<b>ANT</b>	<b>AE</b>	<b>ATC</b>	<b>ANO</b>	<b>DO</b>
CN	14,99 ± 3,13	10,13 ± 3,25	0,95 ± 0,78	5,89 ± 0,87	2,88 ± 2,49*	2,35 ± 2,00
C	15,11 ± 3,29	10,58 ± 2,09	0,95 ± 0,71	5,19 ± 2,17	4,17 ± 3,40	2,58 ± 1,71
T	17,62 ± 2,39	13,00 ± 3,73	0,90 ± 0,80	5,36 ± 2,41	6,52 ± 5,69*	4,82 ± 2,98
ρ	0,31	0,22	0,57	0,85	0,03*	0,12

ATF: Área total furca; ANT: Área de novo tecido; AE: Área de epitélio; ATC: Área de conjuntivo; ANO: Área de novo osso; DO: densidade óssea.

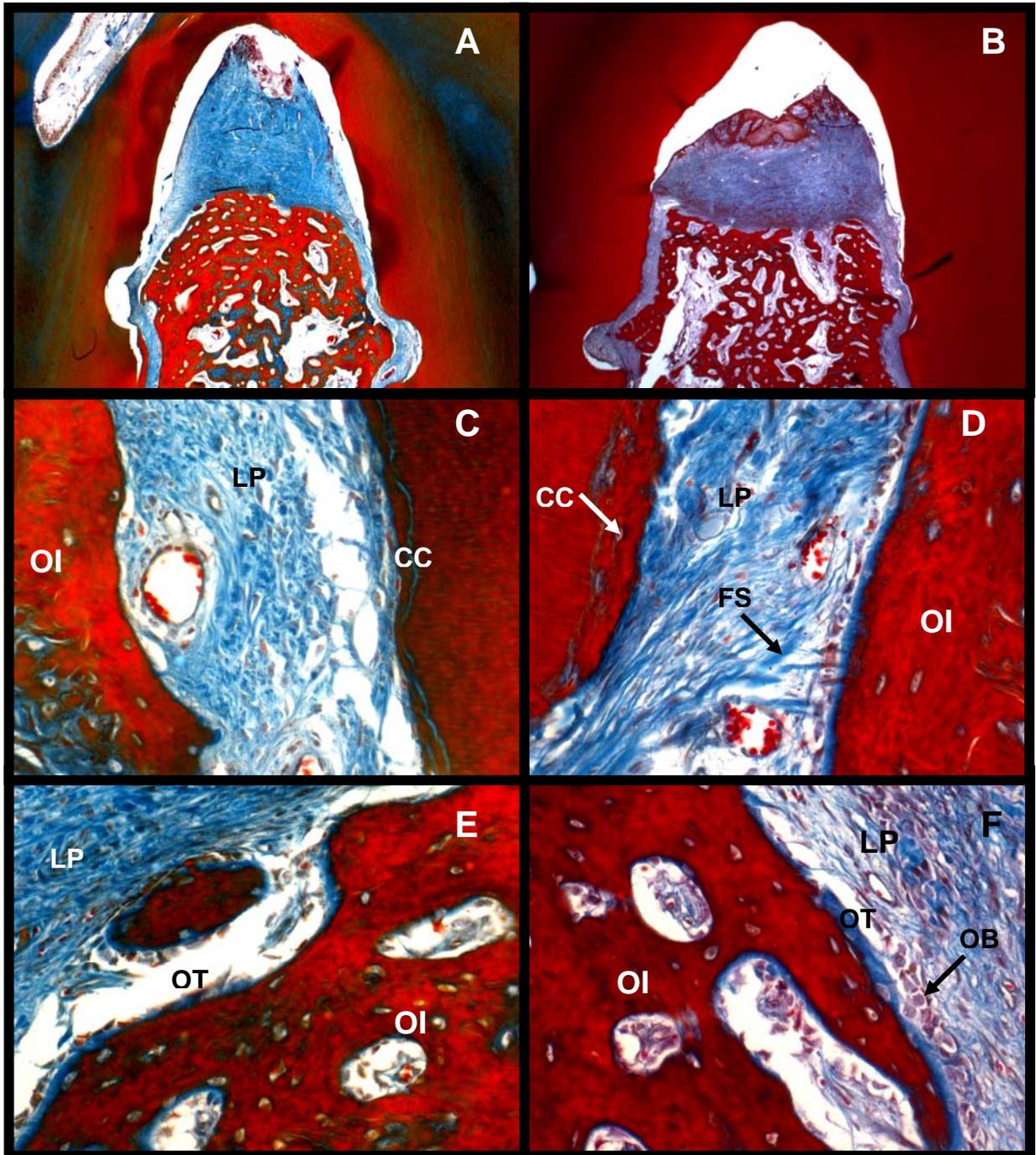
(Friedman Test,  $\rho < 0,05$ )

\*Diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle negativo e teste para o parâmetro ANO ( $\rho = 0,03$ ).

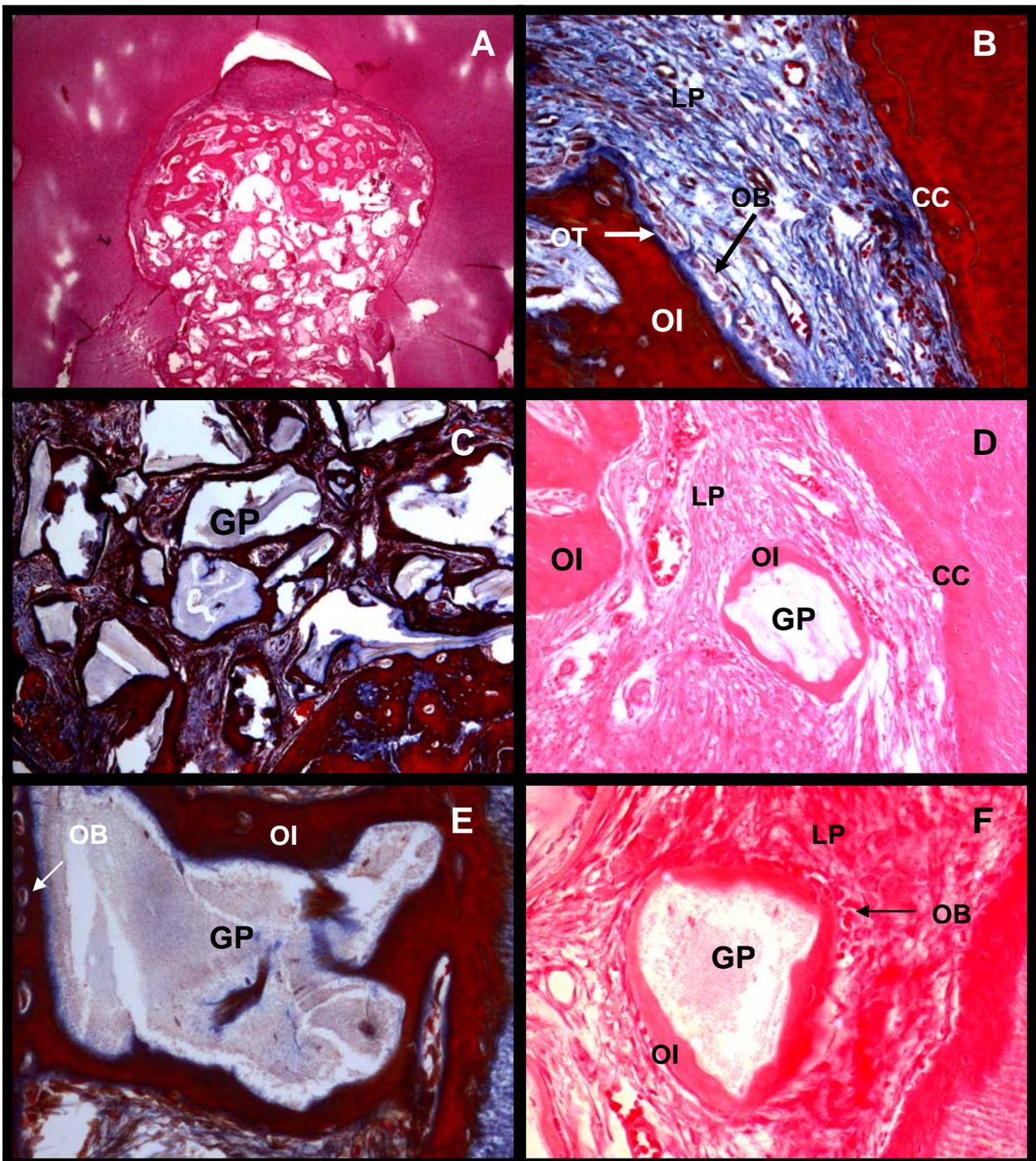
**Tabela 3** - Média dos parâmetros em %.

