

Estudo clínico da aplicação de matriz inorgânica de osso associado a peptídeo sintético de adesão celular (MIO/P-15), PepGen P-15[®], em lesões periodontais avançadas de cães¹

Daniel G. Ferro^{2*} e Marco A. Gioso³

ABSTRACT.- Ferro D.G. & Gioso M.A. 2009. [Clinical study of effectiveness of an Anorganic Bone Matrix and Cell-Binding Peptide (ABM/P-15), PepGen-P15[®]: Application in advanced periodontal lesions of dogs.] Estudo clínico da aplicação de matriz inorgânica de osso associado a peptídeo sintético de adesão celular (MIO/P-15), PepGen P-15[®], em lesões periodontais avançadas de cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(2):109-116. Laboratório de Odontologia Comparada, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. E-mail: deferro@usp.br

The development of biologic modalities designed to enhance bone regeneration and wound healing of specific periodontal sites continues to be a challenge and has been accomplished through the cell binding activity of Type-I collagen. These have been provided by a synthetic cell binding peptide (P-15), associated to an anorganic bone matrix (ABM) to form ABM/P-15. The aim of this study was to evaluate the attachment loss and periodontal pocket response in teeth after 3 and 6 months with ABM/P-15 graft application. Twenty one dogs from the Veterinary Hospital, University of São Paulo, were anesthetized in order to accomplish periodontal treatment and 132 teeth faces with attachment loss were treated. From these, 36.4% (48 faces) received cell binding peptide and 63.6% (84 faces) compounded the control group that received conventional treatment (muco-gingival flap and root planning). The procedure was documented by intra-oral radiography and all periodontal probings were photographed. After 3 and 6 months, the animals were re-anesthetized in order to accomplish new photography, radiography and periodontal probing exams. The 48 attachment loss faces that received graft material exhibited 40% of regeneration rate after 6 months. The control faces did not change their attachment level. The palatal face presented the better regeneration rates (40%) and the canines and molars teeth showed the better responses (57.14% and 65%, respectively). There was no post-surgical infection related to absence of oral home care. It can be concluded that ABM/P-15 helps a more rapidly periodontal structure re-attachment and regeneration, including alveolar bone. Its application was easy and practical, and the post-surgical complications incidence was low. Nevertheless, more work is necessary to evaluate the amount and the quality of formed bone and periodontal ligament.

INDEX TERMS: Veterinary dentistry, periodontal disease, animal graft, animal bone implant, bone regeneration, type I Collagen, P-15, cell-binding peptide, dog.

¹ Recebido em 13 de junho de 2008.

Aceito para publicação em 11 de setembro de 2008.

² Centro Odontológico Veterinário (Odontovet), Av. Magalhães de Castro 12, Butantã, São Paulo, SP 05502-000, Brasil. Autor para correspondência: deferro@usp.br

³ Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-900. E-mail: maggioso@usp.br

RESUMO.- Os mecanismos biológicos desenvolvidos para aumentar a qualidade da regeneração óssea e da reparação tecidual de sítios periodontais específicos continuam a ser um desafio e têm sido complementado pela capacidade de adesão celular do colágeno do tipo I, promovida por um peptídeo sintético de adesão celular (P-15), associado a uma matriz inorgânica de osso (MIO) para formar MIO/P-15. O objetivo deste estudo foi avaliar

a perda do nível clínico de inserção e a resposta da bolsa periodontal em dentes após 3 e 6 meses da aplicação de enxerto com MIO/P-15. Vinte e um cães do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo foram anestesiados para realização de tratamento periodontal e 132 faces dentais com perda de nível clínico de inserção foram tratadas, sendo que 36,4% (48 faces) receberam o peptídeo de adesão celular e 63,6% (84 faces) compuseram o grupo controle que recebeu tratamento convencional (retalho muco-gengival e aplainamento radicular). O procedimento foi documentado através de radiografia intrabucal e todas as sondagens de bolsas periodontais foram fotografadas. Depois de 3 e de 6 meses, os animais foram re-anestesiados a fim de se obter novas avaliações, radiografias, fotografias e sondagens periodontais. As 48 faces com perda de nível clínico de inserção que receberam material de enxertia apresentaram taxa de 40% de recuperação do nível clínico de inserção após 6 meses. O grupo controle de faces dentais não apresentou alteração do nível clínico de inserção. A face palatina foi a que apresentou melhor taxa de regeneração (40%) e os dentes caninos e molares mostraram as melhores respostas (57,14% e 65%, respectivamente). Não houve sinais de infecção pós-cirúrgica relacionadas à falta de higienização oral dos animais. Pode-se concluir que o MIO/P-15 auxilia na regeneração e re-aderência das estruturas periodontais, incluindo osso alveolar. Sua aplicação mostrou-se fácil e prática e a incidência de complicações pós-cirúrgicas foi baixa. Ainda assim, mais estudos e pesquisas são necessários para que se avalie a quantidade e a qualidade do osso e do ligamento periodontal formados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Odontologia veterinária, enxerto animal, implante de osso animal, regeneração óssea, colágeno do tipo I, P-15, peptídeo de adesão celular, cão.

INTRODUÇÃO

A regeneração completa do tecido periodontal é a linha de frente das pesquisas atuais sobre terapia periodontal. O desenvolvimento de modelos biológicos para aumentar a regeneração óssea e a reparação tecidual de sítios periodontais específicos continua a ser um desafio que vem sendo complementado por um grupo de mecanismos, entre os quais se destaca a capacidade de adesão celular do colágeno do tipo I promovida por um peptídeo sintético de adesão celular (P-15), o qual é incorporado a um esqueleto de matriz inorgânica de osso (MIO). Esta combinação aumenta a migração, a adesão e a diferenciação celular (Bhongade & Tiwari 2007).

