

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE-FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

Andréa Junqueira Côrtes

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ DERIVADA DO ESMALTE
(EMDOGAIN®) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS CIRÚRGICAS EM RATOS *WISTAR***

Juiz de Fora

2014

ANDRÉA JUNQUEIRA CÔRTEZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ DERIVADA DO ESMALTE
(EMDOGAIN®) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS CIRÚRGICAS EM RATOS *WISTAR***

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação, mestrado em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Junqueira Côrtes, Andréa.
Avaliação do efeito da matriz derivada do esmalte (Emdogain®) sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas cirúrgicas em ratos wistar / Andréa Junqueira Côrtes. -
- 2014.
114 f. : il.

Orientadora: Beatriz Julião Vieira Aarestrup
Coorientador: Fernando Monteiro Aarestrup
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, 2014.

1. Cicatrização. 2. Óxido nítrico. 3. Colágeno. 4. Fator de Necrose Tumoral alfa. 5. Fator de Crescimento Transformador beta. I. Julião Vieira Aarestrup, Beatriz , orient. II. Monteiro Aarestrup, Fernando , coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ - REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

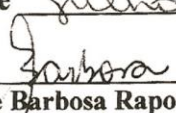
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

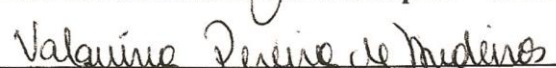
ATA Nº. 03/2014

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

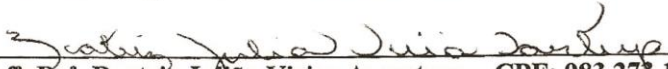
Aos 14 dias do mês de Julho do ano de 2014, às 12 horas, no Anfiteatro da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, reuniu-se a Banca Examinadora composta pela Professora Orientadora Dr^a. Beatriz Julião Vieira Aarestrup, pela Prof^a. Dr^a. Valquíria Pereira de Medeiros, pela Prof^a. Dr^a. Nádia Rezende Barbosa Raposo e pelo Prof. Dr. Rodrigo Guerra de Oliveira para a Defesa Pública de Dissertação de Mestrado, (requisito parcial) intitulada: "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ DERIVADA DO ESMALTE (EMDOGAIN[®]) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS CIRÚRGICAS EM RATOS WISTAR", da Candidata ANDRÉA JUNQUEIRA CÔRTEZ, linha de pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial dos materiais, instrumentos e técnicas odontológicas – área de concentração Clínica Odontológica. A presidente da Banca e orientadora, Prof^a. Dr^a. Beatriz Julião Vieira Aarestrup abriu a sessão dando a todos o conhecimento das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir, a candidata passou para defesa de sua dissertação, apresentando uma exposição de 40 minutos. Após a apresentação, a Banca arguiu a candidata sobre o seu trabalho, tendo a mesma respondido às questões apresentadas. Em seguida, a Banca se reuniu para julgamento da defesa, chegando ao seguinte resultado: a mestranda foi APROVADA. Para validar a defesa e fazer jus ao título de Mestre em Clínica Odontológica, a Mestranda deverá entregar na Secretaria do Programa, no prazo máximo de 60 dias corridos, a Dissertação corrigida e encadernada nos moldes da UFJF, e o artigo referente à Dissertação enviado para Publicação em qualis indicado pelo orientador. Também não poderá ter pendências de qualquer natureza junto à Secretaria do Programa. Esta Ata terá validade de 60 dias para ser apresentada como documento de Defesa, quando então, será substituída pelo documento de entrega dos exemplares e do artigo, com validade até a obtenção do Diploma. O não cumprimento dos requisitos supra citados, impedirá ao aluno de obter a titulação. Nada mais havendo a tratar, foi encerrada a sessão de defesa e lavrou-se a presente ata, que será assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Candidata, que afirmam ter ciência e o pleno acordo.

Juiz de Fora, 14 de julho de 2014.

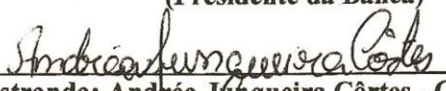

Prof^a. Dr^a. Nádia Rezende Barbosa Raposo – CPF: 829.919.606-04


Prof^a. Dr^a. Valquíria Pereira de Medeiros – CPF: 829.151.054-72


Prof. Dr. Rodrigo Guerra de Oliveira – CPF: 030.334.196-31


Prof^a. Dr^a. Beatriz Julião Vieira Aarestrup – CPF: 983.273.136-49

(Presidente da Banca)


Mestranda: Andréa Junqueira Côrtes - CPF: 071.114.986-07

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup e ao meu coorientador Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup, responsáveis pela realização deste trabalho e por me mostrarem o caminho da ciência.

Agradeço à equipe Implante Perio pela oportunidade oferecida e por viabilizar o trabalho, em especial ao Prof. Dr. Robert Carvalho da Silva.

À Profa. Dra. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves, diretora da Faculdade de Odontologia da UFJF e ao coordenador do mestrado Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo pelo trabalho e atenção dedicados a este processo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Guerra que foi um grande incentivador durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

À minha família, Auro, Vera e Guto, por me apoiarem nas horas difíceis e de cansaço, e me manterem serena para cada novo passo. Em especial ao meu pai, Auro, por me orientar de todas as formas possíveis neste processo.

A você João, obrigada pelo amparo e grande incentivo na trajetória e conclusão desta etapa, e principalmente pelo amor e carinho.

Agradeço aos meus tios Murilo e Beth pela participação, apoio e torcida, sempre com muito carinho e preocupação.

Aos colegas de trabalho por serem amigos e por toda a colaboração.

Agradeço aos colegas do Núcleo de Pesquisa que sempre me auxiliaram no enriquecimento do trabalho.

RESUMO

A matriz derivada do esmalte (EMD) é um complexo proteico de origem ectodérmica, isolado de germes dentários em desenvolvimento. Originalmente utilizada na regeneração de tecidos do periodonto, vem se mostrando um excelente recurso na regeneração de outros tecidos mesenquimais como derme, tecido ósseo e tendão. No presente estudo, o potencial cicatrizante da matriz foi analisado histopatologicamente em feridas cutâneas cirúrgicas realizadas em ratos *Wistar*, eutanaziados nos dias 01, 03, 07, 14 e 21. Durante o experimento, as feridas foram acompanhadas macroscopicamente e, a seu término, foram removidas e submetidas ao processamento histológico. À avaliação microscópica, foi observado que as lesões tratadas com a EMD evoluíram para o remodelamento dérmico de modo mais eficaz em tempo e qualidade em relação ao grupo controle não tratado, a partir do 3º dia pós-operatório; o amadurecimento e organização do colágeno foi bastante evidente a partir do 7º dia e, destaca-se que nos dias 14 e 21 o plano muscular, na profundidade da pele, exibiu excelente regeneração, sendo que, também neste período, o amadurecimento vascular se mostrou mais significativa nas amostras tratadas. Além da análise histomorfométrica, foi realizada a avaliação da expressão de iNOS, TGF- β 2 e TNF- α por imunistoquímica. A expressão de iNOS foi significativamente mais expressiva nas amostras tratadas, aumentando progressivamente a partir do 7º dia pós-operatório. Os resultados sugerem que a EMD, aplicada em feridas cutâneas cirúrgicas, potencializa a neoformação e o remodelamento de colágeno, amadurecimento vascular e regeneração muscular possivelmente via modulação do óxido nítrico.

Palavras-chave: Cicatrização. Óxido nítrico. Colágeno. Fator de Necrose Tumoral alfa. Fator de Crescimento Transformador beta.

ABSTRACT

The enamel matrix derivative (EMD) is a protein complex of ectodermal origin, isolated from the developing tooth germs. Originally used in the regeneration of periodontal tissues, has proved to be an excellent resource in the regeneration of other mesenchymal tissues such as dermis, bone and tendon. In the present study, the healing potential of the matrix was analyzed histologically in surgical wounds made in *Wistar* rats, euthanized on days 01, 03, 07, 14 and 21. During the experiment, the wounds were followed macroscopically, and at its end, were removed and subjected to histological processing. For microscopic evaluation, it was observed that the lesions treated with EMD progressed to dermal remodeling more effectively in time and quality in relation to the untreated control group, from the 3th postoperative day ; the maturation and organization of the collagen was quite evident from the 7th day , and it is noteworthy that on 14 and 21 muscle -up, the skin depth, showed excellent regeneration, and also in this period, vascular maturation showed more significantly in the treated samples. In histomorphometric analysis, evaluation of iNOS, TGF- β 2, and TNF- α expression was performed by immunohistochemistry. The expression of iNOS was significantly more expressive in the treated samples, increasing progressively from the 7th postoperative day. The results suggest that EMD applied on surgical wounds enhances the new formation and remodeling of collagen, vascular maturation and muscle regeneration possibly via modulation of nitric oxide.

Keywords: Healing. Nitric oxide. Collagen. Tumor Necrosis Factor-alpha. Transforming Growth Factor beta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Imagem representativa das incisões paralelas no dorso do animal. 34
- Figura 2.** Áreas selecionadas para captura e realização de histomorfometria. 38
- Figura 3.** Marcação automática da área de fibras de colágeno, coloração HE, no programa ZEN Lite 2012® 40
- Figura 4.** Aspecto macroscópico da cicatrização das feridas cutâneas cirúrgicas..... 44
- Figura 5.** Corte histológico de amostra cutânea de ratos Wistar..... 45
- Figura 6.** Corte histológico de amostra cutânea de ratos Wistar..... 48
- Figura 7.** Imagem de corte histológico corado em HE. 49
- Figura 8.** Expressão positiva de iNOS (seta preta) e células inflamatórias não marcadas positivamente para iNOS (seta azul)..... 51
- Figura 9.** Expressão positiva de TGF- β 2 (seta preta) e células inflamatórias não marcadas positivamente para TGF- β 2 (seta azul). 53
- Figura 10.** Imagem representativa de corte histológico marcando a expressão positiva (seta preta) para TNF- α e células inflamatórias não marcadas positivamente para TNF- α (seta azul) através do processo de imunohistoquímica. Aumento original de 400x. 55

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Quantidade de secções vasculares por campo microscópico. Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no 14^o dia de pós-operatório. Resultados expressos em média aritmética. 46
- Gráfico 2.** Quantidade de leucócitos por campo microscópico. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Resultados expressos em média aritmética. 47
- Gráfico 3.** Área de colágeno por μm^2 . Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos dias 14 e 21 pós-operatório ($p < 0,05$). Resultados expressos em média aritmética. 50
- Gráfico 4.** Quantidade de células que expressaram positivamente iNOS por μm^2 . Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao terceiro, sétimo e décimo quarto dias de pós-operatório. Resultados expressos em média aritmética. 52
- Gráfico 5.** Quantidade de células que expressaram positivamente TGF- β 2 por campo microscópico. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Resultados expressos em média aritmética. 54
- Gráfico 6.** Número de células que expressaram positivamente TNF- α por campo microscópico. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados os intervalos de tempo entre os grupos. Resultados expressos em média aritmética. 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP	Proteínas ósseas morfogenéticas
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
COX	Ciclo-oxigenase
EMD	Matriz derivada do esmalte
et al.	et alii
FCs	Fatores de crescimento
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HE	Hematoxilina e eosina
HPLFs	Fibroblastos do ligamento periodontal humano
H ₂ O ₂	Água oxigenada
IL	Interleucina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
PGA	Alginato de propileno glicol
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
MC3T3-E1	Células osteoblásticas
MMP	Matriz de metaloproteinase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
O ₂ ⁻	Íon superóxido
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-AB	Fator de crescimento derivado de plaquetas AB
PGs	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
PTH	Paratormônio
RGD	Sequência de aminoácidos: arginina, glicina e asparagina
rhBMP-2	Proteína óssea morfogenética recombinante humana 2
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
=	igual
±	mais ou menos
°C	Graus Celsius
p	nível de significância
x	vezes (referente à magnificação da lente objetiva em microscopia óptica)
≅	aproximadamente
®	marca registrada
mm	milímetro
µm	micrômetro
ml	mililitro
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
mg/Kg	miligrama por quilo
mg/ml	miligrama por mililitro
g	grama
pH	potencial hidrogeniônico
nº	número
DP	desvio padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	15
2.1	MATRIZ DERIVADA DO ESMALTE (EMD)	15
2.2	COMPOSIÇÃO E VEÍCULOS.....	17
2.3	PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS DE AÇÃO.....	19
2.4	INFLAMAÇÃO E REPARO DE TECIDOS MOLES	25
2.5	POSSÍVEL PAPEL DA EMD COMO MEDIADORA DA INTERAÇÃO ENTRE TIPOS CELULARES DE ORIGEM DIFERENTE	26
2.6	CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO	28
3	HIPÓTESE	31
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1	ANIMAIS.....	33
5.2	CONFEÇÃO CIRÚRGICA DA LESÃO	33
5.3	ACOMPANHAMENTO MACROSCÓPICO DAS FERIDAS.....	35
5.4	EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CUTÂNEAS.....	35
5.5	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	36
5.6	ANÁLISE HISTOPATÓLOGICA DESCRITIVA	37
5.7	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	37
5.7.1	Quantificação semiautomática do infiltrado inflamatório	38
5.7.2	Quantificação semiautomática de secções vasculares	39
5.7.3	Histomorfometria automática da matriz extracelular colagenosa	39
5.8	EXPRESSÃO IN SITU DE TNF- α , iNOS, TGF- β 2 POR IMUNOISTOQUÍMICA	40
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6	RESULTADOS	43
6.1	ACOMPANHAMENTO MACROSCÓPICO DA CICATRIZAÇÃO	43
6.2	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA E HISTOMORFOMETRIA.....	44
6.3	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	50

7	DISCUSSÃO	57
8	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A matriz derivada do esmalte (EMD) é uma forma purificada de proteínas extraídas da matriz de esmalte de suínos (Emdogain®, Straumann AG, Basel, Suíça) que parece controlar e promover a regeneração de uma série de tecidos de origem mesenquimal (ASPRIELLO et al., 2011; JOHNSON et al., 2009; SAITO et al., 2010; SCHNEIDER et al., 2011). A matriz é composta em mais de 90% por amelogenina, tendo enamelinas como o segundo maior composto. O alginato de propilenoglicol, utilizado como veículo, preenche os pré-requisitos essenciais para facilitar a aplicação da EMD no momento da cirurgia, além de permitir sua dispersão no local aplicado (HE et al., 2005; VENEZIA et al., 2004).

A maioria dos estudos publicados sobre os efeitos biológicos da EMD utiliza como modelos experimental e clínico a periodontite; a inflamação crônica do periodonto, formado por um grupo de tecidos mesenquimais (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar), sendo utilizada comumente como modelo para estudo de reações inflamatórias crônicas inespecíficas (COCHRAN et al., 2003; ESPOSITO et al., 2004; FUJITA et al., 2011; HAMMARSTRÖM, 1997; SAADOUN, 2008).

Nas reações inflamatórias crônicas, o perfil de citocinas produzidos pelas células do infiltrado é de fundamental importância para a evolução do processo cicatricial (TAUBMAN; KAWAI, 2001).

Destaca-se aqui, o papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e em menor proporção por linfócitos e outras células com papel imunológico (OLD, 1988). Esta citocina está associada à destruição de tecidos moles e duros por necrose, assim como à indução à apoptose (SEYMOUR et al., 1996). A apoptose regula a vida média das células do infiltrado inflamatório, o que é de particular importância para a eficiência da resposta do hospedeiro, assim como para o nível de lesão tecidual (McCORD; EDEAS, 2005).

Outro componente diretamente associado à inflamação e, conseqüentemente, à evolução do reparo, é o óxido nítrico (NO), um gás produzido em resposta a diversos estímulos inflamatórios (HIROSE, et al., 2001; SHAPIRA et al., 2000). Em níveis fisiológicos, o NO participa da modulação da resposta imunológica do hospedeiro exercendo papel importante contra células tumorais,

bactérias e vírus. Porém, em concentrações elevadas pode agir como uma molécula citotóxica levando a lesões secundárias nas áreas inflamadas (BATISTA et al., 2002; ZOCHODNE; LEVY, 2005). O papel imunomodulador pró-inflamatório do NO, através da elevação dos níveis de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) tem despertado a atenção de alguns pesquisadores (BALIGA et al., 2005; BATISTA et al., 2002).

Outra citocina de interesse é o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), um fator de crescimento que estimula a síntese de matriz extracelular, além de inibir a apoptose induzida pelo TNF- α . Assim, com a aplicação da EMD em culturas de células osteoblásticas MC3T3-E1 tratadas com TNF- α , a apoptose é significativamente reduzida, resultado obtido fisiologicamente pelo TGF- β 1 (HE et al., 2005).

O efeito anti-inflamatório da EMD pode explicar a melhor cicatrização de tecidos gengivais e de feridas cutâneas (SPAHR et al., 2002). Diversos estudos demonstraram o efeito da EMD em tecidos do periodonto com resultados promissores. Porém, os mecanismos de ação do tratamento com a EMD em lesões de tecidos moles ainda não foram elucidados (AL-HEZAIMI; AL-ASKAR; AL-RASHEED, 2011; KHEDMAT et al., 2011; MIRASTSCHIJSKI et al., 2004).

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 MATRIZ DERIVADA DO ESMALTE (EMD)

A EMD é um complexo proteico obtido a partir da purificação da matriz do esmalte e reproduz os eventos do desenvolvimento dos tecidos que constituem o periodonto (JOHNSON et al., 2009; KASAJ et al., 2012).

A participação de proteínas da matriz do esmalte na formação radicular foi proposta pela primeira vez na década de 1970, incluindo iniciação da cementogênese, mediação da adesão entre cimento e dentina, bem como indução da regeneração periodontal. Um produto comercial de proteínas da matriz do esmalte foi clinicamente reconhecido em 1997 e vem sendo amplamente usado em cirurgias periodontais (HE et al., 2005). Esta abordagem utiliza o extrato da matriz de esmalte embrionária, concebida com o propósito de induzir células mesenquimais a imitar os processos que ocorrem durante o desenvolvimento do dente e da estrutura periodontal (VENEZIA et al., 2004).

A EMD comercial, utilizada em pesquisas experimentais e clínicas, assim como em pacientes submetidos à cirurgia periodontal, é obtida a partir de germes dentários em desenvolvimento provenientes de leitões de seis meses de idade. Como as fases moleculares da odontogênese são muito semelhantes em diferentes espécies de mamíferos, o complexo proteico não causa reações adversas em humanos (HAGENAARS et al., 2004; HATAKEYAMA et al., 2003; LAAKSONEN; SORSA; SALO, 2010; SAADOUN, 2008; VENEZIA et al., 2004).

A doença periodontal é causada por um processo inflamatório resultante da interação entre colonização bacteriana e resposta imunológica do hospedeiro. Este processo é iniciado pela liberação de endotoxinas bacterianas que estimulam células fixas e móveis do tecido conjuntivo da área infectada a secretarem citocinas pró-inflamatórias e proteinases. Esta cascata de eventos resulta na inflamação e destruição do periodonto (AL-HEZAIMI; AL-ASKAR; AL-RASHEED, 2011; FUJITA et al., 2011; HAGENAARS et al., 2004; HENRIQUES et al., 2010; NOKHBEHSAIM et al., 2011b; SAITO et al., 2008; TOKIYASU et al., 2000; ZELDICH et al., 2007a; ZELDICH et al., 2010; ZHANG; DONG; CHU, 2010). A recessão gengival acontece

quando a localização da margem gengival está apical em relação à junção cimento esmalte. Clinicamente, resulta em exposição da superfície radicular, perda gengival marginal e gradual perda de inserção. As causas mais frequentes da lesão periodontal associada à infecção são má oclusão, ação mecânica, mobilidade dental, iatrogenias, deiscência óssea e inserção alta de músculo, bridas e freios (FUJITA et al., 2011; KÉMOUN et al., 2011; SAADOUN, 2008; TRABULSI et al., 2004). Estudos clínicos e com animais tem demonstrado que a EMD pode regenerar com sucesso a estrutura periodontal (COCHRAN et al., 2003; GKRANIAS et al., 2012).

Os fatores chave para o sucesso da regeneração periodontal são o recrutamento correto de células para o sítio da lesão e a produção adequada da matriz extracelular consistente com os tecidos presentes neste sítio: cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. O manejo destes tecidos tem como objetivo o desenvolvimento de técnicas para estímulo celular específico e consequente reposição dos tecidos destruídos; tal manipulação celular é baseada nos princípios da biologia celular, da biologia do desenvolvimento e de biomateriais.

Estudos têm mostrado que as células de derivação mesenquimal do ligamento periodontal podem ser transplantadas para os defeitos nesta região, o que resulta em regeneração da matriz extracelular sem consequências imunológicas negativas (LANG; SCHULER; NOLDEN, 1998; MALEKZADEH et al., 1998; VAN DIJK, 1991). Os efeitos imunomoduladores das células mesenquimais do estroma têm sido reportados recentemente e poderiam explicar esses resultados favoráveis à regeneração. Além disso, a estratégia do manejo de tecidos para a regeneração periodontal, que expõe a capacidade de regeneração das células mesenquimais do estroma no periodonto é uma tese atrativa. A partir de tal proposta, a necessidade do recrutamento de células para o sítio da lesão é minimizada e a previsibilidade do resultado positivo é maior (MROZIK et al., 2012).

Segundo Rincon, Haase e Bartold (2003), apesar de a EMD não ser considerada um fator de crescimento, apresenta propriedades semelhantes às destas proteínas. O presente estudo comenta a respeito de alguns de seus princípios biológicos observados *in vitro* e *in vivo* envolvendo, principalmente, a regeneração de tecidos duros, porém seus mecanismos de ação e seus efeitos na cicatrização de tecidos moles ainda não foram totalmente elucidados.

2.2 COMPOSIÇÃO E VEÍCULOS

As proteínas da matriz do esmalte são produzidas pelos ameloblastos, células ectodérmicas responsáveis pela síntese da porção orgânica do esmalte e pelo controle de sua mineralização e seu pico de atividade metabólica ocorre durante a fase de formação da coroa (campânula avançada) (NANCI, 2013). As proteínas estruturais e determinantes de mineralização secretadas pelos ameloblastos têm correspondentes que exibem funções correlatas na região radicular, onde tais células não estão presentes. Na raiz dentária, as proteínas da matriz são secretadas pelas células da bainha epitelial de Hertwig e o complexo proteico liberado durante a fase de rizogênese exerce importante papel biológico não só na cementogênese, mas na diferenciação e no desenvolvimento estrutural do periodonto como um todo (AL-HEZAIMI; AL-ASKAR; AL-RASHEED, 2011; ZELDICH et al., 2007a). Destacamos aqui que, na odontogênese, o mecanismo de indução recíproca ocorre na raiz e na coroa de modo semelhante: proteínas sintetizadas por células de derivação ectodérmica induzem à diferenciação de células de derivação mesenquimal (NANCI, 2013).

As proteínas que compõem a matriz são hidrofóbicas e caracterizadas como amelogeninas e não-amelogeninas, sendo 90% delas amelogeninas. Os 10% restantes são enamulina, amelina, matriz de metaloproteinase 20 (MMP-20), além de proteínas morfogenéticas 2 e 7 (BMP2 e BMP7) (KÉMOUN et al., 2011; VENEZIA et al., 2004). Deste complexo, diversos resultados sugeriram que a amelogenina está associada à cicatrização e à regeneração da estrutura periodontal, incluindo a neoformação de cimento (AL-HEZAIMI et al., 2012; ASPRIELLO et al., 2011; KÉMOUN et al., 2011; LYNGSTADAAS et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2011; THOMA et al., 2011; ZELDICH et al., 2007a). Provavelmente, sua ação é modular a cicatrização tecidual reproduzindo os eventos que ocorrem durante a rizogênese reestruturando o periodonto.

Brooks et al. (1994) desenvolveram um estudo genético comparativo entre diversos vertebrados, humanos, ratos, camundongos, bovinos e suínos, com a finalidade de se determinar qual a molécula fundamental para a formação do esmalte. As amelogeninas são fortemente expressas no esmalte do órgão dentário, e demonstram grande nível de sequência homóloga entre todos os vertebrados

examinados (> 80%). Isto sugere que toda a estrutura da molécula de amelogenina é crucial na formação do esmalte e na biomineralização, e as terminações amino e carboxi são particularmente importantes para sua função, além de serem ricas em resíduos de prolina (\cong 30%) (LYNGSTADAAS et al., 2009).

A identificação das proteínas que formam o complexo da EMD culminou com o seu desenvolvimento comercial na forma sintética ou isolada, purificada ou em complexo, necessitando, conseqüentemente, de um veículo para ser administrado (VENEZIA et al., 2004). Originalmente, o produto comercial consistiu em EMD e uma solução veículo de alginato de propilenoglicol (PGA) manipulados imediatamente antes da aplicação. Posteriormente, foi desenvolvida a EMD gel, distribuída já pronta para utilização (VENEZIA et al., 2004; ZELDICH et al., 2007a). Bratthall et al. (2001), realizaram amplo estudo multicêntrico, cujos resultados demonstraram não haver diferença entre o produto original e o gel.