	<b>EC</b>	<b>ENT</b>	<b>EO</b>	<b>ANT</b>	<b>ANO</b>	<b>ATC</b>	<b>AE</b>	<b>DO</b>
CN	48,4%	77%	21%	67%	20%	40%	7%	81,5%
C	65%	77%	35%	70%	28%	35%	7%	61,8%
T	61%	80%	37,5%	73%	37%	31%	5%	80%

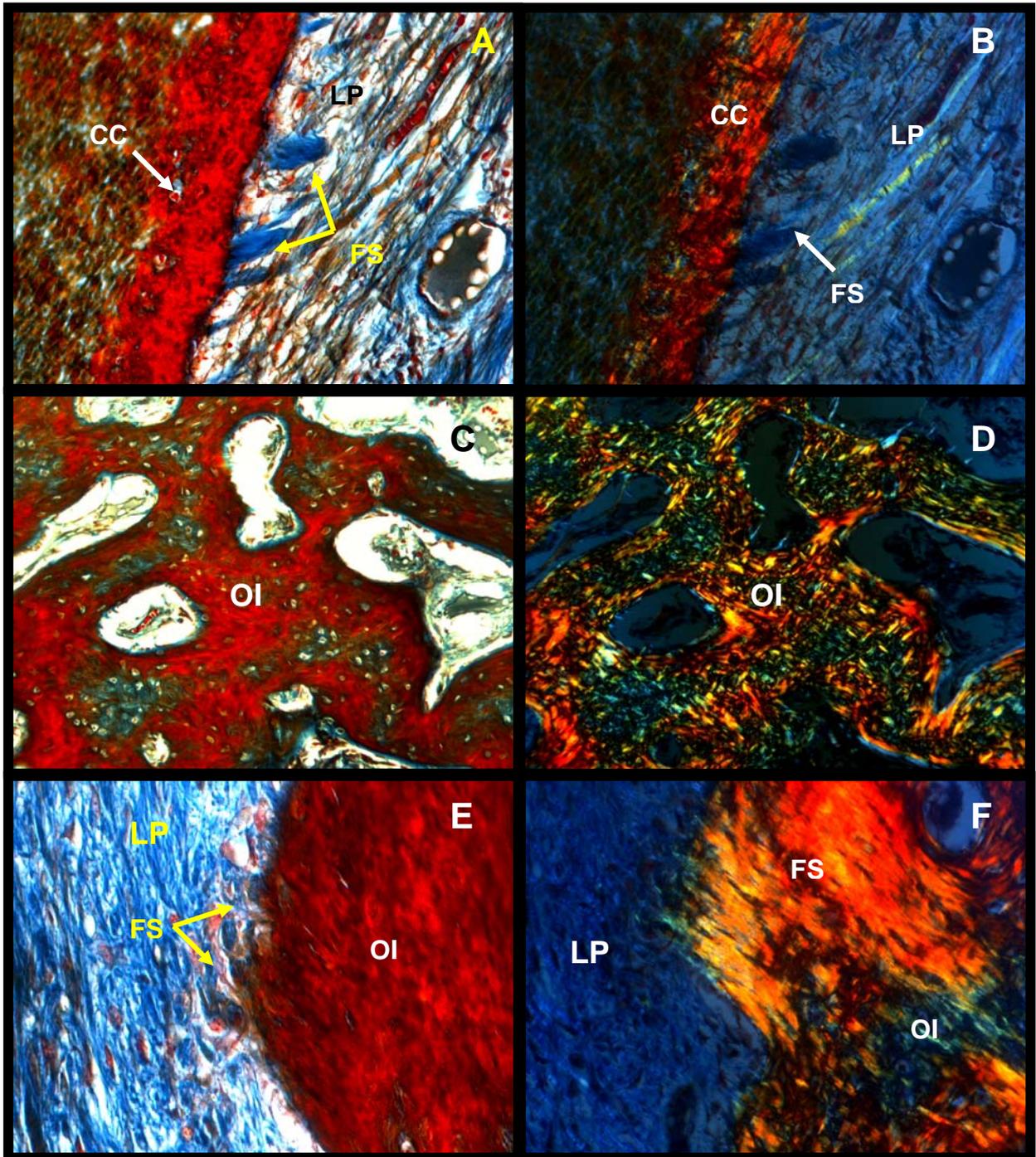
EC: Extensão cimento; ENT: Extensão do novo tecido; Eo: Extensão novo osso; ANT: Área novo tecido; ANO: Área novo osso; ATC: Área tecido conjuntivo; AE: Área epitélio; DO: Densidade óssea



**Figura 3 A-F:** Secções histológicas méso-distais das lesões de bifurcação grau III tratadas, demonstrando a similaridade do padrão histológico dos novos tecidos formados. **A** – Grupo controle negativo; **B** – Grupo controle (Tricrômico de Mallory, aumento original de 2,5X). **C** – Grupo controle negativo: formação de cemento celular (CC), ligamento periodontal com fibras em direção oblíqua (LP), e osso alveolar (OA). **D** – Grupo controle: formação de cemento celular (CC), ligamento periodontal com fibras oblíquas (LP), fibras de Sharpey (FS) e osso imaturo (OI) (Tricrômico de Mallory, aumento original 40x). **E** – Grupo controle negativo: presença osteóide (OT) e osso imaturo (OI) (Tricrômico de Mallory, aumento original 40x). **F** – Grupo controle: setas indicam pavimentação de osteoblastos (OB), osteóide (OT) e osso imaturo (OI) (Tricrômico de Mallory, aumento original 40x).



**Figura 4 A-F:** Secções histológicas demonstrando aspectos dos novos tecidos formados no grupo teste. **A.** – secção méso-distal da lesão de bifurcação grau III tratada (tricroômico de Mallory, aumento original 2.5 x). **B** – formação de cimento celular (CC), ligamento periodontal com fibras em direção oblíqua (LP), osso imaturo (OI), osteóide (OT) e pavimentação de osteoblastos (OB) (tricroômico de Mallory, aumento original 40x). **C** – grânulos da matriz óssea bovina/P15 no interior do defeito (GP) (tricroômico de Mallory, aumento original 10x). **D** – grânulo da matriz óssea bovina/P15 (GP) isolado no ligamento periodontal (LP) (hematoxilina e eosina, aumento original 10x). **E** – grânulo da matriz óssea bovina/P15 (GP), com formação óssea (OI) ao redor e unido ao ligamento periodontal (tricroômico de Mallory, aumento original 40x). **F** – grânulo da matriz óssea bovina/P15 (GP), formação óssea (OI) e a pavimentação de osteoblastos (OB) (tricroômico de Mallory, aumento original 20x).



**Figura 5 A-F:** Secções histológicas demonstram aspectos morfológicos do cimento, osso alveolar e ligamento periodontal no grupo teste. **A** – As setas indicam cementócitos no interior do cimento (CC) e fibras de Sharpey (Tricrômico de Mallory, aumento original de 40X). **B** – Formação de cimento celular de fibras mistas (CC) e das fibras de sharpey sob luz polarizada (Tricrômico de Mallory, aumento original de 40X). **C** – Aspecto do osso imaturo formado (Tricrômico de Mallory, aumento original de 20X). **D** – Aspecto osso imaturo sob luz polarizada (Tricrômico de Mallory, aumento original de 20X). **E** – As setas indicam fibras de sharpey no osso imaturo (Tricrômico de Mallory, aumento original de 40X). **F** – Fibras de sharpey inseridas no osso imaturo sob luz polarizada (Tricrômico de Mallory, aumento original de 40X).

***Discussão***

---

Tratamentos efetivos dos defeitos de bifurcação grau III, representam um grande desafio na periodontia. Apesar de existirem muitas técnicas incluindo a RTG e a associação com os diversos materiais de enxertos ósseos, a efetividade em longo prazo da aplicação destas técnicas, em termos de ganho de inserção ou resolução do defeito, tem causado grandes desilusões e ao mesmo tempo gerado muitas pesquisas<sup>40</sup>. Uma grande variedade de biomateriais foi testada na furca grau III, porém a matriz óssea inorgânica/P15 particulada, recentemente descoberta, ainda não havia sido utilizado neste defeito, no entanto demonstrando excelentes resultados em defeitos infra-ósseos<sup>26,32,38,39</sup>.

O presente estudo avaliou, em cães, o potencial regenerativo da matriz óssea inorgânica/P15 particulada, associado ou não, à membrana de Politetrafluoretileno Expandido (PTFEe) na regeneração periodontal de lesões de bifurcação grau III mandibulares. Os resultados demonstraram que o grupo teste apresentou resultados regenerativos que estão de acordo com trabalhos prévios<sup>28,29,38,41,42</sup>, que indicaram a formação de novo osso, cemento e ligamento periodontal após a utilização da a matriz óssea inorgânica/P15 particulada em diversos modelos experimentais.

Apesar de ter ocorrido nova formação dos tecidos periodontais de suporte nos três grupos experimentais, esta não foi suficiente para que ocorresse o fechamento completo dos defeitos, deixando uma área com ausência de formação tecidual. De acordo com Pontoriero et al<sup>14,43</sup> e Mehlbauer et al<sup>22</sup>, defeitos que possuem altura maior que 4mm, apresentam uma possibilidade menor de regeneração total do defeito. Esta afirmação também é refletida no trabalho de Lindhe et al<sup>20</sup>, no qual o tamanho do defeito levou a uma situação de extrema dificuldade de tratamento, o que pôde ter contribuído grandemente para o não fechamento das bifurcações em nenhum dos grupos tratados. No presente trabalho, a altura dos defeitos de

bifurcação grau III, medidos imediatamente após a confecção destes, foi 3mm. Após a cronificação das lesões com material de impressão, a altura média dos defeitos passou de 3 para 4,8 mm em média em todos os grupos. De acordo com Roriz et al,<sup>36</sup> uma possível hipótese para o fato ocorrido seria o aumento da reabsorção, observado após o período de cronificação da lesão, estimulado pelo material de impressão.