Um grupo de substâncias tem sido estudado com o objetivo de aumentar o crescimento ósseo em lesões periodontais avançadas. Há duas décadas, muitos pesquisadores têm estudado estes materiais que compreendem osso autógeno (Smith 1995), hidroxiapatita sintética e vidros bioativos (DeForge 1997), hidroxiapatita natural, osso desidratado descalcificados ou não-descalcificados (Yukna 1989), proteína morfogenética de bovino (Johnson

et. al. 1988) e peptídeo sintético de adesão celular associado à MIO (Yukna et al. 1998, Bhatnagar & Qian 1999, Krauser 2000, Barboza et al. 2002, Yukna 2002, Lallier & Palaiologou 2003).

Este último foi apresentado por Qian & Bhatnagar (1996), como *clone* de uma seqüência de aminoácidos do colágeno do tipo I. Trata-se de uma seqüência exclusiva similar aos resíduos 766-780 da cadeia α_1 (GTPGPQGIAGQRGVV) do colágeno do tipo I que está relacionada ao processo de adesão celular. Desta adesão nasce um sinal para a transformação de células não-diferenciadas (*Stem cells*) em fibroblastos e osteoblastos (Bhatnagar & Qian 1999, Barboza et al. 2002, Valentin & Weber 2004). Daí em diante, a proliferação celular é potencializada pelo aumento dos níveis de TGF- β_1 , BMP-2 and BMP-7, os fatores de crescimento relacionados à proliferação celular.

A matriz inorgânica de osso (MIO), uma substância porosa, xenoplástica e não-protéica, age como arcabouço para o P-15, a seqüência de aminoácidos que permanece aderida a toda a superfície da matriz óssea (Yukna 1989, Bhatnagar & Qian 1999). Isto significa que uma partícula de MIO/P-15 age como dezenas de fitas de colágeno do tipo I (Bhatnagar & Qian 1999).

Ao longo de sua recente aplicação, diversas pesquisas clínicas a respeito do peptídeo de adesão celular têm sido feitas. Em estudo com 25 pacientes humanos, Yukna (2002) acompanhou defeitos infra-ósseos durante 3 anos após a aplicação de uma combinação de matriz inorgânica derivada de hidroxiapatita bovina (MIO) e peptídeo de adesão celular (P-15). Após 6 meses, o nível de recuperação de adesão foi de 16,6% (variando desde 5,4mm até 4,5mm de perda de nível clínico de inserção) e após 3 anos, para 3,8mm (29,6%).

Em outro estudo comparativo (Kubler et al. 2004), a MIO/P-15 foi avaliada e apresentou a maior taxa de diferenciação e proliferação, seguida pela hidroxiapatita bovina de alta temperatura (Osteograf[®]), hidroxiapatita de corais (Algipore[®]), fosfato alfa-tricálcico (Bio-Base[®]) e, finalmente, a hidroxiapatita bovina de baixa temperatura (Bio-Oss[®]).

Há muitos artigos que focam a habilidade da MIO/P-15 de promover regeneração do ligamento periodontal (Sadeghi & Qian 1993, Moses 1997, Lallier 2001, Lallier 2003). Estes estudos *in vitro* têm apresentado o peptídeo de adesão celular como capaz de aumentar a taxa de adesão celular do ligamento periodontal ao osso bovino, sem provar, porém, sua habilidade proliferativa.

Um estudo clínico e radiográfico recente (Bhongade & Tiwari 2007) avaliou a aplicação da matriz inorgânica de osso (MIO) associada ao P-15 durante procedimentos para regeneração periodontal em humanos. As conclusões indicaram que o uso do P-15 combinado com a MIO promove melhores resultados clínicos que o uso exclusivo de raspagem a céu aberto [média de 3,4mm (70,5%) para dentes com enxerto contra 0,9mm (17,33%) para defeitos tratados somente com raspagem a céu aberto].

MATERIAL E MÉTODOS

Para a reunião de animais que compõem este estudo, não foi feita restrição de raça, peso ou sexo. Os critérios de seleção que determinaram a exclusão de animais basearam-se nas condições das lesões periodontais (dentes com mobilidade grau 3, fraturas dentais, malformações dentais), alterações hematológicas ou bioquímicas e a não aceitação das condições inerentes ao experimento pelo proprietário do animal.

Delineamento do estudo

Vinte e um cães, com idades de 5-12 anos (média de 9,05 anos) e com peso médio de 8,25 kg (3,0-27,2 kg) do Hospital Veterinário da FMVZ, USP, foram anestesiados para tratamento periodontal. Não foram selecionados animais com lesões endodônticas ou periodontais graves (como mobilidade dental grau 3, fratura dental, pulpite) ou com alterações sistêmicas (avaliadas através de exame pré-cirúrgico de hematologia e bioquímica sérica completos).

Um total de 91 dentes foi selecionado. Cento e trinta e duas faces com um mínimo perda do nível clínico de inserção foram tratadas. Em 36,4% (48 faces) foi realizada raspagem a céu aberto associada com aplicação de MIO/P-15 e 63,6% (84 faces) compuseram o grupo controle, tratado exclusivamente com raspagem a céu aberto (retalho de Widman (1918) modificado e aplainamento radicular).

Mensurações clínicas

Os procedimentos foram documentados através de radiografias e mensurações de nível clínico de inserção com sonda periodontal, as quais foram todas fotografadas. A profundidade das bolsas periodontais, níveis clínicos de inserção (NCI) e retrações gengivais foram detalhados através de sonda periodontal e foram registrados para comparação dos resultados. Todas as mensurações foram feitas em seis pontos diferentes de cada dente, mas somente o sítio com bolsa mais profunda foi usado.