Dada a propriedade hidrofóbica das amelogeninas, os componentes da EMD se agregam e se tornam praticamente insolúveis em pH fisiológico e em temperatura corporal. Desta forma, as proteínas da matriz derivada devem ser dissolvidas em meios com pH ácido ou alcalino e em baixa temperatura (LYNGSTADAAS et al., 2009). Uma formulação adequada deve ter um pH que não seja neutro e uma reprecipitação gradual da matriz quando em condições fisiológicas (SCHNEIDER et al., 2011; VENEZIA et al., 2004). Hammarström (1997), usando um modelo com macacos, desenvolveu uma série de veículos para determinar qual seria mais eficaz na precipitação da EMD no tratamento da superfície radicular. A regeneração do cimento e osso alveolar foram medidas após oito semanas. Os resultados mostraram que o PGA foi o mais efetivo. Tal veículo melhorou a precipitação da EMD, além de expor as células do ligamento periodontal à agregação de proteínas reestabelecida, levando à interação de matriz e células no local da aplicação.

O hidrogel de propilenoglicol tem se mostrado efetivo no sistema de distribuição de substâncias bioativas porque essas matrizes permitem um ótimo crescimento celular e captação e síntese de proteínas bioativas, como a proteína óssea morfogenética recombinante humana 2 (rhBMP-2) e hormônio paratireoide (PTH). O crescimento das células nessas matrizes pode ser facilitado pela presença de uma sequência de aminoácidos: arginina, glicina e asparagina (RGD). As sequências de RGD são normalmente encontradas em proteínas de matriz

extracelular e participam da adesão, migração e sinalização celular, possibilitando sua interação com as integrinas, um subgrupo de receptores superficiais de células. A possibilidade da aplicação da EMD com um veículo otimizado com ou sem RGD não foi investigada ainda (SCHNEIDER et al., 2011).

Em estudos *in vivo* e *in vitro*, Gestrelus et al. (1997a) observaram que a reologia tixotrópica (característica de um fluido de submeter-se a uma diminuição da viscosidade com o tempo, enquanto é submetido a cisalhamento constante) do PGA permite a aplicação da EMD com uma formulação viscosa. Quando uma força de cisalhamento é aplicada, tal como por meio de uma seringa, a viscosidade da formulação diminui, o que facilita a completa cobertura da superfície radicular a ser tratada. A viscosidade do PGA diminui sob condições fisiológicas, e assim a EMD é liberada para posterior precipitação sobre a superfície radicular exposta na área a ser tratada (SCHNEIDER et al., 2011; VENEZIA et al., 2004).

Conhecer os componentes da EMD ajuda no estudo e na compreensão de seus princípios biológicos e mecanismos de ação.

2.3 PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS DE AÇÃO

A doença periodontal é causada por um processo inflamatório resultante da interação entre a colonização bacteriana e a resposta imunológica do hospedeiro. Este processo é iniciado pela liberação de endotoxinas bacterianas que estimulam células fixas e móveis do tecido conjuntivo da área infectada a secretarem citocinas pró-inflamatórias e proteinases. Esta cascata de eventos resulta na inflamação e na destruição do periodonto (AL-HEZAIMI; AL-ASKAR; AL-RASHEED, 2011; FUJITA et al., 2011; HAGENAARS et al., 2004; HENRIQUES et al., 2010; NOKHBEHSAIM et al., 2011a; SAITO et al., 2008; TOKIYASU et al., 2000; ZELDICH et al., 2007a; ZELDICH et al., 2010; ZHANG; DONG; CHU, 2010).

Os fatores chave para o sucesso da regeneração periodontal são o recrutamento correto de células para o sítio da lesão e a produção adequada da matriz extracelular consistente com os tecidos presentes neste sítio: cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. O manejo destes tecidos tem como objetivo o desenvolvimento de técnicas para estímulo celular específico e consequente

reposição dos tecidos destruídos; tal manipulação celular é baseada nos princípios da biologia celular, da biologia do desenvolvimento e de biomateriais.

Em estudo *in vitro*, um pequeno estímulo e uma proliferação periférica de linfócitos são demonstrados (NIKOLOPOULOS; PETEINAKI; CASTANAS, 2002). Como resultado da estimulação de lipopolissacarídeos e peptídeo-glicanos em células sanguíneas periféricas, o nível elevado de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α é reduzido na presença da EMD (MYHRE et al., 2006).

As prostaglandinas (PGs) são moléculas pleiotrópicas e afetam muitos processos fisiológicos, participando de muitas doenças. Na doença periodontal, por exemplo, as PGs são secretadas em grande quantidade e contribuem para o processo inflamatório, assim como fazem a mediação da indução da reabsorção óssea (HOWELL; WILLIAMS, 1993; MADIANOS; BOBETSIS; KINANE, 2005). Na fase aguda de cicatrização de feridas da pele, as PGs também têm um papel fisiológico na fase inflamatória inicial. No entanto, uma produção local exagerada de PGs, devido ao trauma ou infecção da ferida, pode interferir na adequada cicatrização cutânea (WEINBERG et al., 2009). As PGs provocam mitose e diferenciação nos odontoblastos e estimulam a construção óssea endosteal e periosteal, resultando em ganho ósseo. Porém a síntese da matriz pode ser reduzida como resultado da produção de osteoblastos diferenciados (COCHRAN et al., 2003; KHEDMAT et al., 2011).

A prostaglandina-E2 (PGE2) tem sido documentada como agente antiproliferativo no tecido gengival, assim como em fibroblastos de outra origem (WEINBERG et al., 2009). A EMD é utilizada clinicamente para o tratamento periodontal no local afetado pela inflamação e pode conseqüentemente coexistir com mediadores inflamatórios, como a PGE2 no sítio tratado, fato que pode potencialmente interferir em sua ação (WEINBERG et al., 2010).

Estudos têm mostrado que as células de derivação mesenquimal do ligamento periodontal podem ser transplantadas para os defeitos nessa região, o que resulta em regeneração da matriz extracelular sem conseqüências imunológicas negativas (LANG; SCHULER; NOLDEN, 1998; MALEKZADEH et al., 1998; VAN DIJK, 1991). Os efeitos imunomoduladores das células mesenquimais do estroma têm sido reportadas recentemente e poderiam explicar esses resultados favoráveis à regeneração. Além disso, a estratégia do manejo de tecidos para a regeneração periodontal que expõe a capacidade de regeneração das células mesenquimais do

estroma no periodonto é uma tese atrativa; a partir de tal proposta, a necessidade do recrutamento de células para o sítio da lesão é minimizada e a previsibilidade do resultado positivo é maior (MROZIK et al., 2012).

Uma grande variedade de métodos e de materiais para a regeneração do osso alveolar perdido tem sido descrita. Alguns desses materiais são bem documentados e têm provado sua eficácia e segurança biológica à longo prazo, enquanto, por outro lado, determinadas técnicas vem sendo pesquisadas ainda para se compreender seu princípio de ação (SCHNEIDER et al., 2011; TOKIYASU et al., 2000). A indução da formação óssea é um desafio na regeneração tecidual. Numerosos estudos pré-clínicos e clínicos têm mostrado os efeitos positivos de fatores de crescimento e de diferenciação na regeneração de tecidos duros, e mais recentemente, tecidos moles (SCHNEIDER et al., 2011).

O uso de fatores proteicos derivados do esmalte para promover a regeneração periodontal é baseado no conhecimento de interações recíprocas epiteliais-mesenquimais e são a base para a formação de vários tecidos. Como exemplo, interações apropriadas entre células ectomesenquimais da crista neural e células de origem exclusivamente epitelial resultam na formação de esmalte e de dentina. Muitas moléculas, associadas à bainha epitelial de Hertwig, têm sido sugeridas como tendo um importante papel no controle do desenvolvimento da raiz, dentre as quais se incluem a lamelina, a amelina, derivados de proteínas do esmalte e “*esmalte-like*”) (TOKIYASU et al., 2000).

Proteínas da matriz orgânica do esmalte são secretadas por ameloblastos durante a formação da coroa, e regulam a mineralização do esmalte. Foi comprovado que várias destas proteínas são secretadas pelas células epiteliais durante a rizogênese desempenhando importante papel biológico na cementogênese e na formação da estrutura periodontal. Esta descoberta culminou no desenvolvimento da EMD e o veículo alginato de propileno glicol (AL-HEZAIMI et al., 2012).

A compreensão dos processos moleculares associados ao reparo e regeneração tecidual, fatores de crescimento (FCs) aplicados em superfícies radiculares ou em feridas de tecidos moles é fundamental para a modulação de mecanismos de regeneração (ABOLFAZLI et al., 2009; ESPOSITO et al., 2004; FUJITA et al., 2011; HAGENAARS et al., 2004; HENRIQUES et al., 2010; HOANG; OATES; COCHRAN, 2000; JOHNSON et al., 2009; KASAJ et al., 2012;

LAAKSONEN; SORSA; SALO, 2010; NOKHBEHSAIM et al., 2011b; RINCON; HAASE; BARTOLD, 2003; SAITO et al., 2008; ZELDICH et al. 2010).

O esmalte fracionado, não comercial, proveniente de germes dentários de suínos, apresentou pequena quantidade de BMP (IWATA et al., 2002) e TGF- β 1 (KAWASE et al., 2001), porém, a maioria dos estudos atribuiu os benefícios da EMD às proteínas específicas da matriz do esmalte (KAWASE et al., 2001). Através de várias técnicas tem sido demonstrado que a EMD é absorvida tanto pela hidroxiapatita e pelo colágeno quanto pela raiz exposta. Tal absorção forma um complexo esférico, e quantidades residuais permanecem detectáveis no sítio tratado por duas semanas, como foi demonstrado com Gestrelius et al. (1997a). Esse parece ser um período suficiente para permitir a recolonização por células do ligamento periodontal e células mesenquimais indiferenciadas. Estes dados foram confirmados por estudos dos mesmos autores quando a microscopia eletrônica de varredura do dente tratado pela EMD, extraído em diferentes intervalos de tempo por duas semanas após a cirurgia, demonstrou uma colonização progressiva de células semelhantes morfológicamente a fibroblastos, o que não foi observado no grupo controle, sem o tratamento com EMD (GESTRELIUS et al., 1997a). Mais recentemente, análises imunoistoquímicas demonstraram que a EMD permanece presente em molares extraídos de ratos após quatro semanas da sua aplicação (HAMAMOTO et al., 2002; SCULEAN et al., 2002).

Kim, Tominaga e Tanaka (2005), não encontraram nenhum efeito da EMD sobre o crescimento de fibroblastos e osteoblastos provenientes de ratos em meio de cultura incluindo EMD com 10% de soro, porém observaram um aumento dose dependente da quantidade dessas células com a aplicação da EMD. No seu trabalho *in vivo*, foi injetado EMD/propilenoglicol (EMD/PG) e os autores optaram pelo uso da EMD e não da EMD gel por não se conhecer até então os constituintes da EMD gel (KIM; TOMINAGA; TANAKA, 2005).

EMD possibilita a melhora da proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal, tanto quanto o aumento da produção de proteínas e colágeno e da mineralização, mas não de células epiteliais. Isso aumenta a produção total de proteínas pelas células do ligamento periodontal e promove a formação de nódulos mineralizados das células do ligamento periodontal. Em contraste, a EMD não tem efeitos significativos na migração ou adesão e distribuição das células do ligamento periodontal (GESTRELIUS et al., 1997b). Por microscopia eletrônica de varredura,

foi demonstrado que a EMD parece aumentar a adesão dos fibroblastos do ligamento periodontal em superfície de raízes comprometidas e, mais especificamente, esta função de adesão celular foi atribuída à amelogenina; tal função explica parcialmente o efeito da terapia com EMD na regeneração periodontal (HOANG et al., 2002).

Destaca-se que as células envolvidas na regeneração periodontal respondem à EMD de maneiras diferentes. A taxa de adesão, a produção de fatores de crescimento (TGF- β 1, IL-6, PDGF-AB), o índice de proliferação e o metabolismo celular mesenquimal no ligamento periodontal humano em cultura aumentaram significativamente na presença de EMD (LYNGSTADAAS et al., 2009). Em contraste, EMD aumentou a secreção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e fator de crescimento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB) em culturas de células epiteliais, mas inibiu seu crescimento. Este achado sugere que EMD favorece o crescimento de células mesenquimais ao invés do crescimento de células epiteliais. Além disso, foi mostrado que a EMD parece exibir um efeito citostático sobre as células epiteliais em cultura (GESTRELIUS et al., 1997b; KAWASE et al., 2001). Isso pode explicar o efeito biológico da EMD de regeneração tecidual guiada, observado *in vivo*, somado a um possível papel preventivo na mecânica de membranas de barreira (HOANG et al., 2002).

Avanços no isolamento e síntese de fatores de crescimento e polímeros biodegradáveis possibilitaram maior índice de sucesso na manipulação de tecidos como cartilagem e osso, entre outros. Dada sua origem mesenquimal, o periodonto é considerado um excelente sítio para tais procedimentos nos casos de perdas teciduais em lesões causadas pela periodontite (ESPOSITO et al., 2004).

Dada a capacidade da EMD de regeneração tecidual, não se pode deixar de ressaltar sua importância na reabilitação de lesões odontológicas com destruição e perda de tecidos, como a doença periodontal.

A aplicação tópica da EMD em bolsa periodontal foi capaz de aumentar a expressão de VEGF no tecido gengival, apesar de ainda não ser claro como ocorre a estimulação da produção desse fator de crescimento (ASPRIELLO et al., 2011). Sakoda, Nakajima e Noguchi (2012) hipotetiza que a EMD pode estimular a produção de VEGF através de fibroblastos gengivais humanos.

Os fibroblastos do ligamento periodontal humano (HPLFs) assumem um papel de grande importância no processo de cicatrização de feridas que se segue à

doença periodontal ou um trauma dental, incluindo avulsão do dente. Fatores de crescimento têm sido amplamente investigados quanto ao crescimento e/ou diferenciação das células do ligamento periodontal. Porém, o leque de especificidades funcionais compromete sua aplicação clínica (KHEDMAT et al., 2011). Uma observação clínica comum quando a EMD é utilizada para a cirurgia de regeneração periodontal é a grande rapidez da cicatrização de feridas e a minimização de sintomas pós-cirúrgicos, como a dor.

Estudos *in vitro* de células do ligamento periodontal demonstraram que a EMD estimula a proliferação celular, síntese de fatores de crescimento como TGF- β 1 VEGF, moléculas da matriz, células de ligação e mineralização (GESTRELIUS et al., 1997a; HOANG; OATES; COCHRAN, 2000; OKUBO et al., 2003).

Em seu estudo, Fujita et al. (2011), relataram que a eficácia da EMD nos procedimentos de regeneração periodontal tem evoluído de forma bem sucedida com um recobrimento saudável e desenvolvendo gengiva ceratinizada.

A partir deste princípio, surgiu a necessidade de se compreender especificamente a ação da matriz nos tecidos moles de um modo geral, seja mucosa bucal, em reconstituição de sua matriz extracelular e revascularização, bem como em outras perdas teciduais em mucosas e pele.

Apesar de a utilização da EMD experimental e clinicamente ser ampla para regeneração de tecidos do periodonto e para tecido ósseo, seus efeitos sobre o processo cicatricial em tecidos moles vêm sendo incipientemente pesquisado. Estudos têm demonstrado que a amelogenina promove a cicatrização e regeneração de estruturas de suporte dos dentes, incluindo cimento (ESPOSITO et al., 2004; SCHNEIDER et al., 2011). Porém, observou-se que o tratamento de feridas epiteliais padronizadas com EMD promoveu o fechamento da ferida em menor tempo quando comparado com feridas que foram apenas suturadas (AL-HEZAIMI; AL-ASKAR; AL-RASHEED, 2011).

De modo interessante, destacam-se diversos relatos na literatura (HE et al., 2005; LYGSTADAAS et al., 2009; RINCON; HAASE; BARTOLD, 2003; WENNSTRÖM; LINDHE, 2002) nos quais os pesquisadores observaram *secundariamente* regeneração de tecidos moles nas áreas de acesso cirúrgico para aplicação da EMD com o objetivo de reconstituição de tecidos duros dentários, como cimento e osso alveolar.

2.4 INFLAMAÇÃO E REPARO DE TECIDOS MOLES

Inspirados por observações clínicas em cirurgias orais, vários investigadores estudaram o efeito da amelogenina na cicatrização de feridas crônicas e agudas em pele (HAGENAARS et al., 2004; LYNGSTADAAS et al., 2009; WENNSTRÖM; LINDHE, 2002). Dessa forma, torna-se fundamental para se compreender os efeitos da EMD no tecido cutâneo, conhecer em quais camadas a pele é dividida. Na região mais superficial encontra-se a epiderme com tecido queratinizado. Logo abaixo se encontra a derme papilar, seguida pela derme reticular I e II e a região subcutânea, onde se encontra o plano muscular (AARESTRUP, 2012).

O primeiro estudo que demonstrou que amelogeninas estimulam a cicatrização de feridas em pele mostrou que o tecido de granulação na ferida tratada com EMD foi significativamente maior, e o preenchimento dessa ferida e a re-epitelização em toda sua profundidade progrediu quase duas vezes mais rápido na presença de EMD (MIRASTSCHIJSKI et al., 2004). Foi observado neste estudo que no local da aplicação da EMD a amelogenina estimulou a angiogênese através da indução da secreção de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), PDGF, MMP-2. Isso suporta a ideia de que amelogenina em geral trabalha estimulando células mesenquimais a expressar fatores que são importantes na cicatrização, crescimento e regeneração da pele.

A cicatrização das lesões cutâneas assépticas é caracterizada pela deposição de matriz e remodelação da lesão inflamatória, mas qual a intensidade da inflamação é necessária para um ótimo reparo tecidual ainda é desconhecido (NOKHBEHSAIM et al., 2011b).

Leucócitos polimorfonucleares (PMNs), em sua maioria neutrófilos, são as primeiras células para defesa do hospedeiro contra lesões assépticas iniciais e simples, bem como aquelas causadas por bactérias e seus produtos. PMNs são células fagocitárias numericamente predominantes encontradas na circulação periférica, compondo de 50 a 70% do total da população de células do sangue. Em tecidos moles, PMNs migram continuamente dos vasos sanguíneos pelo tecido para o sulco gengival, marcando tipicamente 90% das células do sulco gengival. No sulco, as PMNs, presumidamente, protegem a estrutura periodontal dos constituintes

da placa dental. A formação do biofilme no dente inicia a elaboração de várias substâncias que atraem PMNs para o sítio da inflamação por quimiotaxia. Na atividade fagocitária, a síntese e liberação de superóxido (O_2^-) é a maior requisição para morte oxidativa microbiana por PMNs. Além disso, PMNs são a principal fonte de MMP-8, colagenase do hospedeiro que media a degradação do tecido colágeno no periodonto inflamado. A MMP-8 é liberada durante a degranulação do lisossomo durante a fagocitose ou por desintegração (necrose) dos PMNs (KARIMA; VAN DIKE, 2012).

O impacto da EMD na inflamação e cicatrização de feridas cutâneas tem sido um ponto controverso. Parkar e Tonetti (2004) demonstraram que em células mesenquimais do ligamento periodontal de humanos, EMD inibe a expressão de genes envolvidos nos eventos iniciais da inflamação na cicatrização de feridas, enquanto os genes que codificam o crescimento e as moléculas que promovem a reparação são estimulados.

A cicatrização sem complicações é reportada frequentemente após a aplicação da EMD e o efeito antimicrobiano do veículo PGA pode ser uma das causas. Um número de razões para essa observação tem sido sugerida, incluindo efeitos anti-inflamatório e antimicrobianos (LYNGSTADAAS et al., 2009).

Análises imunoistoquímicas do periodonto para osteopontina e colágeno tipo I e III revelaram que o tratamento com EMD resultou em uma maior expressão de colágeno e um rápido desenvolvimento de tecido conjuntivo durante uma fase inicial de cicatrização de feridas (SCULEAN et al., 2003). O tratamento do ligamento periodontal e fibroblastos gengivais com EMD mostrou melhorar o processo de preenchimento da ferida *in vitro* (HOANG; OATES; COCHRAN, 2000; RINCON; HAASE; BARTOLD, 2003).

2.5 POSSÍVEL PAPEL DA EMD COMO MEDIADORA DA INTERAÇÃO ENTRE TIPOS CELULARES DE ORIGEM DIFERENTE

De acordo com a teoria clássica da rizogênese e da estrutura periodontal, a bainha epitelial de Hertwig induz células mesenquimais da papila dental a formar um manto de predentina antes de se desintegrar e deixar a superfície radicular.

Como resultado da apoptose da bainha epitelial de Hertwig durante o processo embrionário, a barreira física formada entre as células mesenquimais do folículo dental e a formação de dentina se desintegra. As células mesenquimais que se expuseram à dentina formada são induzidas a se diferenciar em cementoblastos, responsáveis pela cementogênese. O processo de deposição de cimento é um pré-requisito para a formação tanto do ligamento periodontal quanto do osso alveolar (AL-HEZAIMI; AL-ASKAR; AL-RASHEED, 2011; VENEZIA et al., 2004).

Tal mecanismo de interação recíproca é observado no desenvolvimento embrionário e também nos processos cicatriciais. A resposta normal de cicatrização começa no momento em que o tecido é lesionado. O contato das plaquetas com o colágeno exposto provoca a liberação de fatores de coagulação bem como fatores de crescimento e citocinas como o PDGF e TGF- β . Após hemostasia, os neutrófilos iniciam a fagocitose e, como parte desta fase da resposta inflamatória, os macrófagos dão continuidade a esta fagocitose, além de liberar mais PDGF e TGF- β . A partir daí fibroblastos migram para iniciar a fase proliferativa e depositam uma nova matriz extracelular. A nova matriz de colágeno então se organiza na fase final da remodelação (DIEGLMANN; EVANS, 2004).

Os mecanismos envolvidos na cicatrização cutânea na presença da EMD ainda não foram totalmente esclarecidos, mas tem sido mostrado que a aplicação local do produto estimula a angiogênese pela indução da secreção de VEGF, PDGF e MMP2. De forma geral, a amelogenina estimula células mesenquimais a expressar fatores importantes para a cicatrização, crescimento e regeneração (KAWASE et al., 2001).

A EMD tem demonstrado ser considerável promessa para a regeneração de defeitos periodontais quando aplicada na superfície radicular durante a cirurgia periodontal, restaurando a função do ligamento periodontal, cimento e osso alveolar. Sabe-se que a EMD atua na formação de vasos sanguíneos, tecidos de granulação e acelera a cicatrização de feridas, além de interferir na produção de inúmeras citocinas e fatores de crescimento (ASPRIELLO et al., 2011).

Apesar de diversos estudos registrarem na literatura resultados positivos associados à aplicação da EMD na regeneração periodontal, o mecanismo de ação biológica pelo qual a EMD influencia a cicatrização ainda não é totalmente esclarecido (AL-HEZAIMI; AL-ASKAR; AL-RASHEED, 2011; ASPRIELLO et al., 2011; HAGENAARS et al., 2004; KASAJ et al., 2012; MIRASTSCHIJSKI et al., 2004;

NOKHBEHSAIM et al., 2011b; SAKODA; NAKAJIMA; NOGUCHI, 2012; SCULEAN et al., 2003).

2.6 CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

Entre os mediadores inflamatórios encontra-se o TNF- α , citocina conhecida por sua ação pró-apoptótica em vários tipos de células, incluindo os fibroblastos. A ação pró-apoptótica do TNF- α é iniciada pela ligação ao seu receptor (TNFR1), que estimula a montagem das proteínas associadas à morte e subsequente ativação das proteases como cisteína, que fazem a mediação da morte celular (ZELDICH et al., 2007b). A capacidade da EMD de inibir apoptose induzida por TNF- α corrobora a observação de ter um efeito similar às células osteoblásticas MC3T3-E1 (HE et al., 2005). A noção de que prevenir a sinalização do TNF- α pode minimizar os efeitos prejudiciais da inflamação na gengiva ou na estrutura periodontal já foi sugerida (GRAVES; COCHRAN, 2003). Além do efeito mitogênico da EMD nos fibroblastos gengivais, observou também que a EMD promove saúde gengival, prevenindo a morte das células em resposta aos mediadores inflamatórios (ZELDICH et al., 2007b).

Myhre et al. (2006) testaram sangue de humanos com lipossacarídeos e peptídeoglicanos incubados com diferentes concentrações de EMD ou um análogo de cAMP. Seus resultados mostraram uma liberação atenuada de TNF- α e IL-8, enquanto a liberação de IL-10 não foi alterada. Os resultados sugeriram que a EMD limita a liberação de citocinas pró-inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos e peptídeoglicanos no sangue humano. Khedmat et al. (2011) mostraram que a EMD não promove a secreção de TNF- α e IL-1 β , porém ela aumenta a atividade fagocitária dos macrófagos. Este estudo demonstra, ainda, que a EMD acelera a cicatrização de feridas melhorando o curso da cicatrização.