Além do tamanho do defeito, a morfologia deste pode ter influenciado muito na resposta da cicatrização, pois se tratava de um extenso defeito horizontal com apenas uma parede óssea como fonte potencial para o fornecimento das células, essenciais para desencadear a regeneração periodontal<sup>14</sup>. Segundo Lindhe et al.<sup>8</sup> a formação de uma nova inserção, neste tipo de defeito, é portanto dependente do crescimento coronal do tecido do ligamento periodontal, o qual dificulta a neoformação tecidual.

Segundo Scantlebury<sup>44</sup>, vários fatores contribuem para o sucesso das terapias com RTG, dos quais se destacam: a exclusão do epitélio juncional e do tecido conjuntivo, a estabilidade da ferida, a adesão do coágulo de fibrina à superfície radicular e maturação deste, e a manutenção de um espaço adequado, proporcionado pela membrana. Tratando-se de extensos defeitos presentes no estudo, o risco de colapso (vestíbulo-lingual) da membrana tornou-se provável, interferindo na estabilização do coágulo<sup>45</sup> e diminuindo o espaço para a proliferação celular. A estabilização da ferida e a adesão do coágulo são fatores essenciais para que haja a regeneração periodontal<sup>7,46,47</sup> e, podem ter sido prejudicados por situações pertinentes ao modelo experimental. Segundo Caton & Greenstein<sup>48</sup>, a falta de adesão do coágulo de fibrina na superfície radicular, prejudica o vedamento marginal, que pode ter contribuído para a migração do epitélio juncional e do tecido

conjuntivo, conduzindo a uma menor formação de tecido ósseo no grupo controle e teste.

A migração do epitélio juncional e do tecido conjuntivo favoreceram, nos grupos controle e teste, a formação de epitélio na parte mais coronal do defeito e a presença de uma grande porção de tecido conjuntivo. Estes achados também foram encontrados em estudos prévios<sup>20,49</sup> e este fato foi atribuído à retração do retalho no período pós-operatório, expondo a membrana e o fórnix da furca e ao tamanho do defeito<sup>20</sup>. Klinge et al.<sup>50</sup> analisaram a influência da posição do retalho e o tamanho do defeito e observaram que reposicionamento adequado do retalho, pode prevenir a retração marginal do tecido, mas que o tamanho pouco influencia neste aspecto.

Adicionalmente à exposição da membrana e do fórnix da furca, que ocorreu após os primeiros quinze dias de pós-operatório, devido à retração do retalho e favorecendo a migração do epitélio, há outro indício de que a presença da placa com a ação contínua bacteriana, também podem levar um menor sucesso na regeneração dos defeitos de bifurcação grau III<sup>49</sup>.

O grupo teste apresentou um diferencial que foi a presença da matriz óssea inorgânica/P15 particulada, o qual obteve as mesmas interferências citadas anteriormente em relação ao grupo controle, porém alcançou uma média de formação óssea maior e diferenças estatisticamente significantes quando comparado com o grupo controle negativo. Deve-se ressaltar que o preenchimento do defeito através da neoformação tecidual, neste grupo, foi comparativamente maior em relação aos outros grupos, sendo que mais de 50 % dos tecidos foi composta por nova formação óssea.

O fato de não haver diferença significativa entre o grupo teste e controle, pode estar relacionado ao fato de que em dois cães grupos teste, não foram encontrados

grânulos do enxerto ósseo, e nos outros cães, a quantidade encontrada foi relativamente menor quando comparada àquela colocada no defeito no ato cirúrgico, podendo dessa forma diminuir o potencial regenerativo do tratamento. Estes achados também foram encontrados no trabalho de Roriz et al.<sup>36</sup> no qual foi utilizada a matriz óssea inorgânica/P15 flow em defeitos de bifurcação grau III e observou-se que não havia a presença de grânulos em nenhum dos dentes do grupo teste, reduzindo desta forma a formação óssea neste grupo.

Uma provável hipótese para o fato ocorrido e citado anteriormente é de que o defeito de grau III apresenta-se somente com uma parede óssea como limite apical, as raízes dentais como limites proximais, a membrana nas faces livres, além do teto da bifurcação como limite superior. Dessa forma, em contato com o enxerto existiam várias superfícies pouco viáveis. Entretanto, não se deve deixar de lado a possibilidade do material de enxerto ter sido parcialmente substituído por novo osso, ao invés de ter sido perdido.

No entanto, como citado anteriormente, os dentes referentes ao grupo teste de quatro cães apresentaram partículas da matriz óssea inorgânica/P15 particulada após as 12 (doze) semanas da colocação. Nestas peças, foi possível observar uma formação óssea maior no defeito envolvendo os grânulos do enxerto ósseo, com uma densidade óssea de 80% em relação à área total óssea.

Histologicamente pode ser observado que os grânulos concentravam-se próximos à base do defeito, com uma formação óssea ao redor dos grânulos encontrados em meio ao novo tecido em formação, além de uma área óssea formada acima do nível das partículas. A matriz óssea estava em contato direto com as partículas do biomaterial e não havia intervalos entre o enxerto ósseo e o novo osso. Estes achados estão de acordo com estudos prévios realizados em modelos

animais<sup>42,28,41</sup> e humanos<sup>26,29,32,51</sup>, nos quais o tempo médio de avaliação foi de 4 a 12 semanas para os experimentos em animais e de 4 a 6 meses para a avaliação em humanos, evidenciando nova formação óssea nos grupos que continham a matriz óssea inorgânica/P15. A formação de novo osso ao redor de uma partícula que se encontrava no interior do defeito torna-se indicativa do potencial regenerativo deste biomaterial. Adicionalmente Hahn<sup>52</sup>, confirmou a estabilidade deste enxerto ósseo, no período de 8 anos, após a colocação do biomaterial em um alvéolo fresco, através da manutenção do trabeculado ósseo e da estabilidade da parede enxertada.

Este provável potencial regenerativo da matriz óssea inorgânica/P15 particulada exibido anteriormente, pode ser explicado através da estimulação de fibroblastos do ligamento periodontal a se proliferarem mais rapidamente dentro de um defeito recentemente preenchido por partículas<sup>27</sup>, iniciando um processo regenerativo. Esta ocorrência pode ser atribuída à cadeia de quinze aminoácidos - P15 - presente na matriz óssea bovina, o qual tem mostrado facilitar o processo fisiológico de forma similar ao colágeno<sup>31</sup>. Portanto, a matriz óssea inorgânica/P15 pode ser denominada como um enxerto ósseo com propriedades osteoindutoras.

Além da formação óssea, novo cemento foi observado no grupo teste e controle com aspectos histológicos similares para ambos os tecidos (qualitativo). Listgarten<sup>53</sup> e Nalbandian & Frank<sup>54</sup> demonstraram que o cemento que se forma sobre as raízes que foram expostas cirurgicamente se apresenta relativamente fino, com células e com a predominância de fibras colágenas intrínsecas e paralelas à superfície radicular, características estas corroboradas por Roriz et al.<sup>36</sup>. Neste último trabalho citado, os autores analisaram a regeneração das bifurcações grau III,

e encontraram características histológicas do cimento bastante semelhantes às observadas no presente estudo.

Apesar do presente trabalho não ter mostrado uma quantidade de neoformação de tecidos mineralizados aproximada aos valores apresentados em outros estudos<sup>26,38,51</sup> provavelmente pelas dificuldades encontradas nesta pesquisa, a qualidade destes tecidos parece não ter sido prejudicada.

Trabalhos prévios mostraram resultados clínicos e histológicos bastante satisfatórios com a utilização da matriz óssea inorgânica/P15 particuladas em defeitos periodontais. Neste trabalho, ao ser testado em defeitos mais difíceis de alcançar a regeneração periodontal, o potencial regenerativo deste biomaterial parece ter sido demonstrado, quando presente no grupo teste, evidenciando a formação óssea que gerou ao seu redor. A formação de novo cimento e ligamento periodontal, também foi encontrada de forma satisfatória juntamente à área de novo osso.

Porém, para que haja uma confirmação do absoluto potencial deste biomaterial, serão necessários novos trabalhos que o testem nas mais diferentes situações clínicas, com o objetivo de se obter regeneração total e absoluta do defeito.

***Conclusões***

---

Em relação à regeneração periodontal do defeito através da neoformação tecidual, pode ser observada uma similaridade entre os resultados do grupo teste, controle e controle negativo para todos os parâmetros. Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos teste e controle negativo em relação à área de formação óssea. Para todos os outros itens avaliados não houve diferença significativa.

No entanto, o potencial regenerativo da matriz óssea bovina inorgânica/P15 presente no grupo teste pode ser demonstrado através da maior formação de área óssea em relação aos outros grupos, considerando as dificuldades inerentes do modelo experimental. Adicionalmente, quando a Matriz Óssea Inorgânica/P15 permaneceu nos defeitos, pode-se observar evidente formação óssea circunscrevendo as partículas.

Porém, um modelo crítico como o apresentado, não permite evidências conclusivas quanto ao potencial regenerativo da matriz óssea bovina inorgânica/P15.