Depois de 3 e de 6 meses, os animais foram re-anestesiados para obtenção de novas fotografias, novas radiografias e novos exames de sondagem periodontal. A totalidade dos procedimentos clínicos e cirúrgicos em cada paciente foi realizada pelo mesmo profissional Médico Veterinário.

Procedimento cirúrgico

Antes da realização do implante, foi realizado tratamento periodontal completo e os elementos dentais foram selecionados. As áreas escolhidas para a cirurgia periodontal foram avaliadas por meio de sonda periodontal, radiografia e fotografia. Foi feita uma abordagem cirúrgica convencional baseada na técnica de retalho muco-gengival de Widman modificado (Widman 1918). Um retalho mucoperiosteal foi, então, rebatido para exposição do osso.

O defeito ósseo foi debridado para remoção do tecido de granulação e detoxificação da superfície radicular e do osso alveolar, usando-se instrumento de ultra-som e curetas. A superfície radicular foi vigorosamente raspada até que se obtivesse consistência dura e superfície lisa para remoção da placa bacteriana, do cálculo e dos tecidos necrosados.

A MIO/P-15⁴ foi aplicada e levemente comprimida no defeito até a crista da parede adjacente do osso alveolar para preencher, mas não para transbordar sobre o defeito. Seguindo a orientação do fabricante, as partículas de MIO/P-15 foram misturadas com solução de cloreto de sódio a 0,9% em pote

Dappen estéril usando-se espátula também estéril (espátula de Luccas). As partículas não dissolvem, mas apenas solubilizam no líquido. O retalho muco-gengival foi então suturado em sua posição pré-reabsorção, usando-se pontos separados com fio absorvível de poliglactina 910⁵, 4-0.

No grupo controle de dentes (84 faces) foi realizado retalho muco-gengival, aplainamento radicular e sutura.

Cuidados pós-operatórios

Após a cirurgia, foi recomendada a todos os pacientes a administração de associação de espiramicina e metronidazol⁶, de 75.000 UI/kg e 12,5mg/kg, respectivamente, PO a cada 24 horas por 14 dias após a cirurgia. Os proprietários foram instruídos a aplicar colutório a base de gluconato de clorexidina⁷ a 0,12% em toda a boca do animal, quatro vezes ao dia durante 14 dias.

Escovação dental diária também foi recomendada para ser iniciada 15 dias após o tratamento. Os proprietários foram instruídos a respeito de técnicas de condicionamento para facilitar o procedimento de escovação.

Análise de dados

A análise estatística foi realizada com base nos dados obtidos a partir dos dentes (incisivos, caninos, pré-molares e molares), das faces dentais (vestibular, lingual ou palatina, distal e mesial) e entre ambos os grupos (MIO/P-15 e o grupo controle), correlacionando valores absolutos de nível clínico de inserção (em mm, antes e depois de 3 e 6 meses) e valores relativos de recuperação do nível clínico de inserção (em %).

Os testes de normalidade foram realizados através do teste de Anderson-Darling. Testes de correlação e de significância foram feitos usando-se teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para valores de probabilidade (p) maiores que 0,05, a diferença estudada foi considerada não-significante; valores menores que 0,05 foram considerados significantes.

RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo estão descrito a seguir, acompanhados de suas respectivas análises estatísticas. O Quadro 1 apresenta o grupo de cães estudado.

Os Quadros 2 e 3 apresentam as médias dos valores de NCI obtidos através da mensuração das faces dentais nos três momentos do estudo (cirurgia, 3 meses e 6 meses após a cirurgia). Para cada tipo de dente foi calculado o percentual de recuperação do NCI, baseado nas medianas do conjunto de faces mensuradas após seis meses. Este valor foi subtraído do valor obtido no dia da cirurgia a fim de se considerar os resultados ao final do estudo. Os percentuais negativos referem-se aos casos em que, ao invés de recuperação, houve perda do NCI, caracterizada pelo aumento da bolsa periodontal ou da retração gengival. O valor zero mostra os casos em que, em média, não houve alteração do NCI entre o dia da cirurgia e 6 meses depois.

⁴ PepGen P-15[®], Dentsply Friadent Ceramed, Lakewood, CO, USA.

⁵ Vicryl[®], Johnson & Johnson GatewaySM, Irvine, CA., USA.

⁶ Stomorgyl[®], Meril, Paulínia, São Paulo, Brasil.

⁷ Periogard[®], Colgate-Palmolive, SBC, Brasil.

Quadro 1. Vinte e um cães separados por raça, sexo, idade e peso (kg) submetidos a tratamento periodontal e selecionados para o estudo com ao menos um dente com 4mm de perda de nível clínico de inserção ou mais

Raça	Sexo	Idade	Peso
Bassetthund	Fêmea	6	27,2
Bichon Frisé	Macho	7	4,4
Cocker Spaniel	Macho	11	13,1
Cocker Spaniel	Fêmea	12	12,0
Cocker Spaniel	Fêmea	8	13,5
Cocker Spaniel	Macho	6	12,0
Daschund	Fêmea	6	9,0
Dobermann Pinscher	Macho	9	5,5
Poodle	Macho	14	4,5
Poodle	Fêmea	10	5,0
Poodle	Macho	9	8,7
Poodle	Macho	13	5,4
Poodle	Macho	10	5,2
Poodle	Fêmea	10	6,4
Poodle	Fêmea	9	4,5
Poodle Toy	Macho	10	3,5
Poodle Toy	Fêmea	10	3,5
Schnauzer	Fêmea	5	6,2
Whippet	Fêmea	11	17,5
Yorkshire	Fêmea	9	3,0
Yorkshire	Fêmea	5	3,2
Média		9,05	8,25
Mediana		9,00 ^a	5,50 ^b
Desvio padrão		2,52	5,95

^a Teste de normalidade Anderson-Darling $p=0,277$.

