

Daniel Maltez Miraglia

As proteínas derivadas da matriz de esmalte na terapia periodontal

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Odontologia
2010

Daniel Maltez Miraglia

As proteínas derivadas da matriz de esmalte na terapia periodontal

Monografia apresentada ao curso
de Especialização em Periodontia
da Faculdade de Odontologia de
Minas Gerais.

Orientador: Prof. Sérgio Diniz.

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Odontologia
2010

M671p Miraglia, Daniel Maltez
2010 Proteínas derivadas da matriz de esmalte na regeneração periodontal /
MP Daniel Maltez Miraglia. 2010.
52f.: il.
Orientador: Sérgio Diniz Ferreira
Monografia (Especialização)- Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Odontologia.
1. Regeneração tecidual guiada periodontal. 2. Osteogênese.
I. Ferreira, Sérgio Diniz. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Odontologia . IV. Título.

BLACK D64



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Faculdade de Odontologia
 Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
 Av. Prof. Amâncio Carlos, 6627 - Pampulha
 Belo Horizonte - MG - 31.270-9011
 Tel: (31) 3409-3476 Fax: (31) 3409-2472
 Email: odontol-postgrad@ufmg.br

Ata da Comissão Examinadora para julgamento de Monografia do aluno **DANIEL MALTEZ MIRAGLIA**, do Curso de Especialização em Periodontia, realizado no período de 08/08/2008 a 31/07/2010

Aos 28 (vinte e oito) dias do mês de julho de 2010, às 09:30 horas, na sala 3410 da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Sérgio Diniz Ferreira (Orientador), Telma Campos Medeiros Lorentz e José Augusto César Discacciati. Em sessão pública foram iniciados os trabalhos relativos à apresentação do trabalho final de conclusão do curso intitulado "As proteínas derivadas da matriz do esmalte na terapia periodontal regenerativa". Encerrada a exposição, foi iniciada a arguição e em seguida passou-se à apuração final. A nota obtida pelo aluno foi 100 (cem) pontos. A Comissão Examinadora decidiu pela sua aprovação. Para constar, eu, Sérgio Diniz Ferreira (Orientador), Presidente da Comissão, lavrei a presente ata que assino, juntamente com os demais membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de julho de 2010.

Colegiado de Pós-Graduação
 Faculdade de Odontologia da
 UFMG

Confere com o original

11/07/2011

[Assinatura]
 Assinatura

[Assinatura]
 Sérgio Diniz Ferreira - Orientador

[Assinatura]
 Telma Campos Medeiros Lorentz

[Assinatura]
 José Augusto César Discacciati

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo incentivo.

Aos colegas do curso, pelo
companheirismo.

Aos professores, pela competência.

Ao meu orientador, Sérgio Diniz, pela
paciência, boa vontade e exemplo
profissional.

À professora Telma Lorentz, pelo carinho
e inspiração.

Ao professor José Augusto Discacciati,
pela boa vontade e auxílio na correção.

Ao amigo José Carlos, pela amizade e
inspiração.

“Ele faria da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino

Sumário	página
Lista de abreviaturas	v
Lista de figuras	vi
Resumo	vii
Abstract	ix
1 Introdução	11
2 Revisão de literatura	13
2.1 Conceitos (regeneração x reparo)	14
2.2 Técnicas regenerativas: considerações e apresentação do produto comercial (Emdogain) para uso clínico	14
2.3 Considerações sobre cicatrização: aspectos biológicos	16
2.4 Proteínas derivadas da matriz de esmalte	18
2.5 Mecanismos de ação das proteínas derivadas da matriz de esmalte	20
2.6 Resultados clínicos, histológicos e radiográficos	27
3 Discussão	38
4 Conclusão	44
5 Referências Bibliográficas	46

Lista de abreviaturas

AAP – academia americana de periodontia

BMPs – proteínas morfogenéticas ósseas

DFDBA – osso alógeno liofilizado

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – fator de crescimento epidérmico

ePTFE - politetrafluoretileno expandido

E-selectin – molécula de adesão endotelial

FLPs – fibroblastos do ligamento periodontal

HERS – restos epiteliais da bainha de Hertwig

FGs – fibroblastos gengivais

ICAM – molécula de adesão intracelular

IGF1 – fator de crescimento insulínico 1

IGF2 – fator de crescimento insulínico 2

IL1 – interleucina 1

IL3 – interleucina 3

IL5 – interleucina 5

IL6 – interleucina 6

MMPs – metaloproteinases

mRNA – RNA mensageiro

OPG – osteopontina

PCR - reação em cadeia da polimerase

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

PDME – proteínas derivadas da matriz de esmalte

PTH - paratormônio

TIMPs – inibidores de metaloproteinases

TGF-beta – fator de crescimento beta

TNF – fator de necrose tumoral alfa

Lista de figuras	página
Fig. 01 – Emdogain® - apresentação do produto	15
Fig. 02 – Emdogain® - técnica de aplicação)	16
Fig. 03 – Modelo de cicatrização	17
Fig. 04 – Caso clínico – preenchimento de defeito infra-ósseo	29
Fig. 05 – Caso clínico – preenchimento de defeito infra-ósseo	29
Fig. 06 – Aumento da mineralização promovido pelo EMD	30
Fig. 07 – Regeneração periodontal <i>in vivo</i>	33

Resumo

Nos últimos anos, as modificações nas técnicas e abordagens da terapia periodontal nos possibilitam tratamentos regenerativos eficazes, no entanto, a variedade de materiais e técnicas fazem necessária uma reflexão para que seja feita a escolha correta para cada caso. Fatores de crescimento vêm sendo utilizados nas últimas décadas, com diferentes taxas de sucesso. Estudos clínicos e laboratoriais demonstram que vários desses materiais podem realmente resultar em regeneração periodontal. Recentemente, proteínas derivadas da matriz de esmalte surgiram como uma alternativa para se obter regeneração periodontal e o Emdogain®, proteína de origem suína associada a um veículo à base de alginato de propileno-glicol (PGA), se propõe a promover um ganho de inserção clínico e histológico, regenerando estruturas periodontais perdidas, criando uma matriz extracelular natural para re-colonização de superfícies radiculares por células que expressam o fenótipo do cementoblasto, induzindo a formação de um cemento acelular de fibras extrínsecas, além de inibir a migração de células epiteliais. Histologicamente, os estudos apresentam resultados divergentes quanto à regeneração periodontal, porém, clinicamente, a maioria dos estudos apresenta resultados significantes e satisfatórios quanto ao ganho de inserção. Embora os estudos sejam promissores, a aplicação clínica do Emdogain ainda é limitada, devido à especificidade da técnica e do alto custo.

Abstract

Lately, innovations on periodontal regenerative therapy have significantly improved the results of treatments, but a reflection is needed to lead us make the correct decision for each case. Many growth factors have been used in the last decades, with different rates of success. Studies have shown that many of these growth factors can really promote periodontal regeneration. Recently, enamel matrix derivate (Emdogain®) has appeared as an alternative approach for periodontal regeneration, creating an extracellular matrix that allows recolonization of root surfaces by cementoblasts-like cells, inducing formation of new acellular cementum and inhibiting epithelium migration. Histological studies have shown divergent results, but it is proved that Emdogain® significantly improves periodontal attachment levels and reduces probing pocket depth when compared with open-flap debridement. Although studies are promising, the clinical use of Emdogain® is still limited by technical specificity and high charges.

Introdução

A doença periodontal é uma patologia multifatorial que leva à perda das estruturas de suporte dos dentes, muitas vezes comprometendo sua funcionalidade (Lindhe, 2005).

O tratamento da doença periodontal consiste na remoção e controle da placa e tártaro supra e subgingivais visando reduzir a inflamação e, muitas vezes, no recontorno da estrutura óssea visando uma melhor adaptação dos tecidos gengivais, facilitando o controle de placa durante a manutenção (Newman, 1994).

Devido às sequelas do tratamento, muitas vezes faz-se necessária uma intervenção visando a regeneração de estruturas perdidas (Oda e Carvalho, 2004). Nos últimos anos, diferentes técnicas e materiais vêm sendo propostos na tentativa de se obter uma regeneração periodontal verdadeira.

Um material obtido através das proteínas derivadas da matriz de esmalte, cujo nome comercial é Emdogain, vem sendo utilizado como uma alternativa promissora na regeneração periodontal, capaz de induzir a formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar (Gestrelius *et al.*, 2000).

Embora o Emdogain® apresente resultados clínicos promissores, sua técnica e indicação clínica são limitadas, variando de acordo com variações anatômicas (Casarin *et al.*, 2009), e seu custo é elevado, dificultando sua utilização clínica.

Assim, o objetivo desse estudo é avaliar e comparar, através de uma revisão de literatura, os resultados clínicos, radiográficos e histológicos; indicações e técnicas de utilização do Emdogain®, bem como descrever seus mecanismos moleculares de ação.

Revisão de literatura

2.1 Conceitos: regeneração x reparo

Após uma terapia periodontal, desencadeiam-se cascatas celulares que comandam o processo de cicatrização. Esse processo pode ocorrer de duas formas: reparo e regeneração. O reparo acontece quando os tecidos danificados são substituídos por outros cuja função não é igual à do tecido original. Na regeneração os tecidos formados apresentam a mesma função e constituição dos tecidos perdidos. Há formação de novo ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Oda e Carvalho, 2004).

2.2 Técnicas regenerativas: considerações e apresentação do produto comercial - Emdogain®- para uso clínico

Em alguns casos, o reparo dos tecidos periodontais pode resultar em defeitos estruturais, e/ou estéticos, como exposição radicular em regiões anteriores e exposição da região da furca, tornando a área de difícil higienização e favorável para a recidiva da doença. Nesses casos, há a indicação de uma terapia periodontal regenerativa (Lindhe, 2005).

Em 1996, a associação americana de periodontia definiu três critérios para que um procedimento regenerativo pudesse ser considerado uma terapia estimuladora de regeneração:

1. Amostras histológicas humanas demonstrando a formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso coronário a um sulco de marcação.
2. Experimentos clínicos controlados em humanos demonstrando melhora na inserção e no osso.
3. Estudos histológicos controlados em animais demonstrando a formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso.

Preenchendo esses critérios, uma terapia pode ser considerada estimuladora da regeneração verdadeira.

As proteínas derivadas da matriz de esmalte para uso clínico foram lançadas primeiramente em 1996 na Europa pela BIORA AB, sob o nome comercial de Emdogain®, disponível em seringas de 0,3ml para defeitos únicos e 0,7ml para defeitos múltiplos. Atualmente, a patente do produto pertence à empresa Straumann (Figura 1), porém, sua composição e técnica de aplicação não foram alteradas, segundo o fabricante.