TGF- β tem um papel central na cicatrização de feridas e suas isoformas foram identificadas (CONDE et al., 2011; NOKHBEHSAIM et al., 2011b). O TGF- β 2 está relacionado com a resposta inflamatória e subsequente cicatrização durante o processo de cura em feridas (CONDE et al., 2011). TGF- β 1 facilita a migração de queratonócitos da ferida e com sucesso na reepitelização e estimula os fibroblastos

a depositarem novas proteínas da matriz extracelular que suporta células e vasos em crescimento (NOKHBEHSAIM et al., 2011a).

As funções semelhantes do TGF- β e das BMP foram encontradas em várias frações da EMD (SUZUKI et al., 2005). Além disso, a EMD tem mostrado aumentar a síntese de fatores de crescimento como TGF- β 1 (OKUBO et al., 2003; PARKAR; TONETTI, 2004). Foi sugerido que o cimento e as atividades de osteopromoção da EMD são induzidas pelo menos em parte por fatores de crescimento (TAKAYAMA et al., 2005).

Achados *in vitro* mostraram que EMD modula uma variedade de tipos celulares, dental ou não, de diferentes formas: o aumento dos níveis de cAMP e indução da síntese e secreção de TGF- β e IL-6. Em cultura de células do ligamento periodontal e fibroblastos gengivais, estimula a proliferação de pré-osteoblastos e diferenciação de osteoblastos imaturos (GESTRELIUS et al., 1997b; LYNGSTADAAS et al., 2009).

A angiogênese é um processo de muitas fases, envolvendo degradação proteolítica da matriz, migração, proliferação, alinhamento e formação tubular por células endoteliais vasculares e maturação dos vasos recém-formados. Mais estudos são necessários para afirmar que EMD tem a habilidade de estimular um espectro inteiro de processos molecular e celular que resultem na formação de novos vasos sanguíneos (THOMA; COCHRAN, 2010).

O VEGF promove a cicatrização de feridas regulando a permeabilidade vascular, o fluxo das células inflamatórias para o sítio da injúria, migração e proliferação de células endoteliais pré-existentes, e o recrutamento de células derivadas da medula óssea, progenitoras de endotélio. VEGF parece ter um importante papel na remodelação óssea, atraído células endoteliais e osteoclastos e estimulando a diferenciação de osteoblastos (NOKHBEHSAIM et al., 2011a). O VEGF estimula a proliferação e migração de células endoteliais e tem efeito na permeabilidade vascular quando já existem microvasos, o que ocorre nas fases iniciais da reparação da ferida, teoricamente seguida da deposição de matriz rica em fibrina, necessária para a migração celular.

Um dos mecanismos que tem sido propostos para a regulação da cicatrização da pele é a expressão de óxido nítrico sintase induzido (iNOS) neste tecido. O iNOS é produzido por uma variedade de células, incluindo músculos esquelético e liso, fibroblastos e células epiteliais. O impacto do NOS na reparação

da ferida pode ser atribuído a suas influências funcionais na angiogênese, inflamação, proliferação celular, deposição e remodelação da matriz (AL-HEZAIMI; AL-ASKAR; AL-RASHEED, 2011).

Apesar de evidências científicas demonstrarem o sucesso do uso do Emdogain® em tratamentos periodontais, seu mecanismo de ação em tecidos moles permanece obscuro. Para o perfeito entendimento desta terapêutica, faz-se necessária a utilização de modelos experimentais em animais, já que o tecido gengival é muito fino, o que torna difícil a obtenção de uma quantidade suficiente de tecido gengival como amostra, sendo necessário apenas para examinar a reação do tecido à EMD (KIM; TOMINAGA; TANAKA, 2005). Assim, a pele do dorso de ratos vem sendo usada em alguns experimentos com o objetivo de avaliar, através desse modelo, a expressão de citocinas e mediadores inflamatórios que poderiam estar envolvidos no mecanismo de ação (KIM; TOMINAGA; TANAKA, 2005).

3 HIPÓTESE

A aplicação da matriz derivada de esmalte (EMD) favorece a cicatrização de feridas cutâneas cirúrgicas em ratos *Wistar*, permitindo melhor vascularização e melhor qualidade de matriz extracelular em menor tempo de evolução, em relação a feridas não tratadas com o produto.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da matriz derivada do esmalte (EMD) (Emdogain®) na cicatrização de feridas cutâneas cirúrgicas em ratos *Wistar*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a evolução clínica do processo de cicatrização entre as feridas cutâneas cirúrgicas tratadas com EMD;
- Avaliar histopatologicamente e histomorfometricamente a área cicatricial por quantificação da celularidade do infiltrado inflamatório e secções vasculares nas áreas em cicatrização;
- Avaliar os efeitos da EMD sobre a expressão de TNF- α , TGF- β e iNOS *in situ*;
- Comparar os resultados obtidos com aqueles provenientes de amostras tratadas com solução salina (Grupo controle).

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido em cooperação com a Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – Suprema e com o Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic, Campinas, São Paulo onde foram delineados os procedimentos operatórios experimentais. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob parecer nº 064/2012 (Anexo A).

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados no experimento ratos *Wistar* (n = 25), com 6 a 8 semanas de idade, pesando de 250 g a 300 g, pertencentes à colônia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos no biotério da Suprema – Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora em uma sala com temperatura controlada (± 23 °C), e alojados em gaiolas individuais com maravalha em um ciclo de luz de 12:12 (luzes acesas às 6:00), com ração peletizada e água *ad libitum*, onde foi realizada a confecção cirúrgica da lesão.

5.2 CONFECÇÃO CIRÚRGICA DA LESÃO

Para realização da ferida cirúrgica, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (ket-a-XYL[®], Agrovvetmarket, Brasil) via intramuscular, nas doses de 40 e 15 mg/kg respectivamente. Os mesmos foram colocados em decúbito ventral com as pernas fixadas a uma placa cirúrgica e a região dorsal foi tricotomizada após desinfecção com álcool a 70%. Com utilização de lâminas cirúrgicas nº 15c (Lamedid[®], Barueri, Brasil), foram confeccionadas duas incisões bilaterais e paralelas ao eixo central e longitudinal do dorso, com 4,0 cm de comprimento até o tecido subcutâneo em profundidade incluindo a fáscia muscular

subjacente. As incisões que se localizaram à esquerda constituíram o grupo teste (Emdogain®) e à direita, o grupo controle (solução salina) (Figura 1).



Figura 1. Imagem representativa das incisões paralelas no dorso do animal.

Nas feridas de teste foi aplicado em dose única 0,7 ml de Emdogain® na apresentação gel 30 mg/ml (instituto Straumann, AG, Basel, Suíça), dentro das bordas da incisão, enquanto o grupo controle recebeu mesma quantidade de solução salina. A seguir, as bordas foram fechadas com suturas simples interrompidas (Nylon 6-0, Techno Fio®, Goiânia, Brasil). A distância entre as perfurações da agulha ao longo da lesão foi de aproximadamente 3 mm. Imediatamente após a sutura, foram colocados sobre as incisões, respectivamente nos grupos teste e controle, uma camada de gel e solução salina, durante cinco minutos. Após o procedimento, os animais foram dispostos em gaiolas individuais.

Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico em dias diferentes. Foram subdivididos em subgrupos (n = 5), determinados pela data da confecção da lesão e todos os animais do experimento foram eutanasiados no 22º dia (Tabela 1), por questão operacional.

Tabela 1. Divisão dos grupos de acordo com o período de cicatrização

Grupos	Tempo Pós-cirúrgico	n
I	21	5
II	14	5
III	7	5
IV	3	5
V	1	5

5.3 ACOMPANHAMENTO MACROSCÓPICO DAS FERIDAS

As feridas foram avaliadas macroscopicamente e fotografias digitais foram realizadas antes da eutanásia, com a utilização de câmera de alta resolução (Canon, Japão) com foco fixo.

Os animais foram avaliados no 1º, 3º, 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório, através da análise macroscópica da presença de tecido de granulação, redução da área da lesão, crosta e coloração da lesão, comparando grupos teste e controle.

5.4 EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CUTÂNEAS

Ao 22º dia do início do experimento, todos os animais sofreram eutanásia por aprofundamento anestésico com ketamina e xilazina, dobrando a dose utilizada para a confecção cirúrgica da lesão. Foi realizada excisão do tecido incluindo 0,5 cm de pele adjacente às bordas da ferida em cicatrização bem como todo o tecido cicatricial em profundidade, tanto da ferida tratada quanto da ferida não tratada. As

amostras teciduais excisionadas foram fixadas em formol 10% (pH 7) por período mínimo de 24 horas, antes de seguirem para processamento histológico.

5.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O material foi colocado em cassetes e submetido a seis banhos em álcool de 95% para ser desidratado. Em seguida, passou por três banhos de xilol para ser diafanizado. Logo após, passou por dois banhos em parafina a 48 °C. A inclusão do material foi feita em recipientes contendo parafina líquida a 50 °C. Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo modelo CUT 4060 da marca SLEE Mainz (Mainz, Alemanha) para a obtenção dos cortes do material com espessura de 4 µm. A “pesca” foi realizada em recipiente com água a 50 °C, evitando a ocorrência de microdobras, com a lâmina mergulhada na água para coletar os cortes. A secagem foi realizada em estufa a 70 °C.

Depois de confeccionadas as lâminas histológicas, 50 foram separadas para realização da coloração de rotina com hematoxilina e eosina (HE) e 150 foram destinadas à realização de imunohistoquímica, sendo estas últimas silanizadas.

A coloração de rotina (hematoxilina e eosina) (LUNA, 1968) foi utilizada para avaliação morfológica dos cortes histológicos, na qual os núcleos coram-se em azul escuro (basofílicos) e o citoplasma em róseo (eosinofílicos).

Para a coloração foi realizado o seguinte protocolo:

- Três banhos em xilol para desparafinização por cinco minutos cada;
- Três banhos em álcool 95% por cinco minutos cada;
- Lavagem da lâmina em água corrente durante três minutos;
- Coloração pela hematoxilina (corante básico) durante cinco min;
- Lavagem da lâmina em água corrente durante cinco minutos;
- Coloração, pela eosina (corante ácido) durante dois minutos;
- Lavagem rápida em água;
- Três banhos em álcool 99,5% para desidratação do corte por dois minutos cada;
- Dois banhos em xilol, três minutos cada.

Após coloração foi feita a montagem final utilizando-se Entelan® e lamínula.

5.6 ANÁLISE HISTOPATÓLOGICA DESCRITIVA

A partir da análise das amostras coradas por HE foi realizada a descrição microscópica geral da área em cicatrização. A avaliação foi realizada por dois diferentes observadores com experiência e formação em histopatologia, acompanhados por alunos. Os cortes foram observados em microscópio óptico (Zeiss, Berlin, Alemanha) acoplado à câmera Axiostar Plus, em aumentos de 20x, 40x, 100x, em toda sua extensão. A partir desta avaliação, foi selecionada para captura digital (programas Axiovision e ZEN Lite 2012®, Zeiss, Berlin, Alemanha), uma região do corte que abrangesse todas as camadas da pele em cicatrização, em aumento de 100x, fornecendo assim uma observação panorâmica da região em reparo.

A descrição histopatológica realizada a partir da imagem panorâmica baseou-se nos critérios de qualidade e amadurecimento do tecido cicatricial (organização e densidade de fibras colágenas na matriz extracelular), intensidade e celularidade do infiltrado inflamatório e reepitelização e angiogênese.

5.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para análise histomorfométrica, quatro regiões ao longo da área cicatricial foram selecionadas para captura digital em aumento de 400x (programa ZEN Lite 2012®, Zeiss, Berlin, Alemanha). As regiões, sequencialmente, corresponderam à superfície da incisão, abrangendo a epiderme ou correspondente à sua localização, além de três regiões na derme (derme papilar, derme reticular e tecido subcutâneo sobre a fáscia muscular). As áreas capturadas para histomorfometria encontram-se destacadas na Figura 2.

Ressalta-se que as análises foram realizadas exclusivamente no tecido de granulação, excluindo-se as áreas de tecido maduro correspondente à pele não cicatricial remanescente.

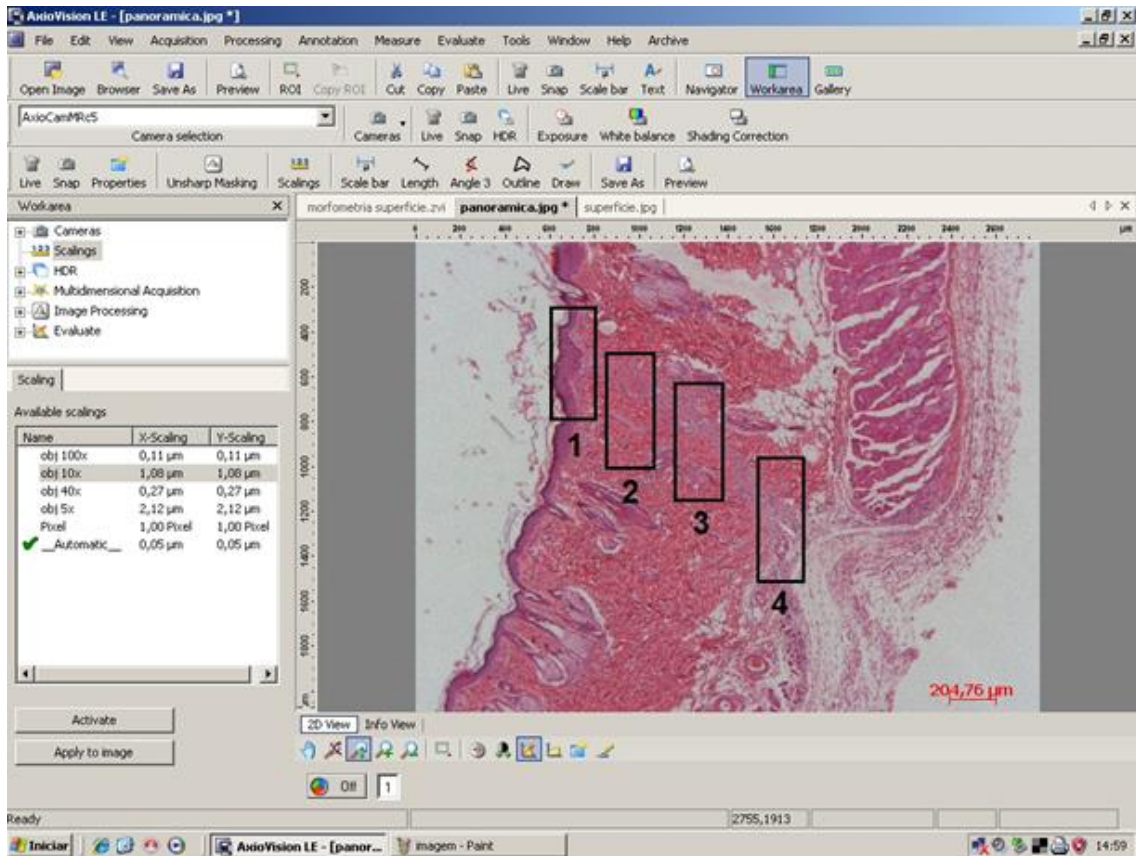


Figura 2. Áreas selecionadas para captura e realização de histomorfometria. Superfície da incisão com epiderme e derme papilar (1); derme reticular I (2), derme reticular II (3) e região profunda, subcutânea e muscular (4). Imagem realizada a partir da interface do programa axiovision.

5.7.1 Quantificação semiautomática do infiltrado inflamatório

A contagem dos elementos celulares polimorfonucleares e mononucleares foi realizada a partir das imagens capturadas em 400x, por meio de seleção manual. Foram excluídos aqueles leucócitos intravasculares e em rolamento. Os valores absolutos obtidos em cada amostra foram somados e o

resultado foi expresso por média aritmética simples (\pm DP), assim como o total das contagens de cada grupo.

5.7.2 Quantificação semiautomática de secções vasculares

A partir das análises das imagens capturadas em 400x, foi realizada manualmente a contagem de secções vasculares por campo, considerando-se um valor absoluto por luz observada, independente do calibre e da incidência de corte. Os valores obtidos em cada amostra foram somados e o resultado foi expresso por média aritmética simples (\pm DP), assim como o total das contagens de cada grupo.

5.7.3 Histomorfometria automática da matriz extracelular colagenosa

A determinação da quantidade de colágeno depositada na matriz extracelular foi realizada por meio de seleção automática a partir do programa ZEN Lite 2012[®] (Figura 3). Os valores foram expressos em μm^2 e o total de cada amostra foi somado e o resultado foi expresso por média aritmética simples (\pm DP), assim como o total das contagens de cada grupo.

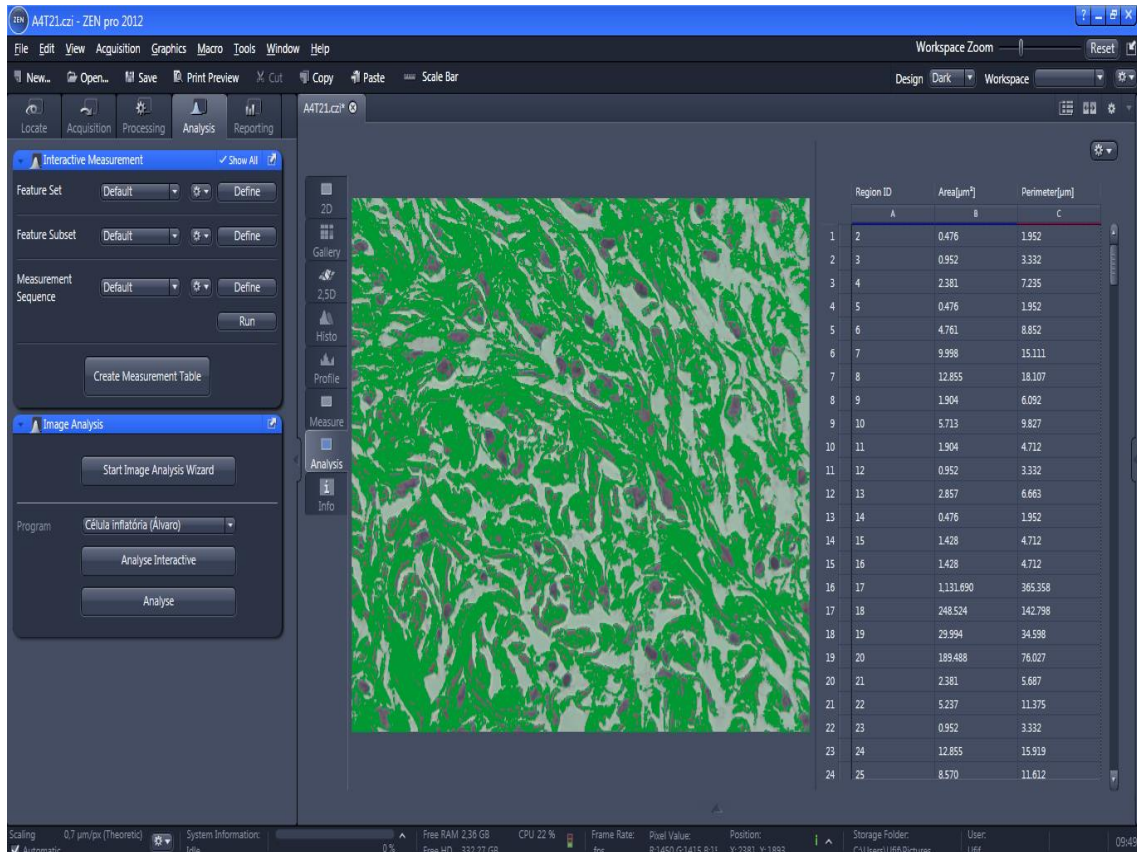


Figura 3. Marcação automática da área de fibras de colágeno, coloração HE, no programa ZEN Lite 2012®

5.8 EXPRESSÃO IN SITU DE TNF- α , INOS, TGF-B2 POR IMUNOISTOQUÍMICA

A imunoistoquímica foi realizada utilizando o complexo estreptoavidina-biotina peroxidase com o sistema Starr Trek Universal HRP Detection® (Biocare Medical, Califórnia, EUA). A técnica foi utilizada para detecção da expressão de TNF- α , iNOS, TGF- β 2. O método incluiu as seguintes etapas:

- Desparafinização em estufa a 60 °C por 30 minutos;
- Desparafinização em xilol I, II, III, cinco minutos cada;
- Reidratação em álcool 100%, 90%, 70%, três minutos cada;
- Banho em água destilada por cinco minutos;
- Bloqueio com peroxidase endógena (H_2O_2 + metano): dois banhos de 30 minutos cada;

- Recuperação antigênica: aquecer em banho maria (95 °C) com PBS por quarenta minutos;
 - Resfriamento por 20 minutos (temperatura ambiente);
 - Banho em PBS por um minuto;
 - *Background sniper*: adicionar quatro gotas e incubar por 15 minutos;
 - Remoção do excesso;
 - Incubação com anticorpo primário (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) por uma hora;
 - Banho em PBS: dois banhos de três minutos cada;
 - *Link Universal Trekkie*: quatro gotas. Incubar por 20 minutos;
 - Banho em PBS: dois banhos de dois minutos cada;
 - *Trek Avidim* – HRP label: estreptavidina. Dez minutos em temperatura ambiente;
 - Banho em PBS: dois banhos de três minutos cada;
 - *Betazoid DAB Chromogem*: uma gota (DAB) e um ml de tampão substrado por cinco minutos;
 - Banho em água destilada: dois banhos de dois minutos cada;
 - Banho em PBS por um minuto;
 - Contra-coloração com hematoxilina por dois minutos;
 - Banho em H₂O_d: dois banhos de dois minutos cada;
 - Banho em PBS por um minuto;
 - Desidratação em álcool 100%: três banhos de um minuto cada;
 - Desidratação em xilol: três banhos de um minuto cada;
 - Montagem da lâmina com Entelan[®] e lamínula.

O controle da reação imunistoquímica foi realizado comparando-se células marcadas e não marcadas em um mesmo campo microscópico.

Imagens de campos analisados foram obtidas usando o sistema de análise de imagem computadorizada ZEN Lite 2012[®]. Foi realizada captura de imagens de todos os cortes em 400x com câmera digital do microscópio Axiostar Plus (Zeiss, Berlin, Alemanha).

A avaliação microscópica foi realizada por meio do programa ZEM PRO 2012[®] e foram consideradas positivas aquelas células com colocação castanha intracitoplasmática. Os resultados foram expressos em média ± DP.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir do programa SPSS for Windows 16, foi utilizado o teste ANOVA para análise de variância, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados referentes ao estudo e a comparação das variáveis envolvidas nos ensaios foram expressos em números inteiros ou média \pm desvio padrão (DP).

Foram avaliados 5 feridas controle e 5 feridas tratadas de cada dia de pós operatório. Cada ferida foi analisada em 4 campos distintos por 2 observadores com experiência e formação em histopatologia, gerando um total de 20 campos analisados.

6 RESULTADOS

6.1 ACOMPANHAMENTO MACROSCÓPICO DA CICATRIZAÇÃO

Na avaliação macroscópica da lesão, foi observado que as feridas apresentaram cicatrização mais rápida no grupo tratado em comparação àquelas do grupo controle, sendo que diferença foi mais evidente no período entre os dias 14 e 21 (Figuras 4D e 4E, respectivamente).

Nos estágios iniciais, nos dias pós-operatórios 1 e 3 (Figuras 4A e 4B, respectivamente) foram observadas hiperemia e edema, características compatíveis com o estágio do processo de cicatrização fisiológica, sem diferença entre os grupos.

Após o 7º dia da cirurgia as feridas do grupo tratado apresentaram cicatrização discretamente melhor que as do grupo controle com coaptação dos bordos e resquícios de crosta, enquanto que no grupo controle as feridas ainda exibiam áreas hiperêmicas intercaladas com formação de crosta úmida (Figura 4C).

Já ao 14º dia pós-operatório observou-se retração maior da ferida tratada quando comparada à ferida do grupo controle, além da persistência da hiperemia no grupo controle em relação ao grupo teste (Figura 4D).

Após 21 dias de pós-operatório a ferida tratada apresentou-se quase completamente cicatrizada, ao contrário do grupo controle no qual a cicatriz ainda era evidente (Figura 4E).