^b Teste de normalidade Anderson-Darling $p=0,001$.

Quadro 2. Distribuição dos valores (mm) das médias e desvios-padrões correspondentes aos níveis clínicos de inserção (NCI) das faces dentais do grupo que recebeu MIO/P-15, mensurados nos três momentos (aplicação do peptídeo e pós-operatório de 3 e de 6 meses) e porcentagem de recuperação do NCI, agrupados de acordo com os tipos de elementos dentais a que cada face pertence

Grupo de dentes tratados com MIO/P-15	Mensuração dos momentos (aplicação e pós-operatório)			Recuperação (%) ^a
	Momento do implante	3 meses depois	6 meses depois	
Caninos(N=15) ^b	5,90±2,04	3,43±1,72	3,53±2,36	+ 57,14 ^c
Incisivos(N=20)	5,07±2,34	4,73±2,08	4,93±2,60	+ 23,81 ^d
Molares(N=6)	6,03±3,40	3,37±2,03	2,96±1,88	+ 65,00 ^e

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney: ^a Valores calculados com base nas medianas dos grupos, ^b Valores de "N" correspondentes ao número de faces examinadas, ^c $p=0,0094$, ^d $p=0,2516$, ^e $p=0,0143$.

Os números obtidos a partir das comparações entre os valores de cada momento serviram de base para o cálculo do nível de correlação entre eles para o intervalo de confiança de 95% (aceitando-se nível de significância de $p<0,05$). O valor de p para a correlação entre 3 meses e a cirurgia ficou em 0,0001, enquanto para os valores de 6 meses e da cirurgia ficaram em 0,0029 (Quadro 6). Os dados obtidos foram também agrupados segundo as faces de dentes tratadas, respeitando-se os dois grupos experimentais, MIO/P-15 e controle (Quadros 4 e 5). As Figuras 4 e 5 representam os histogramas dos dois

Quadro 3. Distribuição dos valores (mm) das médias e desvios-padrões correspondentes aos níveis clínicos de inserção (NCI) das faces dentais do grupo controle, mensurados nos três momentos (cirurgia e pós-operatório de 3 e de 6 meses) e porcentagem de recuperação do NCI, agrupados de acordo com os tipos de elementos dentais a que cada face pertence

Grupo controle de dentes	Mensuração dos momentos (cirurgia e pós-operatório)			Recuperação (%) ^a
	Momento da cirurgia	3 meses depois	6 meses depois	
Caninos(N=12) ^b	4,17±2,44	4,42±2,78	4,83±2,72	0 ^c
Incisivos(N=28)	4,46±2,37	4,25±2,14	3,88±2,18	0 ^d
Pré-molares(N=2)	4,56±2,56	4,54±1,51	4,67±3,05	-83,33 ^e
Molares(N=8)	7,01±3,25	7,25±3,04	8,21±2,70	-26,79 ^f

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney: ^a Valores calculados com base nas medianas dos grupos, ^b Valores de "N" correspondentes ao número de faces examinadas, ^c $p=0,5254$, ^d $p=0,2348$, ^e $p=1,0000$, ^f $p=0,4948$.

Quadro 4. Distribuição dos valores (em mm) das médias e desvios-padrões correspondentes aos níveis clínicos de inserção (NCI) do grupo controle, mensurados nos três momentos (cirurgia e pós-operatório de 3 e de 6 meses) e porcentagem de recuperação do NCI, agrupados de acordo com as faces dentais estudadas

Faces dentais	Mensuração dos momentos (cirurgia e pós-operatório)			Recuperação (%) ^a
	Momento da cirurgia	3 meses depois	6 meses depois	
Vestibular(N=19) ^b	5,13±2,57	4,89±2,62	5,16±2,71	+9,09 ^c
Palatina(N=26)	5,71±2,61	4,73±2,44	5,19±3,14	0 ^d
Mesial(N=22)	5,41±2,52	5,00±2,53	5,55±2,56	0 ^e
Distal(N=17)	5,38±2,60	4,88±2,85	5,32±2,90	0 ^f

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney: ^b Valores de "N" correspondentes ao número de faces examinadas, ^a Valores calculados com base nas medianas dos grupos, ^c $p=1,0000$, ^d $p=0,5238$, ^e $p=0,7841$, ^f $p=0,9585$.

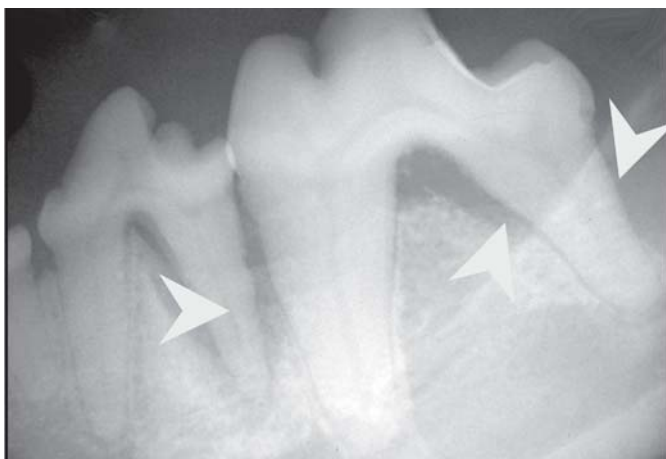


Fig.1. Imagem radiográfica obtida no dia da aplicação do MIO/P-15 em dente primeiro molar inferior esquerdo de cão. Observam-se imagens radiolúscidas (setas) nas regiões correspondentes às lesões reabsorptivas.