FIGURA 1 - Emdogain® -Straumann.

Fonte: www.straumann.com. Acesso em 06/2010

O fabricante preconizou um protocolo para a técnica de aplicação. A área deve ser anestesiada e um retalho total deve ser realizado nas superfícies vestibular e lingual (ou palatina). As incisões devem ser preferencialmente intrasulculares e o retalho hidratado constantemente com solução salina. Devem ser realizados raspagem e alisamento radicular, remoção do tecido de granulação e condicionamento radicular com EDTA para remover o “smear layer”. Antes de aplicar o produto a área deve ser irrigada e a contaminação com sangue ou saliva evitada. O Emdogain® deve ser aplicado cobrindo a raiz do dente e o retalho deve ser suturado, cobrindo completamente as áreas interproximiais (Fig. 2).

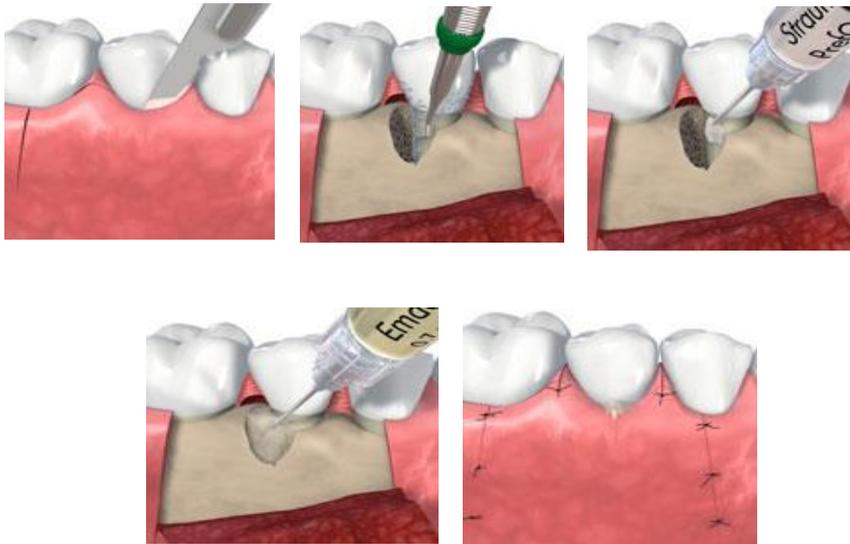


FIGURA 2 - Técnica de aplicação do produto, segundo Straumann (2010). Retalho total, raspagem e alisamento radicular, condicionamento radicular com EDTA, aplicação do Emdogain®, estrutura do retalho. Fonte: www.straumann.com. Acesso em 06/2010.

2.3 Considerações sobre cicatrização: aspectos biológicos

A cicatrização de uma ferida cirúrgica inclui uma série de processos biológicos controlados, que se iniciam com uma quimiotaxia de células específicas, como osteoblastos e fibroblastos, e terminam com a formação e maturação de uma matriz extracelular. Essa matriz fornece células e vascularização para a neoformação tecidual. Há uma rápida migração do epitélio, cobrindo essa matriz e formando uma barreira protetora. Histologicamente, esse epitélio é semelhante ao epitélio original (Lindhe, 2005).

Quando ocorre no ligamento periodontal após terapia cirúrgica, esse processo apresenta uma complexidade maior, pois envolve vários tipos de tecido que possuem diferentes características, além de ocorrer em um ambiente séptico (Illueca *et al.*, 2006). Em 1976, Melcher propôs o modelo de cicatrização periodontal que utilizamos até hoje (Fig. 3). Segundo sua teoria, a natureza da

conexão que se estabelece entre o dente e o tecido periodontal depende da origem das células que repovoam a área em cicatrização (células de origem epitelial, conjuntiva, originadas do osso alveolar ou ligamento periodontal) e as únicas células capazes de proporcionar uma regeneração verdadeira seriam as células originadas do ligamento periodontal e do osso alveolar (Illueca *et al.*, 2006).

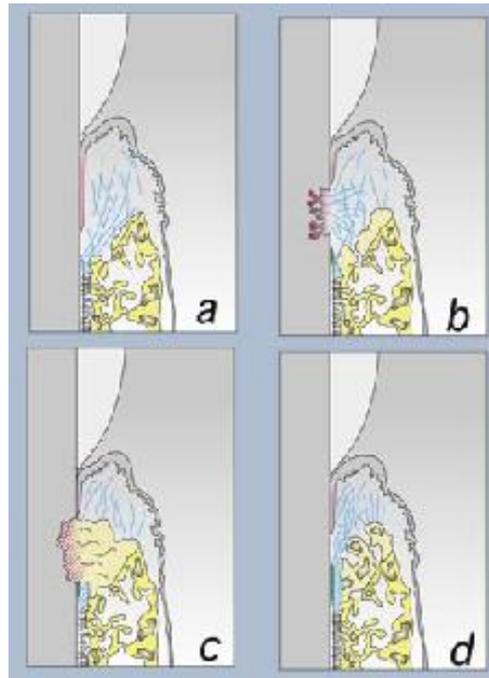


FIGURA 3 - Modelo de cicatrização . a) epitélio juncional longo b) inserção conjuntiva com reabsorção radicular c) anquilose com reabsorção radicular d) regeneração periodontal parcial.

Fonte: Illueca *et al.*, 2006.

Para Grzesik e Narayanan (2002), embora a extensão do defeito e a quantidade de tecido a ser formada seja importante, dois fatores são fundamentais para determinar o tipo de cicatrização que irá ocorrer: os tipos celulares disponíveis e a presença ou ausência de citocinas reguladoras que recrutam ou estimulam essas células.

Acredita-se que a matriz de esmalte seja responsável pela formação dos cristais de hidroxiapatita no osso alveolar (Simmer e Fincham, 1995). Estudos imunohistoquímicos e com microscopia eletrônica encontraram as proteínas derivadas da matriz de esmalte no cimento

acelular, e demonstraram que elas são responsáveis pela iniciação e modulação do processo de cementogênese (Slavkin *et al.*, 1989; Slavkin *et al.*, 1989).

As células dos restos epiteliais da bainha de Hertwig também depositam a matriz de esmalte antes da formação do cimento, reforçando as evidências de que a matriz de esmalte alojada na parte apical da raiz em formação é responsável pela iniciação do processo de formação do cimento. Os autores sugerem que uma possível estratégia para promover a regeneração periodontal seria mimetizar os eventos ocorridos durante a formação embrionária dos tecidos periodontais (Hammarstrom *et al.*, 1997).

A formação do cimento se inicia após o início da formação da raiz. A formação radicular é guiada pelos restos epiteliais da bainha de Hertwig (HERS), um colar de células epiteliais derivadas do prolongamento apical do órgão de esmalte. Esse colar possui duas camadas celulares, e a camada interna é contínua com a camada de ameloblastos na coroa, que sintetizam e secretam as proteínas da matriz de esmalte, como na formação da coroa (Illueca *et al.*, 2006).

2.4 – Proteínas derivadas da matriz de esmalte

O principal componente dessas proteínas é a amelogenina (Fincham *et al.*, 1994). Sua função é controlar o tamanho e organização dos cristais de hidroxiapatita na matriz de esmalte. Ela se organiza em uma monocamada, formando uma matriz extracelular insolúvel, com alta afinidade por hidroxiapatita e colágeno (Gestrelus *et al.*, 1997). Segundo Hoang *et al.* (2002), a amelogenina é uma proteína responsável pela adesão entre as células e possui afinidade por hidroxiapatita.

Gestrelus *et al.* (1997) realizaram um estudo *in vitro* para determinar a habilidade das proteínas derivadas da matriz de esmalte (PDME) em influenciar propriedades específicas de células do ligamento periodontal, como migração, adesão e proliferação. Os resultados

demonstraram que as PDME *in vitro* induziram a formação de proteínas agregadas, promovendo um ambiente ímpar para a interação celular. Nessas condições, as proteínas derivadas da matriz de esmalte induziram a proliferação das células do ligamento periodontal e aumentou a produção de proteínas por essas células. Os autores sugeriram que as proteínas derivadas da matriz de esmalte poderiam funcionar na regeneração periodontal.

Em 1997, Hammarstrom *et al.* pesquisaram se a matriz de esmalte poderia estar associada à regeneração, ao serem aplicadas em defeitos periodontais induzidos em macacos. Foi realizado um retalho bilateral, de canino à primeiro molar; e foram removidos a tábua óssea vestibular, o ligamento periodontal exposto e o cimento dos dentes. Preparações de matriz de esmalte foram aplicadas antes do reposicionamento e sutura dos retalhos. Após 8 semanas a cicatrização foi avaliada através da microscopia. Os resultados demonstraram regeneração dos tecidos periodontais entre 60 a 80%.

Em 1999, Spar e Hammarstrom realizaram um estudo visando investigar a formação de cimento e suas características, aplicando a matriz de esmalte em dentes de ratos. Eles extraíram os primeiros molares de ratos com 5 anos de idade, retiraram o cimento e depois reinsertaram esses dentes com a coroa voltada para o alvéolo, possibilitando o seu contato direto com a matriz de esmalte. Após um período de observação de 2 a 14 dias, foi realizada microscopia eletrônica nesses elementos, constatando que uma camada superficial de células foliculares em contato com a matriz de esmalte sofreu alterações morfológicas e aumentou sua expressão de colágeno tipo I e um tecido semelhante ao cimento que foi formado na superfície da matriz.

Gestrelius *et al.* (2000) descreveram o papel das proteínas derivadas da matriz de esmalte na formação do cimento (durante a embriogênese), e sugeriram sua utilização como uma forma de se obter uma regeneração periodontal verdadeira, imitando este processo. O autor utilizou o termo “biomimetização” para descrever as inovações baseadas em processos naturais.

Em 1997, Heijl *et al.* realizaram um estudo *in vivo*, em humanos, para analisar

histologicamente os efeitos do Emdogain® na regeneração periodontal, em um defeito periodontal experimental em humano. O defeito foi criado cirurgicamente em um incisivo inferior, o produto foi aplicado sobre a raiz exposta e o retalho foi reposicionado e suturado. O dente foi extraído 4 meses após, juntamente com os tecidos periodontais moles e duros para avaliação histológica. Foi observada uma cicatrização periodontal pela formação de cemento acelular, com neoformação do osso e ligamento periodontal. O novo cemento cobriu 73% do defeito original e o epitélio juncional migrou apicalmente cobrindo 12% do defeito. O ganho de osso alveolar foi de 65%. Os resultados indicaram as PDME como uma alternativa eficaz na regeneração periodontal.

