Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Pós-Graduação em Periodontia

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos e na cicatrização de alvéolos pós-extração com ou sem material de enxerto. Estudo histomorfométrico e microtomográfico em cães.

Carolina de Moraes Rego Mandetta

Ribeirão Preto
2017

CAROLINA DE MORAES REGO MANDETTA

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos e na cicatrização de alvéolos pós-extração com ou sem material de enxerto. Estudo histomorfométrico e microtomográfico em cães.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior

Ribeirão Preto
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Mandetta, Carolina de Moraes Rego

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos e na cicatrização de alvéolos pós-extração com ou sem material de enxerto. Estudo histomorfométrico e micro-tomográfico em cães.

138p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Novaes Jr, Arthur Belém

1. Alvéolo pós-extração.
2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana.
3. Implante imediato.
4. Remodelação óssea alveolar.
5. Enxerto xenógeno.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina de Moraes Rego Mandetta

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos e na cicatrização de alvéolos pós-extração com ou sem material de enxerto. Estudo histomorfométrico e microtomográfico em cães.

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

Área de concentração: Periodontia.

Aprovado em: ____ / ____ / 2017

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À minha amada família,

As pessoas mais importantes em minha vida, meus pais **Hercules** e **Cynthia**, meus irmãos **Vicente**, **Carla** e **Helio**, meus avós **Sydney** e **Nilza**, meu marido **Ronaldo** e meu filho **Marcelo**.

Simplesmente por tudo....

“Chega um momento em sua vida, que você sabe:

Quem é imprescindível para você,

Quem nunca foi

Quem nunca será

Quem será sempre!”

Charles Chaplin

Agradecimentos Especiais

À minha **mãe**, que sempre renunciou aos próprios desejos em favor dos meus e dos meus irmãos. Você fez de meus sonhos os seus, sem medir esforços para realizá-los. Iluminou meu caminho com amor e extrema dedicação. A você, minha eterna gratidão e todo o meu amor.

Aos meus queridos avós, **Sydney** e **Nilza**, grandes exemplos de vida, perseverança, amor e dedicação. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio e tudo o que sempre fizeram por mim e por nossa família.

Aos meus irmãos **Vicente, Carla e Helio**, meus melhores amigos e eternos companheiros, que nem mesmo a distância é capaz de diminuir toda a admiração, respeito e carinho que temos uns pelos outros, pelo contrário, só aumenta o desejo de estarmos sempre juntos.

A meu marido, **Ronaldo**, por oferecer-me todo o suporte necessário para que meu objetivo fosse alcançado. Muito obrigada pelo amor, companheirismo, incentivo, paciência e especialmente pela alegria contagiante com que sempre conduziu a situação.

A meu filho, **Marcelo**, onde em apenas um olhar já sobravam motivos para sempre seguir em frente. Por dar um novo sentido a nossas vidas e nos fazer querer ser sempre melhores. Simplesmente por ser a melhor parte de mim e por encher de amor e alegria nossa família.

À minha família, *avós, tios e primos*, que de certa maneira, sempre estiveram de longe ou perto vibrando por minhas conquistas. Em especial a minha querida tia **Joina** por toda dedicação e prestatividade.

Ao meu orientador, **Profº Dr Arthur Belém Novaes Júnior**, exemplo de competência, espírito científico e dedicação a pesquisa. Muito obrigada pelas oportunidades, ensinamentos e confiança.

Ao meu marido, **Ronaldo**, meus cunhados **Alexandre, Angélica e Carla**, minha mãe e minha irmã **Carla**, por todo cuidado dedicado a nosso menino, especialmente nos últimos meses, em que estive ausente em muitos momentos. Muito obrigada por tornarem esses momentos menos difíceis e, dessa forma, diminuírem minha angustia, permitindo a conclusão deste trabalho.

Agradecimientos

À **Deus**, por me conceder o Dom da vida, força, amparo, proteção, pela possibilidade de empreender esse caminho evolutivo, e por me proporcionar tantas oportunidades.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, responsáveis por minha formação profissional. Ao **Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi**, pelo entusiasmo e amor, contagiante, a periodontia. Ao **Prof. Dr. Mário Taba Júnior**, pelas conversas agradáveis sobre pesquisa. Ao Prof. **Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pelos conselhos e incentivo ao trabalho. À Prof^a. **Daniela Bazan Palioto** pelos ensinamentos transmitidos. Ao prof. **Michel Reis Messori** pelos ensinamentos e trocas de experiências.

Ao prof. **Valdir Antônio Muglia**, pela colaboração na fase experimental do estudo, com a confecção das próteses.

Ao professor **Paulo Tambasco de Oliveira**, pela amizade e disposição com que sempre me recebeu e orientou.

Aos colegas de Doutorado, **Carol Delmondes, Umberto e Gustavo**, pelos bons momentos de alegria compartilhados, convivência harmoniosa e apoio durante esta trajetória.

Em especial a **Carol Delmondes**, a grande amiga que que ganhei de presente da pós-graduação e que se tornou um verdadeiro membro de minha família. E a **Umberto Demoner Ramos**, que participou ativamente em todas as fases deste estudo.

A todos os colegas da turma de pós-graduação: **André Moreira, Cristine Borges, Felipe Santos, Felipe Torres, Gabriel Bastos, Kelly Roccio, Mariana Sales, Tulio Pignaton, Paulinha e Patrícia Garani**. por todo o companheirismo e senso de equipe.

À técnica do Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos, **Adriana Luisa Gonçalves de Almeida**, pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e por toda assistência prestada durante o tempo em que estivemos juntas trabalhando nas análises das peças deste trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Histologia, **Sebastião Bianco**, pelo processamento das peças calcificadas

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, **Dulce de Oliveira Negretti, Tatiana Angeli Passos Fernandes (Tati) e Carla Daniela Lima (Dani)**, secretárias do departamento de CTBMF e Periodontia, pela inestimável e constante ajuda, além da relação de respeito e amizade para com todos nós.

Às secretarias da seção de pós-graduação, **Isabel Sola, Regiane Cristina Sacilotto e Mary Possani**, pela disponibilidade e cordialidade no atendimento às nossas necessidades recorrentes.

Às funcionarias da Clínica de Pós-Graduação, **Dani, Sueli e Dona Joana**, pela amizade, ajuda, alegria, disponibilidade e compreensões diárias.

Aos funcionários do Biotério II, **Aldo e Édson (Marmita)**, cuja contribuição foi imprescindível para a realização de nosso estudo. Ao médico veterinário, **Rafael**, por toda dedicação e competência demonstrada no cuidado com os cães.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP)**, pela estrutura científica e tecnológica oferecida aos estudantes para realização de pesquisas em nível de excelência internacional.

À **CAPES** pelo recurso financeiro através da bolsa de pós-graduação

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Epígrafe

“De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre começando...
a certeza de que é preciso continuar...
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:
fazer da interrupção, um caminho novo...
da queda, um passo de dança...
do medo, uma escada...
do sonho, uma ponte...
da procura, um encontro.”

Fernando Pessoa

Resumo

RESUMO

Mandetta CMR. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos e na cicatrização de alvéolos pós-extração com ou sem material de enxerto. Estudo histomorfométrico e microtomográfico em cães. 138p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2017.

A reabsorção óssea alveolar associada as perdas dentais constitui uma condição inerente ao processo de cicatrização fisiológico natural. Técnicas como a instalação de implantes imediatos e técnicas de preservação alveolar têm sido sugeridas com o objetivo de limitar as alterações adversas sofridas pelo processo alveolar. Contudo, frequentemente as perdas dentárias estão associadas a infecções crônicas que tradicionalmente contraindicariam os procedimentos de enxerto ou implantes imediatos, a menos que meticulosos debridamento e irrigação alveolar associados a adequado protocolo antibiótico pré e pós-operatório sejam empregados. Alternativas precisam ser testadas para a substituição do uso indiscriminado de antibioticoterapia sistêmica. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da TFDa na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos e na cicatrização de alvéolos pós-extração associados ou não ao uso de enxertos xenógeno através de análises microtomográficas e histomorfométricas. Para tanto, foram selecionados 8 cães, os quais foram submetidos a uma fase de indução de doença periodontal por ligadura, seguida por um período de estabelecimento da doença. Após a exodontia dos pré-molares bilaterais, aleatoriamente os alvéolos de um lado da mandíbula foram descontaminados por debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina (grupo controle) e do outro lado por debridamento mecânico e irrigação com solução salina associados a terapia fotodinâmica antimicrobiana (grupo teste), e subsequentemente submetidos a instalação de implantes imediatos, dando origem aos grupos GT-I (Grupo Teste – Implante) e GC-I (Grupo Controle – Implante). Os demais alvéolos, foram utilizados para o estudo da dinâmica de cicatrização alveolar. Os sítios foram aleatoriamente alocados em: GT-C (Grupo teste – Coágulo), GT-BO (Grupo Teste – Bio-Oss®), GT-BOC (Grupo Teste – Bio-Oss® Collagen), GC-C (Grupo Controle – Coágulo), GC-BO (Grupo Controle – Bio-Oss®) e GC-BOC (Grupo Controle – Bio-Oss® Collagen). Após 12 semanas, os cães foram sacrificados e as amostras processadas para as análises de microtomografia computadorizada, histologia e histomorfometria. Na avaliação da

cicatrização dos alvéolos pós-extração, embora os alvéolos descontaminados com TFDa (GT-C, GT-BO, GT-BOC) tenham apresentado melhores resultados numéricos, em relação a altura da crista óssea vestibular (ACOV) e a dimensão buco-lingual (DBL), não foram evidenciadas diferenças relevantes na análise histomorfométrica. Apenas a ACOV, mensurada na avaliação microtomográfica bidimensional, demonstrou-se significativamente inferior nos alvéolos do grupo teste que não receberam material de enxerto (GT-C) quando comparados aos respectivos alvéolos do grupo controle (GC-C). Na avaliação dos implantes imediatos, a análise histomorfométrica dos parâmetros: reabsorção da crista óssea vestibular (RCOV) e contato osso implante (BIC) demonstrou resultados significativamente superiores no GT-I em relação ao GC-I, e do parâmetro densidade óssea (DO) demonstrou apenas resultado numericamente superior no GT-I em relação ao GC-I. Todas as análises microtomográficas bidimensionais (RCOV) e tridimensionais (volume ósseo – BV, porcentagem óssea – BV/TV, densidade de superfície óssea – BS/TV, espessura trabecular – Tb.TH, número de trabéculas – Tb.N e separação trabecular – Tb.SP) demonstraram resultados significativamente melhores nos implantes do grupo teste (GT-I) em relação aos implantes do grupo controle (GC-I). A TFDa demonstrou potencial como agente de descontaminação de alvéolos pós-extração periodontalmente infectados, previamente a instalação de implantes imediatos e na cicatrização de alvéolos pós-extração associados ou não a materiais de enxerto xenógenos, sem o uso de antibioticoterapia sistêmica associada.

Palavras chave: Alvéolo pós-extração, terapia fotodinâmica antimicrobiana, implante imediato, remodelação óssea alveolar, enxerto xenógeno.

Abstract

ABSTRACT

Mandetta CMR. **The effect of aPDT on the decontamination of infected alveoli prior to immediate implantation and on post extraction socket healing with or without xenogeneic graft. A histomorphometric and microcomputed tomographic study in dogs.** 138p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2017.