## ***Referências Bibliográficas***

---

1. Oates TW, Rouse CA, Cohran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 1993; 64:142-148.
2. Araújo MJ, Berglundh T, Lindhe J. GTR treatment of degree III furcation defects with 2 different resorbable barriers. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 253-259.
3. Palioto DB, Joly JC, De Lima AFM, Mota LF, Cafesse R. Clinical and radiographic treatment evaluation of class III furcation defects using GRT with and without inorganic bone matrix. *J Clin Periodontol* 2003; 30:1-8.
4. Melcher AH. On repair potencial of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 47(5):256-60.
5. Ripamonti U, Reddi AH. Periodontal regeneration: potencial role of bone morphogenetic proteins. *J Periodont Res* 1994; 29:225-235.
6. Rossa Jr C, Marcantonio Jr E, Cirelli CA, Marcantonio RAC, Spolidorio LC, Fogo JC. Regeneration of class III furcation defects with basic fibroblast growth factor(b-FGF) associated with GTR. A descriptive and histometric study in dogs. *J Periodontol* 2000; 71: 775-784.
7. Wikesjo UME, Nilvéus RE, Selvig KA. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J Periodontol* 1992; 63: 158-65.
8. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratamento periodontal regenerativo in: *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 2005; 4 ed: 436-438.
9. Caffesse RG, Nasjleti CE, Plotzke AE, Anderson GB, Morrison EC. Guided tissue regeneration and bone grafts in the treatment of furcation defects. *J Periodontol* 1993; 64:1145-1153.
10. Mellado JR, Salkin LM, Freedman AL, Stein MD. A compararive study of ePTFE periodontal membranes with and without decalcified freeze-dried-bone alografts for the regeneration of interproximal intraosseous defects. *J Periodontol* 1995; 66: 751-755.

11. Sigurdsson TJ; Tatakis DM, Lee MB, Wikesjo UME. Periodontal regenerative potential of space-providing expanded polytetrafluorethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. *J Periodontol* 1995; 66:511-521.
12. Guimarães MCM, Passanezi E, Santana ACP, Greggi SLA. Pool of bovine morphogenetic proteins and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony periodontal defects. I clinical measurements. *J Appl Oral Sci* 2004; 12(1): 70-7.
13. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring t, Wennstrom J. New attachment in the human periodontium by guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 604-616.
14. Pontoriero R, Lindhe J, Nyman S, Karring T, Rosenberg E, Sanavi F. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 170-174.
15. Blumenthal NM. A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE membranes in the treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. *J Periodontol* 1993; 64: 925-933.
16. Fernandes JMA, Rego ROCC, Spolidório LC, Marcantonio RAC, Jr EM, Cirelli JA. Enamel matrix proteins associated with GTR and bioactive glass in the treatment of class III furcation in dogs. *Braz Oral Res* 2005; 19(3): 169-75.
17. Eickholz P, Hausmann E. Evidence for healing of class II and III furcations after GTR therapy: digital subtraction and clinical measurements. *J Periodontol* 1997; 68(7):636-644.
18. Garret S, Gantes B, Zimmerman G, Egelberg J. Treatment of mandibular class III periodontal furcation defects. Coronally positioned flaps with and without expanded polytetrafluorethylene membranes. *J Periodontology* 1994; 65(6): 592-597.
19. Pontoriero R, Lindhe J. Guide tissue regeneration in the treatment of degree III furcation defects in maxillary molars. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 810-812.
20. Lindhe J, Pontoriero R, Berglundh T, Araujo M. The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 276-283.

21. Becker W, Becker BE, Berg L., Prichard J, Cafesse R. & Rosenberg E. New Attachment after treatment with root isolation procedures: report for treated class III and class II furcations and vertical osseous defects. *Int Journal Of Periodontics and Rest Dentistry* 1988; 8: 9-23.
22. Mehlbauer MJ, Greenwell H, Nouneh I, Drisko C, Wittwer JW, Yancey J, Rebitski G. Improved closure rate of class III furcations using a layered GTR technique. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20(3): 285-295.
23. Anderegg CR, Martin SJ, Gray JL, Mellnig JT, Gher ME. Clinical evaluation of the use of decalcified freeze-dried bone allograft with guided tissue regeneration in the treatment of molar furcation invasions. *J Periodontol* 1991; 62(4): 264-268.
24. Eickholz P, Kim T-Sun, Holle R, Hausmann E. Long-Term of guided tissue regeneration therapy with non-resorbable and bioabsorbable barriers.I.Class II furcations. *J Periodontol.* 2001; 72: 35-42.
25. Yamanouchi K, Chang CY, Yamada S. A clinical evaluations of guided tissue regeneration in the treatment of classes III and class II furcation bony defects. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1995; 36(1): 9-17.
26. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Gruz 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. *J Periodontol* 2000; 71(11): 1671-1679.
27. Lallier TE, Yukna R, Marie SS, Moses R. The putative collagen binding peptide hastens periodontal ligament cell attachment to bone replacement graft materials. *J Periodontol* 2001; 72(8): 990-997.
28. Scarano A, Iezzi G, Petrone G, Orsini G, Degidi M, Strocchi R, Piattelli A. cortical bone regeneration with a synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric pilot study. *Implant Dent* 2003; 12(4): 318-324.
29. Hahn J, Rohrer MD, Tofe AJ. Clinical, radiographic, histologic, and histomorphometric comparison of PepGen P-15 particulate and PepGen P-15 flow in extraction sockets: a same –mouth case study. *Implant Dentistry* 2003; 12(2): 170-174.

30. Sogal A, Tofe A. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used in dental applications. *J Periodontol* 1999 Sep; 70(9): 1053-63.
31. 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 Aug; 31(4): 545-54.
32. Yukna RA, Salinas TJ, Carr RF. Periodontal regeneration following use of ABM/P-15: A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002; 22(2): 146-155.
33. Lallier TE, Palaiologou AA, Yukna RA, Layman DL. The putative collagen-binding peptide P-15 promotes fibroblast attachment to root shavings but not hydroxyapatite. *J Periodontol*. 2003; 74(4): 458-467.
34. Barros RRM, Novaes Jr AB, Roriz VM, Oliveira RR, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr M, Palioto DB. Anorganic bovine matrix/P-15 "flow" in the treatment of periodontal defects: case series with 12 months of follow-up. *J Periodontol* 2006; 77: 1280-128.
35. Neiva RF, Tsao Y-P, Eber R, Shotwell J, Billy E, Wang H-L. Effects of a putty-form hydroxyapatite matrix combined with the synthetic cell-binding peptide p-15 on alveolar ridge preservation. *J Periodontol* 2008; 79:291-299.
36. Roriz VM, Souza SL, Taba MJr, Palioto DB, Grisi MF. Treatment of class III furcation defects with expanded polytetrafluorethylene membrane associated or not with anorganic bone matrix/synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric study in dogs. *J Periodontol*. 2006 Mar; 77(3): 490-7.
37. Kubler A, Neugebauer J, Oh J-H, Scheer M, Zoller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes. An vitro study. *Implant Dent* 2004; 13: 171-179.
38. Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, Evans GH, Aichelmann-Reidy ME, Moore K, Cruz R, Scott B. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix(ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol* 1998; 69(6): 655-663.
39. 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(P15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *J Periodontol* 2002; 73:123-128.

40. Rupprecht RD, Horning GM, Towle HJ. A clinical evaluation of hydroxyapatite cement in the treatment of class III furcation defects. *J Periodontol* 2001; 72: 1443-1450.

41. Barboza EP, Souza RO, Caúla AL, Neto LG, Caúla FO, Duarte MEG. Bone regeneration of localized chronic alveolar defects utilizing cell binding peptide associated with anorganic bovine-derived bone mineral: A clinical and histological study. *J Periodontol* 2002; 73: 1153-1159.

42. Vastardis S, Yukna RA, Mayer ET, Atkinson BL. Periodontal regeneration with peptide-enhanced anorganic bone matrix in particulate and putty form in dogs. *J Periodontol* 2005; 76: 1690-1696.

43. Pontoriero R, Nyman S, Ericsson I, Lindhe J. Guided tissue regeneration in surgically-produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(3): 159-163.

44. Scantlebury TV. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol*. 1993; 64(11 Suppl): 1129-37.

45. Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodontol Res*. 1987; 22(3): 233-42

46. Wikesjö UM, Claffey N, Egelberg J. Periodontal repair in dogs. Effect of heparin treatment of the root surface. *J Clin Periodontol*. 1991; 18(1):60-4.

47. Claffey N. New attachment and tissue regeneration. *Int Dent J*. 1992; 42(2):71-7.

48. Caton JG, Grenstein G. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 1993;1: 9-15.

49. Park J-B, Matsura M, Han K-Y, Norderyad O, Lin W-L, Genco RJ, Cho MII. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 1995;66:462-477.

50. Klinge B, Nilveus R, Kiger RD, Egelberg J. Effect of flap and defect size on healing of experimental furcation defects. *Journal of Clinical Periodontology*. 1981;8: 236-248.
51. Matos SM, Guerra FA, Krauser J, Marques F, Ermida JM, Sanz M. Clinical evaluation of the combination of a anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P15) in particulate and hydrogel form as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month reentry controlled clinical study. *J Periodontol* 2007; 78: 1855-1863.
52. Hahn J. 8-year onlay bone graft and ridge augmentation with PepGen P15: a clinical and radiographic case study. *Implant Dent* 2004; 13: 228-231.
53. Listgarten MA. Electron microscopic study of the junction between surgically denuded root surfaces and regenerated periodontal tissues. *J Periodontal Res*. 1972; 7(1): 68-90.
54. Nalbandian J, Frank RM. Electron microscopic study of the regeneration of cementum and periodontal connective tissue attachment in the cat. *J Periodontal Res*. 1980; 15(1): 71-89.