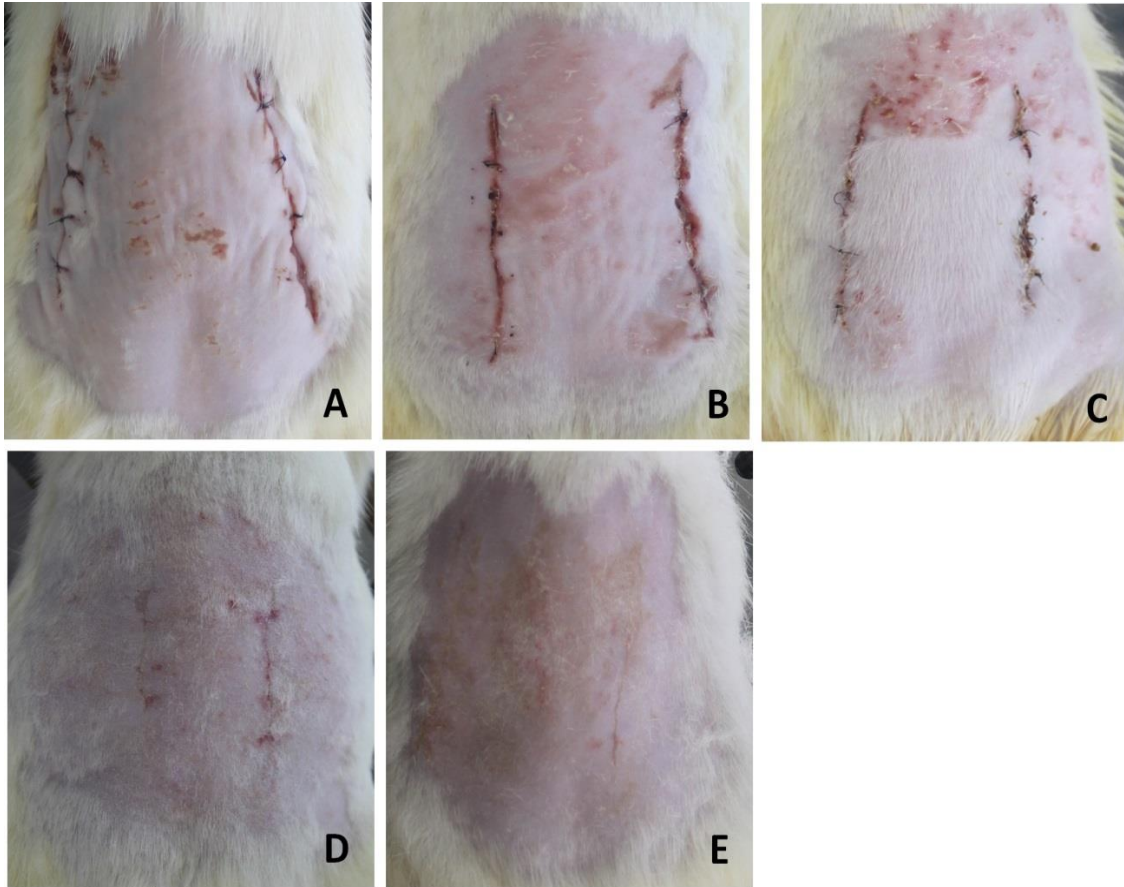


Figura 4. Aspecto macroscópico da cicatrização das feridas cutâneas cirúrgicas. Lesão esquerda: grupo tratado; lesão direita: grupo controle. (A) Primeiro dia após a cirurgia. Ambas as feridas cirúrgicas exibem bordas cruentas. (B) Terceiro dia após a cirurgia. Observam-se bordas mais coaptados no grupo tratado. (C) Sétimo dia após a cirurgia. Destaca-se a crosta mais imatura na ferida não tratada. (D) Décimo quarto dia após a cirurgia. Observa-se maior retração da ferida no grupo tratado. (E) Vigésimo primeiro dia após a cirurgia. A linha cicatricial é evidente no grupo controle enquanto há cicatrização quase total do grupo tratado.

6.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA E HISTOMORFOMETRIA

O número de vasos neoformados no grupo controle e tratado foi semelhante nos estágios iniciais de cicatrização. No entanto, ao 3º dia de pós-operatório os vasos do grupo tratado eram mais maduros quando comparados ao grupo controle (Figura 5C). Ao sétimo dia de pós-operatório a angiogênese foi mais evidente no grupo tratado em relação ao grupo controle, apresentando um maior número de vasos neoformados (Figura 5D). Após 14 dias da cirurgia a formação vascular se mostrava muito mais evidente no grupo tratado.

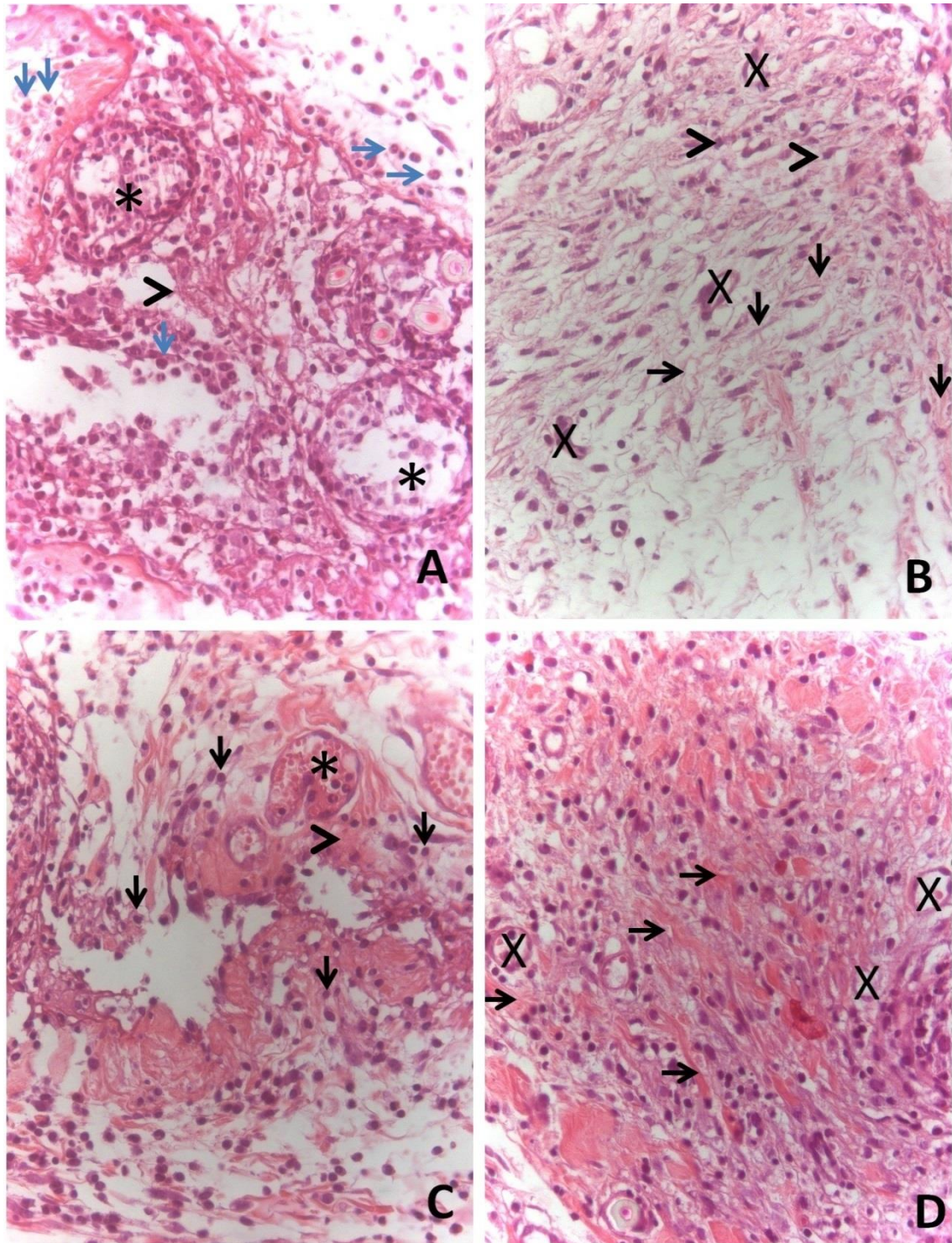


Figura 5. Corte histológico de amostra cutânea de ratos Wistar. (A) Infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos (setas azuis), intensa angiogênese (asterisco) e formação fibrinosa (cabeça de seta). Grupo controle. Terceiro dia pós-operatório. (B) Observa-se angiogênese (X) e fibras colágenas (setas). Grupo controle. Sétimo dia pós-operatório. (C) Infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos (setas), angiogênese (asterisco) e formação fibrinosa (cabeça de seta). Grupo tratado. Terceiro dia pós-operatório. (D) Observam-se vasos neoformados mais maduros em relação às amostras não tratadas (X) e fibras colágenas mais densas (setas). Grupo tratado. Sétimo dia pós-operatório. Coloração por hematoxilina e eosina. Aumento original de 400x.

Foi evidente a prevalência da formação de novos vasos sanguíneos no grupo tratado quando comparado ao grupo controle, sendo esta diferença minimizada ao 21º dia de pós-operatório (Gráfico 1).

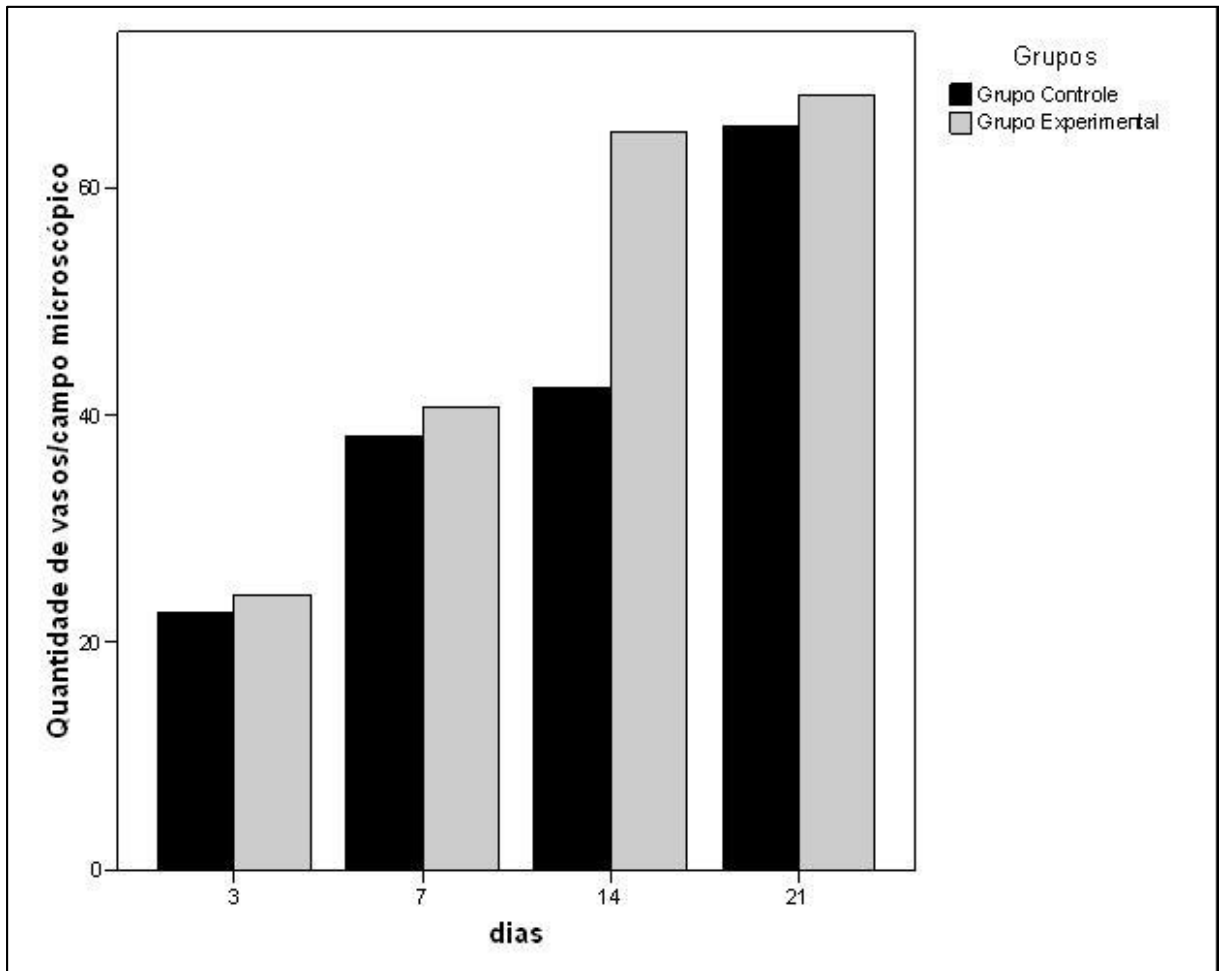


Gráfico 1. Quantidade de seções vasculares por campo microscópico. Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no 14º dia de pós-operatório. Resultados expressos em média aritmética.

O processo de cicatrização das feridas cutâneas foi melhor no grupo tratado quando comparado ao grupo controle em todos os tempos de pós-operatório, exceto ao 1º dia, no qual a cicatrização em ambos os grupos apresentava aspectos semelhantes e consistentes com a fase inicial da cicatrização fisiológica.

Foi possível observar que não houve diferença significativa na contagem de leucócitos entre os grupos, tratado e controle em nenhum tempo de cicatrização (Gráfico 2).

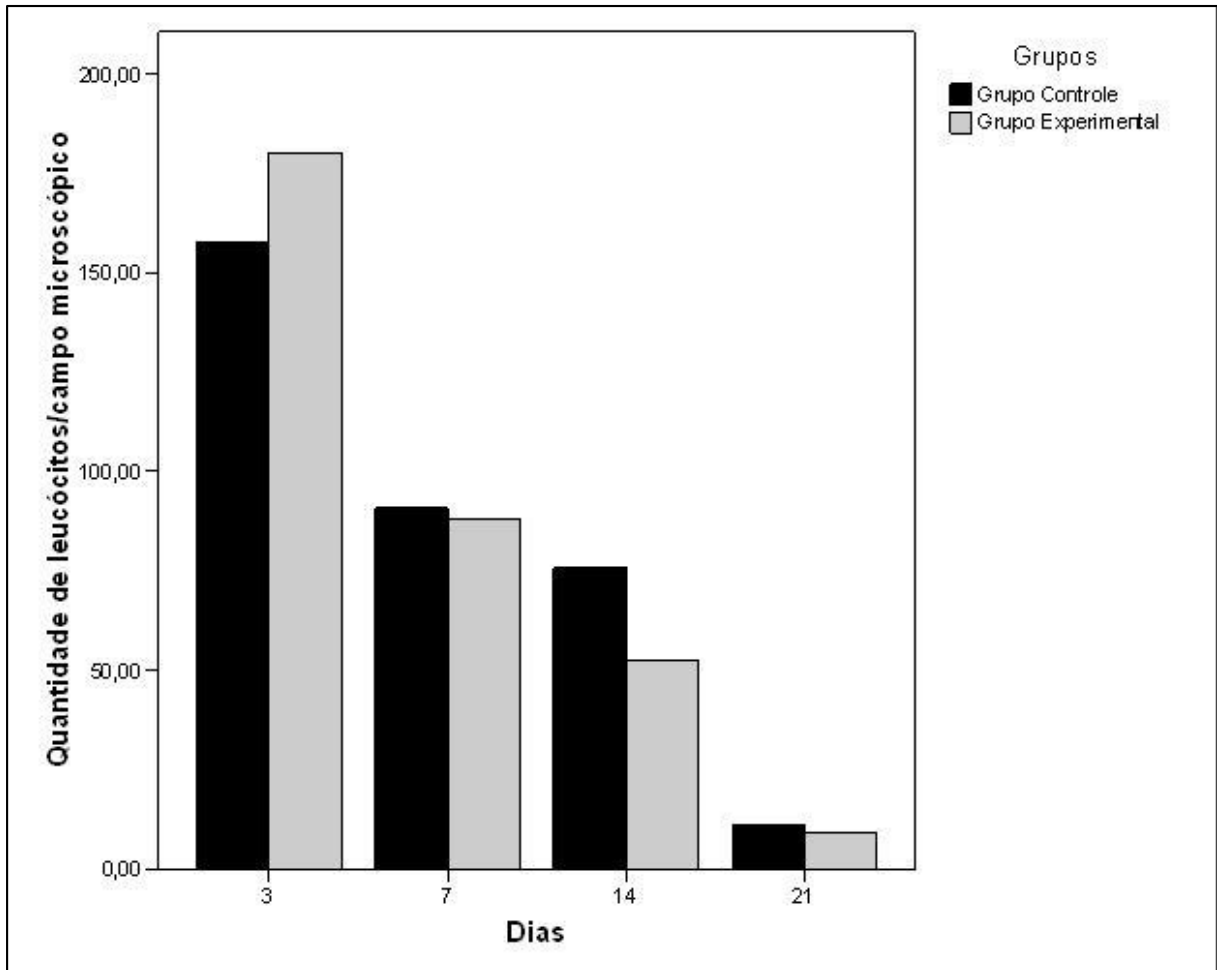


Gráfico 2. Quantidade de leucócitos por campo microscópico. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Resultados expressos em média aritmética.

No dia 3 de pós-operatório foi observada uma maior cobertura superficial pelo coágulo no grupo tratado em relação ao grupo controle, além da maior presença do infiltrado inflamatório no grupo tratado (Figura 6D).

Ao 7º dia de pós-operatório as bordas epiteliais e as camadas dérmicas do grupo tratado se mostravam mais estáveis enquanto, no grupo controle as feridas ainda eram preenchidas por tecido cicatricial imaturo. O tecido de granulação das dermes papilar e reticular estava denso e mais maduro no grupo tratado, não havendo diferença no grau de reepitelização entre os grupos, tratado e controle. (Figura 6B e 6F, respectivamente).

O tecido subcutâneo do grupo controle ao 14º dia apresentou maior desorganização do plano muscular. Foi possível observar reepitelização e formação de queratina em ambos os grupos, porém a organização da arquitetura celular era maior no grupo tratado, além de evidente maior maturação da camada subepitelial

no grupo tratado quando comparado ao grupo controle (Figuras 6C e 6G, respectivamente).

Após 21 dias de pós-operatório, ambos os grupos apresentavam reepitelização e formação da camada de queratina semelhantes, porém no grupo tratado foi possível notar a formação de anexos epidérmicos, ao contrário do grupo controle. Ainda observaram-se fibras musculares evidentes e organizadas no grupo tratado quando comparado ao grupo controle (Figuras 6H e 6D, respectivamente).

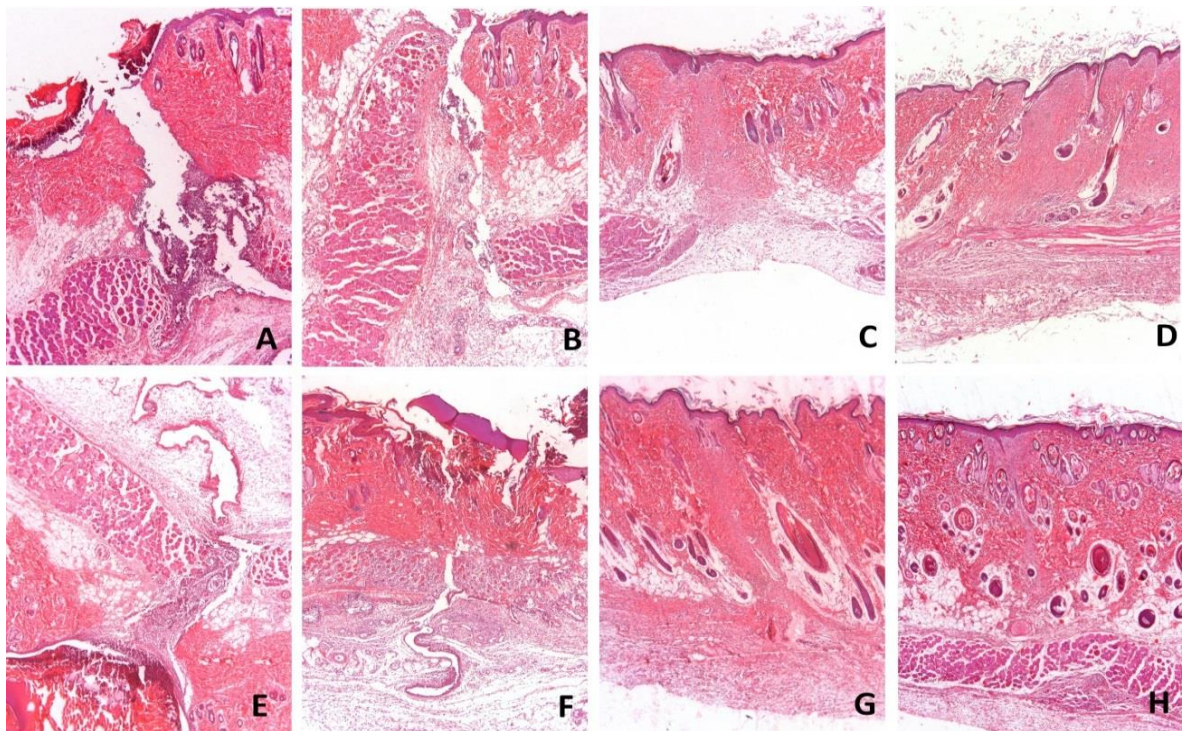


Figura 6. Corte histológico de amostra cutânea de ratos Wistar. (A) Observa-se menor cobertura superficial de coágulo. Grupo controle. Terceiro dia pós-operatório (B) Observa-se reepitelização. Grupo controle. Sétimo dia pós-operatório. (C) Nota-se menor fechamento da ferida. Grupo controle. Sétimo dia pós-operatório (D) Observa-se formação de camada muscular. Grupo controle. Vigésimo primeiro dia pós-operatório. (E) Nota-se maior cobertura superficial de coágulo. Grupo tratado. Terceiro dia pós-operatório. (F) Observam-se bordas epiteliais e camadas da derme mais estáveis. Grupo tratado. Sétimo dia pós-operatório. (G) Destaca-se maior fechamento da ferida. Grupo tratado. Décimo quarto dia pós-operatório. (H) Destaca-se formação de anexos epidérmicos na área cicatricial e camada muscular mais organizada e madura. Grupo tratado. Vigésimo primeiro dia pós-operatório. Coloração por hematoxilina e eosina. Aumento original de 100x.

A análise automática da deposição de colágeno na matriz extracelular foi semelhante em ambos os grupos nos dias 3 e 7, quando gradualmente, as amostras provenientes do grupo teste exibiram aumento dos feixes de colágeno. Este

aumento foi visivelmente expressivo entre os dias 7 e 14. A partir deste dia, observou-se discreto aumento no grupo teste (do dia 14 para o dia 21) e pequena redução no grupo controle (no mesmo intervalo de tempo) (Figura 7).

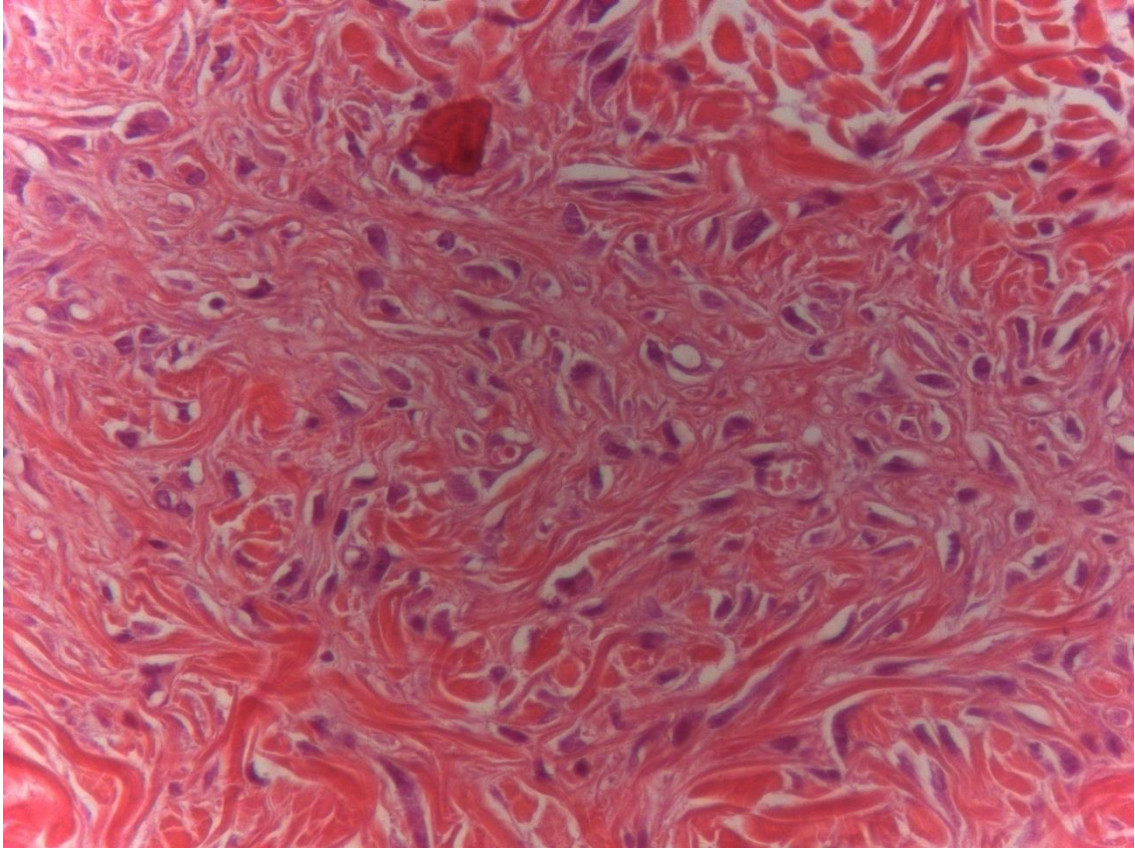


Figura 7. Imagem de corte histológico corado em HE. Destaca-se a formação de colágeno na área cicatricial. Aumento original de 400x.