Alveolar bone resorption following tooth loss is an inherent condition of the natural healing process. Therefore, several techniques, such as immediate implants placement and post extraction socket preservation, have been suggested in order to limit the adverse changes suffered by the alveolar process. However, extraction sockets commonly results from the removal of teeth affected by chronic infection, which conventionally contraindicates immediate bone graft and implant placement unless meticulous wound debridement and alveolar irrigation associated to a suitable pre- and post-operative antibiotic protocol are employed. Alternatives ought to be tested in order to substitute the indiscriminate use of systemic antibiotic therapy. The aim of the present study was to evaluate the effect of the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the decontamination of infected post extraction sockets, previously to immediate implant placement and in the healing of post extraction sockets associated or not to xenografts. In the first phase, periodontitis was induced with ligatures in the mandibular premolars of eight beagle dogs. After 2 months, in the second phase of the study the dogs had their mandibular bicuspid bilaterally extracted, and randomly one hemi-mandible was decontaminated by mechanic debridement associated to saline solution irrigation (Control Group – CG), and the other hemi-mandible was decontaminated with mechanic debridement and saline solution irrigation associated to antimicrobial photodynamic therapy (Test Group – TG). Thereafter, 3 immediate implants in each side of the mandible were placed and the following groups were devised: TG-I (Test Group – Implant) and CG-I (Control Group – Implant). The remaining sockets were used for the study of the healing dynamic. The sockets were randomly assigned to the following groups: Test Group – Blood clot (TG-BC), Test Group – Bio-Oss® (TG-BO), TG – BOC (Test Group Bio-Oss® Collagen), Control Group – Blood Clot (CG-BC), Control Group – Bio-Oss® (CG-BO) and Control Group Bio-Oss® Collagen (CG-BOC). After 12 weeks, the dogs were sacrificed and the specimens were processed for microtomographic, histological and histomorphometric analysis. When the post extraction healing process was evaluated, the aPDT decontaminated sockets (TG-BC, TG-

BO and TG-BOC) presented better numerical results in comparison to both buccal bone crest height (BCL) and in the bucco-lingual dimension (BLD). However, there were no statistically differences among the groups for these parameters in the histomorphometric analysis. Only the BCL measured in the two-dimensional microtomographic analysis showed statistic better results in the TG-BC when compared to the CG-BC. In the evaluation of the immediate implant placement the histomorphometric analysis presented statistically better results for the TG-I in the bone-implant contact (BIC), as well as in the vertical buccal bone loss (VBBL). The bone density (BD) was numerically better in the TG-I than in the CG-I. Both two-dimensional (VBBL) and three-dimensional (bone volume – BV, percentage of the total bone volume - BV/TV, bone surface density - BS/TV, trabecular thickness – Tb.Th, trabecular separation – Tb.Sp and trabecular number – TB.N) microtomographic analysis showed statistically better results in the TG-I. The aPDT showed potential in the decontamination of infected post extraction sockets previously to immediate implant placement and in the healing of post extraction sockets associated or not to xenogeneic grafts, without the use of systemic antibiotics.

Key words: Extraction socket, antimicrobial photodynamic therapy, alveolar bone remodeling, immediate implant, xenograft.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Desenho experimental proposto no estudo.....	45
<i>Figura 2.</i> Indução de doença periodontal por ligadura: A. Elevação de retalho total; B. Ligaduras posicionadas em defeitos intra-ósseos, criados cirurgicamente, ao redor dos pré-molares mandibulares; C. Retalho reposicionado e suturado; D. Aspecto clínico após 8 semanas de indução da doença periodontal; E. Radiografia periapical evidenciando a perda óssea alveolar	47
<i>Figura 3.</i> Instalação de Implantes Imediatos e Preservação ou não dos alvéolos remanescentes: A. Aspecto inicial da mucosa e dos dentes; B. Elevação de retalho total; C. Hemisseccção dos pré-molares mandibulares; D. Alvéolos pós-extração; E. Grupo teste: Debridamento + irrigação com solução salina; F. Grupo Controle: Debridamento + irrigação com solução salina + TFDa; G. Implantes imediatos; H. Transferentes em posição para moldagem e posterior confecção das próteses; I. Enxerto ósseo nos respectivos alvéolos selecionados aleatoriamente - P2 mesial: Bio-Oss®, P3 mesial: Bio-Oss® Collagen e P4 mesial: Coágulo; J. Sutura; K. Próteses instaladas uma semana após o procedimento cirúrgico	50
<i>Figura 4.</i> Imagens microtomográficas representando as medidas 2D (medidas lineares) nos alvéolos: A. Reabsorção da crista óssea vestibular (V) em relação a crista óssea lingual (L): Determinada como uma medida linear vertical a partir de uma linha imaginária (amarela) partindo da crista óssea lingual ao ponto mais alto da crista óssea vestibular; B. Dimensão buco-lingual do alvéolo (DBL): Avaliada 1 mm abaixo do ponto ósseo mais alto no alvéolo (Linha vermelha).....	53
<i>Figura 5.</i> Imagem microtomográfica representando a medida linear (2D): Reabsorção vertical da crista óssea (RVCO) - Distância resultante entre o ombro do implante e o primeiro contato osso-implante	54
<i>Figura 6.</i> Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando as medidas histomorfométricas aferidas nos alvéolos; A. Reabsorção da crista óssea vestibular (V) em relação a crista óssea lingual (L) foi determinada como uma medida linear vertical em duas regiões diferentes: de uma linha imaginária partindo da crista óssea lingual ao ponto mais alto de osso neoformado (ACOV-ON), e de uma linha imaginária da crista óssea lingual ao primeiro ponto de osso antigo (ACOV-OA) (linha branca); B. A dimensão buco-lingual do alvéolo (DBL) foi avaliada 1 mm abaixo do ponto ósseo mais alto no alvéolo (Linha vermelha); C. A densidade óssea	

histológica foi determinada a partir de um retângulo incluindo a região do defeito (em branco). A área óssea total (AOT), área medular (AM) e partículas residuais do enxerto (PRE) foram quantificadas. Uma linha tracejada branca foi desenhada para separar osso antigo (OA) e osso novo (ON) (Magnificação de 2,5x)..... 56

Figura 7. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando as medidas histomorfométricas aferidas na face vestibular dos implantes imediatos. A. Reabsorção da crista óssea vestibular (RCOV): determinada a partir de uma linha imaginária do ombro do implante em direção ao primeiro contato osso-implante (Magnificação de 2,5x); B. Densidade óssea histológica e contato osso implante (BIC): determinados a partir de um retângulo de 3 mm², partindo do primeiro contato osso-implante (Magnificação de 2,5x)..... 57

Figura 8. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo teste que não receberam material de enxerto (GT-C), coradas em vermelho de alizarina. A. A entrada do alvéolo demonstrou-se fechada por uma ponte de tecido mineralizado neoformado, unindo as tábuas ósseas vestibular (V) e lingual (L), enquanto nas porções marginais e central encontrava-se osso novo (ON) e área medular (AM) (Magnificação de 1,6x). B. Aspectos do osso novo (ON) com presença de matriz osteóide (MO) pavimentada por osteoblastos (cabeça de seta) e osteoclastos (OC – seta) caracterizando processo de modelamento e remodelamento ósseo ativo (Magnificação de 10x). C. Note a diferença entre ON e o osso antigo (OA) disposto em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso lamelar (OL) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm)..... 61

Figura 9. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo controle que não receberam material de enxerto (GC-C), coradas em vermelho de alizarina. A. A entrada do alvéolo demonstrou-se fechada por uma ponte de tecido mineralizado neoformado, unindo as tábuas ósseas vestibular (V) e lingual (L), enquanto nas porções marginais e central encontrava-se osso novo (ON) e área medular (AM) (Magnificação de 1,6x). B. Aspectos do osso novo (ON) com presença de matriz osteóide (MO) pavimentada por osteoblastos (OB – cabeça de seta) e osteoclastos (OC – seta) caracterizando processo de modelamento e remodelamento ósseo ativo (Magnificação de 20x). C. Note a diferença entre ON e o osso antigo (OA) disposto em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso lamelar (OL) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm)..... 62

Figura 10. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo teste que receberam enxerto de Bio-Oss® (GT-BO), coradas em vermelho de alizarina. A. Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocupam boa parte da entrada e interior dos alvéolos. Ocasionalmente foi observada a presença de partículas fora do tecido ósseo (*) (Magnificação de 1,6x). B. A maior parte das partículas demonstraram-se revestidas por ON, com células osteoclásticas (OC - seta) sobre as partículas residuais de enxerto (PRE) (Magnificação 20x). C. Observe a diferença entre o osso novo (ON) e o osso antigo (OA) em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso antigo (OA) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm) 63

Figura 11. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo controle que receberam enxerto de Bio-Oss® (GC-BO), coradas em vermelho de alizarina. A. Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocupam boa parte da entrada e interior dos alvéolos. Ocasionalmente foi observada a presença de partículas fora do tecido ósseo (*) (Magnificação de 1,6x). B. Algumas partículas demonstraram-se revestidas por ON, enquanto outras encontravam-se circunscritas em área medular (AM), com células osteoclásticas (OC - seta) sobre as partículas residuais de enxerto (PRE) (Magnificação 20x). C. Observe a diferença entre o osso novo (ON), e o osso antigo (OA) em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso antigo (OA) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm)..... 64

Figura 12. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo teste que receberam enxerto de Bio-Oss® Collagen (GT-BOC), coradas em vermelho de alizarina. A. Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocupam boa parte da entrada e interior dos alvéolos. Ocasionalmente foi observada a presença de partículas fora do tecido ósseo (*) (Magnificação de 1,6x). B. Algumas partículas demonstraram-se revestidas por ON, enquanto outras encontravam-se circunscritas por tecido conjuntivo fibroso (TC) (Magnificação 20x). C. Observe a diferença entre o osso novo (ON) e o osso antigo (OA) em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso antigo (OA) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm)..... 65

Figura 13. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo controle que receberam enxerto de Bio-Oss® Collagen (GC-BOC), coradas em vermelho de alizarina. A. Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocupam a entrada dos alvéolos, com grande parte das PRE observadas fora do tecido ósseo (Magnificação de 1,6x). B. Poucas partículas demonstraram-se revestidas por ON, enquanto a maior parte encontravam-se circunscritas por tecido conjuntivo fibroso (TC) (Magnificação 20x). C. Observe a diferença entre o (ON) e o osso antigo (OA) em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso antigo (OA) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm) 66

Figura 14. Imagem representativa da microtomografia computadorizada (Micro-CT): A. Alvéolo do grupo teste que cicatrizou em presença de coágulo (Grupo Teste Coágulo - GT-C) e B. Alvéolo do grupo controle que cicatrizou em presença de coágulo (Grupo Controle Coágulo - GC-C), três meses após o procedimento de extração dentária. Observe a melhor preservação da crista óssea vestibular ao lado esquerdo no alvéolo do grupo teste (GT-C) e ao lado direito no alvéolo do grupo controle (GC-C) 71

Figura 15. Imagem histológica corada em vermelho de alizarina representando os implantes imediatos instalados em sítios que foram descontaminados com TFDa (GT-I). Note o implante integrado ao tecido ósseo adjacente e o nível da tábua vestibular ligeiramente apical ao ombro do implante (Magnificação de 2,5x) 73

Figura 16. Imagem histológica corada em vermelho de alizarina representando os implantes imediatos instalados em sítios que foram descontaminados com debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina (GC-I). Note o comprometimento da integração do implante ao tecido ósseo adjacente e o nível da tábua vestibular bastante apical ao ombro do implante (Magnificação de 2,5x) 74

Figura 17. Imagem histológica corada em vermelho de alizarina representando os implantes imediatos instalados em sítios que foram descontaminados com debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina (GC-I). Note a presença de infiltrado inflamatório ao redor da superfície do implante (Magnificação de 10x) 75

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1.</i> Avaliação histomorfométrica das medidas lineares em alvéolos: Altura da crista óssea vestibular em relação ao osso novo (ACOV-ON), Altura da crista óssea vestibular em relação ao osso antigo (ACOV-OA) e Dimensão buco-lingual (DBL), comparações intra e inter-grupos.....	68
<i>Tabela 2.</i> Avaliação histomorfométrica das medidas de área em alvéolos: Área medular (AM), Área óssea total (AOT) e Partículas residuais de enxerto (PRE); comparações intra e inter-grupos.....	69
<i>Tabela 3.</i> Avaliação microtomográfica bidimensional da altura da crista óssea vestibular (ACOV) e da dimensão buco-lingual (DBL) em alvéolos, comparações intra e inter-grupos.....	71
<i>Tabela 4.</i> Avaliação microtomográfica tridimensional em alvéolos: Volume ósseo (BV); Porcentagem óssea (BV/TV); Densidade de superfície óssea (BS/TV), Espessura trabecular (Tb.Th), Separação trabecular (Tb.SP) e Número de trabéculas (Tb.N), comparações intra e inter-grupos.....	72
<i>Tabela 5.</i> Avaliação histomorfométrica da reabsorção vertical da crista óssea vestibular (RVCO) – Medida linear vertical do ombro do implante ao primeiro contato osso-implante (BIC), comparação inter-grupos	76
<i>Tabela 6.</i> Avaliação histomorfométrica do contato osso-implante (BIC) e da densidade óssea (DO), comparação inter-grupos	76
<i>Tabela 7.</i> Avaliação microtomográfica bidimensional da reabsorção vertical da crista óssea vestibular (RVCO) – Medida linear vertical do ombro do implante ao primeiro contato osso-implante (BIC), comparação inter-grupos	77
<i>Tabela 8.</i> Avaliação microtomográfica tridimensional em implantes, comparação inter-grupos	77