***Artigo em Inglês***

---

**Regenerative potencial of an anorganic bone matrix/synthetic cell-binding peptide grafts using the class III furcations lesion model: A histologic and histomorphometric study in dogs**

**Flávia A. Suid**, Graduate student of Periodontology\*

**Guilherme O. Macedo**, Graduate student of Periodontology\*

**Germana J. Borges**, Graduate student of Periodontology\*

**Arthur B. Novaes Jr.**, Chairman of Periodontology\*

**Sérgio L.S. Souza**, Professor of Periodontology\*

**Mário Taba Jr**, Professor of Periodontology\*

**Daniela B. Palioto**, Professor Periodontology\*

**Márcio F.M. Grisi**, Professor of Periodontology\*

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

Address for correspondence and reprints:

Márcio Fernando de Moraes Grisi

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: [mgrisi@forp.usp.br](mailto:mgrisi@forp.usp.br)

## ABSTRACT

**Background:** The aim of this study was to verify the regenerative potential of particulate ABM/Synthetic Peptide in class III furcation defects associated or not with ePTFE membranes.

**Material and Methods:** Six dogs were used and class III furcation defects were produced in the lower pre-molars and filled with impression material. After 21 days, the membranes and the bone grafts were inserted and P3 and P4 were randomized to form the test and control groups. P2 was the negative control. The animals were sacrificed 3 months post-treatment.

**Results:** Comparisons between groups by the Friedman Test ( $p < 0.05$ ) showed statistically significant differences between the test and negative control groups, based on NBA parameter. In the negative control group, a new bone area (NBA) of 20% was observed. In the test group, a new bone area of 37% was observed. There was no statistically significant difference between the groups to the others parameters.

**Conclusions:** The statistical analysis using Friedman Test ( $p < 0.05$ ) showed statistically significant differences between the test and negative control groups, based on NBA parameter. Furthermore, when the Inorganic Bone Matrix/P15 remained inside the defects, it could be clearly observed that new bone formation not only circumscribed the particles but formed above the level of the particles.

**Keywords:** Expanded polytetrafluorethylene membrane, class III furcation lesion, ABM/Synthetic Peptide, GTR.

## INTRODUCTION

One of the main goals of periodontal therapy is to allow tissue to regenerate<sup>1</sup> and to reestablish the function and structure of the periodontal tissues that were damaged or destroyed by inflammatory periodontal diseases.<sup>2,3</sup>

Periodontal regenerative processes requires the neo-formation of bone, cement and periodontal ligament, through migration, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells (cementoblasts, fibroblasts and osteoblasts)<sup>1</sup> and undifferentiated mesenchymal cells<sup>4,5,6</sup> towards the bone clot that is formed after different periodontal therapies.<sup>5</sup>

When attempting to repair the tissues damaged by the inflammatory process, the cells from the lamina propria from the gingival tissues migrate to the defect, leading to the formation of a long junctional epithelium.<sup>4,7</sup> Furthermore, cells derived from the connective and bone tissue migrate, leading, respectively, to root resorption and ankylosis, and, thus, impeding the periodontal regenerative process.<sup>8</sup> On the other hand, the periodontal ligament cells represent the cellular group that leads to the formation of new attachment and favor the production of new tissues.<sup>8</sup>

Utilizing physical barriers, such as membranes, absorbable or not, during guided tissue regeneration (GTR), has been the most commonly used technique aimed at periodontal regeneration. When the membrane is placed between the surgical wound and the gingival connective tissue, it impedes the migration of the epithelial and connective tissue cells to the root surface, allowing the repopulation of the root surface area and the blood clot, by cells of the periodontal ligament and endosteum.<sup>9,10,11</sup>, leading to the neo-formation of cementum, periodontal ligament and bone.<sup>3,6,12</sup> There are several types of membranes available, the *expanded polytetrafluorethylene membrane* (ePTFE) among them, it's non-absorbable and

semi-permeable as is required. Its biological acceptance has been widely analyzed in several histological and clinical studies.<sup>6,11</sup>

Several studies, utilizing ePTFE membranes demonstrated the formation of new attachment and osseous gain during the treatment of class II furcation defects and vertical or angular infraosseous defects.<sup>6,13,14,15,16</sup>

When it comes to the usage of GTR, obtaining consistent results in the treatment of furcation defects is much more difficult than in the treatment of infraosseous defects, according to Mehlbauer.<sup>22</sup> Amongst the furcation defects, the class II lesion molars have more predictable results.<sup>17,20</sup>

Class III furcation defects are less predictable and don't allow for very satisfactory results<sup>18</sup> due to the morphology, height (more than 4mm), width of the defect, difficulty of decontamination of the root surfaces, source of periodontal cells from the remaining bone structure, amongst other factors, which diminish the possibility of completely regenerating the tissues.<sup>14,19</sup> However, there are studies that show significative results by completely enclosing a class III furcation defect and solely utilizing GTR or associating this technique with other biomaterials.<sup>19,21,22</sup> Other studies show partial healing of class III furcation defects after other regenerative therapies and they highlight that their success rate is reduced.<sup>3,17,23,24,25</sup> For these reasons, many studies have utilized the class III furcation lesions as an experimental model to test the potential of new biomaterials.<sup>2,20,7</sup>

Several biomaterials are being employed with GTR, mainly in class III furcation defects.<sup>21</sup> Functioning as filling and space making materials<sup>9</sup>, bone grafts have a large osteogenic potential through osteoinduction or osteoconduction<sup>22,11,12</sup> and may contribute to the healing of class III defects; although the results are shown to be diverse and unpredictable.

Recently, more studies are being carried out using ABM/Synthetic Cell Binding Peptide<sup>‡</sup> grafts. This graft is the result of the combination of an inorganic portion (inorganic bovine bone mineral matrix - IBBMM) which contains calcium and essential minerals for bone production, and an organic portion which is comprised of a synthetic sequence of 15 type I collagen amino acids, responsible for cellular adhesion and for initiation of several other cellular events (migration, proliferation and differentiation) that are necessary for bone repair.<sup>26,27,28,29</sup>

This bone graft has been shown to be safe regarding immunogenicity and the transmissibility of diseases, as the anorganic bovine bone mineral matrix is processed in order to remove all organic material and the amino acid sequence is synthetically produced, eliminating any association with natural collagen-derived substances.<sup>30,31</sup>

ABM/Synthetic Peptide increases fibroblasts bonding and periodontal cells migration, proliferation and differentiation towards the root surfaces, thus, promoting an increase in bone matrix formation<sup>25,26,29,30,31,32</sup>, indicating the osteogenic potential of this material, which resembles biological autogenous bone grafts. ABM/Synthetic Peptide has been cited as a biomaterial that leads to true periodontal regeneration.<sup>28,32,33</sup> ABM/Synthetic Peptide can be found in the market as a particulate mixture (dry) or in gel form. When either form is used, it offers significantly increased new bone formation in the defect.<sup>28,29</sup> There are reports that when ABM/Synthetic Peptide flow (gel) is used in fresh alveoli and infraosseous defects in humans, it promoted bone formation that was proved through histomorphometric and radiographic analysis.<sup>34,35</sup> However, due to its low viscosity and high flowage, the gel presentation of this material might lead to dissatisfactory results when utilized in more critical areas<sup>36</sup>. ABM/Synthetic Peptide in its particulate

---

<sup>‡</sup>PepGEN P15, Dentsply Friadent CeraMed, Lakewood, CO.

presentation does not show this disadvantage and has the same properties as the flow counterpart.

In vitro studies have reported that particulate ABM/Synthetic Peptide permitted a more of periodontal ligament cell migration and proliferation when used alone or when compared to other bone grafting materials.<sup>27,31,33,37</sup> This inherent property of the ABM/Synthetic Peptide can be clinically supported by the fact that it fills the bone defect more thoroughly when compared to demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA) or to anorganic bovine bone matrix derived hydroxyapatite.<sup>26,38</sup> In a study in which ABM/Synthetic Peptide was used in an infraosseous defect and histological analysis was performed, periodontal regeneration was observed.<sup>32</sup> According to Yukna et al<sup>32</sup>, ABM/Synthetic Peptide assists the periodontal regeneration of a previously contaminated root surface area.

Due to the fact that class III furcation defects are the experimental model of highest difficulty to achieve satisfactory regeneration, the objective of this study is available the regenerative potencial of an ABM/Synthetic cell-binding peptide grafts using class III furcation lesion model.

## MATERIALS AND METHODS

Six (6) dogs of mixed races weighting an average of 20kg were selected. The animals had good overall health, intact teeth, did not present any primary occlusal traumas or buccal lesions of viral or fungal nature.

One week prior to the first surgery, full mouth prophylaxis with ultrasonic points was performed. One night before the surgical procedure the animals were kept in fast. For surgery, they were pre-anesthetized with Zolazepan at 0.10mL/kg and Acepromazin at 0.10mL/kg and were anesthetized and maintained with the oxygen volatile anesthetic Isoflurane<sup>δ</sup>.

To produce the class III furcation defects, intrasulcular incisions were performed in the buccal and lingual surfaces of the mandibular P2, P3 and P4s, and mucoperiosteal flaps were raised. After raising the flaps, osteotomy was performed in the furcation area using surgical diamond burs and Ochsenbein chisels<sup>β</sup>. The defects in the pre-molars were made with the removal of 3mm of bone tissue in the apico-occlusal direction, and were standardized using a periodontal probe<sup>φ</sup>. The interradicular bone until a buccal-lingual communication between the roots was established.