Fig.2. Imagem radiográfica obtida 6 meses após aplicação do MIO/P-15 em dente molar inferior esquerdo (mesmo dente da Fig.1). Observa-se imagem de radiopacidade óssea (setas) nas regiões correspondentes às lesões observadas no dia da aplicação (Fig.1).

Quadro 5. Distribuição dos valores (mm) das médias e desvios-padrões correspondentes aos níveis clínicos de inserção (NCI) do grupo tratado com MIO/P-15, mensurados nos três momentos (aplicação do peptídeo e pós-operatório de 3 e de 6 meses) e porcentagem de recuperação do NCI, agrupados de acordo com as faces dentais estudadas

Faces dentais tratadas com MIO/P-15	Mensuração dos momentos (aplicação e pós-operatório)			Recuperação (%) ^a
	Momento do implante	3 meses depois	6 meses depois	
Vestibular(N=13) ^b	5,69±3,12	4,15±1,95	4,96±2,42	+16,67 ^c
Palatina(N=15)	5,80±2,18	2,90±1,42	3,17±1,55	+40,00 ^d
Mesial(N=12)	6,33±2,19	4,29±2,56	4,38±2,95	+24,97 ^e
Distal(N=8)	4,44±2,13	2,94±0,94	2,25±0,89	+45,00 ^f

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney: ^a Valores calculados com base nas medianas dos grupos, ^b Valores de "N" correspondentes ao número de faces examinadas, ^c p=0,7556, ^d p=0,0023, ^e p=0,0578, ^f p=0,0759.

grupos, baseados nos percentuais obtidos entre os valores aos 6 meses e no dia da cirurgia.

DISCUSSÃO

Como condição para realização do procedimento do implante de peptídeo, todos os animais foram submetidos a

Quadro 6. Distribuição dos valores (mm) das médias e desvios-padrões correspondentes aos níveis clínicos de inserção (NCI) das faces dentais mensurados nos três momentos (cirurgia e pós-operatório de 3 e de 6 meses) e porcentagem de recuperação do NCI, agrupados nos dois conjuntos experimentais (o que recebeu MIO/P-15 e o que não o recebeu)

Faces dentais tratadas com MIO/P-15	Mensuração dos momentos (aplicação e pós-operatório)			Recuperação (%) ^a	
	Momento da cirurgia ^a	3 meses depois ^b	6 meses depois ^c	Momento da cirurgia até 3 meses depois ^d	Momento da cirurgia até 6 meses depois ^e
MIO/P-15(N=41)	5,87±2,56	3,62±2,03	3,84±2,43	+40,00	+40,00
Controle(N=50)	5,00±2,70	5,00±2,61	5,00±3,00	0	0

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney: ^a p=0,1030, ^b p=0,0309, ^c p=0,0698, ^d p=0,0001, ^e p=0,0029.



Fig.3. Exame clínico realizado 6 meses após implante de PepGen P-15® mostrando sulco gengival de 3mm de profundidade em dente que apresentava 8mm de bolsa periodontal no dia do implante (5mm de recuperação do NCI); mesmo dente das Figuras 1 e 2. Cão da raça Cocker Spaniel.

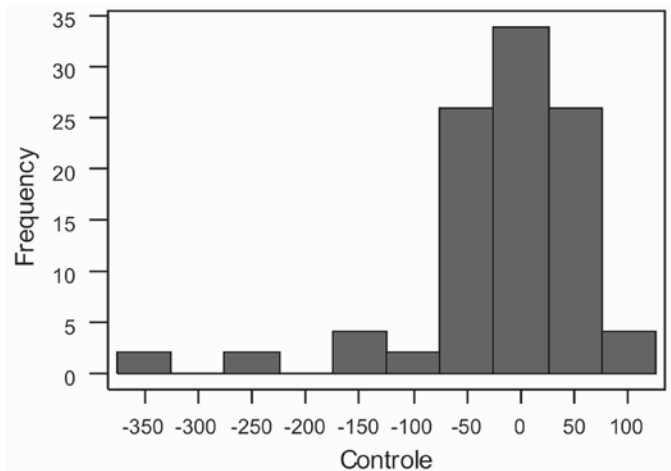


Fig.4. Histograma mostrando a frequência (em %) com que as porcentagens de recuperação do NCI ocorreram no grupo completo de faces que recebeu tratamento convencional.

tratamento periodontal convencional. Esta adequação do meio bucal foi importante também para que se obtivessem condições de avaliação e de escolha dos dentes que receberiam o implante ou não, ainda que se recomende, ao

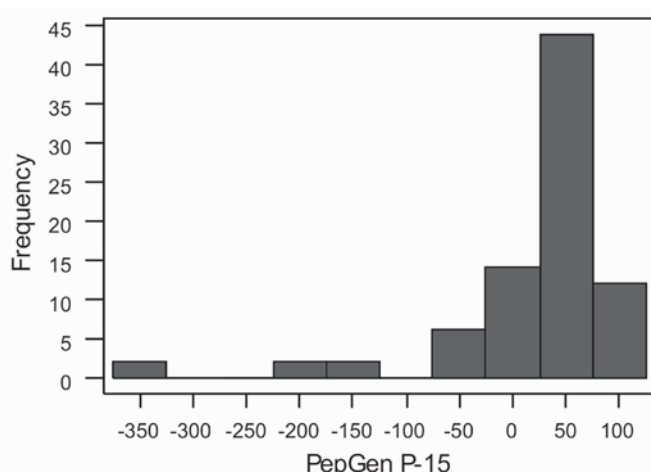


Fig.5. Histograma mostrando a frequência (em %) com que as porcentagens de recuperação do NCI ocorreram no grupo completo de faces que recebeu tratamento com o PepGen P-15®.