*Lista de Abreviaturas,
Siglas e Símbolos*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TFDa: Terapia fotodinâmica antimicrobiana

GT-I: Grupo Teste – Implante

GC-I: Grupo Controle - Implante

GT-C: Grupo Teste - Coágulo

GT-BO: Grupo Teste - Bio-Oss

GT-BOC: Grupo Teste - Bio-Oss Collagen

GC-C: Grupo Controle - Coágulo

GC-BO: Grupo Controle - Bio-Oss

GC-BOC: Grupo Controle - Bio-Oss Collagen

P1: Primeiro pré-molar

P2: Segundo pré-molar

P3: Terceiro pré-molar

P4: Quarto pré-molar

Micro-CT: Microtomografia computadorizada

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

ROI: Região de interesse

VOI: Volume de interesse

ACOV: Altura da crista óssea vestibular

DBL: Dimensão buco-lingual

BV: Volume ósseo da amostra

BV/TV: Razão entre o volume ósseo e o volume da amostra

BS/TV: Razão entre o volume ósseo da amostra e o volume total da amostra

Tb.Th: Espessura trabecular

Tb.N: Número de trabéculas

Tb.SP: Separação trabecular

RVCO: Reabsorção da crista óssea vestibular

ACOV-ON: Altura da crista óssea vestibular – Osso novo

ACOV-OA: Altura da crista óssea vestibular – Osso antigo

DO: Densidade óssea

AOT: Área óssea total

AM: Área medular

PRE: Partículas residuais de enxerto

RCVO: Reabsorção da crista óssea vestibular

ON: Osso novo

OA: Osso antigo

OL: Osso lamelar

OFP: Osso de fibras paralelas

BIC: Contato osso-implante

V: Vestibular

L: Lingual

MO: Matriz osteoide

OB: Osteoblasto

OC: Osteoclasto

TC: Tecido conjuntivo

µm: Micrometro

mm²: Milímetro quadrado

%: Porcentagem

Mp: Mega pixel

O presente estudo foi realizado no Biotério II (Canil) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), no Laboratório de Histologia e no Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, e no Laboratório de Histologia

Este estudo foi desenvolvido com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número: 2013/24.324-0 e deu origem a dois artigos científicos. Os dados histológicos, histomorfométricos e micro-tomográficos referentes aos alvéolos foram enviados para a revista *Clinical Oral Implants Research* e os dados histológicos, histomorfométricos e micro-tomográficos referentes aos implantes serão enviados para a mesma revista científica.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	34
2. PROPOSIÇÃO.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Seleção dos Animais	44
3.2. Desenho Experimental	44
3.3. Procedimentos Cirúrgicos.....	45
3.3.1. Primeira Fase Cirúrgica: Instalação de ligaduras para indução de doença periodontal.....	46
3.3.2. Procedimentos pós-operatórios - Primeira Fase Cirúrgica: Instalação de ligaduras para indução de doença periodontal.....	46
3.3.3. Segunda Fase Cirúrgica: Exodontia, Instalação de Implantes Imediatos e Preservação dos alvéolos remanescentes.....	48
3.3.4. Procedimentos pós-operatórios - Segunda Fase Cirúrgica: Exodontia, Instalação de Implantes Imediatos e Preservação dos alvéolos remanescentes.....	51
3.4. Sacrifício e Processamento Histológico	51
3.5. Análise Microtomográfica (Micro-CT).....	51
3.6. Análise Histomorfométrica.....	55
3.7. Análise Estatística	57
4. RESULTADOS	59
4.1. Observações Clínicas.....	59
4.2. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na cicatrização de alvéolos pós-extração associados ou não ao uso de material de enxerto	59
4.2.1. Análise Histológica Qualitativa.....	59
4.2.2. Análise Histomorfométrica.....	67
4.2.3. Análise Microtomográfica (Micro-CT)	69
4.3. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos	73
4.3.1. Análise Histológica Qualitativa.....	73
4.3.2. Análise Histomorfométrica.....	75
4.3.3. Análise Microtomográfica (Micro-CT)	76

5. DISCUSSÃO.....	79
5.1. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na cicatrização de alvéolos pós-extração com ou sem material de enxerto	80
5.2. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos	87
 6. CONCLUSÃO.....	 94
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 96
 ANEXO – ARTIGO EM INGLÊS	 111

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais inflamatórias, consideradas alterações dos tecidos de revestimento e sustentação dos órgãos dentais, têm sua etiopatogenia relacionada ao acúmulo de biofilme microbiano as superfícies dentárias (Genco, 1992; Kinane & Lappin, 2001). Em termos epidemiológicos, praticamente a totalidade da população é acometida pelos diferentes tipos de doenças periodontais, que constituem uma das principais causas de perdas dentárias entre os adultos (Jenkins *et al.*, 1988).

Durante o processo fisiológico natural de cicatrização dos alvéolos pós-extração, ocorre uma cascata de eventos celulares e teciduais que incluem a formação e maturação do coágulo sanguíneo, que posteriormente é infiltrado por fibroblastos e gradativamente substituído por tecido de granulação. Por fim, ocorre o estabelecimento de uma matriz provisória que propicia a formação de osso imaturo. Ao longo desse processo, durante os primeiros 30 dias de cicatrização, observa-se uma fase inicial de formação óssea, que resulta no preenchimento de grande parte do volume alveolar. Contudo, com a progressão do processo de modelação e remodelação ocorre a substituição do tecido ósseo inicialmente formado, até então dominado por osso imaturo, por osso lamelar e medular (Amler, 1969; Cardaropoli *et al.*, 2003; Araújo & Lindhe, 2005).

A reabsorção óssea alveolar, associada as perdas dentárias, constitui uma condição inerente ao processo de cicatrização, que resulta em marcantes alterações dimensionais do rebordo alveolar (Lam, 1960; Cardaropoli *et al.*, 2003; Schropp *et al.*, 2003; Araújo & Lindhe, 2005). A reabsorção alveolar inicia-se imediatamente após a extração dentária, é progressiva e apresenta maior redução do volume ósseo durante os primeiros 3 meses de cicatrização. Contudo, essas alterações podem ser observadas até 1 ano após a exodontia, resultando em uma redução em espessura de aproximadamente 33% após 3 meses e de até 50% após 12 meses (Schropp *et al.*, 2003). Além disso, pode ser observada uma redução mais pronunciada na tábua óssea vestibular em relação a tábua óssea lingual ou palatina da crista óssea (Pietrovski & Massler, 1967; Carlsson & Ericsson, 1967; Schropp *et al.*, 2003; Araújo & Lindhe, 2005; Barone *et al.*, 2008) e uma redução significativamente maior em espessura do que em altura (Johnson, 1969; Cardaropoli *et al.*, 2003; Araújo & Lindhe, 2005). Dessa forma, esse processo resulta em um rebordo alveolar mais estreito e curto, levando ao deslocamento da crista óssea para

uma posição mais lingual/palatina (Pietrovski & Massler, 1967; Araújo & Lindhe, 2005; Van der Weijden *et al.*, 2009), consequentemente dificultando a instalação de implantes em uma posição tridimensional adequada sem a ocorrência de deiscências e/ou fenestrações da tábua óssea vestibular (Iasella *et al.*, 2003).

Uma série de investigações têm sido conduzidas a fim de estabelecer a real magnitude das alterações dimensionais que ocorrem após os procedimentos de exodontia. Em uma recente revisão da literatura sobre preservação alveolar, Horváth e colaboradores (2013) relataram reduções médias do rebordo alveolar entre 2.5 e 4.6 ± 0.3 mm em espessura e entre 0.8 ± 1.6 e 3.6 ± 1.5 mm em altura nos alvéolos que cicatrizaram espontaneamente. As consequências clínicas das alterações fisiológicas, nos tecidos duros e moles, podem afetar os resultados das terapias subsequentes com o objetivo de restaurar a dentição perdida, tanto por limitar a quantidade de osso disponível para o posicionamento ideal de implantes, como por comprometer os resultados estéticos das restaurações protéticas.

Com o objetivo de conter as alterações dimensionais, imediatamente após as extrações dentárias, diferentes abordagens têm sido propostas, incluindo a regeneração óssea guiada com o uso de membranas absorvíveis ou não-absorvíveis, sozinhas ou em associação com enxertos autógenos ou substitutos ósseos (Lekovic *et al.*, 1997; Lekovic *et al.*, 1998; Iasella *et al.*, 2003; Barone *et al.*, 2008; Horváth *et al.*, 2010; Mardas *et al.*, 2010), o uso de enxertos com substitutos ósseos (Araújo *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2009; Suaid *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2015; de Barros *et al.*, 2016), o selamento alveolar com enxertos de tecido mole autógeno (Tal *et al.*, 1999; Karaca *et al.*, 2015) e a instalação de implantes imediatos (Lazzara, 1989; Denissen *et al.*, 1993; Watzek *et al.*, 1995; Paolantonio *et al.*, 2011; Kinaia *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, durante o período de desenvolvimento da implantodontia moderna, esforços concentravam-se principalmente no fenômeno da osseointegração e nas melhores técnicas para sua obtenção e manutenção. De acordo com o protocolo de Brånemark, um período de cicatrização de 6 a 12 meses seria recomendado previamente à instalação de implantes (Adell *et al.*, 1981). Contudo, além de estender consideravelmente o período de tratamento, à medida que o tempo de extração até a instalação do implante aumenta, a reabsorção alveolar progressiva resulta em perdas marcantes do volume ósseo (Carlsson & Ericsson, 1967; Schropp *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2005) tornando o posterior aumento ósseo, simultâneo à instalação de implantes,

menos previsível (Zitzman et al., 1999). Por outro lado, se os procedimentos regenerativos não forem realizados, a reabsorção óssea favorece o posicionamento inadequado dos implantes, do ponto de vista protético (Paoloantonio et al., 2001).

A instalação imediata de implantes foi descrita inicialmente por Schulte & Heimke (1976) em um estudo clínico com 8 anos de acompanhamento, com posterior confirmação dos resultados através de análises histológicas por Krump & Barnett (1991) e Barzilay (1991). Nas últimas décadas, a instalação de implantes imediatos com a finalidade de minimizar o colapso do tecido ósseo durante o período de cicatrização pós-extração e de reduzir o tempo de tratamento, vem sendo realizada com bastante frequência com base nos índices de sucesso compatíveis àqueles encontrados em implantes inseridos em sítios cicatrizados (Polizzi et al., 2000; Wagenberg & Froum, 2006; Altintas et al., 2016). Além disso, a instalação de implantes imediatos apresenta uma série de vantagens para os pacientes, relacionadas ao reduzido tempo de tratamento, menor número intervenções cirúrgicas e morbidade, custos reduzidos e maior possibilidade de posicionamento tridimensional adequado do implante, contribuindo, à vista disso, para uma melhora acentuada na estética, biomecânica e sobrevivência dos implantes ao longo do tempo (Werbitt & Goldberg, 1992; Missika, 1994; Schropp et al., 2003; Bhola et al., 2008).

No entanto, em algumas situações a instalação imediata de implantes é impossibilitada em razão da ausência de volume ósseo vertical e/ou horizontal suficientes para que a estabilidade primária seja atingida (Albrektsson et al., 1981). Dessa forma, seguindo o mesmo contexto de limitar a perda óssea decorrente do processo fisiológico de remodelamento pós-extração, uma outra situação, bastante relevante, tem sido a regeneração de alvéolos pós-extração, uma vez que a preservação da estrutura óssea remanescente torna-se fundamental para viabilizar a instalação de implantes em um segundo momento de tratamento.