After the preparation of the furcations lesions, these were filled with polyether impression material (Impregum F)<sup>4</sup> to induce an inflammatory response, to reduce natural bone repair and to favor formation of a biofilm. The flaps were repositioned and sutured using 4.0 silk sutures. The sutures were removed 10 days later. The impression material was left in the furcation area for 21 days and, then, removed

---

<sup>δ</sup>Isoflurane, Instituto Bioquímico, Atibaia-SP

<sup>β</sup>Ochsenbein chisel, Hu-Friedy, Chicago, IL.

<sup>φ</sup>PCPUNC 15, Hu-Friedy.

<sup>4</sup>Impregum F<sup>®</sup>, 3M do Brasil Ltda., Sumaré-SP, Brasil

through scaling and root planing with Gracey curettes<sup>£</sup>. The animals underwent periodontal prophylaxis with ultrasound<sup>ᵖ</sup>, weekly, and chlorhexidine digluconate at 0.12%<sup>§</sup>, daily.

After two weeks into the plaque control regimen, the surgical procedures for the treatment were initiated. The same sedation and anesthetic steps used in the first surgery were carried out. Then, the intrasulcular incisions were performed both buccally and lingually exposing the furcation defects. The defects and roots were scaled and root planed with Gracey curettes (Hu-Friedy) and then measured in the apico-occlusal, mesio-distal and buccal-lingual directions using a marked periodontal probe. For the histomorphometric analysis, notches were made on the roots at the bone level. The animals were grouped as follows: test group – association of particle ABM/Synthetic Peptide and expanded polytetrafluorethylene membrane – ePTFE – (GTW2)<sup>†</sup> with one membrane placed buccally and the other lingually; control group – ePTFE membrane (GTW2) placed buccally and lingually and negative control group (P2) no biomaterials were used. The hemi-mandibles teeth (P3 and P4) for the test and control groups were randomly selected. The dogs were fed with pasty dog ration and the sutures removed after 10 days. The antibiotic, spiramycin was administered for 10 days at the ratio of 1pill/10kg of weight and the anti-inflammatory ketoprofen<sup>™</sup> was administered for 3 days at the ratio of 1pill/20kg of weight. Wound-healing control was performed using chlorhexidine digluconate at 0.12% over the wound area at a daily basis and by weekly prophylaxis.

After 4 weeks of plaque control, following the same sedation and anesthetic steps of the first surgery, the membranes were removed from the control and test

---

<sup>£</sup> Hu-Friedy

<sup>ᵖ</sup> Cavitron 3000, Dentsply.

<sup>§</sup> Periogard, Colgate-Palmolive Company, New York, NY.

<sup>†</sup> Gore-Tex, W.L.Gore & Associates Flagstaff, AZ.

<sup>™</sup> Ketofen, Merial Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP

groups with small intrasulcular incisions in the P3 and P4 teeth and the wound was sutured using 4.0 silk sutures. A daily prophylactic treatment using chlorhexidine digluconate at 0.12% and a weekly prophylactic treatment using ultrasound was initiated. Both were carried out until euthanasia.

The animals were sacrificed with a lethal dose of sodium thiopental; 12 weeks after the membranes had been inserted.

After mandible dissection, the blocks were fixed in formalin buffered at 10%, pH 7, for 48 hours and, afterwards, placed in 10% trichloric acetic acid for decalcification for a period of 45 days. The blocks were dehydrated using increasing concentrations of alcohol and diaphanized in xylol, and, finally, included in paraffin. Non-consecutive sections, 7 $\mu$ m thick, were obtained in the mesio-distal plane, until the end of the defect was reached. The samples were dyed using hematoxylin-eosin (HE) and Mallory's trichromic™ stain.

Histomorphometric analysis was conducted with a microscope attached to a photographic camera, with which area and linear measurements of the defects were obtained. The following area measurements were taken into consideration: furcation total area (FTA), newly formed tissue area (NTA), epithelium area (EA), connective tissue area (CTA), newly formed bone area (NBA). Bone density (BD) was also measured. The following linear measurements were taken into consideration: defect height extension (DE), newly formed tissue extension (NTE), newly formed bone extension (BE), furcation extension (FE) and newly formed cement extension (CE). Each final measurement was calculated using the arithmetic mean obtained from 5 different sections from each tooth. The statistical analysis was performed using a non-parametric test – Friedman ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) – for the test groups, control groups and negative control groups.

## RESULTS

### CLINICAL FINDINGS

All animals endured the surgical procedures very well, and did not present any post-operative complications. However, in four out of six animals there was exposure of the membrane after the fifteenth day following its insertion, both in the control and test groups, due to marginal gingival recession.

Following membrane removal, it was verified that four animals presented some degree of gingival recession with exposure of part of the furcation region.

### HISTOLOGICAL EVALUATION

In the control group and negative control group, 12 teeth were evaluated and new periodontal tissue formation was observed (bone, periodontal ligament and cementum) above the apical limit of the root notch (figure 2 A, C). In all animals, a stratified squamous epithelium was found in the coronal-most region (figure 2 A). The connective tissue was dense, containing bundles of collagen fibers attached to newly formed cementum, which was present throughout the extension of the furcation region (figure 2 A).

The newly formed bone was immature; it was circumscribed by osteoids and paved with osteoblasts both in the interior and exterior of the lamellae (figure 2 C). In some areas, bone matrix was also organized concentrically around some lamellae (figure 2 E).

The newly formed cementum was of the cellular mixed fiber type, showing inclusions of cells and intrinsic and extrinsic collagen fibers; it was found throughout the extension of the defect, except in areas where epithelial tissue was present

(figure 2 C). Incremental lines were observed between the newly formed cementum and dentin. This new tissue was frequently laid over irregular areas which were an evidence of dentinary surface absorption.

In the test group, 12 teeth were analyzed and newly formed periodontal tissues (bone, cementum and periodontal ligament) were also observed above the apical limits of the root notch (figure 2 B, D). In 10 teeth, stratified squamous epithelium appeared in the coronal-most region of the newly formed tissues (figure 2 B). The connective tissue was dense, with inserted collagen fibers in newly formed cementum. Sharpey fibers were frequent throughout the extension of the furcation area (figure 2 B).

The bone that was formed was considered immature (woven bone); presenting a predominantly interlaced-like matrix and inserted Sharpey fibers (figures 2 F and 3 B). However, in some areas, lamellae circumscribed by a concentric bone matrix were evident (figure 3 B). A covering of osteoblasts both in the internal and external surfaces of the lamellae of the newly formed bone was present (figure 2 D).

Amongst the newly formed bone, it was possible to observe the presence of ABM/Synthetic Peptide bone graft particles (figure 3 D, E, F). These particles were dispersed in the region corresponding to the area of new bone formation, towards the apical-most region of the connective tissue and/or periodontal ligament (figure 3 D). Around the particles, the formation of an immature bone matrix occurred, allowing for distinguishing characteristics (figure 3 D, E, F). Furthermore, it was noted that the particles involved by this bone matrix was ankylosed to the cementum surface, and both structures were physically united. (figure 3 E).

The newly cementum was also predominantly encountered (figure 3 E), becoming thinner and thinner towards the top of the furcation area and present

throughout the entire defect, except in the areas of epithelial formation where cementum presence was interrupted. This tissue was of the cellular mixed fiber type, showing inclusions of cells and intrinsic and extrinsic collagen fibers (figure 3 E) and frequently laid over irregular areas indicating dentinary surface absorption (figure 3 B)

Periodontal ligament fibers were predominately oblique (figure 3 A). Sharpey fibers were found in this ligament both in newly formed bone and cementum

## **HISTOMETRY**

The characteristics in the newly formed tissues in the test group were very similar to the ones found in the control and negative control groups, differing only on the values of the areas that were measured. Table number 1 shows linear measurement comparisons, scaled in *mm*, for all groups; there is no statistically significant difference between any of the parameters. Table number 2 shows area measurement comparisons, scaled in *mm<sup>2</sup>*, for all the groups; there is statistically significant difference between the test group and negative control group when new bone formation area (NBA) is the compared parameter. The other parameters do not produce statistically significant differences. (Friedman Test,  $p < 0,05$ ). Table number 3 shows percentage values obtained from all the groups.

## DISCUSSION

Treating class III furcation defects effectively has been a great challenge in periodontology. Despite the existence of several techniques including GTR and the association with innumerable materials and bone grafts, the long-term effectivity of these techniques, when it comes to periodontal attachment gain or the resolution of the problem itself, has generated disappointment and, at the same time, inspired lots of studies.<sup>40</sup> A great variety of biomaterials have been tested for class III furcation defects. However, the recently discovered particulate ABM/Synthetic Peptide had not yet been tested in this particular defect, and it had already showed excellent and promising results in infrabony defects.<sup>26,32,38,39</sup>

The present study has evaluated, in dogs, the regenerative potential of particulate ABM/Synthetic Peptide bone grafts, associated or not, with expanded polytetrafluorethylene membranes (ePTFE) for periodontal regeneration of mandibular class III furcation defects. The obtained results demonstrate that the test groups reached the regenerative success of other previous studies.<sup>28,29,38,41,42</sup>, which was indicated by formation of new bone, cementum and periodontal ligaments, after using ABM/Synthetic Peptide in several experimentation models.