Zetterstrom *et al.* (1997) testaram a segurança durante o tratamento com as proteínas derivadas da matriz de esmalte em 107 pacientes. Demonstraram que o potencial imunogênico das PDME é extremamente baixo. O grupo de estudo foi tratado com Emdogain e o grupo controle, com a terapia convencional (raspagem em campo aberto). As comparações demonstraram as mesmas ocorrências no pós-operatório entre os dois grupos.

Um estudo semelhante foi realizado por Nikolopoulos *et al.* (2002). Os autores acompanharam 10 pacientes tratados com Emdogain® durante um ano e não observaram nenhuma alteração imunológica ou humoral, indicando que o produto pode ser utilizado com segurança.

2.5 Mecanismos de ação das proteínas derivadas da matriz de esmalte

As proteínas derivadas da matriz de esmalte são capazes de estimular propriedades específicas do ligamento periodontal (Gestrelus *et al.*, 1997). Os autores realizaram um estudo *in vitro*, avaliando a capacidade do Emdogain na migração, adesão, proliferação, atividade biológica e mineralização de células do ligamento periodontal, como fibroblastos gengivais (FGs) e células

epiteliais. Concluíram que o Emdogain estimula a atividade celular dos FGs e a mineralização, através da produção de nódulos minerais por estas células. Observaram também que o Emdogain® induz a proliferação dos FGs, mas não das células epiteliais. Não foram observados efeitos significantes sobre a migração ou adesão celular. Também foi investigada a possível presença de vários fatores de crescimento, como fator de estimulação de granulócitos macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF-b), fobronectina, interferon gama (INF-gama), inteleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento insulínico 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), fator de crescimento neural (NGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento e transformação beta (TGF-beta). Como nenhum desses fatores foi encontrado, os autores sugeriram que as PDME podem servir como uma matriz positiva para as células que promovem a regeneração periodontal.

Hoang *et al.* (2000) realizaram um estudo *in vitro* para investigar a influência das proteínas derivadas da matriz de esmalte nas células do ligamento periodontal, fibroblastos gengivais e células ósseas derivadas de osteosarcoma. Foram criados modelos de feridas experimentais. Estas células foram tratadas com PDME em uma concentração de 5 a 100 µg/ml, além de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) a 20ng/ml como controle positivo e fator de crescimento insulínico (IGF-I) a 100ng/ml como controle negativo. As células do ligamento periodontal na presença das PDME demonstraram uma resposta superior estatisticamente significativa ($p < 0,001$) do que as células tratadas com PDGF e IGF-I. As proteínas derivadas da matriz de esmalte também demonstraram maior influência no crescimento dos fibroblastos do que o PDGF. Foi demonstrado que as PDME não só são capazes de estimular a proliferação e migração das células do ligamento periodontal e do tecido conjuntivo gengival, como também de células ósseas, porém, o seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido.

O TGF-beta é um fator de crescimento capaz de induzir a osteogênese *in vivo*, a

diferenciação de células osteogênicas *in vitro*, o crescimento de tecidos periodontais e inibir a proliferação epitelial (Iwata *et al.*, 2002). Para Kawase *et al.* (2001), os efeitos das PDME na proliferação celular estão relacionados com o fator de crescimento TGF-beta. Os autores relataram que o Emdogain® age sobre seus receptores, aumentando não só a sua quantidade nos tecidos gengivais, como também a sua meia vida. Realizaram um estudo, cultivando fibroblastos gengivais e células epiteliais e verificando o efeito do Emdogain® sobre elas, através da avaliação de níveis de quinases, por métodos imunohistoquímicos. Observaram que, além dos efeitos terem sido semelhantes aos efeitos promovidos pelo TGF-beta, os níveis celulares deste fator de crescimento estavam aumentados. O efeito estimulador do Emdogain® seria, dessa forma, indireto. Os autores comentaram que o TGF-beta seria o principal responsável pela estimulação do crescimento dos tecidos periodontais, apesar de estar presente em baixas concentrações nas PDME.

Kawase *et al.* (2000) demonstraram que o Emdogain® possui um efeito sobre as células epiteliais, ao inibir seu ciclo de proliferação. Foram incubadas células epiteliais derivadas de carcinoma e, após 3 dias, foi verificada uma inibição da proliferação destas células de uma maneira dose-dependente. Após este período, as células foram examinadas através de métodos imunohistoquímicos. Os autores relacionaram essa inibição à inibidores de quinases, indicando que o efeito do Emdogain® é citostático para células epiteliais.

Segundo o estudo de Shu *et al.* (2006), o Emdogain® é capaz de impedir a proliferação de células epiteliais de maneira dose-dependente. Os autores realizaram uma cultura de células epiteliais oriundas de fragmentos de tecido gengival coletados em gengivectomias. Essas células foram expostas a diferentes concentrações dos produtos. Segundo os autores, em baixas concentrações não foi observada nenhuma alteração, porém, na concentração de 200µg/ml, houve uma inibição significativa na proliferação das células epiteliais.

Segundo Cattaneo *et al.* (2003), as PDME induzem a proliferação dos fibroblastos gengivais. Os autores realizaram uma cultura com fibroblastos gengivais humanos em placas de

Petri e o seu crescimento foi monitorado durante 1, 3 e 8 dias, na presença e ausência das proteínas derivadas da matriz de esmalte. O crescimento foi maior do que o do grupo controle em todas as culturas com PDME. Através da microscopia eletrônica, foi observado que os fibroblastos, na presença de PDME, apresentavam corpo celular achatado fortemente ligado ao substrato e superfície externa arredondada. Também foram detectados processos celulares finos e alongados partindo do corpo celular e traços de atividade de fosfatase alcalina, observados em cementoblastos. Estes achados podem ser evidências de diferenciação celular, onde os fibroblastos se parecem com cementoblastos, o que representaria mais um indício de como as PDME poderiam auxiliar na regeneração periodontal.

Yuan *et al.* (2003) avaliaram como o Emdogain® poderia acelerar a regeneração periodontal. Para isso, realizaram uma cultura com células endoteliais humanas em um modelo de tecido e implantaram cirurgicamente membranas de colágeno embebidas com PDME em camundongos. No grupo controle, as membranas foram implantadas da mesma forma, porém, sem as PDME. Os autores relataram uma proliferação de vasos sanguíneos nos modelos de tecido tratados e nenhum crescimento no grupo controle. Nos camundongos, foi detectado um aumento significativo na proliferação de células endoteliais em comparação com o grupo controle. Embora tenha sido constatado um efeito angiogênico das PDME, os mecanismos através dos quais isto ocorreu ainda não foram esclarecidos.

He *et al.* (2004), sugeriram que o Emdogain®, além de promover a proliferação e diferenciação de células ósseas, promove a expressão da osteopontina (OPG), uma citocina que inibe a função osteoclástica. Células pré-osteoblásticas foram tratadas com PDME e incubadas, sendo este o grupo de estudo. No grupo controle, as células foram incubadas da mesma forma, porém, sem receber PDME. Após o período de incubação, foi removido o mRNA das células e analisado pelo método PCR para determinar o nível celular das proteínas ósseas, fatores de crescimento e OPGs. Em todas as células do grupo de estudo, os níveis dessas proteínas estavam

aumentadas em comparação com o grupo controle, indicando possíveis mecanismos de ação do Emdogain®.

Susuki *et al.* (2005) fracionaram o Emdogain® em 22 subtipos, pelo tamanho das moléculas, através do método de cromatografia. Segundo os autores, foram encontradas várias moléculas semelhantes ao TGF-beta e às proteínas ósseas morfogenéticas. Comentaram que s PDME poderiam exercer um efeito estimulatório direto sobre o periodonto, por apresentar esses fatores em sua constituição.

Mythre *et al.* (2006) investigaram a capacidade do Emdogain® de influenciar na resposta inflamatória. Foi coletado sangue de voluntários humanos e as amostras foram estimuladas com lipossacarídeos e peptídeoglicanos. Um grupo foi exposto às PDME e analisada a expressão de TNF-alfa, interleucina-10 e interleucina-8 pelo método ELISA. Os autores relataram que os níveis de interleucina-10 não foram alterados, mas a expressão de interleucina-8 e TNF-alfa foi atenuada, o que poderia indicar que o Emdogain® possui alguma atividade antiinflamatória.

Song *et al.* (2007) demonstraram que o Emdogain® induz a diferenciação celular, através de um estudo *in vivo* em camundongos. Os autores primeiramente isolaram células da medula óssea de porcos. Depois, retiraram os dentes dos mesmos animais, limpando, separando e cortando as raízes em secções longitudinais. As raízes foram condicionadas com EDTA e divididas em grupos. O grupo de estudo foi tratado com PDME e recebeu a aplicação das células da medula e o grupo controle não recebeu as PDME. Todas as raízes foram envolvidas com uma membrana de politetrafluoretileno expandido (ePTFE) e inseridas cirurgicamente no dorso de camundongos previamente preparados. Após 3 semanas, uma espécie do grupo de estudo apresentou um tecido semelhante ao cimento, com fibras inseridas nele. Em algumas áreas, este tecido estava firmemente aderido à raiz. Após 8 semanas, apenas uma espécie do grupo controle demonstrou uma formação de tecido semelhante ao cimento. Todas as outras demonstraram uma formação de tecido fibroso, sem evidências de regeneração. No grupo de estudo, a maioria das espécies demonstrou evidências

de regeneração, com formação de tecido semelhante ao cimento, em alguns casos, com fibras inseridas e osso alveolar. Os autores relataram o aparecimento de células semelhantes à cementoblastos, alinhadas na superfície do tecido calcificado neoformado. Este estudo, segundo os autores, mostra a eficácia das PDME em induzir a diferenciação celular.

Lossdörfer *et al.* (2007) sugeriram que o Emdogain® é capaz de promover a expressão da OPG. Os autores realizaram um estudo *in vitro*, expondo células do ligamento periodontal às PDME e ao paratormônio (PTH) como grupo controle. Foi observado um aumento da expressão de osteopontina. Os autores comentaram que este fato pode contribuir para criar um ambiente favorável à regeneração.

Lee *et al.* (2008) avaliaram a influência do Emdogain® na expressão de TGF-beta, interleucina-6 (IL-6), fator de crescimento insulínico (IGF-I), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e osteopontina (OPG), em culturas com células humanas e de camundongos tratadas com Emdogain®. Concluíram que o Emdogain® estimulou a expressão de TGF-beta, IL-6, IGF-I, BMPs e OPG, em diferentes níveis, sugerindo, também, que seus efeitos estimulatórios devem-se à regulação de mediadores locais. Estes mediadores estimulam a diferenciação e proliferação de diferentes tipos celulares importantes para a regeneração, como, por exemplo, osteoblastos e fibroblastos.