Diante do entendimento geral de que os enxertos ósseos inseridos em alvéolos pós-extração podem compensar os processos catabólicos observados na região da tabua óssea vestibular, além de estabilizar o coágulo, manter espaço, atuar como arcabouço para a migração celular e fornecer uma fonte externa de minerais e/ou colágeno (Araújo et al., 2008; Araújo et al., 2009), uma série de materiais de enxerto incluindo o osso autógeno (Araújo & Linhe, 2011; Hanser & Khoury, 2014), osso liofilizado desmineralizado (Froum et al., 2002; Wood & Mealey, 2012), osso liofilizado

mineralizado (Wood & Mealey, 2012; Borg & Mealey, 2015), osso bovino desproteínizado (Araújo *et al.*, 2010; Lindhe *et al.*, 2014; Milani *et al.*, 2016), polímeros aloplásticos (Serino *et al.*, 2003; Lindhe *et al.*, 2013), vidros bioativos (Camargo *et al.*, 2000; Froum *et al.*, 2002; Clozza *et al.*, 2014), compósitos cerâmicos (Mardas *et al.*, 2010), têm sido propostos na tentativa de preservar o rebordo alveolar pós-exodontia.

No entanto, um enxerto xenógeno em particular, o osso bovino mineral desproteínizado, tem sido o material de enxerto relatado com maior frequência na literatura e tem apresentado resultados satisfatórios no tratamento de defeitos alveolares (Jensen *et al.*, 1996; Berglundh & Lindhe 1997), em procedimentos de preservação alveolar (Berglundh & Lindhe 1997; Tal 1999; Artzi *et al.*, 2000; Carmagnola *et al.*, 2003; Norton *et al.*, 2003; Nevins *et al.* 2006; Araújo & Lindhe, 2009; Maia *et al.*, 2015), em procedimentos de levantamento de seio maxilar (Smiler *et al.*, 1992; Piattelli *et al.*, 1999; Maiorana *et al.*, 2003) e no reparo de defeitos periodontais (Wetzel *et al.*, 1995; Velentini *et al.*, 2000, Houser *et al.*, 2001). Bio-Oss® (Bio-Oss®; Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) consiste em uma hidroxiapatita bovina desproteínizada, química e fisicamente similar ao osso humano, com porosidade natural e não-antigênica, e com partículas de 0,25 a 1 mm conforme o fabricante. De acordo com uma série de estudos pré-clínicos (Berglundh & Lindhe, 1997; Hürzeler *et al.*, 1997; Haas *et al.*, 1998) e clínicos (Camelo *et al.*, 2001; Artzi *et al.*, 2001; Hising *et al.*, 2001; Yildirim *et al.*, 2001; Carmagnola *et al.*, 2003) esse biomaterial atua como um arcabouço que estimula a aposição de osso novo por osteocondução (Artzi *et al.*, 2001; Norton *et al.*, 2003;), formando uma matriz osso/enxerto eficaz (Maiorana *et al.*, 2000; Valentini & Abensur, 1997) e mínima reabsorção após a cicatrização (Carmagnola *et al.*, 2003; Araújo & Lindhe, 2009). O mesmo osso bovino desproteínizado (90%) combinado com fibras de colágeno suíno (10%) (Bio-Oss® Collagen – Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), também tem sido avaliado em estudos clínicos (Heberer *et al.*, 2008) e experimentais (Araújo *et al.*, 2008; Araújo & Lindhe, 2009; Maia *et al.*, 2015), especialmente em procedimentos de preservação de rebordo (Araújo & Lindhe, 2008; Araújo *et al.*, 2009; Fickl *et al.*, 2008a; Fickl *et al.*, 2009; Heberer *et al.*, 2008), com resultados promissores. Em um estudo em animais, Araújo e colaboradores (2009) demonstraram que esse biomaterial parece modificar a remodelação e contração marginal do rebordo que ocorrem após a remoção dentária, mantendo, dessa forma, as

dimensões das paredes de tecido duro do alvéolo e preservando o perfil dimensional característico do processo alveolar.

De acordo com uma série de estudos (Norton *et al.*, 2003; Nevins *et al.*, 2006) implantes instalados em regiões submetidas a procedimentos de preservação alveolar, com enxertos de osso bovino desproteínizado, apresentam resultados satisfatórios, e suas taxas de sucesso são comparáveis às daquelas de implantes instalados em osso nativo, e apresentam menor (Gholami *et al.*, 2012) ou nenhuma necessidade de procedimentos adicionais com finalidade de aumento da estrutura óssea (Barone *et al.*, 2008; Pelegrine *et al.*, 2010). Em 1997, Berglundh & Lindhe observaram, em um estudo em cães, que quatro meses após a instalação de implantes em sítios com defeitos previamente preenchidos com Bio-Oss® o contato osso-implante, tanto no aspecto qualitativo quanto quantitativo, exibiam o mesmo nível de osseointegração do que nos implantes inseridos em osso nativo.

Ao longo dos últimos 20 anos, diversos estudos têm relatado a avaliação de alvéolos pós-extração não associados a lesões inflamatórias, projetando desta maneira uma condição promissora de cicatrização. Entretanto, frequentemente as perdas dentárias estão associadas a remoção de dentes com comprometimento periodontal (69.20%), e/ou endodôntico (24.6%) (López-Martínez *et al.*, 2015) resultando em alvéolos de extração infectados, que convencionalmente contraindicariam a instalação de implantes e/ou enxertos ósseos imediatos (Schwartz-Arad & Chaushu, 1997a; Barzilay, 1993; Becker & Becker, 1990; Werbitz & Goldberg, 1992) devido ao elevado risco de contaminação do enxerto e/ou da superfície do implante e falhas no processo de cicatrização (Rosenquist & Grenthe, 1996; Quirynen *et al.*, 2003). Nessas situações, têm sido proposto que os procedimentos de enxerto ou de instalação de implantes sejam postergados para 6 a 8 semanas após a remoção dos dentes portadores de lesões inflamatórias (Lundgren & Nyman, 1991; Bartee, 2001; Tischlet & Mich, 2004; *et al.*, 2008). Contudo, de acordo com o estudo de Araújo e colaboradores (2005) o processo que resulta em críticas alterações dimensionais da crista óssea alveolar é mais pronunciado nos estágios iniciais de cicatrização, que envolve as primeiras 8 semanas após o procedimento de exodontia. Ademais, uma série de estudos clínicos (Novaes Jr *et al.*, 1995; Kfir *et al.*, 2007; Mardinger *et al.*, 2009; Mardinger *et al.*, 2012; Manor *et al.*, 2015) e pré-clínicos (Novaes Jr *et al.*, 1998; Novaes Jr *et al.*, 2004; Marcaccini *et al.*, 2003) têm evidenciado que alvéolos resultantes da exodontia de dentes portadores de

lesões inflamatórias crônicas podem receber material de enxerto ou implantados imediatamente após a remoção dentária, desde que meticolosos procedimentos de curetagem e debridamento alveolar associados a um adequado protocolo antibiótico pré e pós-operatório sejam realizados. Contudo, é importante salientar que o uso de antibioticoterapia sistêmica apresenta algumas desvantagens, as quais estão relacionadas, especialmente, com efeitos colaterais indesejáveis, resultantes do uso do agente antimicrobiano e com o risco aumentado do desenvolvimento de seleção e resistência antimicrobiana (Wainwright, 1998; Kleinfelder *et al.*, 1999; Usacheva *et al.*, 2001; Kömerik *et al.*, 2003; Gad *et al.*, 2004). Esses efeitos já podem ser observadas entre os patógenos periodontopatogênicos, previamente considerados como susceptíveis (Mosca *et al.*, 2007; Ardila *et al.*, 2010; Rams *et al.*, 2013; Rams *et al.*, 2014), especialmente em regiões em que não há uso restrito e controlado desse tipo de medicamento (van Winkelhoff *et al.*, 2005; Ardila *et al.*, 2010).

Nesse contexto, novas alternativas que venham a oferecer a possibilidade eficaz de remoção dos patógenos periodontais, com um mínimo de danos para a saúde sistêmica do hospedeiro estão sendo estudadas. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), que inicialmente foi desenvolvida para o tratamento de neoplasias, é capaz de eliminar diversos microorganismos, inclusive de espécies encontradas na cavidade oral, conforme demonstrado em uma série de estudos *in vitro* (Chan & Lai, 2003; Eick *et al.*, 2013; Alvarenga *et al.*, 2015; Theodoro *et al.*, 2015). Dessa forma, a TFDa que apresenta como princípio a erradicação de células por meio da utilização de um fotossensitizador, representado por um agente de absorção óptica (corante), e de uma fonte de luz, representada por um *laser* de baixa intensidade com comprimento de onda apropriado (Von Toppeiner, 1904; Qin *et al.*, 2008; de Almeida *et al.*, 2009), tem sido sugerida como uma nova e promissora abordagem tanto no tratamento das doenças periodontais (Kömerik, 2003; de Almeida *et al.*, 2007; de Oliveira *et al.*, 2007; de Almeida *et al.*, 2008; Alwaeli *et al.*, 2013; Betsy *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2016a) como periimplantares (Dörtbudak *et al.*, 2001; Shibli *et al.*, 2003; Shibli *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2016b).

O mecanismo de ação da TFDa requer que o fotossensitizador mantenha-se em intimo contato com a área afetada, e então o agente fotossensitizante absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado. Na presença de um substrato, neste caso o oxigênio, o fotossensitizador, ao retornar ao seu estado natural,

transfere a energia ao substrato, formando compostos altamente reativos e de vida curta como o oxigênio singlete, que pode provocar sérios danos aos microrganismos via oxidação irreversível de componentes celulares. Diversos estudos têm relatado danos à membrana celular, às mitocôndrias e ao núcleo celular (Lu *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2009). Além disso, a TFDa é capaz reduzir alguns fatores de virulência, como lipopolissacarídeos e proteases (Komerik *et al.*, 2000; Braham *et al.*, 2009), comuns entre os patógenos de origem periodontal. Contudo, fatores relacionados aos fotossensibilizadores (tipo e concentração), parâmetros de irradiação (comprimento de onda e tempo de irradiação) e ao protocolo de fototerapia (tempo de exposição, quantidade de energia empregada), além do tipo de microrganismos presentes podem influenciar no sucesso da técnica (Prates *et al.*, 2011).

A TFDa apresenta uma série de vantagens, das quais destacam-se a eliminação bacteriana em curto espaço de tempo, ausência ou mínimo risco de desenvolvimento de resistência bacteriana, reduzido tempo de tratamento, ausência de efeitos citotóxicos e térmicos, não lesando, dessa forma, os tecidos do hospedeiro (Komerik *et al.*, 2000). Além disso, a utilização de *laser* de baixa intensidade permite a diferenciação entre as bactérias e os tecidos do hospedeiro através da administração de fotossensibilizadores que se unem aos microrganismos alvo.

Em resumo, a literatura científica, não relata opções de tratamento alternativas, a não ser o convencional uso de protocolo antibiótico pré e pós-operatório, no que diz respeito a métodos de descontaminação de alvéolos pós-extração, periodontalmente infectados, previamente a instalação de implantes e/ou enxertos imediatos. Contudo, diante do atual cenário em que o desenvolvimento de seleção e resistência bacterianas associados ao uso indiscriminado de antibióticos tornou-se uma realidade clínica, novas abordagens de tratamento precisam ser investigadas.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Com base nessas informações e na falta de estudos avaliando o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana como uma modalidade de tratamento para descontaminação de alvéolos pós-extração, periodontalmente infectado, o presente estudo teve como objetivo avaliar: 1 - o efeito de descontaminação da TFDa previamente a instalação de implantes imediatos em sítios periodontalmente infectados e 2 - o efeito de descontaminação da TFDa na cicatrização de alvéolos com ou sem material de enxerto através de análises histomorfométricas e microtomográficas.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção dos Animais

Este estudo foi conduzido após submissão e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - protocolo nº 2013.1.992.58.0) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP. Foram selecionados oito (8) cães da raça Beagle, adultos jovens pesando aproximadamente 18 kg, provenientes do biotério de criação da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Todos os animais selecionados apresentavam mandíbulas intactas, sem trauma oclusal generalizado, lesões virais ou fúngicas na boca, boa saúde geral e nenhum envolvimento sistêmico relevante de acordo com o médico-veterinário responsável pelo acompanhamento dos animais durante todo o período da pesquisa. Os cães foram imunizados com vacinas, receberam complexos polivitamínicos, tratamento antiparasitário e foram submetidos a uma profilaxia dental com o uso de pontas ultra-sônicas (Cavitron 3000, Dentssply Mfg. Co., USA) para remoção de cálculo e biofilme dental.