A área de deposição de feixes de colágeno, em μm^2 , encontra-se representadas no gráfico 3.

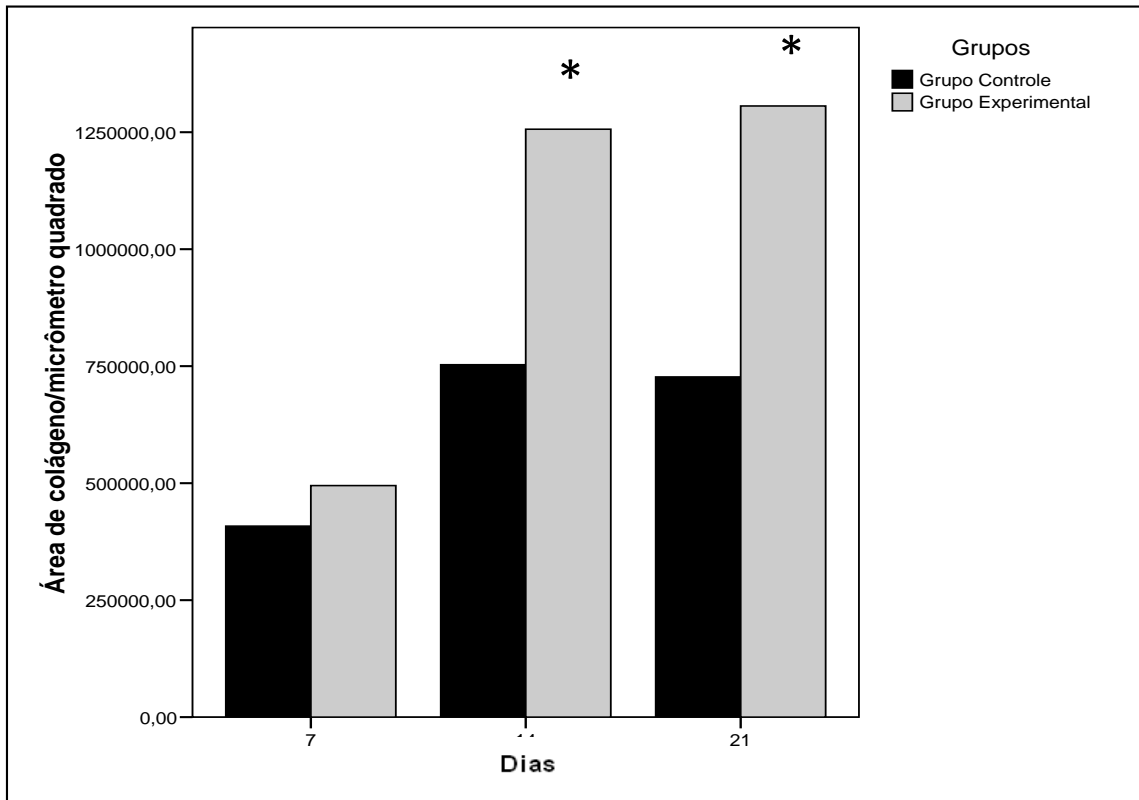


Gráfico 4. Área de colágeno por μm^2 . Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos dias 14 e 21 pós-operatório ($p < 0,05$). Resultados expressos em média aritmética.

6.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Ao 7º dia, 20% das células inflamatórias estavam marcadas positivamente para iNOS no grupo controle e, no grupo tratado, 70% destas células estavam marcadas positivamente pela expressão de iNOS. Já ao 14º dia, a marcação para iNOS foi de 20 e 80% para os grupos controle e tratado, respectivamente (Figura 8).

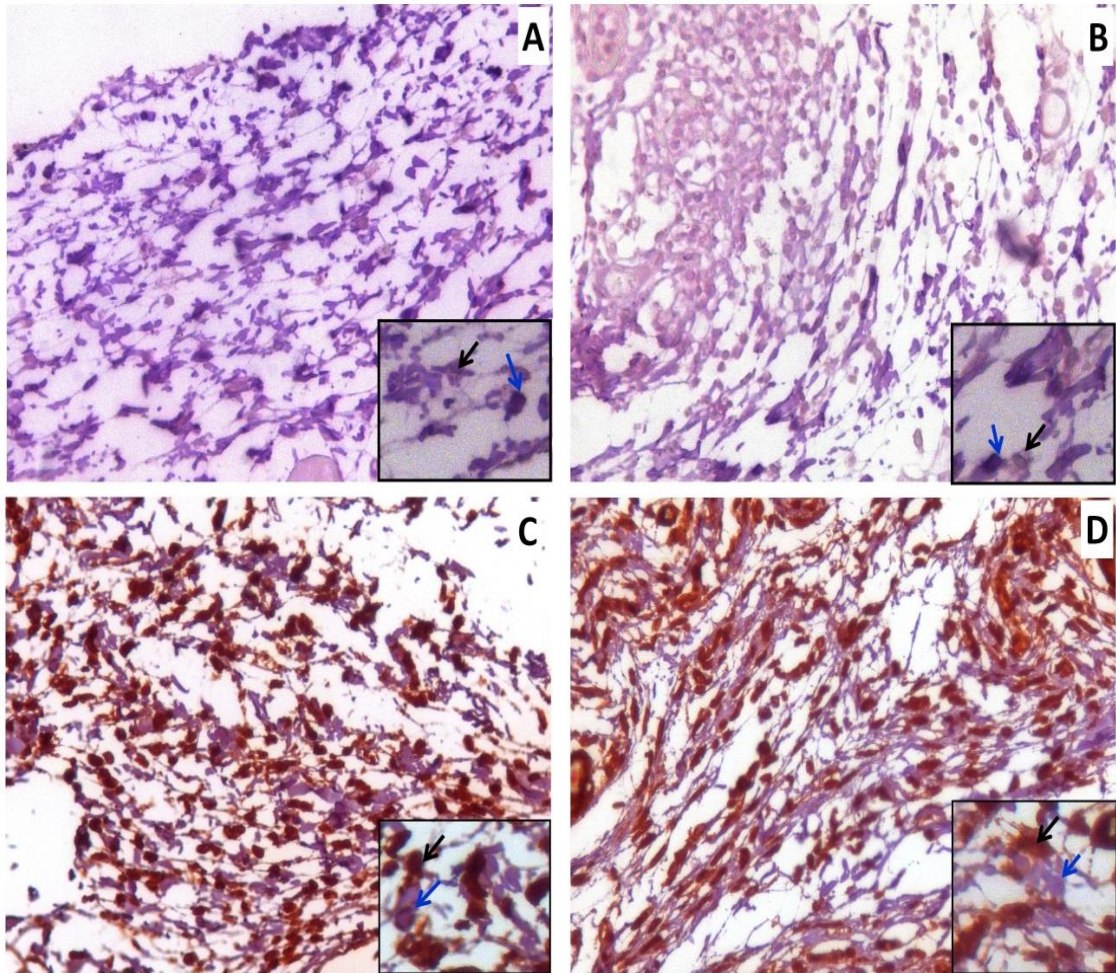


Figura 8. Expressão positiva de iNOS (seta preta) e células inflamatórias não marcadas positivamente para iNOS (seta azul). (A) Grupo controle. Sétimo dia pós-operatório. (B) Grupo controle. Décimo quarto dia pós-operatório. (C) Grupo tratado. Sétimo dia pós-operatório. (D) Grupo tratado. Décimo quarto dia pós-operatório. Aumento original de 400x.

Observou-se através da análise imunoistoquímica maior expressão de iNOS no grupo tratado quando comparado ao grupo controle, sendo essa diferença significativa nos dias 3, 7, 14 (Gráfico 4).

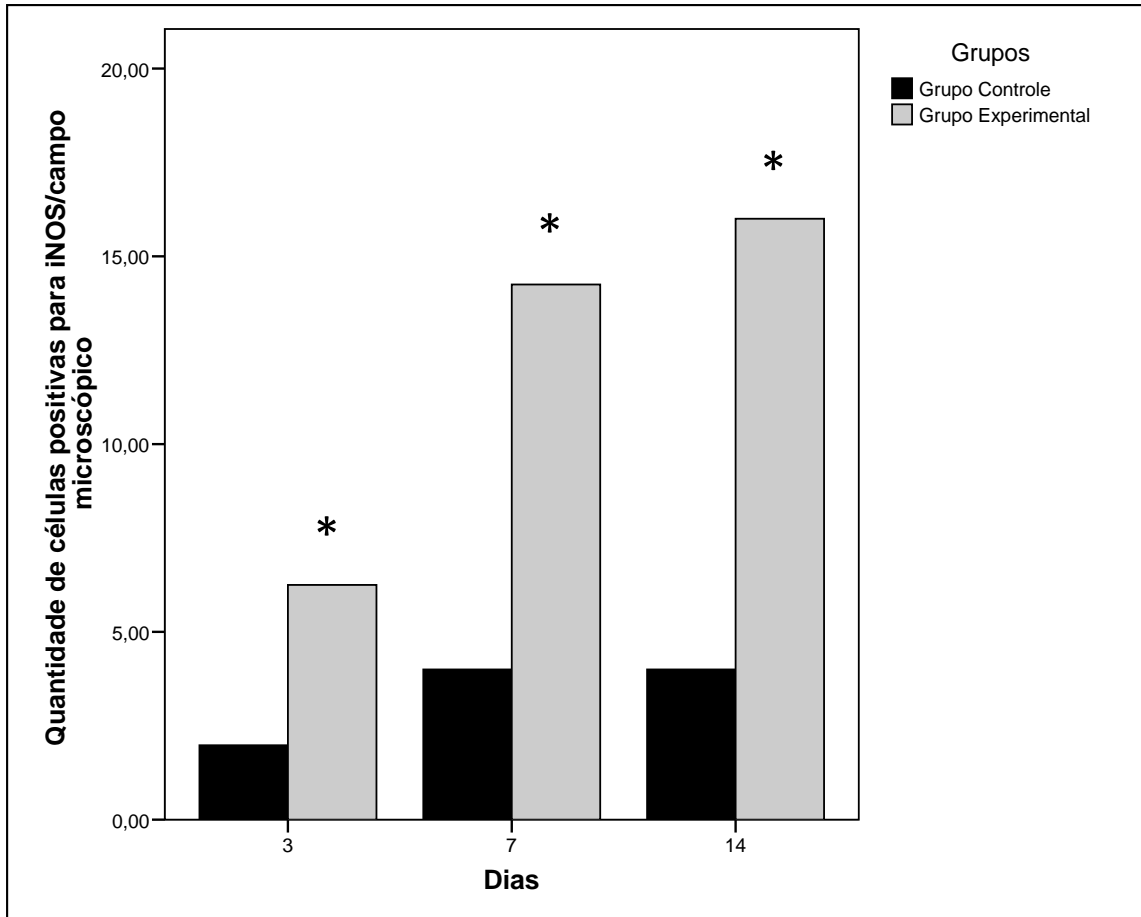


Gráfico 5. Quantidade de células que expressaram positivamente iNOS por μm^2 . Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao terceiro, sétimo e décimo quarto dias de pós-operatório. Resultados expressos em média aritmética.

No dia 7, 60% das células inflamatórias estavam marcadas positivamente para TGF- β 2 no grupo controle, enquanto 80% destas células eram marcadas positivamente no grupo tratado. Já no dia 14, 80% das células estavam marcadas positivamente para TGF- β 2 no grupo controle e 90% no grupo tratado (Figura 9).

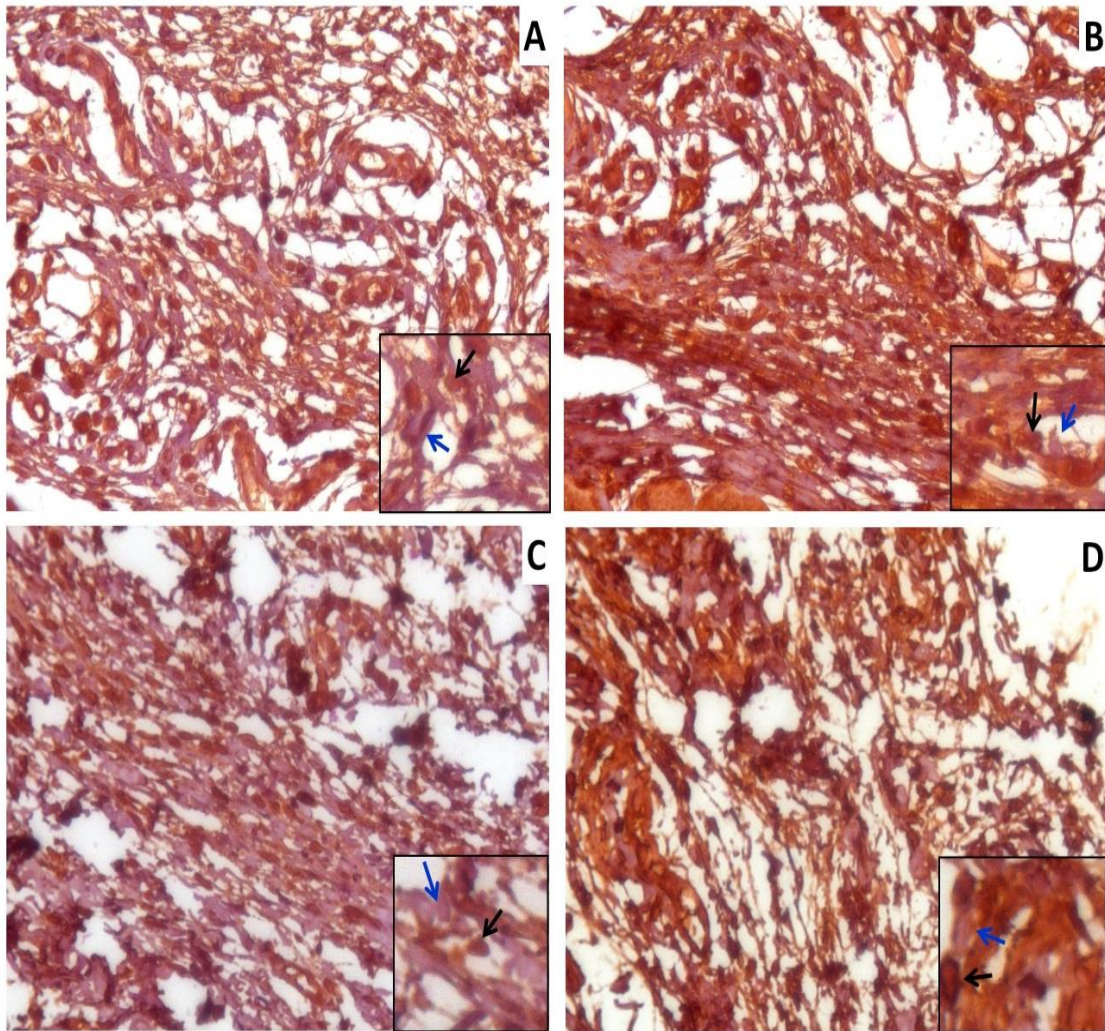


Figura 10. Expressão positiva de TGF- β 2 (seta preta) e células inflamatórias não marcadas positivamente para TGF- β 2 (seta azul). (A) Grupo controle. Sétimo dia pós-operatório. (B) Grupo controle. Décimo quarto dia pós-operatório. (C) Grupo tratado. Sétimo dia pós-operatório. (D) Grupo tratado. Décimo quarto dia pós-operatório. Aumento original de 400x.

A análise imunoistoquímica para TGF- β 2 não mostrou diferença significativa entre os grupo tratado e controle em nenhum tempo de pós-cirúrgico (Gráfico 5).

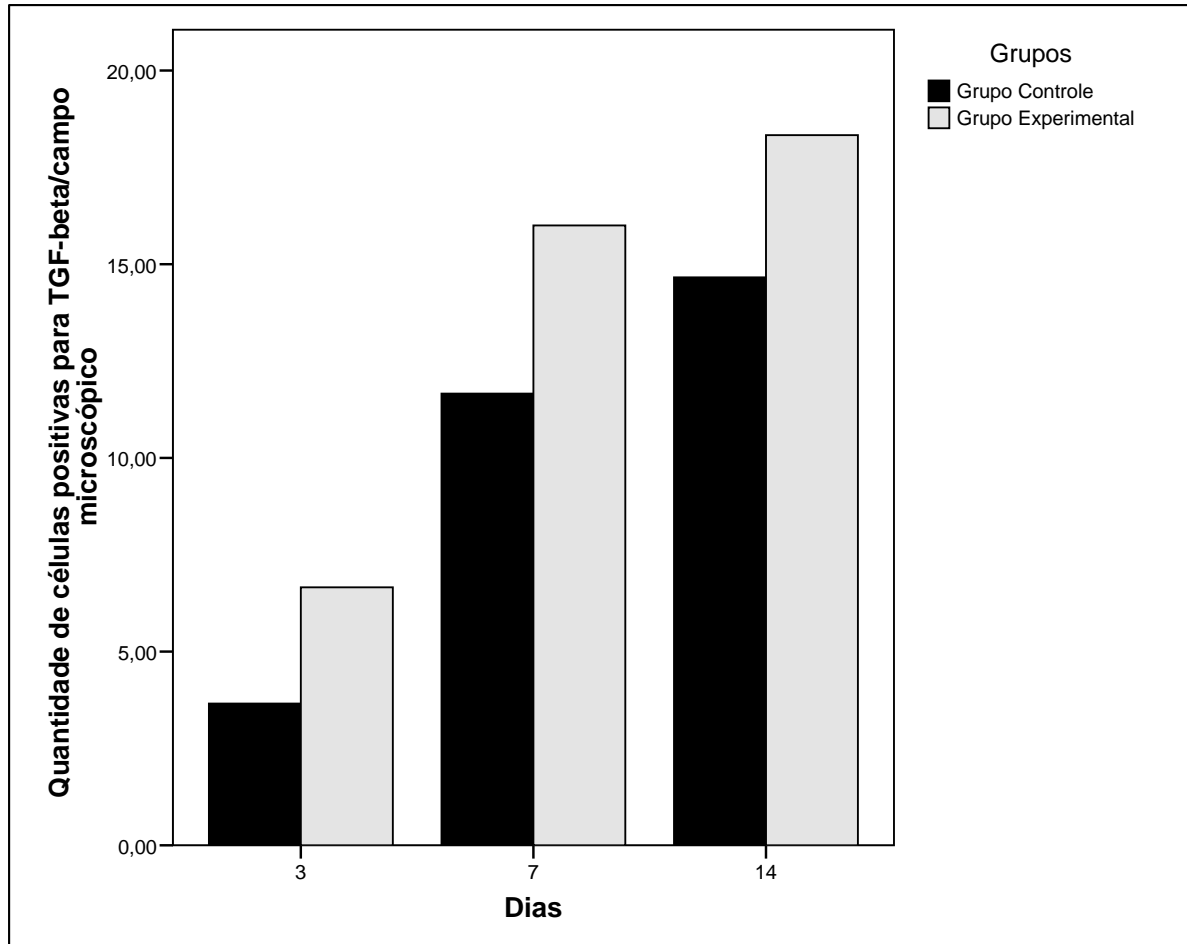


Gráfico 6. Quantidade de células que expressaram positivamente TGF- β 2 por campo microscópico. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Resultados expressos em média aritmética.

Foi realizada ainda a análise imunistoquímica para detecção de TNF- α (Figura 10).

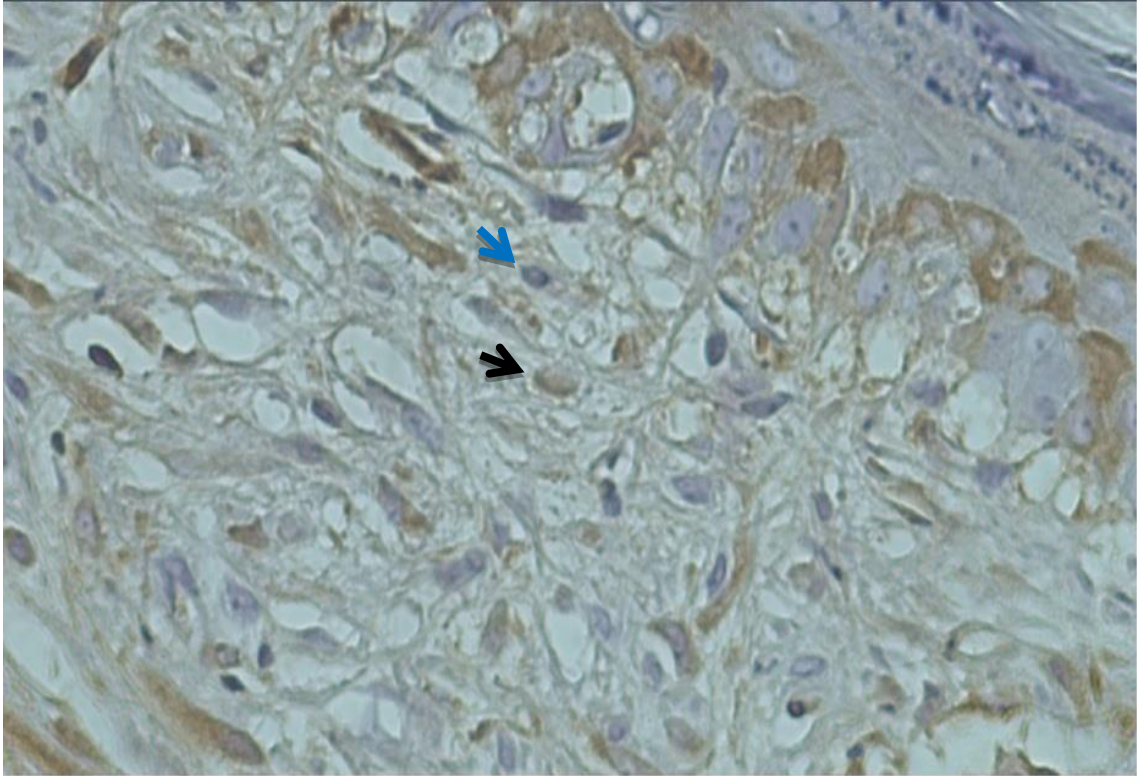


Figura 11. Imagem representativa de corte histológico marcando a expressão positiva (seta preta) para TNF- α e células inflamatórias não marcadas positivamente para TNF- α (seta azul) através do processo de imunohistoquímica. Aumento original de 400x.

A análise imunohistoquímica revelou diferença estatisticamente significativa na expressão de TNF- α ($p = 0,022$) do dia 3 para os dias 7 e 14 ($p = 0,06$ e $p = 0,043$, respectivamente), entretanto, os dias 7 e 14 não se diferenciam entre si ($p > 0,05$). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos de tempo analisados, apesar de ser observada modulação da expressão desta citocina no grupo tratado a partir do dia 7 e mais evidente no dia 14 (Gráfico 6).

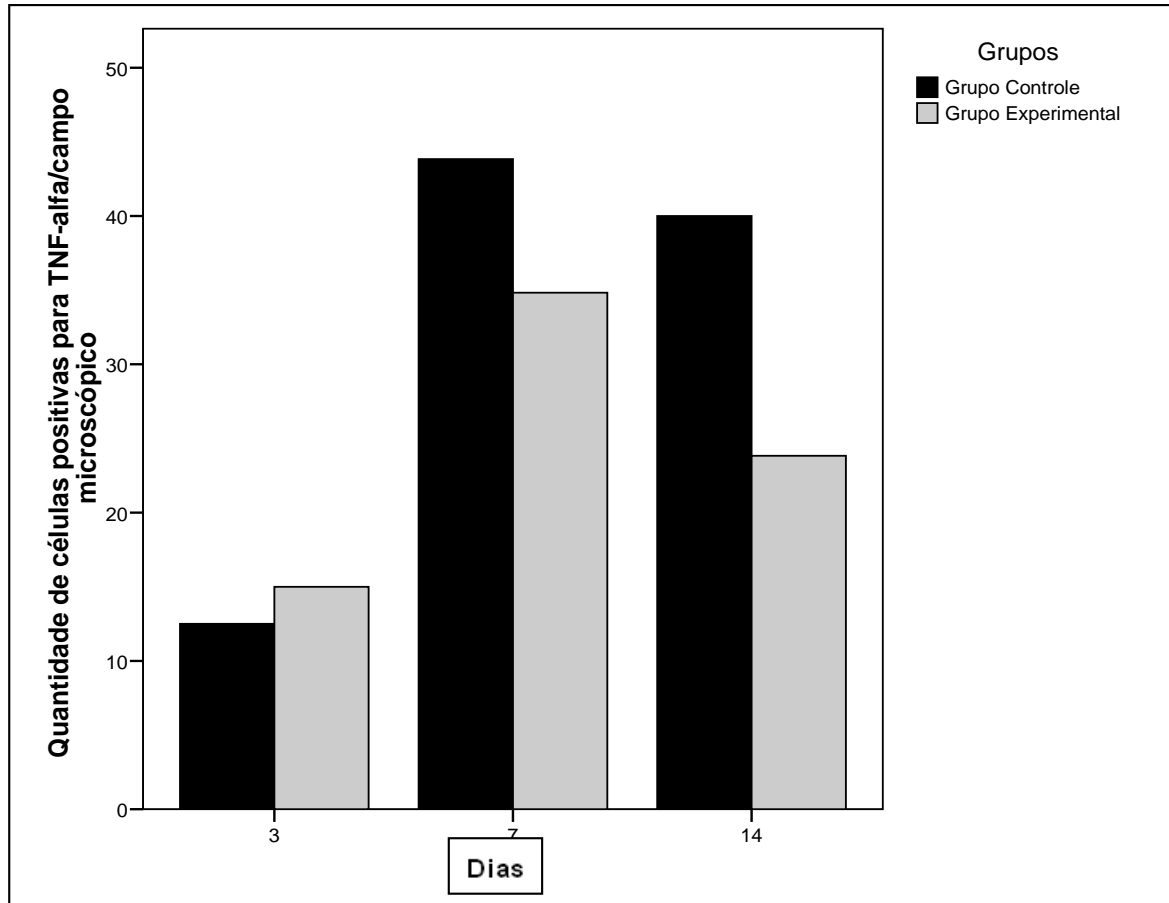


Gráfico 7. Número de células que expressaram positivamente TNF- α por campo microscópico. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados os intervalos de tempo entre os grupos. Resultados expressos em média aritmética.