menos na odontologia humana, sua realização dias antes da cirurgia periodontal. Em se tratando de cirurgia periodontal, talvez esta adequação do meio bucal devesse ter sido realizada sete a dez dias antes do procedimento de implante, o que reduziria a quantidade de bactérias do local, além de contribuir para o controle da gengivite antes da cirurgia. Porém, a necessidade de anestesia geral do paciente veterinário torna este um procedimento difícil de ser conseguido junto aos proprietários de animais.

Todos os procedimentos cirúrgicos, em todas as suas etapas, foram realizados pelo mesmo médico veterinário responsável pelo estudo, o que garantiu a eliminação de uma importante variável experimental.

Por ser uma associação de dois materiais diferentes, a classificação do MIO/P-15 deve ser discutida. Conforme classificação de Martinez & Walker (1999), deve-se considerar o MIO/P-15 como um material de implante e não de enxertia, já que nenhum de seus componentes é material vivo. Não obstante, pode-se dizer que se trata de um composto xenógeno/aloplástico, pois agrega a matriz inorgânica de bovino ao peptídeo sintético de agregação celular.

Deve-se considerar um fator determinante nesta modalidade de estudo, ao envolver animais oriundos de atendimento ao público, ou seja, a intervenção de seus proprietários, responsáveis diretos não somente pela manutenção dos animais, mas também pelo seu traslado até o hospital para as reavaliações necessárias. A principal influência deste aspecto no presente trabalho foi a falta de higienização oral dos animais. Mesmo com as recomendações pós-operatórias, apenas um proprietário relatou escovação diária dos dentes tratados. Esta é uma variável importante no que concerne ao controle da placa bacteriana nos sítios de implante.

Credita-se também a esta falha de anti-sepsia uma parcela pelo insucesso de alguns dos casos aqui demonstrados. A manutenção do agente agressor (bactérias da placa) no sítio ou próximo a ele pode levar à liberação de

mediadores da inflamação e à estimulação de osteoclastos (Page & Schröder 1976) que, em última instância, antagonizam o efeito esperado de reparação. Os seis meses decorridos entre as avaliações é um tempo considerado suficiente para que microorganismos anaeróbios como os *Bacteroides* e *Fusobacterium* (Hennet & Harvey 1991) se desenvolvam, aumentando o potencial de reabsorção dos tecidos adjacentes.

Em relação aos dentes, observou-se significativa diferença entre os resultados dos dois grupos. Enquanto o grupo de dentes que recebeu MIO/P-15 mostrou porcentagens variando de 23,81% (incisivos) de recuperação a 65% (molares), o grupo de dentes que recebeu tratamento convencional apresentou desde 0% (caninos e incisivos) até aumentos de 83,33% na profundidade das lesões.

Os valores encontrados em molares tratados com MIO/P-15 sofreram influência decisiva do grupo de dentes que, em sua maioria, é composto pelos primeiros molares inferiores. Em cães, este último é um dente que, em geral, está apinhado ao quarto pré-molar, o que acelera o processo de lesão óssea devido à dificuldade de higienização. Ao mesmo tempo, as lesões aí produzidas são, muitas vezes, infra-ósseas e de três paredes, o que favorece as técnicas de reparação por enxertia ou implante. Este resultado condiz com os estudos de Chang-Sung Kim et al. (2004).

Nos cães avaliados, observou-se 23,81% ($p=0,2516$) de recuperação do epitélio juncional em incisivos tratados com MIO/P-15, mostrando que não houve diferença significativa entre o momento de seis meses e o momento da aplicação do peptídeo. O grupo que recebeu tratamento convencional não mostrou taxa de reparação (0% para $p = 0,2348$). Isso pode ser explicado devido ao estágio de lesão em que estes dentes se apresentavam no momento da cirurgia periodontal. Principalmente em animais de porte reduzido, o volume de osso perdido foi, em geral, acentuado. Estes dentes apresentavam mobilidade grau 2 e a estabilização das partículas de implante tornou-se comprometida. Além disso, a raspagem e aplainamento destas raízes, por muitas vezes, mostrou-se difícil pelos mesmos motivos.

Como observado na revisão de literatura, um tipo de lesão freqüente em cães com doença periodontal grave é a formação de bolsa periodontal em face palatina (ou lingual). Neste estudo observou-se que, dos dez dentes caninos tratados com MIO/P-15, oito apresentavam lesão nesta face (80%); dos 18 dentes caninos que receberam tratamento convencional, 15 apresentavam a lesão (83,33%). Perdas de inserção que podem chegar a até 12 mm dificultam sobremaneira o tratamento aplicado às raízes devido ao difícil acesso às regiões contaminadas em direção apical. A despeito dos problemas relacionados ao tratamento convencional, fica claro que esta é também uma lesão favorável à aplicação de materiais de enxertia ou implante já que o defeito, na maioria das vezes, é composto por três paredes.