Bosshardt (2008) realizou uma revisão sistemática para demonstrar os benefícios do Emdogain na terapia periodontal regenerativa. Um total de 103 artigos preencheram os quesitos e segundo o autor, o derivado da matriz de esmalte afeta a adesão, migração celular e proliferação celular, expressão de fatores de crescimento, expressão de fatores de transcrição celular, citocinas, componentes da matriz extracelular e outras macromoléculas e expressão de moléculas envolvidas na regulação da remodelação óssea. Os autores reforçam as PDME como uma boa alternativa no tratamento periodontal regenerativo.

Sato *et al.* (2008) avaliaram se o Emdogain® poderia apresentar algum efeito anti-

inflamatório. Para isso, isolaram monócitos de camundongos e expuseram esses monócitos à lipossacarídeos bacterianos, retirados de *Escherichia coli* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Os níveis de TNF-alfa e prostaglandina E2 (PGE2) nestas células foram analisados através de testes imunológicos. Os monócitos tratados com PDME exibiram uma diminuição dos níveis de TNF-alfa e um aumento da PGE2. Os autores comentaram que além de induzir a proliferação, migração, adesão, mineralização e diferenciação das células do ligamento periodontal, o Emdogain® poderia regular a expressão de mediadores inflamatórios, o que, segundo os autores, explicaria por que os pacientes tratados com PDME relatam menos desconforto pós operatório.

Berti *et al.* (2009) estudaram *in vitro* os efeitos das PDME na proliferação, migração e expressão de fatores angiogênicos e moléculas de adesão em células endoteliais do cordão umbilical humano. Os autores avaliaram os efeitos das PDME na proliferação das células após 24 horas, utilizando 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenil tetrazolium bromide e contagem direta de células. Avaliaram a migração celular através de um modelo *in vitro* e a expressão do fator angiogênico angiopoitein-2 (ang-2), moléculas de adesão (ICAM-1) e endothelium-selectin (E-selectin) através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR). A proliferação das células foi observada na dosagem de 0.1 µg/ml de PDME e inibida em altas dosagens (50 à 100 µg/ml), porém, o número total de células não foi afetado. A migração de células foi observada em dosagens de 0,1 a 50 µg/ml e inibida em dosagens maiores. A maior expressão dos genes testados (ICAM-1, E-selectin e ang-2) foi observada na dosagem de 50 µg/ml de PDME. Segundo os autores, o Emdogain® influencia na atividade angiogênica das células endoteliais testadas, sugerindo que ele pode influenciar de forma parecida as células do ligamento periodontal.

Qu *et al.* (2010) estudaram os efeitos do Emdogain® em osteoblastos alveolares, células epiteliais e células endoteliais do cordão umbilical humano. Os autores constataram que a proliferação de todas as células testadas aumentou de maneira dose-dependente. A migração celular foi estimulada da mesma forma nos osteoblastos alveolares e nas células endoteliais, porém a

migração das células epiteliais foi estimulada somente em dosagens menores de 50 µg/ml. Os autores utilizaram o termo “versatilidade biológica”, indicando que o Emdogain® poderia promover a regeneração periodontal de várias formas.

A doença periodontal é caracterizada pelo aumento da atividade das metaloproteinases (MMPs) e diminuição da expressão de seus inibidores (TIMPs). Esse desequilíbrio resulta na destruição progressiva dos tecidos periodontais (Oyarzún *et al.*, 2010).

Zeldich *et al.* (2010) investigaram se o Emdogain® teria algum efeito na modulação das MMPs e TIMPs. Para isso, fibroblastos gengivais foram divididos em três grupos. O primeiro grupo foi tratado com PDME, o segundo com fator de necrose tumoral e o terceiro com ambos. As análises foram realizadas através do método PCR. Segundo os autores, as PDME induziram a expressão da TIMP-3, além de inibir a ação das MMPs quando estavam presentes juntamente com o fator de necrose tumoral. Os autores comentaram que o Emdogain® teria um efeito regulador nessas proteínas, favorecendo o seu equilíbrio nos tecidos gengivais.

Para investigar os efeitos da amelogenina na proliferação, adesão e migração das células que compõe o periodonto, Li *et al.* (2010) isolaram moléculas de amelogenina recombinante (rPAm) de porcos e investigaram sua ação nos fibroblastos do ligamento periodontal (FLP), fibroblastos gengivais (FGs) e células epiteliais gengivais. Foi constatado que a rPAm promoveu a proliferação e migração dos FLPs, porém não a adesão. A proliferação e adesão dos FGs foram aumentadas, porém não a migração. Segundo os autores, um achado interessante no estudo foi a inibição da proliferação, migração e adesão das células epiteliais, indicando que a amelogenina apresenta uma influência importante na regeneração periodontal.

2.6 Resultados clínicos, histológicos e radiográficos

Sculean *et al.* (1999) avaliaram os resultados clínicos de 32 defeitos infra-ósseos de duas ou

três paredes tratados com Emdogain®. Os parâmetros clínicos foram analisados uma semana antes da cirurgia e avaliados novamente após 8 meses. A profundidade de sondagem média foi reduzida de $8,7 \pm 1,5$ mm para $4,3 \pm 1,6$ mm; e o ganho médio de inserção clínica foi de $3,0 \pm 1,5$ mm. A recessão gengival aumentou de $1,8 \pm 1,2$ mm para $3,3 \pm 0,9$ mm. Em 26 dos 35 casos foi observado um ganho ósseo. Os autores comentam que este ganho não foi maior devido ao pequeno intervalo de observação. Concluíram que, embora os resultados tenham sido satisfatórios, são necessários mais estudos histológicos para avaliar a qualidade e estabilidade clínica dos tecidos formados.

Para Sculean *et al.* (1999a), o tratamento de defeitos infra-ósseos utilizando Emdogain® e membranas reabsorvíveis (Resolut, Regenerative Material, W.L. Gore & Assoc., Flagstaff, Arizona, USA) apresentou resultados semelhantes. Foram tratados 14 pacientes, cada um apresentando um defeito infra-ósseo profundo. Após 8 meses, o grupo tratado com Emdogain® apresentou redução de profundidade de sondagem (média 5,7 mm) e ganho clínico de inserção (média 3 mm), porém, os resultados obtidos com a RTG foram semelhantes. Os autores comentaram que, histologicamente, o grupo tratado com Emdogain® apresentou níveis mais elevados de regeneração óssea.

Rasperini *et al.* (1999) avaliaram os efeitos do Emdogain® sobre a profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e preenchimento ósseo em três defeitos. O primeiro paciente apresentava um defeito circular de uma parede em incisivos centrais superiores. Após um ano, o ganho de inserção clínica foi de 7 mm. O segundo paciente apresentava um defeito de três paredes na distal do elemento 13, e apresentou um ganho de inserção clínica de 8 mm após um ano. O terceiro paciente apresentava um defeito combinado de uma e três paredes em um incisivo central. Houve um ganho de inserção de 5 mm após um ano e após 18 meses, foi detectado um aumento significativo na estrutura óssea. Os pacientes foram submetidos a uma terapia de suporte (TPS) de 3 em 3 meses e avaliados 7 anos depois (Rasperini *et al.*, 2005) (Fig. 4). Os autores relataram a estabilidade dos ganhos clínicos obtidos. Reafirmaram a necessidade de um acompanhamento

periodontal rígido, com uma TPS eficiente.

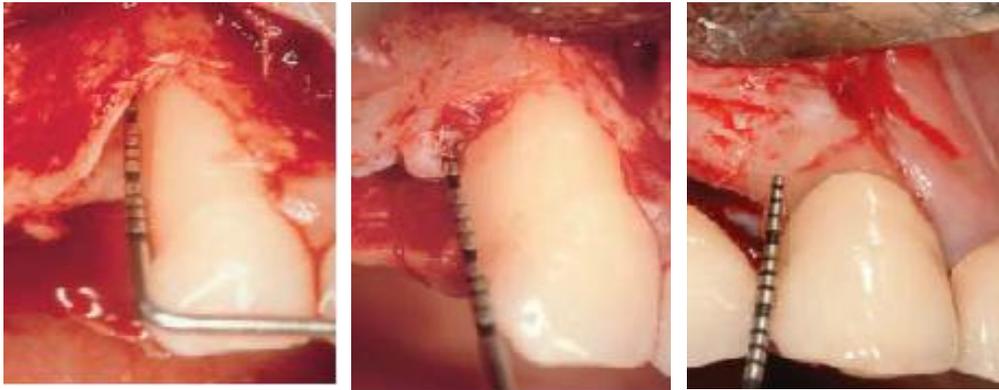


FIGURA 4 – Aspecto de um defeito ósseo anterior ao tratamento, após 1 ano e após 7 anos, demonstrando um preenchimento do defeito.

Fonte: Rasperini *et al.* (2005).

Também avaliando os resultados do Emdogain® na terapia regenerativa, Parodi *et al.*(2000) investigaram seus efeitos clínicos e histológicos em 21 defeitos infra-ósseos interproximais, em pacientes voluntários. Relataram um ganho médio de inserção clínica de 3,4 mm e uma redução média na profundidade de sondagem de 4,9 mm (Fig. 5). Embora os achados clínicos tenham sido significantes, os autores não encontraram melhoras nos exames radiográficos. Relataram que os achados histológicos não encontraram evidências de nova inserção, porém, verificaram uma formação de um novo tecido difícil de ser sondado e bem aderido às paredes do defeito.

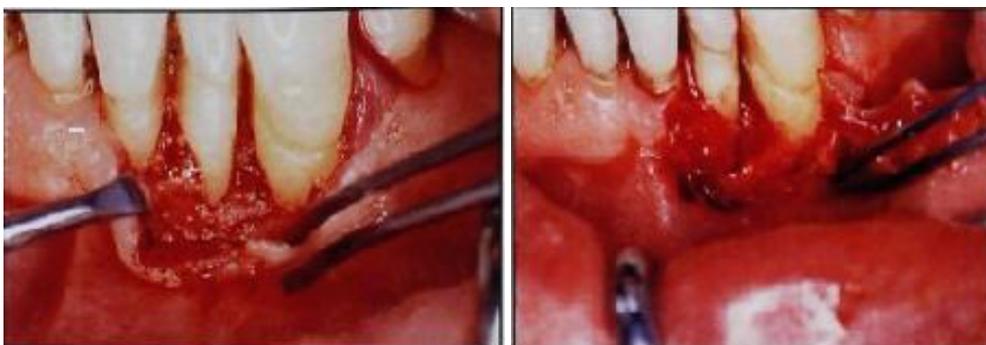


FIGURA 5 – Aspecto inicial de um defeito ósseo e seu aspecto após 12 meses, evidenciando um preenchimento parcial do defeito.

Fonte: Parodi *et al.* (2000).