7 DISCUSSÃO

A EMD gel, através de vários estudos, se mostrou eficiente na cicatrização de tecidos moles (AL-HEZAIMI et al., 2012; MIRASTSCHIJSKI et al., 2004). No presente estudo, foi avaliada a efetividade da EMD gel na cicatrização de feridas cutâneas cirúrgicas em ratos *Wistar* nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 de pós-cirúrgico, Foram observadas as camadas epitelial, derme papilar, dermes reticulares I e II e tecido subcutâneo, incluindo o plano muscular. Ratificando resultados de estudos anteriores, foi observado que a EMD gel acelera a cicatrização de tecidos moles (MIRASTSCHIJSKI et al., 2004). Notou-se que a EMD gel aumentou a quantidade de tecido de granulação além de acelerar a completa reepitelização de formação de anexos epidérmicos.

Os resultados do presente estudo demonstraram que no período próximo ao dia 7 até o dia 14 houve significativa deposição de colágeno em ambos os grupos, porém destacadamente mais intensa no grupo tratado. Entre os dias 7 e 14 houve estabilização da quantidade depositada, sugerindo que, após alta atividade de síntese, a matriz extracelular entrou em sua fase de remodelamento. Observa-se que a deposição de colágeno independe dos níveis de TGF- β 2 nas amostras estudadas, sugerindo que a EMD gel estimula a síntese da matriz extracelular por outra via.

Fibroblastos migram para iniciar a fase proliferativa da cicatrização e depositam uma nova matriz extracelular. A nova matriz de colágeno então se organiza na fase final da remodelação (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Nos primeiros dias de pós-operatório não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, entretanto existiu diferença estatística em função do tempo dentro do mesmo grupo, durante todo o período pós-operatório. O colágeno tipo I predomina na matriz extracelular de humanos além de predominar também no periodonto (SCHROEDER, 1986).

Mirastschijski et al. (2004) avaliaram o tempo de cicatrização em feridas circulares com 2 cm de diâmetro e espessura total na pele de coelhos e observaram que a cicatrização ocorreu duas vezes mais rápida no grupo tratado com EMD gel quando comparada ao grupo controle. Os pesquisadores ainda notaram maior formação e resistência do tecido de granulação no grupo tratado, assim como menor

formação de cicatriz, mais rápido fechamento da ferida com cobertura epitelial e maior maturidade da arquitetura do tecido cicatricial no grupo tratado quando comparado ao grupo controle, mostrando uma cicatrização avançada no primeiro grupo (MIRASTSCHIJSKI et al., 2004). Na pesquisa de Mirastschijski et al. (2004) a análise histopatológica ocorreu apenas ao 28º dia de pós-operatório, enquanto no presente estudo esta avaliação aconteceu ao 1º, 3º, 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório. Além disso, nesta pesquisa a EMD gel foi aplicada tanto entre as bordas da ferida quanto topicamente, após a sutura.

A absorção tanto pela hidroxiapatita e colágeno, quanto pela raiz exposta da EMD gel no tratamento periodontal forma um complexo esférico que permanece detectável no sítio tratado por até 4 semanas após a aplicação (HAMAMOTO et al., 2002; SCULEAN et al., 2002). Porém, não se sabe por quanto tempo as proteínas da EMD gel permanecem dentro da ferida cutânea, sendo que a aproximação dos bordos da ferida e sutura podem ter atuado como fator de proteção para sua ação prolongada nas camadas mais profundas do tecido.

Em outros estudos, observou-se que a aplicação tópica da EMD gel acelerou a cicatrização de tecidos, além de reduzir o desconforto do pós-operatório (LYNGSTADAAS et al., 2009; WENNSTRÖM; LINDHE, 2002). De acordo com Weinberg et al. (2010), a EMD gel induz a proliferação de células fibroblásticas e aumenta o recrutamento de células mesenquimais, porém tem efeito citostático para células epiteliais, ao contrário dos resultados do presente estudo que mostrou a cicatrização acelerada em tecido cutâneo tratado com EMD gel.

Sabe-se que a EMD gel aumenta a angiogênese, formação de tecido de granulação e proliferação de fibroblastos através de VEGF, PDGF, IL-6 e MMP-2 (LYNGSTADAAS et al., 2009; MIRASTSCHIJSKI et al., 2004; SUZUKI et al., 2005). Além disso, promove maior propagação e proliferação de células epiteliais acarretando na cicatrização mais rápida (AL-HEZAIMI et al., 2012; MIRASTSCHIJSKI et al., 2004). Tal afirmação foi ratificada no presente estudo no qual, a partir do dia 7 observou-se maior fechamento da ferida no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Ao avaliar todos os períodos de pós-operatório tanto no grupo tratado quanto no controle, foi possível notar que todas as camadas da pele apresentaram maturidade e organização da sua estrutura, mais precoce no grupo tratado.

A EMD gel auxilia na cicatrização devido ao seu efeito antibacteriano (ARWEILER et al., 2002; NEWMAN et al., 2003; SCULEAN et al., 2001; VOWDEN et al., 2006). Parkar e Tonetti (2004) relataram o efeito anti-inflamatório da EMD gel a partir da diminuição de genes inflamatórios enquanto genes relacionados a moléculas que promovem o reparo e o crescimento aumentam. No presente estudo não foi encontrada diferença significativa na expressão de TGF- β 2 entre os grupos tratado e controle.

A EMD gel desencadeia a expressão de vários fatores envolvidos no processo de cicatrização, crescimento e regeneração por células mesenquimais (LYNGSTADAAS et al., 2009; RESELAND et al., 2006).

Para uma boa cicatrização é preciso a formação de tecido de granulação, o qual depende da angiogênese que se mostra de grande importância para tal processo. VEGF é um fator de crescimento diretamente relacionado à neo-angiogênese e à modulação do recrutamento e atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Além disso, estimula osteoblastos através da modulação de outros fatores osteoindutores como TGF- β 1, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) (CARANO; FILVAROFF, 2003). Foi observado, imunoistoquimicamente, que a expressão de VEGF e a densidade dos vasos aumentou significativamente nas bolsas periodontais tratadas com EMD gel após 48 horas da sua aplicação (ASPRIELLO et al., 2011). Os resultados histológicos do presente estudo mostraram que o sítio tratado com EMD gel teve um incremento da angiogênese, principalmente no dia 14 de pós-operatório.

TGF- β 2 é uma citocina pleiotrópica que estimula a regulação da função vascular, hemostasia, facilita a migração de queratinócitos da ferida e, além de uma reepitelização bem sucedida, estimula os fibroblastos a depositarem novas proteínas da matriz extracelular que suportam o crescimento celular e de vasos na angiogênese (NOKHBEHSAIM et al., 2012). O presente estudo mostrou maior número de células marcadas positivamente para TGF- β 2 no grupo tratado, porém a diferença entre este grupo e o grupo controle não foi estatisticamente significativa.

O iNOS apresenta um importante papel no reparo tecidual participando da angiogênese, proliferação celular, deposição de matriz e remodelação, sendo sugerido como um dos fatores relacionados à cicatrização da pele e do músculo (FILIPPIN et al., 2011; PAULSEN; WURSTER; NANNEY, 1998). Al-Hezaimi et al.

(2012) avaliaram os efeitos da EMD gel em feridas cutâneas no dorso de porquinhos-da-índia ao 5º, 20º e 35º dias de pós-operatório. A avaliação histológica dos pesquisadores revelou um maior fechamento da ferida nos sítios tratados com EMD gel, além de maior formação e organização de tecido conectivo e plano muscular, sugerindo que a modulação dos níveis de iNOS poderiam ter promovido a cicatrização.

Até este momento, o presente estudo foi o único que avaliou imunistoquimicamente os níveis de iNOS no tratamento de feridas cutâneas com EMD gel, sugerindo que o aumento dos níveis de iNOS auxiliam na redução do tempo de cicatrização destas feridas.

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que induz a apoptose de osteoblastos e também reduz a produção de colágeno tipo I (CHUA et al., 2002). A EMD gel demonstra propriedades anti-inflamatórias e, no sangue, a liberação de TNF- α é reduzida pela presença de EMD gel (MYHRE et al., 2006). No presente estudo, a expressão de TNF- α foi avaliada *in situ*. Foi avaliado o número de células que expressaram TNF- α em todos os períodos de pós-operatório. Notamos que, apesar da redução da expressão de TNF- α no grupo tratado em relação ao grupo controle, a diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum período de cicatrização. Porém a diferença foi significativa entre os tempos de pós-operatório em ambos os grupos.

Dentre os mediadores inflamatórios periodontais, o TNF- α é a citocina onipresente, conhecida por sua ação pró-apoptótica em vários tipos celulares, incluindo fibroblastos (REID; LOUIE; HELLER, 1994; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003; WALLACH et al., 1997). Além do efeito mitogênico da EMD gel em fibroblastos gengivais (ZELDICH et al., 2007b), observou-se que a EMD gel previne a morte celular em resposta a mediadores inflamatórios (ZELDICH et al., 2007a). A prevenção da sinalização do TNF- α pode minimizar os efeitos prejudiciais da inflamação gengival e promover a cicatrização (GRAVES; COCHRAN, 2003).

No presente estudo, o tratamento com a EMD gel foi eficaz no controle dos níveis de TNF- α *in situ* a partir do dia 7 até o dia 14, e, apesar de ser observada maior expressão desta citocina no grupo não tratado, não foram observadas diferenças significativas de tempo analisados.

Al-Hezaimi et al. (2012) observaram ainda uma relação da aplicação da EMD gel com a maturidade e organização do plano muscular. O presente estudo mostra esta estabilidade do plano muscular encontrada no grupo tratado. Ao 14º dia de cicatrização foi possível notar no grupo tratado uma maior maturidade e organização do plano muscular no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. A diferença entre os dois grupos se mostra ainda mais evidente ao 21º dia de cicatrização. Dessa forma, observa-se que nas amostras do presente estudo a EMD gel atuou positivamente na cicatrização não apenas da pele, mas também do plano muscular, induzindo a sua regeneração. Sugere-se então, a partir da presente pesquisa, que a EMD gel induz a síntese de fatores envolvidos na formação de fibras musculares, incluindo o iNOS, abrindo portas para novos estudos que possam pesquisar esta atuação.

8 CONCLUSÃO

A EMD gel melhorou e acelerou a cicatrização de feridas cutâneas nas amostras do presente estudo, inicialmente potencializando a angiogênese e a deposição de colágeno, modulando a produção de NO via iNOS em fase mais tardia do reparo.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B. J. **Histologia essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ABOLFAZLI, N. et al. A comparative study of long term results of root coverage with connective tissue graft or enamel matrix protein: 24-month results. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, Valencia, v. 14, n. 6, p. 304-309, jun. 2009.

AL-HEZAIMI, K.; AL-ASKAR, M.; AL-RASHEED, A. Characteristics of newly-formed cementum following emdogain application. **International journal of oral science**, Chengdu, v. 3, n. 1, p. 21-26, Jan 2011.

AL-HEZAIMI, K. et al. Effect of enamel matrix derivative protein on the healing of standardized epithelial wounds: a histomorphometric analysis in vivo. **International wound journal**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 436-441, Aug 2012.

ARWEILER, N. B. et al. Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality. **Clinical oral investigations**, Berlin, v. 6, n. 4, p. 205-209, Dec 2002.

ASPRIELLO, S. D. et al. Effects of enamel matrix derivative on vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in gingival tissues of periodontal pocket: a comparative study. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 82, n. 4, p. 606-612, Apr 2011.

BALIGA, R. S. et al. AIDS-related vasculopathy: evidence for oxidative and inflammatory pathways in murine and human AIDS. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, Bethesda, v. 289, n. 4, p. H1373-1380, Oct 2005.

BATISTA, A. C. et al. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral diseases**, Copenhagen, v. 8, n. 5, p. 254-260, Sep 2002.

BRATTHALL, G. et al. Comparison of ready-to-use EMDOGAIN®-gel and EMDOGAIN® in patients with chronic adult periodontitis. A multicenter clinical study. **Journal of clinical periodontology**, Malden, v. 28, n.10, p. 923-929, Oct 2001.

BROOKES, S. J. et al. The human amelogenin c-terminal sequence is completely homologous to the C-terminal sequence of amelogenin in all species so far studied. **Journal of dental research**, Thousand Oaks, v. 73, n.4, p. 716-717, Apr 1994.

CARANO, R. A.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug discovery today**, Kidlington, v. 8, n. 21, p. 980-989, Nov 2003.

CHUA, C. C. et al. TGF- β 1 inhibits multiple caspases induced by TNF- α in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1593, n. 1, p. 1-8, Dec 2002.

COCHRAN, D. L. et al. The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 74, n. 7, p. 1043-1055, Jul 2003.

CONDE, S. A. P. et al. TGF- β role in gingival overgrowth pathogenesis induced by cyclosporin and actual therapeutical possibilities. **Revista ABO nacional**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 114-118, 2011.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in bioscience**, Searington, v. 9, p. 283-289, Jan 2004.

ESPOSITO, M. et al. Enamel matrix derivative for periodontal tissue regeneration in treatment of intrabony defects: a Cochrane systematic review. **Journal of dental education**, Washington, v. 68, n. 8, p. 834-844, Aug 2004.

FILIPPIN, L. I. et al. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. **Nitric oxide**, Orlando, v. 24 n. 1, p. 43- 49, Jan 2011.

FUJITA, T. et al. Coverage of gingival recession defects using guided tissue regeneration with and without adjunctive enamel matrix derivative in a dog model. **The International journal of periodontics & restorative dentistry**, Chicago, v. 31, n. 3, p. 247-253, Jun 2011.

GESTRELIUS, S. et al. Formulation of enamel matrix derivative for surfasse coating. Kinetics and cell colonization. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 24, n. 9, p. 678-684, Sep 1997a.

GESTRELIUS, S. et al. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 24, n. 9, p. 685-692, Sep 1997b.

GKRANIAS, N. D. et al. Wound healing following regenerative procedures in furcation degree III defects: histomorphometric outcomes. **Clinical oral investigations**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 239-249, Feb 2012.

GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of IL-1 and TNF to periodontal tissue destruction. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 74, n. 3, p. 391-401, Mar 2003.

HAGENAARS, S. et al. Soft-tissue wound healing following periodontal surgery and Emdogain® application. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 31, n. 10, p. 850-856, Oct 2004.

HAMAMOTO, Y. et al. Effect and distribution of enamel matrix derivative Emdogain in periodontal tissues of rat molars transplanted to the abdominal wall. **Dental traumatology**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 12-23, Feb. 2002.

HAMMARSTRÖM, L. The role of enamel matrix proteins in the development of cementum and periodontal tissues. **Ciba Foundation symposium**, Amsterdam, v. 205, p. 246-255, 1997.

HATAKEYAMA, J. et al. The receptor activator of nuclear factor κ B ligand-mediated osteoclastogenic pathway is elevated in amelogenin-null Mice. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 37, p. 35743-35748, Sep 2003.

HE, J. et al. Enamel matrix derivative inhibits TNF- α -induced apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, St. Louis, v. 99, n. 6, p. 761-767, Jun 2005.

HENRIQUES, P. S. G. et al. Application of sub epithelial connective tissue graft with or without enamel derivative for root coverage: a Split-mouth randomized study. **Journal of oral science**, Tokyo, v. 52, n. 3, p. 463-471, Sep 2010.

HIROSE, M. et al. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 72, n. 5, p. 590-597, May 2001.

HOANG, A. M.; OATES, T. W.; COCHRAN, D. L. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 71, n. 8, p. 1270-1277, Aug 2000.

HOANG, A. M. et al. Amelogenin is a cell adhesion protein. **Journal of dental research**, Thousand Oaks, v. 81, n. 7, p. 497-500, Jul 2002

HOWELL, T. H.; WILLIAMS, R. C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of periodontal disease progression. **Critical reviews in oral biology and medicine**, Alexandria, v. 4, n. 2, p. 177-196, 1993.

IWATA, T. et al. Nogging blocks osteoinductive activity of porcine enamel extracts. **Journal of dental research**, Thousand Oaks, v. 81, n. 6, p. 387-391, Jun 2002.

JOHNSON, D. L. et al. Cellular effects of enamel matrix derivative are associated with different molecular weight fractions following separation by size exclusion chromatography. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 80, n. 4, p. 648-656, Apr 2009.

KARIMA, M. M.; VAN DYKE, T. E. Enamel matrix derivative promotes superoxide production and chemo taxis but reduces matrix metalloproteinase-8 expression by polymorphonuclear leukocytes. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 83, n. 6, p. 780-786, Jun 2012.

KASAJ, A. et al. The influence of enamel matrix derivative on the angiogenic activity of primary endothelial cells. **Journal of periodontal research**, Malden, v. 47, n. 4, p. 479-487, Aug 2012.

KAWASE, T. et al. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) rapidly stimulates phosphorylation of MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. **Journal of periodontal research**, Malden, v. 36, n. 6, p. 367-376, Dec 2001.

KHEDMAT, S. et al. Cyclooxygenase 2 plays a role in Emdogain-induced proliferation. **Journal of periodontal research**, Malden, v. 46, n.1, p. 67-73, Feb 2011.

KÉMOUN, P. et al. The role of cells surface markers and enamel matrix derivatives on human periodontal ligament mesenchymal progenitor responses in vitro. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 32, n. 30, p. 7375-7388, Oct 2011.

KIM, N. H.; TOMINAGA, K.; TANAKA, A. Analysis of eosinophilic round bodies formed after injection of enamel matrix derivative into the back of rats. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 76, n. 11, p. 1934-1941, Nov 2005.

LAAKSONEN, M.; SORSA, T.; SALO, T. Emdogain® in carcinogenesis: a systematic review of in vitro studies. **Journal of oral science**, Tokyo, v. 52, n. 1, p. 1-11, Mar 2010.

LANG, H.; SCHULER, N.; NOLDEN, R. Attachment formation following replantation of culture cells into periodontal defects – a study in minipigs. **Journal of dental research**, Thousand Oaks, v. 77, n. 2, p. 393-405, Feb 1998.

- LYNGSTADAAS, S. P. et al. Enamel matrix proteins; old molecules for new applications. **Orthodontics & craniofacial research**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 243-253, Aug 2009.
- MADIANOS, P. N.; BOBETSIS, Y. A.; KINANE, D. F. Generation of inflammatory responses in the gingiva. **Journal of clinical periodontology**, Malden, v. 32, p. 57-71, 2005. Supplement 6.
- MALEKZADEH, R. et al. Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 69, n. 11, p. 1256-1262, Nov 1998.
- MCCORD, J. M.; EDEAS, M. A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. **Biomedicine & pharmacotherapy**, Paris, v. 59, n. 4, p. 139-142, May 2005.
- MIRASTSCHIJSKI, U. et al. Effects of a topical enamel matrix derivative on skin wound healing. **Wound repair and regeneration**, St. Louis, v. 12, n. 1, p. 100-108, Jan/Feb 2004.
- MROZIK, K. M. et al. Effect of coating Straumann® Bone Ceramic with Emdogain on mesenchymal stromal cell hard tissue formation. **Clinical oral investigations**, Berlin, v. 16, n. 3, p. 867-878, Jun 2012.
- MYHRE, A. E. et al. Anti-inflammatory properties of enamel matrix derivative in human blood. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 41, n. 3, p. 208-213, Jun 2006.
- NANCI, A. **Ten Cate histologia oral**. 8. ed. São Paulo: Elsevier, 2013.
- NEWMAN, S. A. et al. Effects of enamel matrix derivative on Porphyromonas gingivalis. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 74, n. 8, p. 1191-1195, Aug 2003.
- NIKOLOPOULOS, S.; PETEINAKI, E.; CASTANAS, E. Immunologic effects of emdogain in humans: one-year results. **The International journal of periodontics & restorative dentistry**, Chicago, v. 22, n. 3, p. 269-277, Jun 2002.
- NOKHBEHSAIM, M. et al. Effects of enamel matrix derivative on periodontal wound healing in an inflammatory environment in vitro. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 38, n. 5, p. 479-490, May 2011a.

NOKHBEHSAIM, M. et al. Interactions of enamel matrix derivative and biomechanical loading in periodontal regenerative healing. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 82, n. 12, p. 1725-1734, Dec 2011a.

NOKHBEHSAIM, M. et al. Anti-inflammatory effects of EMD in the presence of biomechanical loading and interleukin-1 β in vitro. **Clinical oral investigations**, Berlin, v. 16, p. 275–283, Feb 2012.

OLD, L. J. Tumor necrosis factor. **Scientific American**, New York, v. 258, n. 5, p. 59-60, May 1988.

OKUBO, K. et al. Participation of endogenous IGF-I and TGF-beta 1 with enamel matrix derivative-stimulated cell growth in human periodontal ligament cells. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 38, n. 1, p. 1-9, Feb 2003.

PAULSEN, S. M.; WURSTER, S. H.; NANNEY, L. B. Expression of inducible nitric oxide synthase in human burn wounds. **Wound repair and regeneration**, St. Louis, v. 6, n. 2, p. 142-148, Mar/Apr 1998.

PARKAR, M. H.; TONETTI, M. Gene expression profiles of periodontal ligament cells treated with enamel matrix proteins in vitro: analysis using cDNA arrays. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 75, n. 11, p. 1539-1546, Nov 2004.

RESELAND, J. E. et al. The effect of enamel matrix derivative (EMD) on gene expression in osteoblasts. **European journal of oral sciences**, Chichester, v. 114, p. 205-211, May 2006. Supplement 1.

RINCON, J. C.; HAASE, H. R.; BARTOLD, P. M. Effect of Emdogain on human periodontal fibroblasts in an in vitro wound-healing model. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 38, n. 3, p. 290-295, Jun 2003.

REID, T.; LOUIE, P.; HELLER, R. A. Mechanisms of tumor necrosis factor cytotoxicity and the cytotoxic signals transduced by the p75-tumor necrosis factor receptor. **Circulatory shock**, New York, v. 44, n. 2, p. 84-90, Oct 1994.

SAADOUN, A. P. Root Coverage With Emdogain/AlloDerm: A new way to treat gingival recessions. **The European journal of esthetic dentistry**, Berlin, v. 3, n. 1, p. 46-65, 2008.

SAITO, A. et al. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative in private practice: a long-term retrospective study. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 89-96, May 2008.

SAITO, A. et al. Treatment of periodontal defects with enamel matrix derivative: clinical evaluation at early healing stages. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, Tokyo, v. 51, n. 2, p. 85-93, 2010.

SAKODA, K.; NAKAJIMA, Y.; NOGUCHI, K. Enamel matrix derivative induces production of vascular endothelial cell growth factor in human gingival fibroblasts. **European journal of oral sciences**, Copenhagen, v. 120, n. 6, p. 513-519, Dec 2012.

SCHNEIDER, D. et al. Bone regeneration using synthetic matrix containing enamel matrix derivative. **Clinical oral implants research**, Copenhagen, v. 22, n. 2, p. 214-222, Feb 2011.

SCHROEDER, H. E. **The periodontium**: Handbook of Microscopic Anatomy, ed. Handbook of microscopic anatomy. Berlin: Springer, v. 5, p. 47-64, 1986

SCULEAN, A. et al. Effect of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) on ex vivo dental plaque vitality. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 28, n. 11, p. 1074-1078, Nov 2001.