3.2. Desenho Experimental

Este estudo foi realizado utilizando-se o modelo de boca dividida, de acordo com o desenho experimental ilustrado na Figura 1. Cada hemi-arco mandibular foi aleatoriamente designado aos grupos teste (descontaminação alveolar com debridamento mecânico e irrigação com solução salina associados a aplicação de TFDa) ou controle (descontaminação alveolar com debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina) através do método de aleatorização cruzada (Papalexiou et al., 2006) e subsequentemente submetidos a instalação de implantes imediatos, dando origem aos grupos: GT-I: Grupo Teste – Implante (descontaminação alveolar com debridamento mecânico e irrigação com solução salina associados a aplicação de TFDa + instalação de implante imediato) e GC-I: Grupo Controle – Implante (descontaminação alveolar com debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina + instalação de implante imediato). Os demais alvéolos, utilizados para o estudo da dinâmica de cicatrização alveolar, foram então alocados por um bloco aleatoriamente permutado gerado por um programa de computador (Excel), para distribuir os sítios nos

seguintes grupos experimentais: GT-C: Grupo Teste – Coágulo (Descontaminação alveolar com debridamento mecânico e irrigação com solução salina associados a aplicação de TFDa + cicatrização espontânea, somente em presença de coágulo sanguíneo); GT-BO: Grupo Teste - Bio-Oss® (Descontaminação alveolar com debridamento mecânico e irrigação com solução salina associados a aplicação de TFDa + enxerto com Bio-Oss®); GT-BOC: Grupo Teste - Bio-Oss® Collagen (Descontaminação alveolar com debridamento mecânico e irrigação com solução salina associados a aplicação de TFDa + enxerto com Bio-Oss® Collagen); GC-C: Grupo Controle - Coágulo (Descontaminação alveolar com debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina + cicatrização espontânea, somente em presença de coágulo sanguíneo); GC-BO: Grupo Controle Bio-Oss® (Descontaminação alveolar com debridamento e irrigação com solução salina seguido por preenchimento alveolar com Bio-Oss®); GC-BOC: Grupo Controle - Bio-Oss® Collagen (Descontaminação alveolar com debridamento e irrigação com solução salina seguido por preenchimento alveolar com Bio-Oss® Collagen).

Figura 1. Desenho experimental proposto no estudo.

3.3. Procedimentos Cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos realizados nos animais foram divididos em duas fases:

3.3.1. Primeira Fase Cirúrgica: Instalação de ligaduras para indução de doença periodontal

Os animais foram mantidos em jejum na noite anterior aos procedimentos cirúrgicos. Durante o preparo para as cirurgias, os cães foram pré-anestesiados com Zolazepan a 10% na concentração de 0,10 ml/kg (Zoletil 50 – Verbac S.A, São Paulo, SP, Brasil) e Acepromazina na concentração 2% (Acepran – Univet S.A, São Paulo, Brasil). A manutenção anestésica foi obtida através de anestésico volátil – Isoflurano - diluído em oxigênio durante a cirurgia (oxigênio diluído volátil – 2V%). Os animais foram submetidos à intubação traqueal com sonda Magill para adaptação do dispositivo do aparelho de anestesia. Adicionalmente, anestésias locais foram realizadas nas regiões dos pré-molares inferiores (P1, P2, P3 e P4).

Os procedimentos foram realizados por quadrante, em cada cão, nas áreas do segundo ao quarto pré-molar mandibular bilateralmente. A doença periodontal foi induzida através de ligaduras de acordo com a técnica proposta por Schliephake & Kracht (1997), que consistiu na elevação de um retalho de espessura total (Figura 2A) e colocação de fio de sutura não absorvível 4.0 (Ethicon, São José dos Campos, Brasil) em defeitos intra-ósseos criados cirurgicamente, de aproximadamente 1,0mm de profundidade, em torno de cada pré-molar (P1, P2, P3 e P4) (Figura 2B), posteriormente os retalhos foram reposicionados e suturados com fio de sutura reabsorvível 4-0 (Vycril Ethicon, São José dos Campos, Brasil) (Figura 2C).

3.3.2. Procedimentos pós-operatórios - Primeira Fase Cirúrgica: Instalação de ligaduras para indução de doença periodontal

Os animais foram clinicamente examinados semanalmente para substituição imediata de ligaduras, em eventual caso de perda, e radiografados mensalmente para observação da evolução do quadro inflamatório. Ao final de 8 semanas de indução da doença, as ligaduras foram removidas, entretanto o tecido de granulação não foi curetado e as superfícies radiculares não foram raspadas. A instalação da doença periodontal foi confirmada pela presença visível de placa dento-bacteriana, cálculo e sinais clínicos de inflamação (Figura 2D e 2E), entre os quais a presença de bolsas periodontais profundas, sangramento a sondagem e exsudação após compressão dos tecidos moles, além da perda óssea alveolar e envolvimento da região de bifurcação evidenciada através do exame radiográfico (Figura 2F).

Uma vez que o objetivo desta fase foi o de induzir uma infecção periodontal, nenhuma medida profilática foi tomada, somente o cloridato de tramadol (50mg/ml; Tramal – União Química Farmacêutica Nacional S. A., Pouso Alegre, MG, Brasil) foi utilizado como terapia analgésica em intervalos de 12 em 12 horas por 3 dias.

Após confirmação da presença da doença periodontal e remoção das ligaduras, os animais permaneceram mais 4 semanas sem receber medidas de controle de biofilme bacteriano para efetivação do quadro crônico da doença.

Figura 2. Indução de doença periodontal por ligadura: A. Elevação de retalho total; B. Ligaduras posicionadas em defeitos intra-ósseos, criados cirurgicamente, ao redor dos pré-molares mandibulares; C. Retalho reposicionado e suturado; D. Aspecto clínico após 8 semanas de indução da doença periodontal; E. Radiografia periapical evidenciando a perda óssea alveolar.

3.3.3. Segunda Fase Cirúrgica: Exodontia, Instalação de Implantes Imediatos e Preservação dos alvéolos remanescentes

Quatro semanas após a remoção das ligaduras, os animais foram novamente anestesiados, da mesma maneira como descrito na primeira fase cirúrgica e, em seguida, após adequada assepsia da cavidade bucal (Figura 3A), foram realizadas incisões intra-sulculares e elevação de retalhos mucoperiosteais bilaterais dos primeiros aos quartos pré-molares mandibulares (Figura 3B). Os dentes foram seccionados ao meio, no sentido vestibulo-lingual a partir da região de bifurcação (Figura 3C), possibilitando a extração individual das raízes mesial e distal, e, portanto, minimizando a possibilidade de trauma às paredes ósseas alveolares (Figura 3D). Após as exodontias, todos os alvéolos foram meticulosamente debridados seguindo protocolo previamente descrito por Novaes Jr & Novaes (1995), que envolveu a curetagem e irrigação dos alvéolos com solução salina estéril a fim de remover todas as aderências de tecido mole remanescentes e estimular a reabsorção da porção óssea cortical expondo, dessa maneira, os espaços medulares. Esse procedimento foi realizado em ambos os hemi-arcos mandibulares e em seguida apenas um dos hemi-arcos foi selecionado, através do método de aleatorização cruzada (Papalexious *et al.*, 2006), para receber o protocolo de descontaminação por meio da aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Desta forma, dando origem a dois grupos distintos de tratamento de descontaminação alveolar:

- *Grupo Teste (GT)*: Debridamento dos alvéolos como descrito anteriormente por Novaes Jr & Novaes (1995), seguido por terapia fotodinâmica antimicrobiana (Figura 3E), instalação imediata dos implantes e preenchimento ou não dos alvéolos remanescentes de acordo com a aleatorização proposta.
- *Grupo Controle (GC)*: Debridamento dos alvéolos como descrito anteriormente por Novaes Jr & Novaes (1995) (Figura 3F), seguido por instalação imediata dos implantes e preenchimento ou não dos alvéolos remanescentes de acordo com a aleatorização proposta.

A Terapia fotodinâmica antimicrobiana consiste de um *laser* de diodo de mão com bateria recarregável (HELBO® Theralite Laser, bredent medical, Senden, Germany). O comprimento de onda selecionado foi o de 660nm com um poder de 100 mW /cm² por 60 segundos e fluência de 212.23 J/cm². O corante utilizado previamente a aplicação da

terapia fotodinâmica foi uma solução comercialmente disponível de cloreto de fenotiazina (HELBO Blue Photosensitizer®, bredent medical) confeccionada pelo mesmo fabricante do *laser*. O fotossensibilizador foi aplicado posicionando-se a ponta do aplicador no fundo do alvéolo e depositando-o continuamente em sentido coronal até alcançar o tecido mole. O corante permaneceu por 5 minutos, seguido por irrigação abundante com soro fisiológico para a remoção do excesso. Posteriormente, uma ponta de fibra óptica flexível com uma curva de 60º, 8,5 mm de comprimento e 0,06 mm de diâmetro (HELBO 3D Pocket Probe®, bredent medical) foi acoplada ao *laser* para posterior aplicação. Assim, o foi aplicado em toda a extensão do alvéolo (comprimento e circunferência) totalizando 1 min de tratamento. Para tanto, o alvéolo foi dividido em 6 pontos: mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual, e a terapia fotodinâmica antimicrobiana foi aplicada por 10 segundos em cada um dos pontos pré-determinados. Além disso, foi aplicada 1 minuto em cada uma das superfícies internas lingual e bucal dos tecidos moles ao redor do alvéolo.

Após as exodontias e adequado protocolo de descontaminação, os alvéolos P2 distal, P3 distal e P4 distal foram selecionados para a instalação dos implantes imediatos (Blue sky, Bredent Medical GmbH & Co. KG, Seden, Germany: 3,5 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento), totalizando três implantes em cada lado da mandíbula. Todos os implantes foram posicionados ao nível da crista óssea (Figura 3G).

Após a instalação dos implantes, os transferentes foram posicionados para posterior moldagem com silicone de condensação e confecção de próteses metálicas provisórias (Figura 3H). Após a moldagem dos três implantes inseridos em cada lado da mandíbula, os alvéolos P2 mesial, P3 mesial e P4 mesial, remanescentes, foram preparados para receber ou não os enxertos xenógenos, totalizando 3 alvéolos de cada lado da mandíbula (Figura 3I). Aleatoriamente, em um lado da mandíbula, um dos alvéolos recebeu o enxerto ósseo xenógeno Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), o outro alvéolo recebeu o enxerto ósseo xenógeno Bio-Oss® Collagen® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), e o terceiro alvéolo cicatrizou apenas com a presença do coágulo sanguíneo. No lado oposto da mandíbula, o tipo de tratamento foi alternado entre os alvéolos, respeitando-se o método de aleatorização.

Em seguida, cicatrizadores foram adaptados aos implantes e os alvéolos foram suturados com fio reabsorvível 4-0 para manter o coágulo em posição nos grupos que não receberam material de enxerto, e o coágulo combinado ao material de enxerto nos

grupos enxertados (Figura 3J). Após uma semana, os animais foram avaliados para assepsia e remoção das suturas, e, neste mesmo momento, as próteses metálicas foram instaladas caracterizando, dessa forma, a presença de carga precoce (Figura 3K).

Figura 3. Instalação de Implantes Imediatos e Preservação ou não dos alvéolos remanescentes: A. Aspecto inicial da mucosa e dos dentes; B. Elevação de retalho total; C. Hemisseção dos pré-molares mandibulares; D. Alvéolos pós-extração; E. Grupo teste: Debridamento + irrigação com solução salina; F. Grupo Controle: Debridamento + irrigação com solução salina + TFDa; G. Implantes imediatos; H. Transferentes em posição para moldagem e posterior confecção das próteses; I. Enxerto ósseo nos respectivos alvéolos selecionados aleatoriamente - P2 mesial: Bio-Oss®, P3 mesial: Bio-Oss® Collagen e P4 mesial: coágulo; J. Sutura; K. Próteses instaladas uma semana após o procedimento cirúrgico.