Em 2004, Parodi *et al.* publicaram a continuação do estudo, avaliando os pacientes após 3

anos. Os achados clínicos foram semelhantes e não houve diferença significativa entre o estudo com um ano e o estudo com três anos (Fig. 6). Os autores relataram que, embora os achados radiográficos não tenham demonstrado um aumento do volume ósseo, ocorreu uma maior mineralização no tecido ósseo pré-existente, após 3 anos.



FIGURA 6 – Aspecto inicial de um defeito ósseo e aspecto após 36 meses. Nota-se um aumento da mineralização e preenchimento parcial do defeito.
Fonte: Parodi *et al.* (2004).

Heden (2000) analisou o efeito do Emdogain® no tratamento de defeitos infra-ósseos. Foram tratados 72 defeitos em 61 pacientes, e a eficácia do tratamento foi avaliada clinicamente e radiograficamente após um ano. Todos os pacientes apresentavam periodontite crônica que foi previamente tratada por pelo menos um ano. Para serem incluídos no estudo, os defeitos deveriam apresentar profundidade de sondagem maior ou igual à 3 mm e apresentarem uma ou duas paredes ósseas. Após um ano, a redução média das bolsas foi de 4,7 mm e o ganho médio de inserção clínica foi de 4,2 mm. O ganho ósseo médio, radiograficamente, foi de 3,1 mm e o preenchimento do defeito de 70%. Os autores comentaram a eficácia do Emdogain® no tratamento de defeitos de 2 e 3 paredes. Afirmaram que poderiam ter obtido resultados ainda melhores, pois 34% dos pacientes incluídos no estudo eram fumantes. Segundo os autores, embora tenha havido uma melhora também nesse grupo, o ganho de inserção foi menor.

Cochran *et al.* (2003), realizaram um estudo para avaliar os efeitos do Emdogain® histologicamente. Foram criados defeitos infra-ósseos experimentais bilaterais em dentes de

macacos. Neles foi induzido o crescimento de placa e, após 2 meses, foi realizado um retalho e os dentes foram submetidos à raspagem e alisamento radicular. Um lado foi tratado com PDME e o outro serviu de controle. Os retalhos foram suturados a cicatrização ocorreu sem procedimentos de higiene oral. Após 5 meses, os animais foram sacrificados e os os dentes processados para análise histológica. Foi observada regeneração periodontal em ambos os grupos, com formação de novo cemento, novas fibras do ligamento periodontal e novo osso, porém, os defeitos tratados com PDME resultaram em maior regeneração, de uma maneira geral, com maior eficácia nos defeitos mais estreitos. Segundo os autores, os resultados obtidos na regeneração de defeitos largos devem ser interpretados cautelosamente, pois, durante o período de acúmulo de placa, houve maior reabsorção das tábuas ósseas, dificultando seu potencial de nutrição e, conseqüentemente, de regeneração.

Em 2004, Venezia *et al.* realizaram uma revisão do tipo meta-análise para avaliar os efeitos do Emdogain® na terapia periodontal regenerativa e compará-lo com outras técnicas, analisando os resultados clínicos em termos de redução de profundidade de sondagem, ganho de inserção clínica, preenchimento do defeito e aspectos radiográficos. Para avaliar estes resultados, foram analisados 28 estudos contendo 955 defeitos infra-ósseos tratados com Emdogain®. Segundo os autores, o Emdogain® apresentou melhor resultado em termos de redução de profundidade de sondagem do que a raspagem em campo aberto ($4,82 \pm 0,02$ mm vs. $2,59 \pm 0,06$ mm) e nível de inserção clínica ($4,07 \pm 0,03$ mm vs. $2,55 \pm 0,04$ mm). Quando comparado com enxertos xenógenos, o Emdogain® também apresentou resultados superiores, porém, apenas 2 estudos preencheram os quesitos para serem incluídos nessa comparação. Em comparação com a RTG, o Emdogain® também apresentou melhores resultados para o ganho de inserção clínica ($4,07 \pm 0,03$ mm vs. $3,64 \pm 0,12$ mm), porém, apresentou resultado inferior na redução da profundidade de sondagem ($4,82 \pm 0,02$ mm vs. $5,24 \pm 0,13$ mm). O uso combinado de Emdogain® e RTG não apresentou resultados significativos. Os autores citaram o fato da RTG, aparentemente, apresentar maior previsibilidade histológica em

termos de formação de novo osso e novo cimento, em defeitos profundos (>8mm). Comentaram o fato da dificuldade técnica da RTG, pois sua execução envolve mais etapas, demanda um acompanhamento mais rigoroso e apresenta mais transtornos no pós-operatório e, além disso, pode causar recessões gengivais devido à necrose marginal causada no tecido, sendo muitas vezes necessário um segundo procedimento para corrigir essas recessões.

Sakallioğlu *et al.* (2004), analisaram histologicamente a neoformação tecidual obtida através do uso de Emdogain®. Os autores criaram modelos de periodontite em 4 cães e dividiram os modelos, tratando-os com Emdogain ou ácido fosfórico a 36% (grupo controle) e avaliaram seus efeitos após 7, 14, 21 e 28 dias. Após 7 dias, a quantidade de tecido conjuntivo formado no grupo de estudo foi estatisticamente maior ($p < 0,01$). A neoformação óssea se iniciou a partir de 14 dias nos dois grupos. Após 21 dias, foi observada formação de cimento em ambos os grupos. Após 28 dias, foi observado que a quantidade de cimento formado foi maior no grupo de estudo ($p < 0,01$). Os autores relataram que a espessura do cimento foi maior no grupo controle, porém, a diferença não foi significativa ($p > 0,05$). O grupo de estudo apresentou, também, formação de cimento acelular. Comentaram que as fibras neoformadas estavam mais organizadas no grupo de estudo. A quantidade de osso formado foi de $2,41 \pm 0,75$ mm no grupo de estudo e $1,09 \pm 0,46$ mm no grupo controle. A taxa de maturação óssea também estava aumentada no grupo de estudo. Os autores constataram uma maior regeneração histologicamente significativa nos defeitos tratados com Emdogain® (Fig. 7).

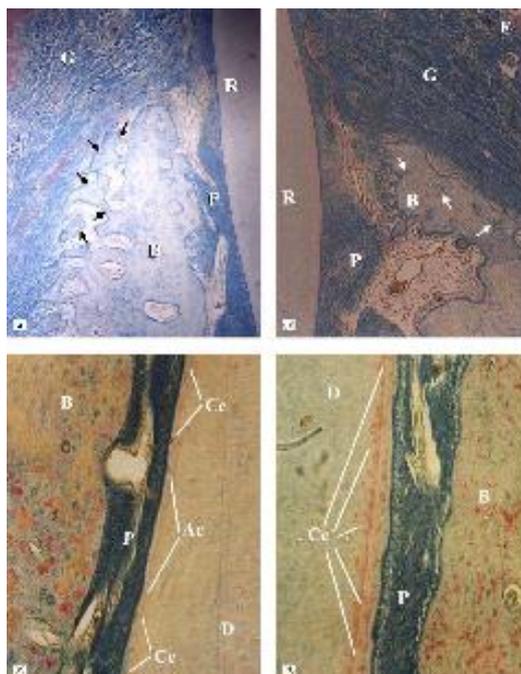


FIGURA 7 – Regeneração periodontal no grupo de estudo (a) e no grupo controle (b) após 28 dias. G: gengiva, E: epitélio, B: novo osso alveolar, R: raiz do dente, P: ligamento periodontal, setas pretas: maturação óssea, setas brancas: osteócitos. Características do cimento no grupo de estudo (c) e no grupo controle (d). B: novo osso alveolar, P: ligamento periodontal, D: dentina, Cc: cimento celular, Ac: cimento acelular.

Fonte: Sakallioğlu *et al.* (2004).

Cesarini *et al.* (2008), estudaram os efeitos do Emdogain® na regeneração de lesões de furca classe II. Foram selecionados 15 pacientes com lesões de furca em 2 dentes correspondentes, com profundidade de sondagem > 4 mm e sangramento presente. O grupo controle recebeu como tratamento a raspagem em campo aberto + EDTA. O grupo de estudo, além desses dois procedimentos, recebeu a aplicação de PDME. Relataram que as PDME não foram eficientes na redução de profundidade de sondagem ou ganho clínico de inserção, porém, aumentaram a conversão de classe II para classe I ($p < 0,05$).

Saito *et al.* (2008) realizaram uma terapia regenerativa utilizando o Emdogain® em 18 dentes com defeitos infra-ósseos e acompanharam os pacientes por pelo menos 2 anos, relatando um ganho de inserção médio de $3,22 \pm 1,4$ mm. Os autores relataram uma recessão gengival mínima após o tratamento (em média 1,11 mm), comentando que esta seria uma vantagem no uso

de Emdogain® em relação à RTG, já que, segundo os mesmos, os tratamentos com RTG levam à recessões maiores. Os autores enfatizaram a necessidade de um controle de placa rígido pelo paciente e um acompanhamento profissional.

Esposito *et al.* (2009), realizaram também uma revisão de literatura para comparar os resultados do Emdogain® com a RTG e enxertos ósseos (BG) na regeneração periodontal. Um total de 13 estudos preencheu os critérios de seleção. Foi constatado que o Emdogain® aumentou de forma significativa o nível de inserção clínica (em média 1,1 mm) e reduziu a profundidade de sondagem (0,9 mm em média), quando comparado aos grupos controle. Em outras comparações, não foram encontradas diferenças significativas, porém, a RTG apresentou maior índice de complicações pós operatórias e recessões gengivais. Afirmaram que embora apresente resultados promissores, as vantagens reais na utilização do Emdogain® deveriam ser analisadas com mais critério, pois podem estar sendo superestimadas.

Chambrone *et al.* (2010) realizaram um estudo comparando a cirurgia à retalho convencional (retalho de Widman modificado) com ou sem o uso de PDME. Foram selecionados 38 defeitos infra-ósseos em 10 pacientes. A redução da profundidade de sondagem encontrada foi em média $4,21 \pm 0,97$ mm para o grupo tratado com PDME, e de $3,28 \pm 1,23$ mm para o grupo controle. Essa diferença é estatisticamente significativa ($p=0,03$). O nível de inserção relativa aumentou em média $5,69 \pm 1,96$ mm no grupo de estudo e $5,24 \pm 1,55$ mm no grupo controle. Os autores comentaram que embora as duas terapias sejam eficientes para aumentar o ganho de inserção relativo, os defeitos tratados com Emdogain® apresentam uma maior redução na profundidade de sondagem.