SCULEAN, A. et al. Immunohistochemical evaluation of matrix molecules associated with wound healing following regenerative periodontal treatment in monkeys. **Clinical oral investigations**, Berlin, v. 6, n. 3, p. 175-82, Sep 2002.

SCULEAN, A. et al. Immunohistochemical evaluation of matrix molecules associated with wound healing following treatment with an enamel matrix protein derivative in humans. **Clinical oral investigations**, Berlin, v. 7, n. 3, p. 167-174, Sep 2003.

SEYMOUR, G. et al. Cellular immunity and hypersensitivity as components of periodontal destruction. **Oral diseases**, Houndmills, v. 2, n. 1, p. 96-101, Mar 1996.

SHAPIRA, L. et al. Experimental stress suppresses recruitment of macrophages but enhanced their *P. gingivalis* LPS-stimulated secretion of nitric oxide. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 71, n. 3, p. 476-481, Mar 2000.

SPAHR, A. et al. Effect of the enamel matrix derivative Emdogain on the growth of periodontal pathogens in vitro. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 62-72, Jan 2002.

SUZUKI, S. et al. Enamel matrix derivative gel stimulates signal transduction of BMP and TGF- β . **Journal of dental research**, Chicago, v. 84, n. 6, p. 510-514, Jun 2005.

TAKAYAMA, T. et al. Enamel matrix derivative stimulates core binding factor alpha1/Runt-related transcription factor-2 expression via activation of Smad1 in C2C12 cells. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 76, n. 2, p. 244-449, Feb 2005.

TAUBMAN, M.; KAWAI, T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. **Critical reviews in oral biology and medicine**, Alexandria, v. 12, n. 2, p. 125-135, 2001.

THOMA, D. S.; COCHRAN, D. L. Unlocking the mystery of periodontal regeneration – different tissues, different phenotypes. **Journal de parodontologie et d'implantologie orale**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 23-60, 2010.

THOMA, D. S. et al. Angiogenic activity of an enamel matrix derivative (EMD) and EMD-derived proteins: an experimental study in mice. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 38, n. 3, p. 253-260, Mar 2011.

TOKIYASU, Y. et al. Enamel factors regulate expression of genes associated with cementoblasts. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 71, n. 12, p. 1829-1839, Dec 2000.

TRABULSI, M. et al. Effects of enamel matrix derivative on collagen guided tissue regeneration-based root coverage procedure. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 75, n. 11, p. 1446-1457, Nov. 2004.

VAN DIJK, L. J. et al. Cell-seeding of periodontal ligament fibroblasts. A novel technique to create new attachment. A pilot study. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 196-199, Mar 1991.

VENEZIA, E. et al. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. **Critical reviews in oral biology and medicine**, Alexandria, v. 15, n. 6, p. 382-402, Nov 2004.

VOWDEN, P. et al. The effect of amelogenins (Xelma) on hard-to-heal venous leg ulcers. **Wound repair and regeneration**, St. Louis, v. 14, n. 3, p. 240-246, May/Jun 2006.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell death and differentiation**, London, v. 10, n. 1, p. 45-65, Jan 2003.

WALLACH, D. et al. Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 410, n. 1, p. 96-106, Jun 1997.

WEINBERG, E. et al. Prostaglandin E2 inhibits the proliferation of human gingival fibroblasts via the EP2 receptor and Epac. **Journal of cellular biochemistry**, Hoboken, v. 108, n. 1, p. 207-215, Sep 2009.

WEINBERG, E. et al. Differential effects of prostaglandin E(2) and enamel matrix derivative on the proliferation of human gingival and dermal fibroblasts and gingival keratinocytes. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 45, n. 6, p. 731-840, Dec 2010.

WENNSTRÖM, J. L.; LINDHE, J. Some effects of enamel matrix proteins on wound healing in the dento-gingival region. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 9-14, Jan 2002.

ZELDICH, E. et al. Enamel matrix derivative protects human gingival fibroblasts from TNF-induced apoptosis by inhibiting caspase activation. **Journal of cellular physiology**, New York, v. 213, n. 3, p. 750-758, Dec 2007a.

ZELDICH, E. et al. Enamel matrix derivative stimulates human gingival fibroblast proliferation via ERK. **Journal of dental research**, Chicago, v. 86, n. 1, p. 41-46, Jan 2007b.

ZELDICH, E. et al. Enamel matrix derivative induces the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 in human gingival fibroblasts via extracellular signal-regulated kinase. *Journal of periodontal research*, Copenhagen, v. 45, n. 2, p. 200-206, Apr 2010.

ZHANG, J. H.; DONG, Z.; CHU, L. Hydrogen sulfide induces apoptosis in human periodontium cells. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 45, n. 1, p. 71-78, Feb 2010.

ZOCHODNE, D. W.; LEVY, D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. **Cellular and molecular biology**, Noisy-Le-Grand, v. 51, n. 3, p. 255-267, Sep 2005.

Apoio financeiro da Rede Mineira de Bioterismo (Rede 31/11 – FAPEMIG), Rede Mineira TOXIFAR (Rede 26/11 – FAPEMIG), do Instituto Straumann e da APG.

ANEXOS

**ANEXO A – Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética na
Experimentação animal/UFJF**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 064/2012 – CEEA sobre “AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EMD (EMDOGAIN®) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de FERNANDO MOREIRA AARESTRUP, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/10/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 25 animais (25 fêmeas) da linhagem Wistar, conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 064/2012- CEEA about “EVALUATION OF THE EFFECT OF EMD (EMDOGAIN®) ON THE PROCESS OF CUTANEOUS WOUND HEALING IN WISTAR RATS” under responsibility of FERNANDO MOREIRA AARESTRUP- is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/10/2012. For the development of this research 25 animals (25 female) lineage Wistar were released, as requested.

Juiz de Fora, 04 de outubro de 2012.

Presidente/CEEA

p/_____
Secretário/CEEA

ANEXO B – Comprovante de submissão de artigo à BioMed Central Editorial

BioMed Central Editorial

Para Robert C da SilvaRobert C da SilvaEu e 10 Mais...

Abr 2 em 8:57 PM

Article title: Effects of enamel matrix derivative on the healing of cutaneous surgical wounds in wistar rats: histopathological and immunohistochemistry study

MS ID : 1819488024125654

Authors : Robert C da Silva, Andrea J Cortes, Julio C Joly, Paulo F M Carvalho, Rodrigo G de Oliveira, Fernando M Aarestrup, André C Montesino, Marcos P C Batista, Leonardo S Picini, Michel M Dard, Wagner R Duarte and Beatriz J V Aarestrup

Journal : BMC Oral Health

Dear Dr da Silva

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the submitting author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the submitting author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1819488024125654_article.pdf (7061 K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/2130588457125662_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to editorial@biomedcentral.com.

The submitting author can check on the status of the manuscript at any time by logging into 'My BioMed Central' (<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The BMC Oral Health Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>

[Responder](#), [Responder a todos](#) ou [Encaminhar](#) | [Mais](#)

ANEXO C – Artigo submetido à BioMed Central Editorial

1 **EFFECTS OF ENAMEL MATRIX DERIVATIVE ON THE HEALING OF**
2 **CUTANEOUS SURGICAL WOUNDS IN WISTAR RATS:**
3 **HITOPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY STUDY**

4 Robert Carvalho da Silva¹

5 Andréa Junqueira Côrtes²

6 Julio César Joly¹

7 Paulo Fernando Mesquita de Carvalho³

8 Rodrigo Guerra de Oliveira⁴

9 Fernando Monteiro Aarestrup⁵

10 André Chacon Montesino⁶

11 Marcos Pearce Cirilo Batista⁶

12 Leonardo Santos Picinini⁷

13 Michel M Dard⁸

14 Wagner Rodrigues Duarte⁹

15 Beatriz Julião Vieira Aarestrup¹⁰

16

17 ¹DDS, Ms, PhD, Implantepério Institute- São Paulo, Brazil.
18 robert@implanteperio.com.br

19 ²DDs, MSc student of Dentistry Faculty of Federal University of Juiz de Fora,
20 Juiz de Fora, Brazil. andreajcortes@yahoo.com.br

21 ¹DDS, Ms, PhD, Implantepério Institute- São Paulo, Brazil.
22 joly@implanteperio.com.br

23 ³DDS, Ms, Implanteperio Institute- São Paulo, Brazil.
24 pauloferando@implanteperio.com.br

25 ⁴DDS, Ms, PhD, Faculty of Medical and Health Sciences, SUPREMA, Juiz de
26 Fora, Brazil. rodrigo.odonto@suprema.edu.br

27 ⁵DDS, Ms, PhD, Laboratory of Immunology, Institute of Biological Sciences,
28 Federal University of Juiz de Fora, Juiz de For a, Brazil.fmastrup@odonto.ufjf.br

29 ⁶DDS, Ms student at the São Leopoldo Mandic University- São Paulo, Brazil.
30 acmontesino@hotmail.com

31 ⁶DDS, Ms student at the São Leopoldo Mandic University- São Paulo, Brazil.
32 marcospearce@hotmail.com

33 ⁷DDS, Ms, PosOdonto Suprema, Juiz de Fora, MG, Brazil.
34 coapicinini@hotmail.com

35 ⁸DDS, Ms, PhD, Professor, New York University, College of Dentistry and
36 Columbia University, College of Dental Medicine, New York, NY, USA.
37 mmd11@nyu.edu

38 ⁹DDS, PhD, Professor, Department of Dentistry School of Health Sciences
39 University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil. duartew@yahoo.com

40 ¹⁰DDS, Ms, PhD, Associate Professor, Department of Morphology Institute of
41 Biological Sciences, Section of Histology of UFJF, Associate Researcher,
42 Laboratory of Immunology and Experimental Pathology, Center for Biology of
43 Reproduction UFJF – Federal University of Juiz de Fora – Juiz de Fora, MG,
44 Brazil. beatrizaarestrup@gmail.com

45

46 Data corresponding author

47 Robert Carvalho da Silva, Av. Independência, 1339, Piracicaba, SP, Brazil.

48 ZIPCODE 13419-155;Phone: 19 982255454

49 Email: robert@implanteperio.com.br

50

51

52

53

54

55 **Abstract**

56 **Background:** Enamel matrix derivative (EMD) is a protein extract originally
57 applied to regenerate lost periodontal tissues. Recently, EMD has also been
58 used for soft tissue wound healing. However, detailed information on the effects
59 of EMD during the healing phases of soft tissue wounds is needed. **Methods:** In
60 the present study, we conducted a time-course histological analysis of the
61 effects of EMD on the healing process of soft tissue wounds. Two 4.0 cm-long
62 parallel incisions extending to the muscular layer were made on the back of the
63 Wistar rats. EMD was applied in the left incision and saline solution was applied
64 in right incision. The rats were euthanized 1, 3, 7, 14, and 21 days after
65 wounding and the healed area was removed for histomorphometrical and
66 immunohistochemical analyses. **Results:** Macroscopically, the experimental
67 wounds healed faster and better than the control wounds. Histological analysis
68 revealed that the healing process of the experimental wounds was better at all
69 time-points starting at day 3. The number of iNOS positively-stained
70 inflammatory cells was superior in the experimental group than in the control
71 group at days 7 and 14, and the difference in the number of TGF- β 1 positive
72 cells was less pronounced between the experimental and control groups.
73 **Conclusions:** These results indicate that EMD accelerates and improves the
74 healing process of skin wounds, by affecting the organization and maturation of
75 all the skin layers reducing the inflammatory response and increasing
76 angiogenesis.

77 **Keywords:** enamel derivative matrix, regeneration, immunohistochemistry

78

79

80 Background

81 The regeneration of tooth supporting tissues lost by periodontal disease
82 has been an important goal of periodontal treatment [1]. Several approaches
83 have been classically proposed to achieve this goal including the use of grafting
84 materials and barrier membranes [1]. More recently, biologic mediators, such as
85 enamel matrix derivative (EMD), have also been applied for periodontal
86 regeneration [2,3,4]. EMD was originally described as a protein extract capable
87 of regenerating root cementum and consequently promoting the formation of a
88 new periodontal ligament and alveolar bone [2,3,5,6]. In fact, a number of
89 animal and clinical studies have demonstrated that EMD can successfully
90 regenerate lost periodontal tissues in intrabony defects, class II furcation
91 defects, and dehiscence defects [1,2,7,8]. Furthermore, EMD has been
92 combined with coronally advanced flap for root coverage procedures, and
93 recent evidence has demonstrated that this combined approach yields
94 predictable long-term results [9,10]. In addition to the regenerative effects of
95 EMD on the periodontal tissues it has been described that EMD gel application
96 has a positive effect on post-operative symptoms and soft tissue healing
97 [11,12]. When compared to other surgical regenerative procedures, EMD
98 application results in less pain and post-operative swelling [1,12,13], which
99 could be attributed to the anti-inflammatory effects of EMD [14], since EMD
100 down-regulates the expression of genes involved in the early inflammatory
101 phases of wound healing [15]. Likewise, the anti-inflammatory effect of EMD
102 could explain the improved healing of gingival tissue and skin wounds [16,17].
103 Another possible mechanism behind the healing effects of EMD is that it
104 stimulates angiogenesis by inducing secretion of vascular endothelial growth

105 factor (VEGF), and other molecules involved in the healing process such as
106 platelet-derived growth factor (PDGF), interleukin-6 (IL-6) and matrix
107 metalloproteinase-2 (MMP-2) [11,18,19]. Apparently, these beneficial effects of
108 EMD in wound healing induce a faster healing as demonstrated in animal skin
109 wound healing models, when EMD application resulted in faster wound closure
110 as control wounds [19,20]. EMD has also been used in the healing of venous
111 leg ulcers and hard-to-heal wounds in humans subjects promoting a significant
112 reduction in ulcer size and pain, compared to control wounds [19,21,22,23]
113 suggesting that EMD acts as a temporary scaffold for cellular adherence, which
114 in turn stimulates cell functions related to wound healing process such as
115 migration, proliferation, and synthesis of mediators that regulate the wound
116 healing processes.

117 Although a few studies have addressed the beneficial effects of EMD on
118 skin wound healing, a histological time-course analysis of the healing process
119 has not been conducted. Furthermore, the assessment of the overall quality of
120 the healed tissue is lacking. Thus, in the present study, we applied a rat skin
121 wound healing model to investigate morphological changes throughout the
122 healing process, to conduct morphometrical evaluation of the healed tissue, and
123 to assess the quality of the newly formed tissue.

124

125 **MATERIALS AND METHODS**

126 **Surgical wound procedure**

127 The experiments were conducted under a protocol approved by the
128 Institutional Animal Research and Care Ethics Committee at the Juiz de Fora
129 Federal University (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil) 064/2012, and Centro de

130 Pesquisas São Leopoldo Mandic (Campinas, São Paulo, Brazil) 2010/0214.
131 Wistar rats (n = 25), weighing 250-300g were used in this study. A combination
132 of ketamine and xylazine (ket-a-xyl[®], Agrovvetmarket, Brazil) was intramuscularly
133 injected to anesthetize the rats in doses of 40 and 15 mg/kg, respectively. The
134 surgical area was disinfected with 70% alcohol and two 4.0 cm-long incisions
135 extending to the muscular layer, bilateral and parallel to the spinal cord, were
136 made on each animal, with #15c surgical blades. The wounds were randomly
137 assigned for the experimental group (EMD gel group) or control group (saline
138 solution group). In the experimental group, EMD gel (0.7 ml, Institute
139 Straumann, AG, Basel, Switzerland) was delivered inside the wound edges,
140 whereas in the control group saline solution was used. The incisions were then
141 closed using simple interrupted sutures (Nylon 6-0). Immediately after suture,
142 EMD gel and saline solution were placed over their respective incisions for 5
143 minutes. Care was taken to avoid cross contamination during this procedure.

144 Animals were caged individually after surgery to avoid damage to the
145 wounds. Five rats were assigned to each of the following subgroups, where T
146 represents treated group and C represents control group:

- 147 T1 and C1: euthanasia at 1 day post-op;
- 148 T3 and C3: euthanasia at 3 days post-op;
- 149 T7 and C7: euthanasia at 7 days post-op;
- 150 T14 and C14: euthanasia at 14 days post-op;
- 151 T21 and C21: euthanasia at 21 days post-op

152 At the time of sacrifice, animals were euthanized by deepening
153 anesthesia with a combination of ketamine and xylazine that was used for the
154 confection of the wounds.

155 **Macroscopic Evaluation**

156 Wounds were evaluated macroscopically and digital photographs with
157 high resolution camera (Canon, Japan) were taken, before the euthanasia,
158 using fixed focus. The animals were analyzed at the 1th, 3th, 7th, 14th and 21th
159 days of postoperatively by macroscopic analysis of the presence of granulation
160 tissue, reduction of the lesion area, crusts and color of the lesion, compared test
161 and control groups.

162 **Histopathological and morphometric study**

163 After the macroscopic evaluation, the skin, including at least 1 cm of
164 tissue adjacent to the incisions, was harvested for histopathological
165 examination. Each specimen was cut in two parts, and half of those were
166 processed according to standard histological protocols, sectioned, stained with
167 hematoxylin-eosin (HE), and observed under a light microscope (Zeiss
168 (Hallbergmoos, Germany). The following histological structures were
169 investigated: the dermis (creation of fibrin network, presence of leukocytes,
170 tissue macrophages, migration, proliferation and orientation of fibroblasts,
171 creation of new extracellular matrix [ECM], neoangiogenesis, and the muscle
172 layer alone). The histological structures and processes were semi-quantitatively
173 evaluated in coded slides.

174 Photomicrographs were taken using the ZEN lite computer system
175 (Zeiss, Berlin, Germany). The following parameters were evaluated histologically
176 and morphometrically: 1. new blood vessel formation; 2. quantification of the
177 inflammatory infiltrate; 3. quality and maturation of the healed tissue
178 demonstrated by the density and organization of the collagen fibers.

179 The routine staining (hematoxylin and eosin – HE) (Luna, 1968) was
180 used for morphological assessment of histological sections, the nuclei stained in
181 dark blue (basophilic) and cytoplasm in pink (eosinophilic). The analysis was
182 performed by two different observers with experience and training in
183 histopathology. Sections were analyzed on Zeiss microscope (Hallbergmoos,
184 Germany) in increments of 20x, 40x and 100x, along its entire length. From this
185 assessment, was selected to capture through the program ZEN lite in 100x and
186 40x magnification, the area corresponding to the surgical wound healing, taking
187 care to cover all cutaneous layers and subcutaneous sample.

188 In the area of initial capture, we selected four areas in each specimen for
189 digital capture 20x magnification, using ZEN lite computer system (Zeiss, Berlin,
190 Germany) coupled to an optical microscope and digital camera, following the
191 standardization of regions in all sections: edge of the open wound or re-
192 epithelized surface and sub epithelial granulation tissue; granulation tissue
193 adjacent to regions of the papillary dermis and reticular dermis; granulation
194 tissue adjacent to the deep reticular dermis; and granulation tissue adjacent to
195 the subcutaneous tissue.

196 **Immunohistochemistry**

197 An analysis of the levels of transforming growth factor (TGF- β) and
198 inducible nitric oxide synthase (iNOS) was performed to evaluate the possible
199 influence of the EMD gel on the cellular composition of the wounds. The method
200 used involved the following steps: a) deparaffinization in an oven at 60°C (30
201 min); b) deparaffinization in Xylene, three times (5 min each); c) rehydration of the
202 cuts in alcohol 100%, 90% and 70% (3 min each); d) wash with distilled water
203 (5min); e) blockage of endogenous peroxidase, two times (30 min each); f)

204 antigen retrieval: warm bath (95°C) with PBS (40 min); g) cooling (room
205 temperature) (20min);h) wash withphosphate buffered saline (PBS) (1 min); i)
206 Background Sniper (15 min); j) removal of excess; k) incubation with a primary
207 polyclonal antibody forone hour – iNOS and TGF- β (Santa Cruz Biotechnology,
208 California, USA; dilution 1:100); l) wash in PBS, two times (3 min each); m)
209 (incubation with Universal Link Tekkie (20 min); n) wash in PBS, two times (2
210 min each); o) Trek Avidin – HRP label: streptavidin at room temperature (10
211 min); p) wash in PBS, two times (3 min each); q) Betazoid DAB Chromogem – 1
212 drop of DAB and 1 ml of substrate buffer (5 min); r) wash with distilledwater, two
213 times (2 min each); s) wash with PBS (1 min); t) contrast with hematoxylin
214 (2min); wash with distilled water, two times (2 min each); u) wash with PBS (1
215 min); v) dehydration in alcohol 100%, three times (1 min each); w) dehydrationin
216 xylene, three times (1 min each); x) assembly of the slide with Entelan®and a
217 coverslip.

218 A count of the number of inflammatory cells stained positively for anti
219 TGF- β 1 antibody or iNOS antibody per microscopic field 40x and 100x original
220 magnification was performed. The results were expressed as percentage of
221 positive inflammatory cells per microscopic field.

222 The control of immunohistochemical reaction was obtained by comparing
223 cells labeled with inlabeled in the same field. Images of the fields analyzed were
224 obtained using the ZEN lite computerized image analysis system (Axiostar
225 Zeiss, Carl Zeiss, Hamburg, Germany).

226 **Statistical Analysis**

227 Results regarding the study and comparison of variables involved in the
228 assays were expressed in whole numbers or mean \pm standard error for *in*

229 *vitro*. When these numbers were distributed as independent samples for *in vitro*
230 assays, variance analysis (ANOVA) was used. A significance level of 0.01 (p
231 less than 0.01) was accepted; therefore the limit of 1% probability of error was
232 established. To perform the calculations, the computer program GraphPad
233 Prisma of GraphPad software was used.

234 **RESULTS**

235 **Macroscopic evaluation**

236 The macroscopic aspect of the experimental and control wounds were
237 different, since the experimental wounds healed faster than the control wounds
238 and this difference was clear at days 14 and 21 (Figure 1 D and E respectively).
239 At earlier stages, days 1 and 3 (Figure A and B respectively) this difference was
240 not noticed, however, the experimental wound appeared slightly better healed
241 than the control wound at day 7 (Figure 1 C).

242 The first and third days after surgery (Figure 1 A and B) no macroscopic
243 difference between the wounds of the control group and the treated group was
244 observed. Both groups showed hyperemia and edema, consistent with
245 physiological healing process at this stage. There was no difference in the
246 extent of the injury.

247 On the seventh day after surgery, while the control group had wound
248 crust evident, in the treated group was observed better coapted edges and
249 lower crust area (Figure. 1 C). Already, on the 14th postoperative noticed a
250 minor shrinkage of lesion and hypercromia was higher in control group
251 compared to the treated group that showed greater wound retraction and
252 absence of hypercromia. The wound treated with EMD showed a flatter scar
253 (Figure 1 D). In the 21th day after surgery there was an almost complete healing

254 of the treated wound, whereas in the controlgroup, the wounds still had pink
255 color and a linear area not epithelized (Figure 1 E).

256 **Histopathological and morphometric study**

257 The amount of newly formed blood vessels was similar in control and
258 experimental groups at initial stages of wound healing, however, the newly
259 formed vessels of the treated at day 3 exhibit more maturity(Figure2 D).At day
260 7, it was observed that the angiogenesis was more evident in the treated
261 samples (Figure 2 E), whereas at day 14, new blood vessel formation was
262 significantly greater in the experimental group than in the control group (Figure
263 2 F and C respectively).It was evident the prevalence of new blood vessel
264 formation in the treated group compared with the control group (Figure 3).

265 The healing process of the experimental wounds was better at all-time
266 points with the exception of day 1, demonstrated a similar healing aspect of
267 both groups. At day 3, it was observed greater superficial clot coverage of the
268 wounded area and the presence of a more pronounced inflammatory infiltrate in
269 the experimental group (Figure. 2 D).Leucocyte counting revealed that there
270 were no significant differences between the experimental and control groups at
271 any time-points (Figure 4).

272 At day 7, the epithelial borders and dermal layers of the experimental
273 group were stable, whereas in the control group the wounds were still filled with
274 a more immature healing tissue. The granulation tissue in the papillary and
275 reticular demis is denser and more organized in the experimental group (day
276 7)(Figure 5 F). No differences were observed in the degree of re-
277 epithelialization of the healing area.At day 14, the subcutaneous tissue in the
278 control group depicted more disorganization of the muscular layer (Figure 5 C).

279 Both groups presented re-epithelialization with keratin formation, however, the
280 experimental group showed slightly better cellular/architectural organization and
281 an evident greater maturation degree of the sub-epithelial layer(Figure 5 G). A
282 clear maturation of scar dermis (sub epithelial and deep) in samples from
283 treated group was observed when compared to control group at day 14(Figure 5
284 G and C respectively).

285 At day 21, newly formed epithelial tissue with superficial keratin
286 formation can be observed in both groups. In the experimental group, the initial
287 formation of epithelial attachments can be seen, whereas that cannot be
288 observed in the control group (Figure 5 H and D respectively). The muscular
289 fibers in the experimental group are more evident and organized as compared
290 to the control group(Figure 5 H and D respectively).

291 **Immunohistochemistry**

292 Immunohistochemical analysis revealed a higher number of iNOS
293 positively-stained inflammatory cells in the experimental group at days 7 and
294 14, as compared to the control group (Figure 6).