3.3.4. Procedimentos pós-operatórios - Segunda Fase Cirúrgica: Exodontia, Instalação de Implantes Imediatos e Preservação dos alvéolos remanescentes

Nos cuidados pós-operatórios, cloridrato de tramadol (50mg/ml; Tramal – União Química Farmacêutica Nacional S. A., Pouso Alegre, MG, Brasil) foi utilizado na dosagem de 3 mg/kg no intervalo de 12 em 12 horas por 3 dias como terapia analgésica, e meloxicam (2 mg/20 Kg; Maxicam – Ouro Fino Saúde Animal LTDS, Cravinhos, SP, Brasil) foi utilizado por 5 dias como antiinflamatório. Os animais foram mantidos com uma dieta leve por pelo menos 15 dias, e a cicatrização das regiões operadas foi acompanhada periodicamente.

Os cães foram mantidos sob rígido controle de biofilme bacteriano através de escovação manual e uso de fio dental 3 vezes por semana. Além disso, foram submetidos mensalmente a uma profilaxia dental com o uso de pontas ultra-sônicas para remoção de cálculo e biofilme dental. Para tanto, foram sedados e anestesiados com Acepran 0,2% na dosagem de 1ml/10 Kg, e Zoletil 50 na dose de 0,10 mL/kg via endovenosa para a anestesia fixa.

3.4. Sacrifício e Processamento Histológico

Doze semanas após a cirurgia de instalação dos implantes imediatos e de enxerto ou não nos alvéolos remanescentes, os animais foram sedados e sacrificados através de indução de anestesia profunda com thiopental sódico (Thpentax, Cristália, Brasil) 25 mg/kg por via endovenosa, seguido por overdose com cloridrato de potássio. As hemimandíbulas foram removidas, dissecadas, reduzidas e fixadas em formalina a 4% em pH 7 por 10 dias.

3.5. Análise Microtomográfica (Micro-CT)

Logo após o sacrifício dos animais, com os espécimes fixados em formaldeído tamponado a 4% (pH 7), os espécimes de implantes e de alvéolos foram analisados por Micro-CT, uma técnica precisa e validada que fornece medidas acuradas de volume e arquitetura óssea (Müller *et al.*, 1996). Com essa metodologia, parâmetros morfométricos são calculados tanto diretamente em três dimensões, ou em duas

dimensões, a partir de imagens binarizadas de cortes individuais. Para aquisição das imagens, foi utilizado um microtomógrafo computadorizado de alta resolução (modelo 1172, SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica), composto por um tubo de raios-X de microfoco com fonte de alta tensão (100kV), um porta-amostra com manipulador de precisão e um detector baseado em uma câmera CCD de 11Mp (4000 x 2300 pixels), com resolução de até 1µm, conectados a um computador de controle e aquisição de dados interligado em rede a computadores com software para reconstrução, visualização e quantificação de imagens bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D).

O escaneamento das amostras foi padronizado com um tamanho de *voxel* isotrópico de 9 µm, 60 kV, 165 µm, em 180°, ângulo de rotação de 0.6 e filtro de alumínio de 0,5 mm de espessura para otimizar o contraste, com tempo de exposição de 540 milissegundos (0.5 segundos). As peças foram posicionadas e fixadas no porta-amostras apropriado para o equipamento, com certa utilidade, possibilitando a estabilização a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento. Após o escaneamento, as projeções tomográficas foram reconstruídas com o auxílio de um software específico (N.Recon®, Sky Scan®), que gerou as imagens em 3D. O software Data Viewer® foi utilizado para a visualização dos eixos coronal, transaxial e sagital dos espécimes, e avaliação 2D (medidas lineares) dos alvéolos e implantes.

As análises 3D foram realizadas através do software CTAn (CTAn., v. 1.8.1.1, SkyScan N.V). Para selecionar a região de interesse (ROI), nos alvéolos, primeiramente um retângulo foi posicionado de tal forma a abranger toda a sua extensão, a partir do ponto coronal de maior formação óssea, medindo 3mm de largura e 5 mm de altura para os alvéolos P2 e P3, e de 3mm de largura e 7 mm de altura nos alvéolos P4. Já nos implantes, foi estabelecido o comprimento entre o ombro e a terceira rosca do implante e o diâmetro de 200µm do anel de avaliação, descontando o espaço do implante. O volume de interesse (VOI) foi determinado através da soma de todos os ROIs sobre um conjunto contíguo de secções transversais da imagem. A binarização foi realizada utilizando-se uma escala de cinza definida por uma densidade de 40-90 para o osso e de 90-255 para o biomaterial na avaliação dos alvéolos e de 30-100 para o osso e de 100-255 para o implante na avaliação dos implantes.

Para a análise 2D dos alvéolos (medidas lineares), as imagens foram posicionadas em seu longo eixo e os seguintes parâmetros foram avaliados:

- *Altura da crista óssea vestibular (ACOV)*: Determinada como uma medida

linear vertical, partindo de uma linha imaginária provinda da crista óssea lingual até o ponto mais alto da crista óssea vestibular (Figura 4A).

- *Dimensão buco-lingual (DBL)*: Determinada como uma medida linear horizontal entre a tábua óssea vestibular e lingual, a partir de uma linha imaginária 1,0 mm abaixo do ponto mais coronal de formação óssea, no interior do alvéolo (Figura 4B).

Para a análise 3D dos alvéolos, os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Volume ósseo total da amostra (BV), expresso em mm^3 ;
- Porcentagem do volume ósseo total (BV/TV): representada pela razão entre o volume ósseo e o volume da amostra, expressa em %;
- Densidade óssea de superfície (BS/TV): representada pela razão entre o volume ósseo da amostra e o volume total da amostra, expressa em $1/\text{mm}$;
- Espessura trabecular (Tb.TH), expressa em mm;
- Número de trabéculas (Tb.N), expressa em $1/\text{mm}$;
- Separação trabecular (Tb.SP), expressa em mm

Figura 4. Imagens microtomográficas representando as medidas 2D (medidas lineares) nos alvéolos: A. Reabsorção da crista óssea vestibular (V) em relação a crista óssea lingual (L): Determinada como uma medida linear vertical a partir de uma linha imaginária (amarela) partindo da crista óssea lingual ao ponto mais alto da crista óssea vestibular; B. Dimensão buco-lingual do alvéolo (DBL): Avaliada 1 mm abaixo do ponto ósseo mais alto no alvéolo (Linha vermelha);

Para a análise 2D dos implantes (medidas lineares), as imagens foram posicionadas em seu longo eixo e os seguinte parâmetro foi avaliado:

- *Reabsorção vertical da crista óssea (RVCO)*: Determinada como uma medida linear vertical partindo do ombro do implante ao primeiro contato osso-implante, na face vestibular (Figura 5) .

Para a análise 3D dos implantes, os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Volume ósseo total da amostra (BV), expresso em mm^3 ;
- Porcentagem do volume ósseo total (BV/TV, %): representada pela razão entre o volume ósseo e o volume da amostra, expressa em %;
- Densidade óssea de superfície (BS/TV, $1/\text{mm}$): representada pela razão entre o volume ósseo da amostra e o volume total da amostra, expressa em $1/\text{mm}$;
- Espessura trabecular (Tb.TH), expressa em mm;
- Número de trabéculas (Tb.N), expressa em $1/\text{mm}$;
- Separação trabecular (Tb.SP), expressa em mm.

Figura 5. Imagem microtomográfica representando a medida linear (2D): Reabsorção vertical da crista óssea (RVCO) - Distância resultante entre o ombro do implante e o primeiro contato osso-implante.

3.6. Análise Histomorfométrica

Após a análise microtomográfica, os espécimes foram transferidos para uma solução de álcool a 70% e, então, desidratados em concentrações ascendentes de álcool até atingir a concentração de 100%. Em seguida, foram infiltrados e incluídos em resina LR White (London Resin Company, Berkshire, England). Posteriormente, os blocos foram seccionados no sentido vestibulo-lingual pela técnica de secção de tecidos duros descrita por Donath & Breuner (1982). Por fim, as lâminas foram preparadas com uma espessura média de 50 µm para análise histomorfométrica e coradas com *Stevenel's blue* e *Alizarin red S* para análise por microscopia de luz.

As secções histológicas longitudinais foram capturadas através de uma câmara de vídeo Leica DC 300F (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany) acoplada a um microcópio Leica DM LB2 (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany), e as imagens foram analisadas no programa Leica QWin (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany) por um examinador cego, ou seja, sem conhecimento dos grupos experimentais.

Para a análise dos alvéolos, os seguintes parâmetros foram utilizados para as medidas lineares (magnificação 2.5x):

- *Altura da crista óssea vestibular (ACOV)*: Determinada como uma medida linear vertical em duas regiões diferentes: (1) de uma linha imaginária provinda da crista óssea lingual até o osso novo no ponto mais alto da crista óssea vestibular (ACOV-ON), e (2) de uma linha imaginária provinda da crista óssea lingual até o osso antigo no ponto mais alto da crista óssea vestibular (ACOV-OA) (Figura 6A).
- *Dimensão buco-lingual (DBL)*: Determinada como uma medida linear horizontal entre as tábuas ósseas vestibular e lingual, a partir de uma linha imaginária 1,0 mm abaixo do ponto mais alto da formação óssea dentro do alvéolo (Figura 6B).

A densidade óssea histológica (DO) foi determinada a partir de um retângulo com 3 mm de largura e 5 mm de altura nos alvéolos P2 e P3 e com 3 mm de largura e 7 mm de altura nos alvéolos P4, abrangendo a região do alvéolo (área total obtida), partindo do ponto mais coronal do osso alveolar. A medida de densidade óssea avaliou a

porcentagem de osso mineralizado em relação à porcentagem de espaços medulares. Foram avaliadas as áreas de tecido ósseo total (AOT), área medular (AM) e partículas residuais de enxerto (PRE) nos grupos que receberam material de enxerto (Figura 6C).

Figura 6. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando as medidas histomorfométricas aferidas nos alvéolos; A. Reabsorção da crista óssea vestibular (V) em relação a crista óssea lingual (L) foi determinada como uma medida linear vertical em duas regiões diferentes: de uma linha imaginária partindo da crista óssea lingual ao ponto mais alto de osso neoformado (ACOV-ON), e de uma linha imaginária da crista óssea lingual ao primeiro ponto de osso antigo (ACOV-OA) (linha branca); B. A dimensão buco-lingual do alvéolo (DBL) foi avaliada 1 mm abaixo do ponto ósseo mais alto no alvéolo (Linha vermelha); C. A densidade óssea histológica foi determinada a partir de um retângulo incluindo a região do defeito (em branco). A área óssea total (AOT), área medular (AM) e partículas residuais do enxerto (PRE) foram quantificadas. Uma linha tracejada branca foi desenhada para separar osso antigo (OA) e osso novo (ON) (Magnificação de 2,5x).

Já na análise histomorfométrica dos implantes, os seguintes parâmetros foram utilizados para as medidas lineares na face vestibular.

- *Reabsorção da crista óssea vestibular (RCOV)*: Determinada como uma distância linear vertical (mm) a partir de uma linha imaginária do ombro do implante em direção ao primeiro contato entre o osso mineralizado e a superfície do implante (Figura 7A).
- *Contato osso-implante (BIC, %)*: Determinado em um retângulo de 3 mm² partindo do primeiro contato osso-implante – razão entre a superfície total do implante e a superfície em contato com o osso, no interior do retângulo (Figura 7B).

A densidade óssea (DO) histológica foi determinada em um retângulo de 3 mm² partindo do primeiro contato osso-implante. A medida avaliou a porcentagem de osso mineralizado em relação à porcentagem de espaços medulares (Figura 7B).