O grupo de dentes caninos que recebeu raspagem e

aplainamento radicular sem MIO/P-15 não apresentou taxa de reparação significativa em relação às lesões inicialmente encontradas (0% com $p=0,5254$). Em comparação com estes valores, os dentes que receberam o peptídeo apresentaram taxa de 57,15% de recuperação, com $p=0,0094$. O quadro 5 mostra que, ao se avaliar cada face individualmente, esta foi a que apresentou as maiores taxas de recuperação de inserção do epitélio (40% com $p=0,0023$).

As duas faces que melhor responderam à aplicação do MIO/P-15 foram a palatina (citada acima) e a mesial (24,97% de reparação com $p=0,0578$). As mesmas faces do grupo controle não mostraram taxa de reparação (0% cada uma com $p=0,5238$ e $p=0,7841$, respectivamente). Quando tratada com MIO/P-15, a face vestibular apresentou 16,67% ($p = 0,7556$) de reparação frente ao grupo controle que apresentou 9,09% ($p=1,0$). Supõe-se que, nesta face, haja uma camada de osso alveolar bastante delgada e as lesões aí produzidas geram pouca área de contato ósseo com o peptídeo. Além disso, o impacto dos alimentos nesta região é constante, o que torna ainda mais difícil manter os grânulos de implante no sítio da lesão.

Em uma análise ampla, compararam-se os dois grupos de dentes (tratados com peptídeo e grupo controle), confrontando os valores obtidos no dia da cirurgia com aqueles encontrados três meses e seis meses depois. O quadro seis mostra que em ambos os casos o grupo tratado com MIO/P-15 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo que recebeu tratamento convencional, reduzindo a profundidade das bolsas periodontais e a perda do nível clínico de inserção. Ao se comparar as taxas de reparação dos dois grupos nos diferentes momentos obteve-se $p=0,0001$ (cirurgia e três meses de pós-operatório) e $p=0,0029$ (cirurgia *versus* 6 meses). Estes são dados superiores aos encontrados por Yukna (1989) que estudou o uso de hidroxiapatita em lesões periodontais. Em comparação com estudo em 25 pacientes humanos (Yukna et al. 2002) tratados com MIO/P-15 os resultados aqui apresentados foram também superiores em termos de porcentagem de recuperação do nível clínico de inserção.

Os resultados obtidos nestes animais são positivos no que se refere à redução de bolsas periodontais profundas. O exame de exploração com sonda periodontal três meses após a cirurgia revelou a existência de um epitélio aderido firmemente ao elemento dental com características de higidez dos tecidos adjacentes.

Em alguns dentes com bolsas periodontais de 10mm de profundidade obteve-se redução para 2 mm. A imagem radiográfica destes sítios mostrou, principalmente aos três meses de pós-operatório, que os grânulos de MIO/P-15 mantiveram-se acondicionados. Esse é um aspecto satisfatório já que havia o risco de que os grânulos se perdessem durante a mastigação do animal ou simplesmente fossem reabsorvidos. Não obstante, baseado em estudos que mostraram o MIO/P-15 como acelerador do processo de adesão de células de reparação por encurtar o tempo

que estas células levam para migrar até o sítio (Qian & Bhatnagar 1996, Yukna et al. 1998, Bhatnagar et al. 1999, Lallier et al. 2001, Scarano et al. 2003), acredita-se que haja um incremento na formação de tecido ricamente emaranhado, composto, principalmente, por fibroblastos, que auxilia na manutenção do material agregado.

Os estudos relativos ao crescimento ósseo nos locais em que foi aplicado o peptídeo, porém, merecem continuidade. Trabalhos como os de Thorwarth et al. (2005a,b) oferecem subsídios para que se possa extrapolar os resultados clínicos aqui observados e se possa compreender as imagens radiográficas positivas logo aos três meses de pós-operatório.

Há a necessidade de se avaliar, histologicamente, a quantidade e a qualidade do osso formado, bem como das estruturas que compõem o periodonto, tal como foi realizado em outros estudos (Yukna et al. 1998, 2002, Krauser et al. 2000, Sigurdsson et al. 2001, Barboza et al. 2002, Lallier et al. 2003, Scarano et al. 2003, Valentin & Weber 2004), para que se possa comparar com resultados como os avaliados por Caton & Zander (1976), Listgarten & Rosemberg (1979), Millis (1999) e Kubler et al. (2004).

Observa-se que as lesões infra-ósseas, ainda que extensas, são favoráveis à aplicação de material granuloso que exige retenção mecânica. Nestas lesões, o osso alveolar reabsorvido forma uma câmara com três paredes mais a face da raiz correspondente. Nesta concavidade, os grânulos de MIO/P-15 são acondicionados de maneira satisfatória e a sua sustentação, desta forma, não se torna exclusivamente dependente do tecido gengival.

Não foram encontrados trabalhos de estudos clínicos e de acompanhamento com o uso do MIO/P-15 em animais. Mesmo a odontologia humana, com muitos estudos sobre o produto, apresenta algumas pesquisas com cães e lesões experimentalmente produzidas. Nenhum estudo, porém, mostra a resposta clínica dos animais meses após a sua aplicação.

REFERÊNCIAS

- Barboza E.P., Souza R.O. & Caula D. 2002. 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.* 73(10):1153-1159.
- Bhatnagar R.S. & Qian J.J. 1999. Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Engineering* 5(1):53-65.
- Bhongade M.L. & Tiwari I.R. 2007. A Comparative evaluation of the effectiveness of an anorganic bone matrix/cell binding peptide with an open flap debridement in human infrabony defects: A clinical and radiographic study. *J. Contemp. Dent. Pract.* 8(6):25-34.
- Caton J.G. & Zander H.A. 1976. Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. *J. Clin. Periodontol.* 3:54-58.
- Chang-Sung Kim, Seong-Ho Choi, Jung-Kiu Chai, Kyoo-Sung Cho, Ik-Sang Moon, Wikesjö U.M.E & Chong-Kwan Kim. 2004. Periodontal repair in surgically created intrabony defects in dogs: influence of the number of bone walls on healing response. *J. Periodontol.* 75:229-235.