Although the formation of new periodontal tissues was evident in all three experimental groups, it did not suffice to seal the defects completely, and an area lacking tissue formation was still encountered. According to Pontoriero et al<sup>14,43</sup> and Mehlbauer et al<sup>22</sup>, defects that are more than 4mm high have a smaller chance of exhibiting full defect regeneration. Lindhe et al<sup>20</sup> has also stated it in one his studies that the size of the defect led to severe treatment difficulty; and that may have also contributed to the lack of fully-healed defects in all of the studied groups of the present work. The height of the class III furcation defects, in the present work,

measured immediately after they had been produced, was 3mm in height. After chronification with impression material, the average height increased from 3mm to 4.8mm. According to Roriz et al.<sup>36</sup> one possible hypothesis for this increased tissue resorption due to lesion chronification period, stimulated by the impression material.

Besides being a large defect, another factor that may have contributed to generate the observed healing response was the morphology of the defect. It was a large horizontal defect comprised of a single intact bone wall that had the potential to supply the area with the cells that would be paramount to periodontal regeneration.<sup>14</sup> According to Lindhe et al.<sup>20</sup>, the formation of a new periodontal attachment, in this particular kind of defect, is highly dependent on the coronal growth of the periodontal ligament.

According to Scantlebury<sup>44</sup>, many factors contribute to the success of GTR therapies, amongst which the following must be highlighted: the removal of the junctional epithelium and connective tissue, wound stability, fibrin clot adhesion to the root surface and maturation of the latter, and adequate space maintenance provided by the membrane. As the extension of the defects that were dealt with in this study was prominent, the risk of membrane collapsing (bucco-lingually) became fairly possible, which hampered clot stability<sup>45</sup> and diminished the space for cell proliferation. The stability of the wound and clotting are decisive factors for periodontal regeneration<sup>7,46,47</sup> and they might have been jeopardized by circumstances pertaining to the experiment model. According to Caton & Greenstein,<sup>48</sup> the lack of adhesion of the fibrin clot on the root surface impairs marginal sealing, which might have contributed to junctional epithelium and connective tissue migration, leading to a smaller bone formation in the test and control groups.

Junctional epithelium and connective tissue migration favored, in the test and control groups, epithelium formation in the coronal-most part of the defect and the presence of large amounts of connective tissue. These findings were also present in previous studies<sup>20,49</sup> and it has been attributed to flap retraction during the post-operative period leading to membrane and furcation fornix<sup>20</sup> exposure. Klinge et al.<sup>50</sup> analyzed flap positioning and defect size as influential factors on marginal tissue recession. Adequate flap positioning might help prevent marginal tissue recession, and defect size has little influence in it.

Besides membrane and furcation fornix exposure, which occurred 15 days into the post-operative period, due to flap recession – what has favored epithelium migration –, there is also evidence that continuous microbial plaque presence and its constant bacterial action may also contribute to reduced success rates in class III defect regeneration.<sup>49</sup>

The test group had a differentiating characteristic and that was the use of particulate ABM/Synthetic peptide grafts. This group had the same experimental difficulties as the control group, but obtained higher means in bone formation and statistically significant differences when compared to the negative control group. Not having statistically significant differences between the test and control groups may be related to the fact that in the test groups of two dogs no bone graft particles were found, and, in the other dogs, the quantity found in the sections was smaller than the amount that had been inserted into the defect during the surgery. This may have reduced the regenerative potential of the treatment. These findings were also reported in the work of Roriz et al., in which flow ABM/Synthetic Peptide was utilized in class III furcation defects, and it was discovered that no graft particles were to be found in the test group teeth, thus reducing bone formation in this group.

One possible hypothesis for these findings is that in class III furcation lesions there is only one bone wall left to serve as apical limitation, only the roots as proximal limitation, only the membrane to serve as limitation on the buccal and lingual furcation entrances and the furcation roof as superior limitation. Having that said, it is notable that there were surfaces of small viability in direct contact with the graft. Nonetheless, what can't be left aside is the possibility of the bone graft being replaced by newly formed bone, instead of being lost.

As previously cited, the teeth of 4 dogs that belonged to the test group still presented ABM/Synthetic Peptide particles 12 weeks of healing. In these sections, it was possible to observe more intense bone formation involving bone graft particles within the defects. Despite the presence of these particles, bone density in this group reached 80%, when compared to the total area of newly formed bone.

Histologically, it could be observed that the particles were mainly present at the base of the defect, and new bone formation was evident around the particles and amidst newly formed tissues. The bone matrix was in direct contact with the biomaterial particles and there were no gaps between the graft and the bone. These findings corroborate with those of previous studies which were also conducted in animal models<sup>42,28,41</sup> - with a mean evaluation time ranging from 4 to 12 weeks - and human models<sup>26,29,32,51</sup>, - with a mean evaluation time ranging from 4 to 6 weeks. In such studies, new bone formation was encountered in the groups that made use of the inorganic bone matrix/P15. New bone formation around a particle inserted into connective or bone tissue indicates the regenerative potential of this biomaterial. More importantly, Hahn confirmed the stability of this graft in an 8-year study, in which this biomaterial was inserted into a fresh alveolus and the bone trabecular, as well as the grafted bone wall were maintained.

This regenerative potential portrayed by ABM/Synthetic Peptide can be explained through stimulation of fibroblasts from the periodontal ligament to proliferate faster inside a defect that has been recently filled with graft particles<sup>27</sup>, initiating a regenerative process. The development of this process can be related to the 15 amino acid chain – P15 – present in the bovine bone matrix, which has been shown to facilitate the physiological regenerative process as similarly as collagen does.<sup>31</sup> Therefore, ABM/Synthetic Peptide can be characterized as a type of bone graft with osteoinducing properties.

Besides bone formation, newly formed cementum was also observed in the test and control groups and similar histological aspects were noticed for both tissues in both groups (qualitatively). Listgarten<sup>53</sup> and Nalbandian & Frank<sup>54</sup> demonstrated that the cementum that is formed over the surgically exposed root surfaces is relatively thin, containing cells and being predominantly made of intrinsic collagen fibers which are parallel to the root surface; characteristics that corroborate with Roriz et al.<sup>36</sup>. In this last cited study, the authors analyzed class III furcation defect regeneration and found characteristics that are much alike to the ones encountered in this present study.

Although the present study did not demonstrate a quantity of mineralized tissue neof ormation similar to other studies<sup>26,38,51</sup> much likely due to the difficulties met during this particular study, the quality of the newly formed tissues does not seem to have been jeopardized.

Previous studies have demonstrated interestingly satisfactory clinical and histological results using particulate ABM/Synthetic Peptide in periodontal defects. In this present study, the regenerative potential of this biomaterial seems to have been demonstrated after using it in the defect that is least conducive to good results

in terms of periodontal regeneration, and achieving bone formation around the particles that were found embedded in connective tissue of the test group. New cementum and periodontal ligament formation was also found satisfactorily in the area of newly formed bone.

However, to reach absolute confirmation of the full potential of this biomaterial, new testing and studies are made necessary under other clinical conditions, so that total and complete defect regeneration can be reached.

## **CONCLUSIONS**

Based on the results and within the limitations of this study, it may be concluded that although some parameters yielded quite similar results, there was statistically significant difference between the test and negative control groups, based on NBA parameter.

Furthermore, the regenerative potential of anorganic bone matrix/P15 was showed when it remained inside the defects and could be observed that a new bone formation not only circumscribed the particles but formed above the level of the particles.

## ILUSTRATION LEGENDS

Figure 1 A-H: **A** - Initial aspect of the mucosa; **B** - Mucoperiosteal flap; **C** – Defect height measurement; **D** – Visual aspects of the defects in surgery number 2; **E** – Insertion of bone graft (ABM/Synthetic Peptide); **F** – Flap repositioning and suture; **G** – Visual aspect of the mucosa after membrane removal; **H** – Post-operative view on the day of sacrifice .

Figure 2 A-F: **A** – Control Group (Mallory's trichromic™, 2.5x magnification); **B** – Test Group (hematoxylin-eosin, 2.5x magnification). **C** – Control Group: cellular cementum formation (CC), periodontal ligament with oblique fibers (PL), sharpey Fibers (SF) and alveolar bone (AB). **D** – Test Group: cellular cementum formation (CC), periodontal ligament with oblique fibers (PL), osteoblasts' paving (OB), osteiods (OT) and alveolar bone (AB) (Mallory's trichromic™, 40x magnification). **E** – Control Group: the arrows show osteiods (OT), immature bone (WB), osteoblasts' paving (OB) (Mallory's trichromic™, 40x magnification). **F** – Test Group: immature bone (WB) (Mallory's trichromic™, 20x magnification).

Figure 3 A-F: Histological sections showing aspects of the newly formed tissues in the test group. **A** – The arrows show cementocytes inside the cementum (CC) and sharpey fibers in periodontal ligament (Mallory's trichromic™, 40x magnification). **B** – Aspect of the immaturely formed bone (Mallory's trichromic™, 20x magnification). **C** – The arrows show sharpey fibers (SF) and immature bone (WB) (Mallory's trichromic™, 40x magnification). **D** – ABM/P15 particles inside the defect (G) (Mallory's trichromic™, 10x magnification). **E** – ABM/P15 particle (G), with Woven bone (WB) around it and attached to the periodontal ligament (Mallory's trichromic™, 40x magnification). **F** – ABM/P15 particle (G), bone formation (WB) e osteoblasts' paving (OB) (Mallory's trichromic™, 20x magnification).