Figura 7. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando as medidas histomorfométricas aferidas na face vestibular dos implantes imediatos. A. Reabsorção da crista óssea vestibular (RCOV): determinada a partir de uma linha imaginária do ombro do implante em direção ao primeiro contato osso-implante (Magnificação de 2,5x); B. Densidade óssea histológica e contato osso implante (BIC): determinados a partir de um retângulo de 3 mm², partindo do primeiro contato osso-implante (Magnificação de 2,5x);

3.7. Análise Estatística

Os dados quantitativos estão apresentados como média e desvio padrão (mediana). O cão foi considerado como a unidade experimental (n=7). Para a análise dos alvéolos, as diferenças intra-grupos, com exceção do parâmetro PRE, foram analisadas através do teste de Friedman. O teste de Wilcoxon foi utilizado com a correção de Bonferroni's para detectar as diferenças estatisticamente significantes intra-grupos. As diferenças inter-grupos de todos os parâmetros e entre-grupos do parâmetro PRE, foram analisadas através do teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Para a avaliação dos implantes imediatos, as diferenças inter-grupos foram analisadas através do teste de Wilcoxon. Para todas as análises foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Observações Clínicas

Dos 8 animais selecionados para o presente estudo, apenas 7 completaram o estudo. Um cão apresentou problemas no momento da reversão da anestesia fixa, após a execução da segunda fase cirúrgica, e foi a óbito. Na primeira fase cirúrgica, a doença periodontal foi induzida com sucesso, com presença de sangramento a sondagem, exsudação após compressão tecidual, presença de bolsas periodontais profundas e evidencia de perda óssea radiográfica. Após a segunda fase cirúrgica (extrações dentárias, instalação dos implantes imediatos e enxerto com substituto ósseo ou não, em alvéolos pré-determinados) a cicatrização geralmente ocorreu sem maiores intercorrência durante o período pós-operatório de 12 semanas. As próteses dentárias permaneceram estáveis durante todo o período experimental, com exceção de um animal que perdeu 1 implante duas semanas após o momento da instalação e teve o elemento em questão removido da prótese. No momento do sacrifício 4 implantes foram considerados perdidos, 1 pertencente ao grupo teste (GT-I) e 3 pertencentes ao grupo controle (GC-I). Em geral, os alvéolos apresentavam-se adequadamente cicatrizados, com exceção de alguns espécimes do grupo controle que receberam enxerto com Bio-Oss® Collagen (GC-BOC).

4.2. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na cicatrização de alvéolos pós-extração associados ou não ao uso de material de enxerto

4.2.1. Análise Histológica Qualitativa

Em geral, foi observada a presença das densas paredes do processo alveolar circundando uma área central preenchida por área medular (AM), osso neoformado (ON) (Figuras 8 e 9) e área medular (AM), osso neoformado (ON) e partículas remanescentes de enxerto (PRE) nos alvéolos que foram submetidos ao procedimento de preservação alveolar com enxerto xenógeno (Figuras 10, 11, 12 e 13). Todos os grupos demonstravam a presença de uma área de osso lamelar (OL) representando o osso antigo (OA) e uma área de osso neoformado (ON) caracterizada pela presença de

osso de fibras paralelas (OFP) com regiões de fibras entrelaçadas (osso imaturo) (Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13).

Em todos os grupos, o osso neoformado estendia-se da porção apical e das paredes laterais dos alvéolos e migravam em direção à porção central. Em algumas regiões, a superfície do osso neoformado era acompanhada por uma camada de osteoblastos (OB) e matriz osteóide (MO) representando o processo de modelação e remodelação ósseo ativo (Figura 8B e 10B). A interface entre o ON e o OL era facilmente perceptível (Figuras 8C e D, 9C e D, 10C e D, 11C e D, 12C e D, 13C e D). A porção coronal do alvéolo estava ocupada por uma ponte de ON nos grupos que não receberam material de enxerto (Figuras 8A e 9A), e por uma ponte de ON associado a PRE nos grupos que receberam material de enxerto (Figuras 10A, 11A, 12A), interligando as cristas ósseas vestibular e lingual, e separando a mucosa marginal.

As partículas residuais de enxerto (PRE) presentes nos grupos que receberam material de enxerto, como parte do protocolo de preservação alveolar, encontravam-se dispersas na região central do alvéolo, com a maior parte das partículas envoltas em íntimo contato por osso neoformado, demonstrando bastante dificuldade em detectar a interface entre as superfícies (Figuras 10 A, B e C, 11A e C e 12A, B e C). Além disso, pode-se observar várias evidências de que o material de enxerto xenógeno estava sendo substituído por osso, incluindo a presença de células osteoclásticas (OC) ao redor de partículas residuais de enxerto (Figuras 10B e 11B). Alguns espécimes do grupo controle preenchidos por Bio-Oss® Collagen (GC-BOC) não apresentaram a porção coronal preenchida por uma ponte de ON associado a partículas residuais de enxerto (Figura 13A), as quais apresentavam-se na maior parte das vezes, nessa situação, envoltas por tecido conjuntivo frouxo (Figura 13B). Contudo, os demais espécimes apresentaram o mesmo padrão de cicatrização descrito anteriormente.

Figura 8. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo teste que não receberam material de enxerto (GT-C), coradas em vermelho de alizarina. A. A entrada do alvéolo demonstrou-se fechada por uma ponte de tecido mineralizado neoformado, unindo as tábuas ósseas vestibular (V) e lingual (L), enquanto nas porções marginais e central encontrava-se osso novo (ON) e área medular (AM) (Magnificação de 1,6x). B. Aspectos do osso novo (ON) com presença de matriz osteóide (MO) pavimentada por osteoblastos (cabeça de seta) e osteoclastos (OC – seta) caracterizando processo de modelamento e remodelamento ósseo ativo (Magnificação de 10x). C. Note a diferença entre ON e o osso antigo (OA) disposto em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso lamelar (OL) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm).

Figura 9. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo controle que não receberam material de enxerto (GC-C), coradas em vermelho de alizarina. A. A entrada do alvéolo demonstrou-se fechada por uma ponte de tecido mineralizado neoformado, unindo as tábuas ósseas vestibular (V) e lingual (L), enquanto nas porções marginais e central encontrava-se osso novo (ON) e área medular (AM) (Magnificação de 1,6x). B. Aspectos do osso novo (ON) com presença de matriz osteóide (MO) pavimentada por osteoblastos (OB – cabeça de seta) e osteoclastos (OC – seta) caracterizando processo de modelamento e remodelamento ósseo ativo (Magnificação de 20x). C. Note a diferença entre ON e o osso antigo (OA) disposto em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso lamelar (OL) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm).

Figura 10. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo teste que receberam enxerto de Bio-Oss® (GT-B0), coradas em vermelho de alizarina. A. Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocupam boa parte da entrada e interior dos alvéolos. Ocasionalmente foi observada a presença de partículas fora do tecido ósseo (*) (Magnificação de 1,6x). B. A maior parte das partículas demonstraram-se revestidas por ON, com células osteoclásticas (OC - seta) sobre as partículas residuais de enxerto (PRE) (Magnificação 20x). C. Observe a diferença entre o osso novo (ON) e o osso antigo (OA) em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso antigo (OA) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm).

Figura 11. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo controle que receberam enxerto de Bio-Oss® (GC-BO), coradas em vermelho de alizarina. **A.** Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocupam boa parte da entrada e interior dos alvéolos. Ocasionalmente foi observada a presença de partículas fora do tecido ósseo (*) (Magnificação de 1,6x). **B.** Algumas partículas demonstraram-se revestidas por ON, enquanto outras encontravam-se circunscritas em área medular (AM), com células osteoclásticas (OC - seta) sobre as partículas residuais de enxerto (PRE) (Magnificação 20x). **C.** Observe a diferença entre o osso novo (ON), e o osso antigo (OA) em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). **D.** Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso antigo (OA) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm).

Figura 12. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo teste que receberam enxerto de Bio-Oss® Collagen (GT-BOC), coradas em vermelho de alizarina. A. Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocupam boa parte da entrada e interior dos alvéolos. Ocasionalmente foi observada a presença de partículas fora do tecido ósseo (*) (Magnificação de 1,6x). B. Algumas partículas demonstraram-se revestidas por ON, enquanto outras encontravam-se circunscritas por tecido conjuntivo fibroso (TC) (Magnificação 20x). C. Observe a diferença entre o osso novo (ON) e o osso antigo (OA) em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso antigo (OA) e o osso novo (ON) Barras para A, B, C e D: 1mm).

Figura 13. Imagens histológicas representando os alvéolos do grupo controle que receberam enxerto de Bio-Oss® Collagen (GC-BOC), coradas em vermelho de alizarina. A. Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocupam a entrada dos alvéolos, com grande parte das PRE observadas fora do tecido ósseo (Magnificação de 1,6x). B. Poucas partículas demonstraram-se revestidas por ON, enquanto a maior parte encontravam-se circunscritas por tecido conjuntivo fibroso (TC) (Magnificação 20x). C. Observe a diferença entre o (ON) e o osso antigo (OA) em um padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10x). D. Observações da imagem C, evidenciadas por luz polarizada (Magnificação 10x). A linha branca tracejada evidencia a separação entre o osso antigo (OA) e o osso novo (ON) (Barras para A, B, C e D: 1mm).

4.2.2. Análise Histomorfométrica

A avaliação de cada grupo foi realizada a fim de explorar a capacidade de manutenção da tábua óssea vestibular e a formação óssea nos alvéolos, de acordo com a altura da crista óssea vestibular (ACOV) relacionada ao osso novo (ACOV-ON) e ao osso antigo (ACOV-OA), dimensão buco-lingual (DBL), área medular (AM), área óssea total (AOT) e partículas remanescentes de enxerto (PRE).

Em resumo, todos os grupos de tratamento demonstraram resultados similares em relação as medidas histomorfométricas lineares, sem diferenças estatísticas significantes entre os parâmetros analisados. A avaliação da crista óssea vestibular em relação ao osso novo (ACOV-ON) e ao osso antigo (ACOV-OA) demonstrou melhores resultados numéricos nos alvéolos dos grupos teste (GT-C, GT-BO e GT-BOC) em relação aos alvéolos dos grupos controle (GC-C, GC-BO e GC-BOC), contudo sem significância estatística (Tabela 1). Na avaliação intra-grupos da ACOV relacionada tanto ao osso novo (ACOV-ON) como ao osso antigo (ACOV-OA), foram observados dados numericamente melhores, ou seja menor reabsorção da crista óssea vestibular, nos alvéolos que receberam material de enxerto, tanto nos grupos teste (GT-BO e GT-BOC) quanto nos grupos controle (GC-BO e GC-BOC) do que nos grupos que não receberam material de enxerto (GT-C e GC-C), entretanto as diferenças não apresentaram significância estatística (Tabela 1).

A dimensão buco-lingual foi avaliada 1 mm a baixo do ponto de maior formação óssea dentro do alvéolo. Em geral, os alvéolos dos grupos teste (GT-C, GT-BO e GT-BOC) conseguiram manter melhor a espessura buco-lingual do que os respectivos alvéolos dos grupos controle (GC-C, GC-BO e GC-BOC). Os alvéolos dos grupos teste que receberam material de enxerto exibiram manutenção sensivelmente superior da DBL em relação aos respectivos alvéolos dos grupos controle que receberam material de enxerto, contudo não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Da mesma forma, em cada grupo de tratamento, os alvéolos que receberam material de enxerto apresentaram melhor manutenção da DBL do que os alvéolos que cicatrizaram espontaneamente. Contudo, novamente não foram observadas diferenças significantes (Tabela 1).

A área total analisada (100%) foi dividida em área medular, área óssea e partículas residuais de enxerto. Na avaliação inter-grupos, os alvéolos do GT-BOC

apresentaram quantidade significativamente inferior de área medular do que GC-BOC e os alvéolos do grupo GT-BO apresentou quantidade significativamente superior de área medular do que GC-BO, já os grupos GT-C e GC-C apresentaram quantidades similares. Os alvéolos dos grupos teste demonstraram 61,02%, 24,10% e 36,43% de área medular nos GT-C, GT-BO e GT-BOC respectivamente, com o grupo GT-BO apresentando quantidade significativamente inferior de AM em relação a GT-C e GT-BOC. Por outro lado, nos grupos controle a quantidade de área medular demonstrou-se similar entre os grupos, embora os grupos que tenham recebido material de enxerto tenham demonstrado valores numericamente inferiores. Em geral, a área óssea total apresentou-se similar entre os grupos avaliados (Tabela 2).

A porcentagem de partículas residuais observadas nos grupos enxertados com Bio-Oss®, tanto no grupo teste ($24,74 \pm 6,04\%$) quanto no controle ($13,80 \pm 3,31\%$), foi numericamente superior àquela observada nos grupos teste ($15,94 \pm 7,84$) e controle ($8,05 \pm 5,97\%$) dos grupos enxertados com Bio-Oss® Collagen. No entanto, apenas o GT-BO apresentou quantidade significativa superior de PRE do que GC-BO (Tabela 2).