Heijl *et al.* (1997b) compararam os efeitos do Emdogain® juntamente com a cirurgia a retalho de Widman modificado a longo prazo, em humanos. Foram tratados 34 sítios com PDME e 34 sítios controle em 33 pacientes. O ganho médio de inserção no grupo de estudo e no grupo controle foi, respectivamente, de 2,2 mm e 1,7 mm, após 36 meses. Os resultados radiográficos também foram significantes, indicando um aumento do nível ósseo nos sítios tratados com o

produto. Segundo os autores, a aplicação de Emdogain® em superfícies radiculares previamente tratadas associadas com defeitos infra-ósseos, promoveu um aumento no ganho de inserção clínica.

Velasquez *et al.* (2002), compararam a eficácia do Emdogain® sozinho ou associado à osso bovino inorgânico (BDX) no tratamento de defeitos infra-ósseos em humanos, em um estudo de boca-dividida. Foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: profundidade de sondagem, ganho de inserção clínica, profundidade do defeito, recessão gengival e altura da crista óssea após 6 e 8 meses. Estatisticamente, os autores só encontraram diferenças na recessão gengival (em média 0,5mm a mais no grupo tratado com Emdogain® sozinho) e preenchimento do defeito (em média 0,9mm a mais no grupo tratado com EMD + BDX). Os autores comentaram que os dois grupos foram eficazes na promoção da regeneração, tendo o grupo tratado com PDME + BDX uma pequena vantagem, por influenciar positivamente o preenchimento do defeito de uma maneira mais eficaz.

Sculean *et al.* (2003) avaliaram a eficácia clínica e histológica da associação do Emdogain® com osso bovino inorgânico (BDX) comparado ao BDX sozinho. Três pacientes apresentando 3 defeitos ósseos infra-ósseos foram selecionadas, sendo dois tratadas com PDME + BDX e uma somente com BDX. A análise histológica demonstrou resultados semelhantes nos 3 casos, pois ocorreu regeneração periodontal em todos os defeitos, com formação de novo cemento com fibras inseridas e novo osso. Clinicamente, os 3 defeitos também apresentaram resultados semelhantes, com redução na profundidade de sondagem. Os autores concluíram que as duas modalidades de tratamento foram eficazes, porém, não houve diferenças estatisticamente significantes entre elas.

Gurinsky *et al.* (2004) realizaram um estudo semelhante, comparando o Emdogain® com a associação de DFDBA + PDME. Os dois grupos apresentaram resultados semelhantes na redução da profundidade de sondagem (em média 4mm para PDME e 3,6mm para PDME + DFDBA) e ganho de inserção clínica (em média 3,2mm para PDME e 3mm para PDME + DFDBA), porém a associação de PDME e DFDBA proporcionou um preenchimento médio do defeito de 74,9%,

enquanto o Emdogain® sozinho proporcionou um preenchimento médio de 55,3%. Os autores relataram que, embora as duas modalidades de tratamento testadas tenham apresentado um resultados semelhantes, a associação de PDME + DFDBA pareceu mais eficaz na estimulação da regeneração óssea.

Del Pizzo *et al.* (2005) selecionaram 15 pacientes com recessões bilaterais classe I e II de Miller. As recessões foram divididas em 2 grupos e tratadas com deslocamento coronal de retalho (grupo controle), ou esta técnica associada ao Emdogain® (grupo de estudo). No grupo controle, os autores obtiveram um recobrimento médio de 90,67% das recessões e no grupo de estudo, a média foi de 86,67%. Após 24 meses, uma cobertura completa foi obtida em 73% (estudo) e 60% (controle). Os autores comentaram que o Emdogain®, embora eficaz na regeneração periodontal, parece não apresentar resultados estatisticamente eficientes quando associado ao retalho posicionado coronalmente para o recobrimento radicular.

Hoidal *et al.* (2008), relataram que o uso combinado entre DFDBA e PDME, embora tenha apresentado bons resultados nos parâmetros clínicos, promovendo um crescimento ósseo significativo ($p < 0,01$), não foi estatisticamente significante em comparação com o DFDBA sozinho. Eles selecionaram 41 defeitos infra-ósseos em voluntários, que foram divididos em 2 grupos e tratados com PDME ou DFDBA. No grupo tratado com DFDBA, 35% dos defeitos apresentaram preenchimento acima de 50%, e 20% dos defeitos, preenchimento acima de 80%. No grupo tratado com DFDBA + PDME, 41,2% dos defeitos apresentaram preenchimento acima de 50%, e 23,5% dos defeitos, preenchimento acima de 80%. Os autores comentaram a eficácia das duas técnicas na regeneração periodontal.

Tu *et al.* (2010) realizaram uma meta-análise para investigar se a associação do Emdogain® com membranas ou substitutos ósseos traria algum benefício na terapia regenerativa. O Emdogain® associado à RTG e associado a substitutos ósseos apresentou, respectivamente, 0,24 mm e 0,07 mm mais redução na profundidade de sondagem do que o Emdogain® sozinho. Para o ganho de

inserção clínica, PDME + substitutos ósseos ou membranas apresentou, respectivamente 0,46 mm e 0,15 mm a mais do que o Emdogain® sozinho. Os autores comentaram que as evidências, embora pequenas, indicam uma certa vantagem no uso de PDME associadas à outros materiais.

Aspriello *et al.* (2010) realizaram um estudo para comparar o osso alógeno liofilizado (DFDBA) puro e associado ao Emdogain® no tratamento de defeitos infra-ósseos. Cinquenta e seis defeitos foram randomizados e designados para o grupo de estudo (DFDBA + PDME) e o grupo controle (DFDBA). As medidas clínicas e radiográficas foram realizadas após 12 meses e, segundo os autores, os dois grupos apresentaram resultados satisfatórios nos parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, ganho de inserção clínica e recessão gengival) e radiográficos (preenchimento ósseo). Diferenças significantes foram encontradas no grupo de estudo comparado ao grupo controle em relação à redução de profundidade de sondagem (5,0 mm vs. 4,0 mm; $P < 0,05$), ganho de inserção clínico (4,0 mm vs. 3,25 mm) e preenchimento ósseo (4,0 mm vs. 3,5 mm; $P < 0,05$). Os autores comentaram que, embora os dois grupos tenham apresentados bons resultados, o tratamento combinado parece apresentar resultados mais satisfatórios.

Discussão

A doença periodontal leva à uma destruição gradativa das estruturas de suporte dos dentes, como ligamento periodontal, cemento e osso alveolar, o que causa uma alteração de toda a estrutura circunvizinha. Essa perda de estrutura pode levar à danos estéticos e funcionais, e até mesmo à perda do dente (Lindhe, 2005).

O tratamento convencional consiste na raspagem e alisamento radicular para eliminar o fator causal primário, que é bacteriano, proporcionando um ambiente favorável para a cicatrização e reconstituição dos tecidos perdidos (Newman, 1994).

Esta cicatrização é influenciada por fatores do hospedeiro e pode ocorrer por reparo ou por regeneração. Muitas vezes, a cicatrização ocorrida resulta em defeitos estéticos ou funcionais severos, sendo necessária uma terapia regenerativa na tentativa de recuperar a área tratada, trazendo benefícios estéticos e/ou funcionais ao paciente (Carvalho, 2004). A forma como acontece essa cicatrização depende de uma cascata de eventos biológicos e uma regulação de diversos fatores, além da disponibilidade de tipos celulares específicos (Melcher, 1976; Cochran e Wozney, 1999).

Para uma terapia ser considerada realmente capaz de promover uma regeneração verdadeira, ela deve seguir os critérios propostos pela Academia Americana de Periodontia. São eles: amostras histológicas evidenciando a formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar; experimentos clínicos controlados em humanos demonstrando melhora na inserção clínica e estudos histológicos controlados em animais demonstrando a formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso (Academia Americana de Periodontia, 1996).

A maioria das terapias regenerativas atuais se baseia na regulação desses fatores e tipos celulares, visando estimular ou inibir a expressão de fatores ou controlar propriedades celulares como migração, diferenciação ou adesão (Gestrelius *et al.*, 1997). Atualmente, as terapias existentes isoladas apresentam resultados limitados e contraditórios, a maioria delas sendo eficaz somente em casos específicos (Lee *et al.*, 2010). Ademais, a complexidade da técnica e o custo elevado tornam a maioria dessas terapias de difícil acesso para a prática clínica.

As proteínas derivadas da matriz de esmalte surgiram como uma alternativa na terapia regenerativa, sob o nome comercial de Emdogain®, em 1996. A sua proposta seria mimetizar eventos que ocorrem durante a embriogênese, buscando uma formação de novo cemento acelular e, conseqüentemente, novas fibras inseridas e novo osso (Gestrelus *et al.*, 2000).

A segurança do produto foi testada em estudos *in vivo* (Zetterstrom *et al.*, 1997; Nikolopoulos *et al.*, 2002), classificando seu potencial imunogênico como muito baixo, o que indica que ele não é capaz de desencadear respostas imunes indesejáveis.

Vários estudos demonstraram que as proteínas derivadas da matriz de esmalte são capazes de influenciar propriedades específicas das células do ligamento periodontal como migração, proliferação e adesão de uma maneira que favoreça a regeneração periodontal (Gestrelus *et al.*, 1997; Cattaneo *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2010). Sendo capaz de estimular estas propriedades, o Emdogain® seria capaz de proporcionar um ambiente ideal para a regeneração, aumentando, no local da ferida cirúrgica, a presença de células que possuem as mesmas propriedades dos tecidos perdidos.

Foi também relatado que o Emdogain® é capaz de induzir a diferenciação celular (Cattaneo *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007), favorecendo a expressão de cementoblastos. Este seria mais um indício de que a aplicação do produto realmente mimetiza eventos ocorridos na embriogênese.

Um efeito sobre as células ósseas também foi observado. Estudos comprovaram que o Emdogain® possui também um efeito regulatório na remodelação óssea, atuando na proliferação e diferenciação dos odontoblastos (Hoang *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2002; He *et al.*, 2004).

Além disso, foi também demonstrada uma regulação de fatores angiogênicos e células endoteliais, indicando que o Emdogain® teria um efeito positivo na expressão desses fatores e proliferação dessas células. Este fato pode explicar a cicatrização mais rápida que ocorre em defeitos tratados com PDME (Yan *et al.*, 2003; Schlueter *et al.*, 2007; Berti *et al.*, 2009; Qui *et al.*, 2010).

Embora os mecanismos através dos quais o Emdogain® influencia na proliferação celular sejam desconhecidos, há evidências de que ele influencia de alguma forma a regulação de mediadores locais como o TGF-beta, IL-6, IGF-I e OPG (Kawase *et al.*, 2001; He *et al.*, 2004; Susuki *et al.*, 2005; Lossdörfer *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008).