## REFERENCES

1. Oates TW, Rouse CA, Cohran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 1993; 64:142-148.
2. Araújo MJ, Berglundh T, Lindhe J. GTR treatment of degree III furcation defects with 2 different resorbable barriers. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 253-259.
3. Palioto DB, Joly JC, De Lima AFM, Mota LF, Cafesse R. Clinical and radiographic treatment evaluation of class III furcation defects using GRT with and without inorganic bone matrix. *J Clin Periodontol* 2003; 30:1-8.
4. Melcher AH. On repair potencial of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 47(5):256-60.
5. Ripamonti U, Reddi AH. Periodontal regeneration: potencial role of bone morphogenetic proteins. *J Periodont Res* 1994; 29:225-235.
6. Rossa Jr C, Marcantonio Jr E, Cirelli CA, Marcantonio RAC, Spolidorio LC, Fogo JC. Regeneration of class III furcation defects with basic fibroblast growth factor(b-FGF) associated with GTR. A descriptive and histometric study in dogs. *J Periodontol* 2000; 71: 775-784.
7. Wikesjo UME, Nilvéus RE, Selvig KA. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J Periodontol* 1992; 63: 158-65.
8. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratamento periodontal regenerativo in: *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 2005; 4 ed: 436-438.
9. Caffesse RG, Nasjleti CE, Plotzke AE, Anderson GB, Morrison EC. Guided tissue regeneration and bone grafts in the treatment of furcation defects. *J Periodontol* 1993; 64:1145-1153.

10. Mellado JR, Salkin LM, Freedman AL, Stein MD. A comparative study of ePTFE periodontal membranes with and without decalcified freeze-dried-bone allografts for the regeneration of interproximal intraosseous defects. *J Periodontol* 1995; 66: 751-755.
11. Sigurdsson TJ; Tatakis DM, Lee MB, Wikesjo UME. Periodontal regenerative potencial of space-providing expanded polytetrafluorethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. *J Periodontol* 1995; 66:511-521.
12. Guimarães MCM, Passanezi E, Santana ACP, Greggi SLA. Pool of bovine morphogenetic proteins and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony periodontal defects. I clinical measurements. *J Appl Oral Sci* 2004; 12(1): 70-7.
13. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring t, Wennstrom J. New attachment in the human periodontium by guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 604-616.
14. Pontoriero R, Lindhe J, Nyman S, Karring T, Rosenberg E, Sanavi F. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 170-174.
15. Blumenthal NM. A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE membranes in the treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. *J Periodontol* 1993; 64: 925-933.
16. Fernandes JMA, Rego ROCC, Spolidório LC, Marcantonio RAC, Jr EM, Cirelli JA. Enamel matrix proteins associated with GTR and bioactive glass in the treatment of class III furcation in dogs. *Braz Oral Res* 2005; 19(3): 169-75.
17. Eickholz P, Hausmann E. Evidence for healing of class II and III furcations after GTR therapy: digital subtraction and clinical measurements. *J Periodontol* 1997; 68(7):636-644.

18. Garret S, Gantes B, Zimmerman G, Egelberg J. Treatment of mandibular class III periodontal furcation defects. Coronally positioned flaps with and without expanded polytetrafluorethylene membranes. *J Periodontology* 1994; 65(6): 592-597.
19. Pontoriero R, Lindhe J. Guide tissue regeneration in the treatment of degree III furcation defects in maxillary molars. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 810-812.
20. Lindhe J, Pontoriero R, Berglundh T, Araujo M. The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 276-283.
21. Becker W, Becker BE, Berg L., Prichard J, Cafesse R. & Rosenberg E. New Attachment after treatment with root isolation procedures: report for treated class III and class II furcations and vertical osseous defects. *Int Journal Of Periodontics and Rest Dentistry* 1988; 8: 9-23.
22. Mehlbauer MJ, Greenwell H, Nouneh I, Drisko C, Wittwer JW, Yancey J, Rebitski G. Improved closure rate of class III furcations using a layered GTR technique. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20(3): 285-295.
23. Anderegg CR, Martin SJ, Gray JL, Mellnig JT, Gher ME. Clinical evaluation of the use of decalcified freeze-dried bone allograft with guided tissue regeneration in the treatment of molar furcation invasions. *J Periodontol* 1991; 62(4): 264-268.
24. Eickholz P, Kim T-Sun, Holle R, Hausmann E. Long-Term of guided tissue regeneration therapy with non-resorbable and bioabsorbable barriers.I.Class II furcations. *J Periodontol.* 2001; 72: 35-42.
25. Yamanouchi K, Chang CY, Yamada S. A clinical evaluations of guided tissue regeneration in the treatment of classes III and class II furcation bony defects. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1995; 36(1): 9-17.

26. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Gruz 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. *J Periodontol* 2000; 71(11): 1671-1679.
27. Lallier TE, Yukna R, Marie SS, Moses R. The putative collagen binding peptide hastens periodontal ligament cell attachment to bone replacement graft materials. *J Periodontol* 2001; 72(8): 990-997.
28. Scarano A, Iezzi G, Petrone G, Orsini G, Degidi M, Strocchi R, Piattelli A. cortical bone regeneration with a synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric pilot study. *Implant Dent* 2003; 12(4): 318-324.
29. Hahn J, Rohrer MD, Tofe AJ. Clinical, radiographic, histologic, and histomorphometric comparison of PepGen P-15 particulate and PepGen P-15 flow in extraction sockets: a same –mouth case study. *Implant Dentistry* 2003; 12(2): 170-174.
30. Sogal A, Tofe A. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived form bovine bone used in dental applications. *J Periodontol* 1999 Sep; 70(9): 1053-63.
31. 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 Aug; 31(4): 545-54.
32. Yukna RA, Salinas TJ, Carr RF. Periodontal regeneration following use of ABM/P-15: A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002; 22(2): 146-155.
33. Lallier TE, Palaiologou AA, Yukna RA, Layman DL. The putative collagen-binding peptide P-15 promotes fibroblast attachment to root shavings but not hydroxyapatite. *J Periodontol.* 2003; 74(4): 458-467.

34. Barros RRM, Novaes Jr AB, Roriz VM, Oliveira RR, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr M, Palioto DB. Anorganic bovine matrix/P-15 "flow" in the treatment of periodontal defects: case series with 12 months of follow-up. *J Periodontol* 2006; 77: 1280-128.
35. Neiva RF, Tsao Y-P, Eber R, Shotwell J, Billy E, Wang H-L. Effects of a putty-form hydroxyapatite matrix combined with the synthetic cell-binding peptide p-15 on alveolar ridge preservation. *J Periodontol* 2008; 79:291-299.
36. Roriz VM, Souza SL, Taba MJr, Palioto DB, Grisi MF. Treatment of class III furcation defects with expanded polytetrafluorethylene membrane associated or not with anorganic bone matrix/synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric study in dogs. *J Periodontol*. 2006 Mar; 77(3): 490-7.
37. Kubler A, Neugebauer J, Oh J-H, Scheer M, Zoller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes. An vitro study. *Implant Dent* 2004; 13: 171-179.
38. Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, Evans GH, Aichelmann-Reidy ME, Moore K, Cruz R, Scott B. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix(ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol* 1998; 69(6): 655-663.
39. 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!5) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *J Periodontol* 2002; 73:123-128.

40. Rupprecht RD, Horning GM, Towle HJ. A clinical evaluation of hydroxyapatite cement in the treatment of class III furcation defects. *J Periodontol* 2001; 72: 1443-1450.
41. Barboza EP, Souza RO, Caúla AL, Neto LG, Caúla FO, Duarte MEG. Bone regeneration of localized chronic alveolar defects utilizing cell binding peptide associated with anorganic bovine-derived bone mineral: A clinical and histological study. *J Periodontol* 2002; 73: 1153-1159.
42. Vastardis S, Yukna RA, Mayer ET, Atkinson BL. Periodontal regeneration with peptide-enhanced anorganic bone matrix in particulate and putty form in dogs. *J Periodontol* 2005; 76: 1690-1696.
43. Pontoriero R, Nyman S, Ericsson I, Lindhe J. Guided tissue regeneration in surgically-produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(3): 159-163.
44. Scantlebury TV. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol*. 1993; 64(11 Suppl): 1129-37.
45. Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodontol Res*. 1987; 22(3): 233-42
46. Wikesjö UM, Claffey N, Egelberg J. Periodontal repair in dogs. Effect of heparin treatment of the root surface. *J Clin Periodontol*. 1991; 18(1):60-4.
47. Claffey N. New attachment and tissue regeneration. *Int Dent J*. 1992; 42(2):71-7.
48. Caton JG, Grenstein G. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 1993;1: 9-15.
49. Park J-B, Matsura M, Han K-Y, Norderyad O, Lin W-L, Genco RJ, Cho MII. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided

tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 1995;66:462-477.

50. Klinge B, Nilveus R, Kiger RD, Egelberg J. Effect of flap and defect size on healing of experimental furcation defects. *Journal of Clinical Periodontology*. 1981;8: 236-248.

51. Matos SM, Guerra FA, Krauser J, Marques F, Ermida JM, Sanz M. Clinical evaluation of the combination of a anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P15) in particulate and hydrogel form as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month reentry controlled clinical study. *J Periodontol* 2007; 78: 1855-1863.

52. Hahn J. 8-year onlay bone graft and ridge augmentation with PepGen P15: a clinical and radiographic case study. *Implant Dent* 2004; 13: 228-231.

53. Listgarten MA. Electron microscopic study of the junction between surgically denuded root surfaces and regenerated periodontal tissues. *J Periodontal Res*. 1972; 7(1): 68-90.

54. Nalbandian J, Frank RM. Electron microscopic study of the regeneration of cementum and periodontal connective tissue attachment in the cat. *J Periodontal Res*. 1980; 15(1): 71-89.