295 Quantification of positive cells showed that, at day 7, 20% of the
296 inflammatory cells in the control group were positive for iNOS, whereas, 70% of
297 those cells were positive in the experimental group. Similarly, at day 14, 20% of
298 the inflammatory cells were positive for iNOS in the control group, and 80% of
299 those cells were positive in the experimental group(Figure 7).

300 On the other hand, the difference in the number of TGF- β 1 positive cells
301 was less pronounced between the experimental and control groups at days 7
302 and 14 (Figure 8).

303 At day 7, 60% of the inflammatory cells were positive for TGF- β 1 in the
304 control group, and 80% of those cells were positive in the experimental group,
305 whereas at day 14, the percentage of positive cells was 80% and 90% for
306 control and experimental groups, respectively (Figure 9).

307 **DISCUSSION**

308 Several reports have demonstrated that EMD gel is capable of markedly
309 improving soft tissue healing [19,20]. In the present study we further explored
310 the soft-tissue healing capacity of EMD gel and performed a time-course
311 analysis of the healing process of different soft tissue layers in an animal model.
312 Our results confirm previous findings that EMD gel treated soft tissue wounds
313 heal much faster with minimal post-operative inflammatory response [19]. We
314 observed that EMD gel treatment increased the amount of granulation tissue
315 and accelerated the time to complete epithelialization by the third day of
316 treatment. Mirastschijski et al. [19] showed that the healing time of circular full-
317 thickness 2-cm skin wounds in rabbits was twice as fast when treated with EMD
318 gel, associated with more granulation tissue formation, which also appeared
319 more resistant. They also observed that in the EMD gel - treated group, it was
320 observed less scar formation, earlier epithelial coverage, more mature scar
321 tissue architecture reflected by regression of blood vessels, meaning an
322 advanced healing [19]. Histopathological examination was only performed 28
323 days after therapy, whereas in our study the histological response was
324 monitored throughout the entire experiment and since we observed an
325 improved healing of the wounds much earlier than 28 days, no analysis at that
326 time-point was performed. This difference in the speed of healing may be
327 explained by the type of skin wound created; i.e., in our study we made an

328 incision, whereas Mirastschijski [19] and co-workers removed a circular portion
329 of the skin including the epithelium. Another interesting aspect regarding the
330 incisional wound used in our study is that EMD gel was applied underneath the
331 wound edges. Although we do not know for how long EMD gel related proteins
332 remained inside the wound, it is likely that the approximation of the incision
333 edges by suturing served as a protective factor for EMD gel to act longer in
334 deeper layers of the tissues. Nevertheless, it is noteworthy that, regardless the
335 wound type, EMD gel is capable of accelerating the healing process in both
336 incisional and excisional wounds.

337 Topical application of EMD in soft tissue wounds has been shown to be
338 beneficial for healing. It has been reported in a number of studies that EMD gel
339 accelerates wound healing with reduced pain and exudate in different wound
340 types [11,12] including in large wounds such as hard-to-heal ulcers in human
341 subjects [21,23,24]. Besides applying EMD gel into the wounded area, we also
342 applied EMD gel topically onto the sutures. However, the fact that EMD powder
343 induces proliferation of fibroblastic cells, enhances mesenchymal cell
344 recruitment, and at the same time is cytostatic for epithelial cells is puzzling
345 [25]. Obviously, the faster wound closure cannot be explained by the direct
346 inhibitory effects of EMD gel on epithelial cells, but possibly by an indirect effect.
347 It is known that EMD gel enhances several processes associated with wound
348 healing such as angiogenesis, granulation tissue formation and proliferation of
349 fibroblasts, in part by stimulation of VEGF, PDGF, IL-6, and MMP-2 [11,18,19].
350 Therefore, EMD gel promotes a faster formation of the foundation for the spread
351 and proliferation of epithelial cells, which in turn results in a faster wound
352 closure. In fact, in the present study we could observe especially from day 7 a

353 much higher number of completely closed wounds as compared with the control
354 group, and that is in line with other studies that also observed faster wound
355 closure after EMD gel therapy [19,20]. By analyzing different time-points
356 throughout the healing process, we could observe that, in the EMD gel treated
357 wounds, all the skin layers presented an organized and mature structure much
358 sooner than the control wounds. According to the hypothesis presented above,
359 this faster tissue maturation is directly related to an improved and faster wound
360 closure.

361 A proposed mechanism for the healing effects of EMD is that it has an
362 important anti-inflammatory effect since it down-regulates inflammatory genes,
363 whereas genes related to repair and growth molecules are up-regulated [15]. In
364 the present study we observed that EMD gel may also significantly modulate
365 the levels of TGF- β around the wound sites and thereby promoting healing and
366 tissue regeneration. Although an absolute explanation for the effects of EMD gel
367 on soft tissue wound healing has yet to be established, all the findings of
368 previous studies and ours put together, may partially explain the wound healing
369 effects of EMD gel on soft tissues. EMD gel is suggested to trigger
370 mesenchymal cells to express important factors behind healing, growth and
371 regeneration processes [26,27]. That would probably lead to angiogenesis
372 stimuli and production of VEGF, PDGF, MMP-2. EMD is also helpful for healing
373 due to its inherent anti-bacterial capacity [28,29,30,31].

374 Angiogenesis is one essential component of a normal wound healing and
375 repair and assists the granulation tissue formation, which is essential for wound
376 closure. VEGF is related to that neoangiogenesis and also modulates the
377 recruitment and activity of osteoblasts and osteoclasts and stimulates

378 osteoblasts by up-regulating other osteoinductive factors, such as TGF- β 1,
379 Insulin Growth Factor 1 (IGF-1), and fibroblast growth factor (FGF-2) [32,33]
380 immunohistochemically observed that VEGF expression and micro vessel
381 density was statistically enhanced in periodontal pockets treated with scaling
382 and root planning following 48 hours of EMD gel application. Our results
383 histologically support their findings since we also observed that sites treated
384 with EMD gel also increased neoangionesis. However, in our study that effect
385 was only evident at days 7 and 14. Differences in the models (human vs rats)
386 and evaluation methods (immunohistochemistry vs histology) might, at least
387 partially, explain that discrepancy.

388 Our immunohistochemical results also showed that inflammatory cells
389 were positive for TGF- β 1 with higher numbers, although not statistically
390 significant, for the experimental sites. TGF- β 1 is a pleiotropic cytokine, which
391 has been demonstrated to regulate a wide array of biological process. It plays a
392 major role in the regulation of vascular function, hemostasis, facilitates
393 migration of wound keratinocytes and, thereby, successful reepithelialization,
394 stimulates fibroblasts to deposit new extracellular matrix proteins, which
395 supports cell and vascular in-growth neoangiogenesis [34]. It has been shown a
396 positive correlation with EMD and increased expression of TGF- β 1 [18,35]. Our
397 results are in line with this possible positive correlation with increased TGF- β 1
398 and neo blood vessel formation, also partially explaining the faster healing of
399 the EMD-treated sites.

400 It has been suggested that one of the factors related to skin and muscle
401 healing is the expression of iNOS, which seems to have an important role on all
402 aspects of tissue repair (angiogenesis, cell proliferation, matrix deposition, and

403 remodeling) [36,37]. Al-Hezaima et al. [20] histologically evaluated the “wound
404 gap” on incisions in the back of guinea pigs treated or not with EMD. In all time
405 points (5, 20 and 35 days) it was observed a statistically smaller gap in the
406 treated sites, and also, through time they noted that in the test group the
407 formation and organization of the connective tissue and muscle layer was
408 better. At the end of the experimental time, over 50% of sites of the test group
409 were completely closed. They hypothesized that EMD gel might modulate the
410 level of NOS around wounded area promoting healing. The present study, as
411 far as we are concerned, is the first study to show immunohistochemically an
412 increase in the iNOS modulation on EMD gel-treated skin wounds, increasing
413 the body of evidences suggesting that EMD gel foster and improves soft tissue
414 healing. Our study is also in line with the previous study [20] in regards muscle
415 formation. At day 14 of healing, the muscular layer was better organized in the
416 EMD gel-treated group than in the control group. Furthermore, at day 21 a
417 striking difference was observed between those two groups in regards to
418 muscle formation, maturation and organization. Although we did not investigate
419 any possible explanation for these findings, it is conceivable that EMD gel
420 induces the synthesis of factors involved in muscle formation, including iNOS.

421 **CONCLUSION**

422 Topical application of EMD gel did not influence the inflammatory
423 infiltrate in the leukocyte count, but acted by increasing angiogenesis and
424 granulation tissue, with consequent improvement in tissue repair. EMD-therapy
425 improves and accelerates the healing of skin wounds.

426

427

428

List of abbreviations

429

430

431

432 EMD enamel matrix derivative

433 VEGF vascular endothelial growth factor

434 PDGF platelet-derived growth factor

435 MPM-2 matrix metalloproteinase-2

436 IL-6 interleukin-6

437 HE hematoxylin-eosin

438 ECM extracellular matrix

439 TGF- β transforming growth factor

440 iNOS inducible nitric oxide synthase

441 PBS phosphate buffered saline

442 IGF-1 InsulinGrowthFactor1

443 FGF-2 fibroblast growth factor

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463 **Competing interests**

464

465 The authors declare that they have no competing interests. There are any non-
466 financial competing interests to declare in relation to this manuscript.

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491 Authors' contributions

492 RCS participated in the design of the study, drafted the manuscript and
493 critical revision of manuscript. AJC carried out the design of the study, drafted
494 the manuscript, analysis and interpretation of data, the immunoassays, drafted
495 the manuscript, critical revision of manuscript and statistical analysis. JCJ
496 participated in the critical revision of manuscript. PFMC carried out the critical
497 revision of manuscript. RGO participated in the design of the study, drafted the
498 manuscript, analysis and interpretation of data, statistical analysis and critical
499 revision of manuscript. FMA carried out the design of the study, analysis and
500 interpretation of data, the immunoassays, drafted the manuscript, critical
501 revision of manuscript and statistical analysis. ACM participated in the data
502 collection and critical revision of manuscript. MPCB carried out the data
503 collection and critical revision of manuscript. LSP participated in the data
504 collection and critical revision of manuscript. MMD carried out the design of the
505 study and critical revision of manuscript. WRD participated in design of the
506 study and critical revision of manuscript. BJVA carried out the design of the
507 study, drafted the manuscript, the immunoassays, analysis and interpretation of
508 data, statistical analysis and critical revision of manuscript. All authors read and
509 approved the final version submitted.

510
511
512
513

514
515
516

517

518

519 Acknowledgements

520

521 This article has financial support from Rede Mineira de Bioterismo (Rede 31/11

522 – FAPEMIG), Rede Mineira TOXIFAR (Rede 26/11 – FAPEMIG) and

523 Straumann Institute.

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563 **REFERENCES**

564

565 1. Palmer RM, Cortellini P; Group B of European Workshop on
566 Periodontology:**Periodontal tissue engineering and regeneration:
567 Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology.** J
568 Clin Periodontol. 2008 35(Suppl8):83-6.

569 2. Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S: **Periodontal regeneration in a
570 buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix
571 proteins.** J Clin Periodontol. 1997, 24(9 Pt 2):669-77.

572 3. Heijl L, Heden G, Svärdröm G, Ostgren A:**Enamel matrix derivative
573 (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects.** J Clin
574 Periodontol. 1997, 24(9 Pt 2):705-14.

575 4. Bosshardt DD:**Biological mediators and periodontal regeneration: a
576 review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels.** J
577 Clin Periodontol. 2008, 35(Suppl8):87-105.

578 5. Gestrelus S, Andersson C, Johansson AC, Persson E, Brodin A, Rydhag
579 L,Hammarström L:**Formulation of enamel matrix derivative for surface
580 coating. Kinetics and cell colonization.**J Clin Periodontol.1997, 24(9 Pt 2):
581 678-84.

582 6. Gestrelus S, Lyngstadaas SP, Hammarström L:**Emdogain--periodontal
583 regeneration based on biomimicry.**Clin Oral Investig. 2000, 4(Suppl2):120-5.
584 Review.

585 7. Cochran DL, King GN, Schoolfield J, Velasquez-Plata D, Mellonig JT, Jones
586 A:**The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as**

- 587 **determined by histological analyses.** J Periodontol. 2003, 74(Suppl7):1043-
588 55.
- 589 8. Gkrantias ND, Graziani F, Sculean A, Donos N:**Wound healing following**
590 **regenerative procedures in furcation degree III defects:**
591 **histomorphometric outcomes.** Clin Oral Investig. 2012 ,16(Suppl1):239-49.
- 592 9. Cortellini P, Pini Prato G:**Coronally advanced flap and combination**
593 **therapy for root coverage. Clinical strategies based on scientific evidence**
594 **and clinical experience.** Periodontol 2000. 2012, 59(Suppl1):158-84.
- 595 10. McGuire MK, Scheyer ET, Nunn M:**Evaluation of human recession**
596 **defects treated with coronally advanced flaps and either enamel matrix**
597 **derivative or connective tissue: comparison of clinical parameters at 10**
598 **years.** J Periodontol. 2012, 83(Suppl11):1353-62. doi:
599 10.1902/jop.2012.110373.
- 600 11. Lyngstadaas SP, Wohlfahrt JC, Brookes SJ, Paine ML, Snead ML,
601 Reseland JE: **Enamel matrix proteins; old molecules for new**
602 **applications.**OrthodCraniofac Res 2009,12:243–253
- 603 12. Wennström JL, Lindhe J:**Some effects of enamel matrix proteins on**
604 **wound healing in the dento-gingival region.** J Clin Periodontol. 2002,
605 29(Suppl1):9-14.
606
- 607 13. Tonetti MS, Fourmouis I, Suvan J, Cortellini P, Brägger U, Lang
608 NP:**European Research Group on Periodontology (ERGOPERIO). Healing,**
609 **post-operative morbidity and patient perception of outcomes following**

- 610 **regenerative therapy of deep intrabony defects.**J Clin Periodontol. 2004,
611 31(Suppl12):1092-8.
- 612 14. Sculean A, Berakdar M, Donos N, Ausschill TM, Arweiler NB:**The effect of**
613 **postsurgical administration of a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor on**
614 **the healing of intrabony defects following treatment with enamel matrix**
615 **proteins.**Clin Oral Investig. 2003, 7(Suppl2):108-12.
- 616 15. Parkar, M.H., and Tonetti, M:**Gene expression profiles of periodontal**
617 **ligament cells treated with enamel matrix proteins in vitro: analysis using**
618 **cDNA arrays.** J Periodontol.2004, 75, 1539.
- 619 16. Myhre AE, Lyngstadaas SP, Dahle MK, Stuestøl JF, Foster SJ,
620 Thiemermann C et al:**Anti-inflammatory properties of enamel matrix**
621 **derivative in human blood.**J Periodontal Res 2006, 41:208– 13.
- 622 17. Spahr A, Lyngstadaas SP, Boeckh C, Andresson C, Ehrlich M, Podbielski A
623 et al:**Effect of the enamel matrix derivative Emdogain on the growth of**
624 **periodontal pathogens in vitro.**J ClinPeriodontol 2002, 29:62–72.
- 625 18. Suzuki S, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K, Arai T, Fukae M et al:**Enamel**
626 **matrix derivative gel stimulates signal transduction of BMP and TGF- β .** J
627 Dent Res. 2005, 84:510–4.
- 628 19. Mirastschijski U, Konrad D, Lundberg E, Lyngstadaas SP, Jorgensen LN,
629 Aagren M:**Effects of a topical enamel matrix derivative on skin wound**
630 **healing.** Wound Repair Regen. 2004,12:100–8.
- 631 20. Al-Hezaimi K, Al-Askar M, Al-Fahad H, Al-Rasheed A, Al-Sourani N, Griffin
632 T, O'Neill R, Javed F:**Effect of enamel matrix derivative protein on the**

- 633 **healing of standardized epithelial wounds: a histomorphometric analysis**
634 **in vivo.** *Int Wound J.* 2012, 9(Suppl4):436-41.
- 635 21. Chadwick P, Acton C:**The use of amelogenin protein in the treatment of**
636 **hard-to-heal wounds.** *Br J Nurs.* 2009, 18(Suppl6):S22, S24, S26, passim.
637 Review.
- 638 22. Romanelli M, Kaha E, Stege H, Wnorowski JW, Vowden P, Maja-
639 **al:Effect of amelogenin extracellular matrix protein and compression on**
640 **hard-to-heal venous leg ulcers: follow-up data.** *J Wound Care* 2008, 17:20–
641 3.
- 642 23. Vowden P, Romanelli M, Peter R, Boström A, Josefsson A, Stege H:**The**
643 **effect of amelogenins (Xelma) on hard-to-heal venous leg ulcers.** *Wound*
644 *Repair Regen.* 2006, 14(Suppl3):240-6.
- 645 24. Romanelli M, Dini V, Vowden P, Agren MS:**Amelogenin, an extracellular**
646 **matrix protein, in the treatment of venous leg ulcers and other hard-to-**
647 **heal wounds: experimental and clinical evidence.** *Clin Interv Aging.* 2008,
648 3(Suppl2):263-72. Review.
- 649 25. Weinberg E, Topaz M, Dard M, Lyngstadaas P, Nemcovsky C, Weinreb
650 **M:Differential effects of prostaglandin E(2) and enamel matrix derivative**
651 **on the proliferation of human gingival and dermal fibroblasts and gingival**
652 **keratinocytes.** *J Periodontal Res.* 2010, 45(Suppl6):731-40.
- 653 26. Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S:
654 **Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on**
655 **enamel matrix derivative.** *J ClinPeriodontol* 1991, 28:181–8.

- 656 27. Reseland JE, Reppe S, Larsen AM, Berner HS, Reinholt FP, Gautvik KM et
657 al:**The effect of enamel matrix derivative (EMD) on gene expression in**
658 **osteoblasts.**Eur J Oral Sci. 2006, 114:205–11.
- 659 28. Vowden P, Romanelli M, Price P: **Effect of amelogenin extra- cellular**
660 **matrix protein and compression on hard-to-heal venous leg ulcers.** J
661 Wound Care 2007, 16:189–95.
- 662 29. Sculean A, Ausschill TM, Donos N, Brex M, Arweiler NB:**Effect of an**
663 **enamel matrix protein derivative (Emdogain) on ex vivo dental plaque**
664 **vitality.**J Clin Periodontol. 2001
- 665 30. Arweiler NB, Ausschill TM, Donos N, Sculean A:**Antibacterial effect of an**
666 **enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality.**Clin Oral
667 Investig. 2002, 6(Suppl4):205-9.
- 668 31. Newman SA, Coscia SA, Jotwani R, Iacono VJ, Cutler CW:**Effects of**
669 **enamel matrix derivative on Porphyromonas gingivalis.** J Periodontol.
670 2003, 74(Suppl8):1191-5.
- 671 32. Carano RA, Filvaroff EH:**Angiogenesis and bone repair.** Drug Discov
672 Today. 2003, 8(Suppl21):980-9. Review.
- 673 33. Aspriello S:**Effects of Enamel Matrix Derivative on Vascular Endothelial**
674 **Growth Factor Expression and Microvessel Density in Gingival Tissues of**
675 **Periodontal Pocket: A Comparative Study.**J Periodontol.2011,82:606-612.
- 676 34. Nokhbehshaim M., Deschner B, Winter J, Bourauel C., Jäger A., Jepsen
677 S:**Deschner J Anti-inflammatory effects of EMD in the presence of**

678 **biomechanical loading and interleukin-1 β in vitro.** Clin Oral Invest.2011
679 16:275–283.

680 35. Okubo K, Kobayashi M, Takiguchi T, Takada T, Ohazama A, Okamatsu
681 Y, Hasegawa K:**Participation of endogenous IGF-I and TGF-beta 1 with**
682 **enamel matrix derivative-stimulated cell growth in human periodontal**
683 **ligament cells.**J Periodontal Res_ 2003, 38 (Suppl1):1-9.

684 36. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier
685 RM:**Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle.**Nitric Oxide.
686 2011, 1;24 (Suppl1):43- 9. doi: 10.1016/j.niox.2010.11.003.

687 37. Paulsen SM, Wurster SH, Nanney LB:**Expression of inducible nitric**
688 **oxide synthase in human burn wounds.** Wound Repair Regen. 1998,
689 6(Suppl2):142-8.

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703 **Figure Legends**

704 Figure 1; Macroscopic analysis; A – 1 day of post op. B – 3 days of post op. C –
 705 7 days of post op. D – 14 days of post op. E – 21 days of post op. Left injury is
 706 the experimental group and right injury is the control group. Macroscopic aspect
 707 of the experimental and control wounds. Difference was clear at days 14 (D)
 708 and 21 (E).

709 Figure 2; Microscopic image –inflammatory infiltrate; In control (A) and treated (D)
 710 samples of 3 days of post op was observed fibrinous deposition (arrow head),
 711 consistent with the repair period. However, the inflammatory infiltrate of control group
 712 (A) exhibit a predominance of polymorph nuclear leukocytes (neutrophils) (blue arrow)
 713 while the treated samples (D) mononuclear leukocytes (lymphocytes) (black arrow)
 714 predominate. The newly formed vessels (asterisk) of the treated samples (D) show
 715 more maturity. The depth of dermis of the 7 days of post op of the treated group (E)
 716 was still filled with weaker scar tissue (\square). Granulation tissue in the papillary dermis
 717 and reticular dermis is more mature, less bulky and collagen (arrows), denser and
 718 more organized when compared with the control group (B). Noted most obvious
 719 angiogenesis (X) in treated samples (E). The subcutaneous tissue of the control group
 720 of the 14 days of post op (C) is more swollen and disorganized muscle layer (arrows)
 721 compared with the samples of the treated group of the 14 days post op (F). Was
 722 observed the apparent maturation of the scars dermis – sub epithelial and deep – in
 723 samples form treated group (C) compared to those of control group (F) at this stage
 724 of repair. Original magnificence 400x.

725 Figure 3; Section of vessels; Count of section of vessels per microscopic field
 726 with original magnification 400x. ANOVA shows differences between the groups
 727 on day 7 of post op, however it was significant on day 14 of post op. $p < 0, 01$

728 Figure 4; Leukocyte count; Leukocyte count per microscopic field with original
 729 magnification 400x. There was no difference between control and treated
 730 groups, just differences over time. $P < 0, 01$

731

732 Figure 5; Microscopic image - wound closure; The healing process of the
 733 experimental wounds was better at all time points with the exception of day 1.
 734 There was greater surface coverage by clot as well as best filling in wound
 735 inflammatory in treated samples at 3 days of post op (E) compared to those of

736 control (A). Similarly, the subcutaneous tissue of the treated samples (E)
737 appears more stable. The epithelial edges and dermal layers of the treated
738 samples of 7 days of post op (F) were stable when compared with the samples
739 from the control group (B). Epithelization with keratinization was observed in
740 samples from both groups of 14 days of post op, however noted discrete best
741 cytoarchitectural organization of treated samples (G) compared to those of the
742 control group (C). It was observed in both samples of 21 days of post op re
743 epithelization with superficial keratinization, however, the samples from the
744 treated group (H) shows evidence of early reconstitution of epidermal
745 appendages while the same did not occur in the control samples (D). Such
746 regeneration was also observed in the subcutaneous layer (H). Although in the
747 samples from the control group (D) the muscle fibers were in rebuilding
748 anatomical integrity, in the samples of the treated group (H) it was more
749 prominent. Original magnificance 200x.

750 Figure 6; Immunohistochemistry of – iNOS; Immunohistochemistry of iNOS: A –
751 7 days of post op, control group; B – 14 days of post op, control group; C – 7
752 days of post op, experimental group; D – 14 days of post op, experimental
753 group. An increased of inflammatory iNOS positive cells in 7 and 14 days in the
754 treated wounds evidenced when compared to control wounds. In detail:
755 inflammatory cells expressing iNOS (black arrow) and inflammatory cells with
756 negative expression (blue arrow). Original magnificance 400x. In detail original
757 magnificance 1000X.

758

759 Figure 7; iNOS expression; iNOS expression cells count per microscopic field
760 with original magnification 400x. The ANOVA shows differences between
761 groups and between time, $p < 0.01$. Except among the groups on the first day.

762

763 Figure 8; Immunohistochemistry of – TGF- β ; Immunohistochemistry of TGF- β : A
764 – 7 days of post op, control group; B – 14 days of post op, control group; C – 7
765 days of post op, experimental group; D – 14 days of post op, experimental
766 group. An increased of inflammatory TGF- β positive cells in 7 and 14 days in
767 the treated wounds evidenced when compared to control wounds, but with no
768 significance. In detail: inflammatory cells expressing TGF- β (black arrow) and

769 inflammatory cells with negative expression (blue arrow). Original magnificence
770 400x. In detail original magnificence 1000X.

771

772 Figure 9; TGF- β expression; TGF- β expression cells count per microscopic
773 field with original magnification 400x. The ANOVA shows no difference between
774 the groups, but the time influenced the variable studied $p < 0.01$.

775

776