Um princípio no qual se baseiam várias terapias regenerativas é o da inibição da proliferação do tecido epitelial, seja agindo diretamente nas células, seja através de barreiras físicas, como membranas. O tecido epitelial, por apresentar uma proliferação mais rápida, invade a ferida cirúrgica, impedindo outras células de crescimento mais lento, como tecido conjuntivo e tecido ósseo, de chegarem ao local (Lindhe, 2005).

As proteínas derivadas da matriz de esmalte se mostraram eficazes na inibição da proliferação (Kawase *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2006) e migração (Li *et al.*, 2010) dos tecidos epiteliais. Esse efeito parece estar relacionado à inibição de quinases (Kawase *et al.*, 2000).

Estudos recentes indicam que até mesmo a resposta inflamatória parece ser afetada de alguma forma pelas proteínas derivadas da matriz de esmalte (Myhre *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2008), fato que poderia explicar a menor incidência de efeitos pós-operatórios adversos.

Devido às diversas maneiras como o Emdogain® influencia na cicatrização periodontal, ele foi descrito como uma terapia que apresenta uma grande versatilidade biológica nos mecanismos de ação. Apesar de promissores, os resultados que apontam toda essa “versatilidade biológica” devem ser analisados com cautela, pois os estudos foram realizados sob condições específicas em modelos específicos, utilizando dosagens específicas; condições que nem sempre podem ser reproduzidas na prática clínica.

Clinicamente e radiograficamente, o Emdogain® se mostrou eficiente na terapia regenerativa, isolado ou quando comparado com a terapia convencional, sendo eficaz na redução da profundidade de sondagem, ganho de inserção clínica e preenchimento ósseo do defeito (Rasperini *et al.*, 1999; Rasperini *et al.*, 2005; Sculean *et al.*, 1999; Heden, 2000; Cesarini *et al.*,

2008; Chambrone *et al.*, 2010). No entanto, não se sabe o tipo de tecido formado sem uma análise histológica, portanto se pode afirmar que houve uma regeneração verdadeira (Parodi *et al.*, 2000).

Histologicamente, os resultados também têm se mostrado promissores, indicando formação de novas estruturas semelhantes às originais, em estudos em animais (Cochran *et al.*, 2003, Sakallioğlu *et al.*, 2004). Os estudos histológicos em humanos apresentaram resultados mais limitados, porém indicando também evidências de regeneração (Heiji *et al.*, 1997; Parodi *et al.*, 2000, Sculean *et al.*, 2000).

Uma consideração a ser feita é o número limitado de estudos histológicos em humanos. Também devemos considerar que, na maioria dos estudos histológicos, os defeitos testados foram experimentais. A doença periodontal pode influenciar não só o defeito, como também a raiz, dificultando o potencial regenerativo dos tecidos periodontais.

Em comparação com outras técnicas regenerativas, como RTG e enxertos com substitutos ósseos, o Emdogain® não apresentou resultados convincentes para podermos afirmar uma maior eficiência em relação à estas técnicas (Venezia *et al.*, 2004; Esposito *et al.*, 2009). Os estudos que avaliaram a combinação de PDME com essas técnicas, embora possam sinalizar uma maior eficiência dessas combinações, também não apresentaram resultados suficientes para que possamos afirmar a sua superioridade em comparação com as técnicas isoladas (Velasquez *et al.*, 2002; Sculean *et al.*, 2003; Gurinsky *et al.*, 2004; Hoidal *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2010). Uma vantagem clara no uso de Emdogain® é a simplicidade de sua técnica de aplicação, comparado à outras técnicas regenerativas.

O Emdogain® apresenta resultados promissores na regeneração periodontal, porém, devemos analisá-los com cuidado, pois estes resultados não são clinicamente superiores aos resultados obtidos com outras técnicas regenerativas. Um maior número de estudos se faz necessário para elucidar a previsibilidade da técnica, principalmente do ponto de vista histológico. A anatomia dos defeitos também aparece como um fator importante a ser considerado, pois pode

afetar diretamente o potencial regenerativo dos tecidos periodontais, limitando a previsibilidade da técnica, além disto o alto custo do produto também representa uma limitação, pela dificuldade de incorporá-lo à prática clínica.

Conclusão

Embora o mecanismo de ação do Emdogain® não esteja bem elucidado, acredita-se que ele age na regulação de citocinas, favorecendo uma regeneração periodontal eficiente.

Estudos clínicos e radiográficos indicam que o Emdogain® é capaz de promover uma regeneração, melhorando parâmetros como profundidade de sondagem, preenchimento ósseo e ganho de inserção.

Histologicamente, embora os estudos apontem que o produto seja eficiente na regeneração periodontal, os resultados ainda não são realmente conclusivos.

Assim, conclui-se que o Emdogain® apresenta resultados significativos, sendo realmente capaz de induzir uma regeneração do ponto de vista clínico. Porém, são necessários mais estudos para elucidar sua previsibilidade, pois os resultados encontrados limitam-se à situações clínicas específicas. Mais estudos histológicos também se fazem necessários para que possamos verificar realmente uma regeneração verdadeira, e o alto custo do produto ainda é uma limitação para seu uso.

Referências

- 1) ASPRIELLO, S.D.; FERRANTE, L.; RUBINI, C.; PIEMONTESE, M. Comparative study of DFDBA in combination with enamel matrix derivative versus DFDBA alone for treatment of periodontal intrabony defects at 12 months post-surgery. *Clin Oral Investig.*, EPUB ahead of print, Jan. 2010.
- 2) BERTI, K.; BRUCKMANN, C.; DARD, M.; ANDRUKHOV, O.; MATEJKA, M.; RAUSCH-FAN, X. Effects of enamel matrix derivative on proliferation/viability, migration, and expression of angiogenic factor and adhesion molecules in endothelial cells in vitro. *J periodontol.*, 80(10):1622-30, Oct. 2009.
- 3) BOSSHARDT, D. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*, 35:87-105, Sep. 2008.
- 4) CESARINI, R.C.; DEL PELOSO RIBEIRO, E.; NOCITI, F.H. JR.; SALLUM, A.W.; SALLUM, E.A.; AMBROSANO, G.M.; CASATI, M.Z. A double-blind randomized clinical evaluation of enamel matrix derivative proteins for the treatment of proximal class-II furcation involvements. *J Clin Periodontol.*, 35(5):429-37, May. 2008.
- 5) CATTANEO, V.; ROTA, C.; SILVESTRI, M.; PIACENTINI, C.; FORLINO, A.; GALLANTI, A.; RASPERINI, G.; CETTA, G. Effect of enamel matrix derivative on human periodontal fibroblasts: proliferation, morphology and root surface colonization. An in vitro study. *J Periodontal Res.*, 38(6):568-74, Dec. 2003.
- 6) CHAMBRONE, D.; PASIN, I.M.; CHAMBRONE, L.; PANNUTI, C.M.; CONDE, M.C.; LIMA, L.A. Treatment of infrabony defects with or without enamel matrix proteins: a 24-month follow-up randomized pilot study. *Quintessence Int.*, 41(2):125-34. Feb. 2010.
- 7) COCHRAN, D.L.; KING, G.N.; SCHOOLFIELD, J.; VELASQUEZ-PLATA, D.; MELLONIG, J.T.; JONES, A. The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. *J Periodontol.*, 74(7):1043-55, Jul. 2003.
- 8) COCHRAN, D.L.; WOZNEY, J.M. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol.*, 2000, 19:40-58, Feb. 1999.
- 9) DEL PIZZO, M.; ZUCHELLI, G.; MODICA, F.; VILLA, R.; DEBERNARDI, C. Coronally advanced flap with or without enamel matrix derivative for root coverage: a 2-year study. *J Clin Periodontol.*, 32(11):1181-7, Nov. 2005.
- 10) ESPOSITO, M.; GRUSOVIN, M.G.; PAPANIKOLAOU, N.; COULTHARD, P.; WORTHINGTON, H.V. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue

- regeneration in intrabony defects. A Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol.*, 2(4):247-66, Jul. 2009.
- 11) FINCHAM, A.G.; MORADIAN-OLDAK, J.; SIMMER, J.P., SARTE, P.; LAU, E.C.; DIEKWISCH, T.; SLAVKIN, H.C. Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structures. *J Struct Biol.*, 112(2):103-9, Mar. 1994.
 - 12) GESTRELIUS, S.; LYGSTADAAS, S.P.; HAMMARSTRÖM, L. Emdogain – periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Investig.*, 4(2):120-5, Jun.2000.
 - 13) GESTRELIUS, S.; ANDERSSON, C.; JOHANSSON, A.C.; PERSSON, E.; BRODIN, A; RYDHAG, L.; HAMMARSTRÖM, L. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol.*, 24(9 Pt 2):678-84, Sep. 1997.
 - 14) GESTRELIUS, S.; ANDERSSON, C.; LIDSTRÖM, D.; HAMMARSTRÖM, L.; SOMERMAN, M. In vitro studies on periodontalligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol.*, 24(9 Pt 2):678-84, Sep. 1997.
 - 15) GODA, S.; KANESHITA, Y.; INOUE, H.; DOMAE, E.; IKEO, T.; IIDA, J.; DOMAE, N. Enamel matrix derivative protein stimulated wound healing via phosphoinositide 3-kinase. *J Periodontol.*, 80(10):1631-7, Oct. 2009.
 - 16) GRZESIK, J.W.; NARAYANAN, A.S. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 13(6):474-84, Jun. 2002.
 - 17) GURINSKY, B.S.; MILLS, M.P.; MELLONIG, J.T. Clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft and enamel matrix derivative versus enamel matrix derivative alone for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol.*, 75(10):1309-18, Oct. 2004.
 - 18) HAMMARSTRÖM, L. Enamel Matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 24(9 Pt 2):658-68, Sep. 1997.
 - 19) HAMMARSTRÖM, L.; HEIJL, L.; GESTRELIUS, S. Periodontal regeneration in a bucal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol.*, 24(9 Pt 2):669-77, Sep. 1997.
 - 20) HE, J.; JIANG, J.; SAFAVI, K.E.; SPÅNGBERG, L.S.; ZHU, Q. Emdogain promotes osteoblast proliferation and differentiation and stimulates osteoprotegerin expression. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 97(2):239-45, Feb. 2004.
 - 21) HEDEN, G. A case report study of 72 consecutive Emdogain-treated intrabony periodontal defects: clinical and radiographic findings after 1 year. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 20(2):127-39, Apr. 2000.