- DeForge D.H. 1997. Evaluation of Bioglass/Perioglass (Consil) synthetic bone graft particulate in the dog and cat. *J. Vet. Dentistry* 14(4):141-145.
- Hennet P.R. & Harvey C.E. 1992. Natural development of periodontal disease in the dog: A review of clinical, anatomical and histological features. *J. Vet. Dentistry* 9(3):13-19.
- Johnson E.E., Urist M.R. & Finerman G.A.M. 1988. Bone morphogenetic protein augmentation grafting on resistant femoral nonunions. *Clin. Orthopaed. Related Res.* 2(230):257-265.
- Krauser J.T., Rohrer M.D. & Wallace S.S. 2000. Human histologic and histomorphometric analysis comparing OsteoGraf/N with PepGen P-15 in the maxillary sinus elevation procedure: A case report. *Implantol. Dentistry* 9(4):298-302.
- Kubler A., Neugebauer J., Oh J.H., Scheer M. & Zöller J.E. 2004. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: An in vitro study. *Implant Dentistry* 13(2):171-179.
- Lallier T.E., Yukna R., Marie S.T. & Moses R. 2001. The putative collagen binding peptide hastens periodontal ligament cell attachment to bone replacement graft materials. *J. Periodontol.* 72(8):990-997.
- Lallier T.E., Palaiologou A.A., Yukna R.A. & Layman D.L. 2003. The putative collagen-binding peptide P-15 promotes fibroblast attachment to root shavings but not hydroxyapatite. *J. Periodontol.* 74(4):458-467.
- Listgarten M.A. & Rosemberg M.M. 1979. Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J. Periodontol.* 50:333-344.
- Millis D.L. 1999. Bone and non-bone-derived growth factors and effects on bone healing. *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.* 29(5):1221-1247.
- Martinez S.A. & Walker T. 1999. Bone graft. *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.* 29(5):1207-1219.
- Moses R.L., Talley D.T., *et al.* 1997. Synthetic cell-binding peptide (P-15) effect on human PDL fibroblast attachment. *J. Dental Res.* 76:354. (IADR Abstracts)
- Page R.C. & Schroeder H.E. 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current works. *Lab. Invest.* 34(3): 235-249.
- Ramfjord S.P. & Nissle R.R. 1974. The modified Widman flap. *J. Periodontol.* 45(8):601-607.
- Qian J.J. & Bhatnagar R.S. 1996. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of synthetic peptide related to collagen. *J. Biomed. Materials Res* 31:545-554.
- Sadeghi M., Qian J.J., Richards D.W. & Bhatnagar R.S. 1993. A synthetic peptide promotes attachment of periodontal ligament fibroblast to anorganic bone mineral. *J. Dental Res.* 72:391. (IADR Abstracts).
- Scarano A., Iezzi G., Petrone G., Orsini G., Degidi M., Strocchi R. & Piattelli A. 2003. Cortical bone regeneration with a synthetic cell-binding peptide: A histologic and histomorphometric pilot study. *Implant Dentistry* 12(4):318-324.
- Sigurdsson T.J., Nguyen S. & Wikesjö U.M.E. 2001. Alveolar ridge augmentation with rhBMP-2 and bone-to-implant contact in induced bone. *Int. J. Periodont. Restorative Dentistry* 21:461-473.
- Smith M.M. 1995. Treatment of a mandibular periodontal interproximal defect with a bone graft in a dog. *J. Vet. Dentistry* 12(2):59-62.
- Thorwarth M., Schultze-Mosagau S., Werhan F., Kessler P., Srour S., Wiltfang J. & Schlegel K.A. 2005a. Bioactivation of an anorganic bone matrix by P-15 peptide for the promotion of early bone formation. *Biomaterials* 26(28):5648-5657.
- Thorwarth M., Schultze-Mosagau S., Werhan F., Srour S., Wiltfang J., Neukam F.W. & Schlegel K.A. 2005b. Enhanced bone regeneration with a synthetic cell-binding peptide - in vivo results. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329(2):789-795.
- Valentin A.H. & Weber J. 2004. Receptor technology, cell binding to P-15: A new method of regenerating bone quickly and safely-preliminary histomorphometrical and mechanical results in sinus floor augmentations. *Keio J. Med.* 53(3):166-171.
- Widman L. 1918. The operative treatment of pyorrhea alveolaris: A new surgical method. *Sv. Tandl. Tidsk. apud Ramfjord S.P. & Nissle R.R.* 1974. The modified Widman flap. *J. Periodontol.* 45(8):601-607. (Cit. Ramfjord & Nissle 1974)
- Yukna R.A. 1989. Osseous defect responses to hydroxyapatite grafting versus open flap debridement. *J. Clin. Periodontol.* 16:398-402.
- Yukna R.A. & Callan D.P., Krauser J.T., Evans G.H., Aichelman-Reidy M.E., Moore K., Cruz R. & Scott J.B. 1998. 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.* 69:655-663.
- Yukna R., Salinas T.J. & Carr R.F. 2002. Periodontal regeneration following use of ABM/P-15: A case report. *Int. J. Periodont. Restorative Dentistry* 22(2):146-55.
- Yukna R.A., Krauser J.T., Callan D.P., Evans, G.H., Cruz R. & Martin M. 2002. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/Cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. *J. Periodontol.* 76(1):123-128.