- 22) HEIJL L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol.*, 24(9 Pt 2):693-6, Sep. 1997.
- 23) HEIJL, L.; HEDEN, G.; SVÄRDSTRÖM, G.; OSTGREN, A. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol.*, 24(9 Pt 2):705-14, Sep. 1997.
- 24) HOANG, A.M.; KLEBE, R.J.; STEFFENSEN, B.; RYU, O.H.; SIMMER, J.P.; COCHRAN, D.L. Amelogenin is a cell adhesion protein. *J Dent Res.*, 81(7):497-500, Jul. 2002.
- 25) HOANG, A.M.; OATES, T.W.; COCHRAN, D.L. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol.*, 71(8):1270-7, Aug. 2000.
- 26) HOIDAL, M.J.; GRIMARD, B.A.; MILLS, M.P.; SCHOOLFIELD, J.D.; MELLONIG, J.T.; MEALEY, B.L. Clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft with and without enamel matrix derivative for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol.*, 79(12):2273-80, Dec. 2008.
- 27) ILLUECA, F.M.; VERA, P.; DE GRADO CABANILLES, P.; FERNANDEZ, V.F.; LOSCOS, F.J.G. Periodontal regeneration in clinical practice. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11(4):E382-92, Jul. 2006.
- 28) IWATA, T; MOROTOME, Y.; TANABE, T.; FUKAE, M.; ISHIKAWA, I.; OIDA, S. Noggin blocks osteoinductive activity of porcine enamel extracts. *J Dent Res.*, 81(6):387-91, Jun. 2002.
- 29) KAWASE, T.; OKUDA, K.; YOSHIE, H.; BURNS, D.M. Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. *J Periodontal Res.*, 35(5):291-300, Oct. 2000.
- 30) KAWASE, T.; OKUDA, K.; MOMOSE, M.; KATO, Y.; YOSHIE, H.; BURNS, D.M. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodontal Res.*, 36(6):367-76, Dec. 2001.
- 31) LEE, A.Z.; JIANG, J. HE, J.; SAFAVI, K.E.; SPANGBERG, L.S.; ZHU, Q. Stimulation of cytokines in osteoblasts cultured on enamel matrix derivative. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 106(1):133-8, Jul. 2008.
- 32) LYGSTADAAS, S.P.; WOHLFAHRT, J.C.; BROOKES, S.J.; PAINE, M.L.; SNEAD, M.L.; RESELAND, J.E. Enamel matrix proteins; old molecules for new applications. *Orthod Craniofac Res.*, 12(3): 243-253, Aug. 2009.
- 33) LI, X.; SHU, R.; LIU, D.; JIANG, S. Different effects of 25-kDa amelogenin on the

- proliferation, attachment and migration of various periodontal cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 9;394(3):581-6, Apr. 2010.
- 34) LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4a ed. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, England, Jul. 2005.
- 35) LOSSDÖRFER, S.; SUN, M.; GÖTZ, W.; DARD, M.; JÄGER, A. Enamel matrix derivative promotes human periodontal ligament cell differentiation and osteoprotegerin production in vitro. *J Dent Res.*, 86(10):980-5, Oct. 2007.
- 36) MYHRE, A.E.; LYNGSTADAAS, S.P.; DAHLE, M.K.; STUESTØL, J.F.; FOSTER, S.J.; THIEMERMANN, C.; LILLEAASEN, P.; WANG, J.E.; AASEN, A.O. Anti-inflammatory properties of enamel matrix derivative in human blood. *J Periodontal Res.*, 41(3):208-13, Jun. 2006.
- 37) NIKOLOPOULOS, S.; PETEINAKI, E.; CASTANAS, E. Immunologic effects of emdogain in humans: one-year results. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 22(3):269-77, Jun. 2002.
- 38) ODA, J.Y.; CARVALHO, J. Cicatrização do periodonto: revisão. *Arq. ciências saúde UNIPAR*; 8(2):159-166, May. 2004.
- 39) OYARZÚN, A.; ARANCIBIA, R.; HIDALGO, R.; PEÑAFIEL, C.; CÁCERES, M.; GONZÁLEZ, M.J.; MARTÍNEZ, J; SMITH, P.C. Involvement of MT1-MMP and TIMP-2 in human periodontal disease. *Oral Dis.*, 16(4):388-95, May. 2010.
- 40) PARODI, R.; LIUZZO, G.; PATRUCCO, P.; BRUNEL, G.; SANTARELLI, G.A.; BIRARDI, V.; GASPARETTO, B. Use of Emdogain in the treatment of deep intrabony defects: 12-month clinical results. Histologic and radiographic evaluation. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 20(6):584-95, Dec. 2000.
- 41) PARODI, R.; SANTARELLI, G.A.; GASPARETTO, B. Treatment of intrabony pockets with Emdogain: results at 36 months. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 24(1):57-63, Feb. 2004.
- 42) PARODI, R.; SANTARELLI, G.A.; GASPARETTO, B. Treatment of intrabony pockets with Emdogain: results at 36 months. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 24(1):57-63, Feb. 2004.
- 43) QU, Z.; LAKY, M.; ULM, C.; MATEJKA, M.; DARD, M.; ANDRUKHOV, O.; RAUSCH-FAN, X. Effect of Emdogain on proliferation and migration of different periodontal tissue-associated cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 109(6):924-31, Jun. 2010.
- 44) RASPERINI, G.; SILVESTRI, M.; RICCI, G. Long-term clinical observation of

- treatment of intrabony defects with enamel matrix derivative (Emdogain): surgical reentry. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 25(2):121-7, Apr. 2005.
- 45) SAITO, A.; NANBU, Y.; NAGAHATA, T.; YAMADA, S. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative in private practice: a long-term retrospective study. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2008 May; 49(2):89-96. Erratum in: *Bull Tokyo Coll*, 49(3):129, Aug. 2008.
- 46) SAKALLIOĞLU, U.; AÇIKGÖZ, G.; AYAS, B.; KIRTILOĞLU, T.; SAKALLIOĞLU, E. Healing of periodontal defects treated with enamel matrix proteins and root surface conditioning-an experimental study in dogs. *Biomaterials*, 25(10):1831-40, May. 2004.
- 47) SATO, S.; KITAGAWA, M.; SAKAMOTO, K.; IIZUKA, S.; KUDO, Y.; OGAWA; MIYAUCHI, M.; CHU, E.Y.; FOSTER, B.L.; SOMERMAN, M.J.; TAKATA, T. Enamel matrix derivative exhibits anti-inflammatory properties in monocytes. *J Periodontol.*, 79(3):535-40, Mar. 2008.
- 48) SIMMER, J.P.; FINCHAM, A.G. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med.*;6(2):84-108, 1995.
- 49) SCULEAN, A.; DONOS, N.; BLAES, A.; LAUERMAN, M.; REICH, E.; BRECX, M. Comparison of enamel matrix proteins and bioabsorbable membranes in the treatment of intrabony periodontal defects. A split-mouth study. *J Periodontol.*, 70(3):255-62, Mar. 1999.
- 50) SCULEAN, A.; WINDISCH, P.; CHIANTELLA, G.C. Human histologic evaluation of an intrabony defect treated with enamel matrix derivative, xenograft, and GTR. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 24(4):326-33, Aug. 2004.
- 51) SCULEAN, A.; WINDISCH, P.; CHIANTELLA, G.C.; DONOS, N.; BRECX, M.; REICH, E. Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. A prospective controlled clinical study. *J Clin Periodontol.*, 28(5):397-403, May. 2001.
- 52) SCULEAN, A.; WINDISCH, P.; KEGLEVICH, T.; CHIANTELLA, G.C.; GERA, I.; DONOS, N. Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative combined with a bovine-derived xenograft. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 23(1):47-55, Feb. 2003.
- 53) SHU, R.; SONG, A.M.; WANG, H.Y.; ZHANG, X.L. [Effects of enamel matrix proteins on the proliferation of human gingival epithelial cells in vitro]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 15(1):38-41, Feb. 2006.
- 54) SLAVKIN, H.C.; BRINGAS, P.J.R.; BESSEM, C.; SANTOS, V.; NAKAMURA, M.;

- HSU, M.Y. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontal Res.*, 24(1):28-40, Jan. 1989.
- 55) SLAVKIN, H.C.; BESSEM, C.; FINCHAM, A.G.; BRINGAS, P.J.R.; SANTOS, V.; SNEAD, M.L. Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins. *Biochim Biophys Acta*, 991(1):12-8, Apr. 1989.
- 56) SONG, A.M.; SHU, R.; XIE, Y.F.; SONG, Z.C.; LI, H.Y.; LIU, X.F.; ZHANG, X.L. A study of enamel matrix proteins on differentiation of porcine bone marrow stromal cells into cementoblasts. *Cell Prolif.*, 40(3):381-96, Jun. 2007.
- 57) SUZUKI, S.; NAGANO, T.; YAMAKOSHI, Y.; GOMI, K.; ARAI, T.; FUKAE, M.; KATAGIRI, T.; OIDA, S. Enamel matrix derivative gel stimulates signal transduction of BMP and TGF- β . *J Dent Res.*, 84(6):510-4, Jun. 2005.
- 58) TU, Y.K.; WOOLSTON, A.; FAGGION JR, C.M. Do bone grafts or barrier membranes provide additional treatment effects for infrabony lesions treated with enamel matrix derivatives? A network meta-analysis of randomized-controlled trials. *J Clin Periodontol.*, 37(1):59-79. Epub 2009, Dec 1, Jan. 2010.
- 59) VELASQUEZ-PLATA, D.; SCHEYER, E.T.; MELLONIG, J.T. Clinical comparison of an enamel matrix derivative used alone or in combination with a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol.*, 73(4):433-40 Apr 2002. Erratum in: *J Periodontol.*, 73(6):684, Jun. 2002.
- 60) VENEZIA, E.; GOLDSTEIN, M.; BOYAN, B.D.; SCHWARTZ, Z. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 15(6):382-402, Nov. 2004.
- 61) YUAN, K.; CHEN, C.L.; LIN, M.T. Enamel matrix derivative exhibits angiogenic effect in vitro and in a murine model. *J Clin Periodontol.*, 30(8):732-8, Aug. 2003.
- 62) ZELDICH, E.; KOREN, R.; DARD, M.; WEINBERG, E. WEINREB, M.; NEMCOVSKY, C.E. Enamel matrix derivative induces the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 in human gingival fibroblasts via extracellular signal-regulated kinase. *J Periodontal Res.*, 45(2):200-6, Apr. 2010.
- 63) ZETTERSTRÖM, O.; ANDERSSON, C.; ERIKSSON, L.; FREDRIKSSON, A.; FRISKOPP, J.; HEDEN, G.; JANSSON, B.; LUNDGREN, T.; NILVEUS, R.; ENVERT, S.; SALONEN, L.; SJÖSTRÖM, L.; WINELL, A.; OSTGREN, A.; GESTRELIUS, S. Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol.*, 24(9 Pt 2):697-704, Sep. 1997.