Tabela 1. Avaliação histomorfométrica das medidas lineares em alvéolos: Altura da crista óssea vestibular em relação ao osso novo (ACOV-ON), Altura da crista óssea vestibular em relação ao osso antigo (ACOV-OA) e Dimensão buco-lingual (DBL), comparações intra e inter-grupos

		ACOV-ON (mm)	ACOV-OA (mm)	EA (mm)
Teste	GT-C ^(a)	$1,38 \pm 0,45$ (1,49)	$1,48 \pm 0,45$ (1,68)	$4,70 \pm 1,29$ (4,35)
	GT-BO ^(b)	$0,97 \pm 0,62$ (1,10)	$1,53 \pm 0,89$ (1,51)	$5,78 \pm 0,75$ (5,97)
	GT-BOC ^(c)	$1,07 \pm 0,54$ (0,86)	$1,61 \pm 0,63$ (1,76)	$5,71 \pm 0,81$ (5,54)
Controle	GC-C ^(d)	$1,79 \pm 0,49$ (1,94)	$2,19 \pm 0,46$ (2,25)	$4,32 \pm 0,61$ (4,44)
	GC-BO ^(e)	$1,36 \pm 1,07$ (1,41)	$1,80 \pm 1,00$ (1,91)	$4,62 \pm 0,99$ (4,98)
	GC-BOC ^(f)	$1,46 \pm 0,65$ (1,28)	$1,91 \pm 0,40$ (1,78)	$4,93 \pm 0,66$ (4,98)
Diferença Intra-grupos (p)*	a/b	ns	ns	ns
	a/c	ns	ns	ns
	b/c	ns	ns	ns
	d/e	ns	ns	ns
	d/f	ns	ns	ns
	e/f	ns	ns	ns
Diferença Inter-grupos (p)**	a/d	ns	ns	ns
	b/e	ns	ns	ns
	c/f	ns	ns	ns

GT-C: Grupo Teste – Coágulo; GT-BO: Grupo Teste Bio-Oss®, GT-BOC: Grupo Teste Bio-Oss® Collagen; GC-C: Grupo Controle – Coágulo; GC-BO: Grupo Controle Bio-Oss®, GC-BOC: Grupo Controle Bio-Oss® Collagen; *: Análise de diferença intra-grupos: Teste de Friedmand *post hoc* Teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni ($p \leq 0,05$); **: Análise de diferença inter-grupos: Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$); ns: sem diferença estatística. Todos os valores estão dispostos como média $\pm$ desvio-padrão (mediana).

Tabela 2. Avaliação histomorfométrica das medidas de área em alvéolos: Área medular (AM), Área óssea total (AOT) e Partículas residuais de enxerto (PRE); comparações intra e inter-grupos

		AM (%)	AOT (%)	PRE (%)
Teste	GT-C ^(a)	61,02 ± 9,70 (55,99)	38,97 ± 9,70 (44,00)	–
	GT-BO ^(b)	24,10 ± 5,33 (22,87)	49,22 ± 5,90 (48,93)	24,74 ± 6,04 (25,30)
	GT-BOC ^(c)	36,43 ± 4,10 (35,01)	46,88 ± 8,44 (43,48)	15,94 ± 7,84 (17,16)
Controle	GC-C ^(d)	54,30 ± 6,92 (55,28)	45,69 ± 6,92 (44,72)	–
	GC-BO ^(e)	38,97 ± 3,90 (38,93)	50,85 ± 8,40 (48,71)	13,80 ± 3,31 (13,62)
	GC-BOC ^(f)	48,23 ± 9,96 (46,25)	42,69 ± 7,65 (44,62)	8,05 ± 5,97 (5,50)
Diferença Intra-grupos (p)*	a/b	P=0,05	ns	–
	a/c	ns	ns	–
	b/c	P=0,05	ns	P=0,03
	d/e	ns	ns	–
	d/f	ns	ns	–
	e/f	ns	ns	ns
Diferença Inter-grupos (p)**	a/d	ns	ns	–
	b/e	P=0,03	ns	P=0,03
	c/f	P=0,04	ns	ns

GT-C: Grupo Teste – Coágulo; GT-BO: Grupo Teste Bio-Oss®, GT-BOC: Grupo Teste Bio-Oss® Collagen; GC-C: Grupo Controle – Coágulo; GC-BO: Grupo Controle Bio-Oss®, GC-BOC: Grupo Controle Bio-Oss® Collagen; *: Análise de diferença intra-grupos: Teste de Friedmann *post hoc* Teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni ($p \leq 0,05$); **: Análise de diferença inter-grupos: Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$); ns: sem diferença estatística. Todos os valores estão dispostos como média ± desvio-padrão (mediana).

4.2.3. Análise Microtomográfica (Micro-CT)

A análise microtomográfica foi realizada a fim de analisar a altura da crista óssea vestibular (ACOV) utilizando-se a crista óssea lingual como referência e a dimensão buco-lingual (DBL) dos alvéolos através de medidas lineares bidimensionais (2D). A microarquitetura óssea tridimensional (3D) nos alvéolos, foi avaliada através de três índices morfométricos básicos: volume ósseo (BV), volume total de interesse (TV) e a superfície óssea (BS). Dessas medidas, as variáveis de avaliação podem ser descritas como: volume ósseo (BV), que relaciona-se a ao volume da região segmentada como osso, medida em mm³; porcentagem óssea (BV/TV), que consiste na razão entre o volume ósseo e o volume total, expresso em % e densidade da superfície óssea (BS/TV), que corresponde a razão entre a área de superfície óssea e o volume da região de interesse (1/mm).

A avaliação 2D dos parâmetros utilizados (ACOV e DBL) demonstrou valores numericamente melhores para os alvéolos do grupo teste em relação aos do grupo

controle. Contudo, apenas os alvéolos do grupo teste que cicatrizaram espontaneamente (GT-C) demonstraram distância entre as cristas ósseas vestibular e lingual significativamente inferiores aos alvéolos do grupo controle que cicatrizaram espontaneamente (GC-C) (Figura 14). Tanto nos grupos teste quanto nos controle, os alvéolos que receberam material de enxerto apresentaram valores numéricos superiores em relação aos alvéolos que cicatrizaram espontaneamente (Tabela 3).

Na análise da microarquitetura óssea tridimensional pode-se observar uma tendência numérica de maior volume ósseo (BV) nos alvéolos dos grupos teste em relação aos dos grupos controle. Quando a porcentagem óssea, obtida pela razão entre o volume de tecido ósseo e o volume total (BV/TV), expressa em %, foi avaliada evidenciou-se uma quantidade significativamente superior de tecido mineralizado nos alvéolos que cicatrizaram espontaneamente do grupo teste do que nos respectivos alvéolos do grupo controle. Já os alvéolos dos grupos teste que receberam material de enxerto demonstraram uma tendência numérica de maior porcentagem de tecido mineralizado do que os respectivos espécimes dos grupos controle, contudo sem significância estatística. No parâmetro superfície de contato ósseo (BS/TV), que representa a área superficial do tecido mineralizado que encontra-se interconectada, observou-se que os alvéolos do grupo teste enxertados com Bio-Oss Collagen (GT-BOC) apresentaram valores significativamente superiores aos respectivos alvéolos do grupo controle (GC-BOC) e os alvéolos do grupo GC-C apresentavam valores significativamente inferiores àqueles observados no GC-BO. A avaliação da microarquitetura óssea trabecular, utilizando os parâmetros espessura trabecular (Tb.Th – espessura média das trabéculas), número de trabéculas (Tb.N – medida do número médio de trabéculas por unidade de comprimento) e separação trabecular (Tb.SP – distância média entre as trabéculas). O número de trabéculas demonstrou-se similar entre todos os grupos teste e controle. A espessura trabecular não demonstrou diferenças significantes entre os respectivos grupos, contudo o GT-C apresentou espessura significativamente superior que os alvéolos do grupo teste que receberam material de enxerto (GT-BO e GT-BOC). A separação trabecular apresentou-se significativamente nos alvéolos do GC-BOC do que nos respectivos alvéolos do GC-BOC.

Figura 14. Imagem representativa da microtomografia computadorizada (Micro-CT): A. Alvéolo do grupo teste que cicatrizou em presença de coágulo (Grupo Teste Coágulo - GT-C) e B. Alvéolo do grupo controle que cicatrizou em presença de coágulo (Grupo Controle Coágulo - GC-C), três meses após o procedimento de extração dentária. Observe a melhor preservação da crista óssea vestibular ao lado esquerdo no alvéolo do grupo teste (GT-C) e ao lado direito no alvéolo do grupo controle (GC-C).

Tabela 3. Avaliação microtomográfica bidimensional da altura da crista óssea vestibular (ACOV) e da dimensão buco-lingual (DBL) em alvéolos, comparações intra e inter-grupos

		ACOV (mm)	DBL (mm)
Teste	GT-C ^(a)	1,32 ± 0,27 (1,20)	4,58 ± 1,04 (4,06)
	GT-BO ^(b)	0,93 ± 0,42 (0,87)	5,75 ± 0,91 (5,88)
	GT-BOC ^(c)	1,01 ± 0,47 (0,79)	5,47 ± 0,66 (5,73)
Controle	GC-C ^(d)	2,32 ± 0,42 (2,30)	4,37 ± 0,63 (4,33)
	GC-BO ^(e)	1,26 ± 0,89 (1,46)	5,47 ± 0,95 (5,68)
	GC-BOC ^(f)	1,40 ± 0,79 (1,22)	5,39 ± 1,04 (5,41)
Diferença Intra-grupos (p)*	a/b	ns	ns
	a/c	ns	ns
	b/c	ns	ns
	d/e	ns	ns
	d/f	ns	ns
	e/f	ns	ns
Diferença Inter-grupos (p)**	a/d	P=0,03	ns
	b/e	ns	ns
	c/f	ns	ns

GT-C: Grupo Teste - Coágulo; GT-BO: Grupo Teste Bio-Oss®, GT-BOC: Grupo Teste Bio-Oss® Collagen; GC-C: Grupo Controle - Coágulo; GC-BO: Grupo Controle Bio-Oss®, GC-BOC: Grupo Controle Bio-Oss® Collagen; *: Análise de diferença intragrupos: Teste de Friedman *post hoc* Teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni ($p \leq 0,05$); **: Análise de diferença entregrupos: Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$); ns: sem diferença estatística. Todos os valores estão dispostos como média ± desvio-padrão (mediana).

Tabela 4. Avaliação microtomográfica tridimensional em alvéolos: Volume ósseo (BV); Porcentagem óssea (BV/TV); Densidade de superfície óssea (BS/TV), Espessura trabecular (Tb.Th), Separação trabecular (Tb.SP) e Número de trabéculas (Tb.N), comparações intra e inter-grupos

		BV (mm ³)	BV/TV (%)	BS/TV (1/mm)	Tb.Th (mm)	Tb.SP (mm)	Tb.N (mm)
Teste	GT-C ^(a)	37,67±21,68 (25,14)	51,19±8,21 (53,22)	11,37±2,32 (11,00)	0,09±0,01 (0,94)	0,45±0,17 (0,45)	5,37±0,85 (5,75)
	GT-BO ^(b)	22,27±5,82 (24,56)	50,12±12,53 (53,95)	17,06±5,19 (19,21)	0,08±0,01 (0,76)	0,26±0,22 (0,18)	6,43±1,90 (7,06)
	GT-BOC ^(c)	24,18±3,58 (25,33)	51,08±7,01 (52,14)	16,91±2,20 (17,31)	0,08±0,01 (0,79)	0,20±0,04 (0,21)	6,36±1,02 (5,79)
Controle	GC-C ^(d)	24,30±3,70 (24,32)	46,70±10,04 (44,99)	12,63±1,62 (12,54)	0,09±0,01 (0,90)	0,36±0,13 (0,29)	5,60±0,90 (5,24)
	GC-BO ^(e)	22,01±2,63 (22,37)	50,01±6,00 (48,89)	17,28±2,26 (16,74)	0,79±0,00 (0,81)	0,22±0,91 (0,17)	6,33±0,71 (6,44)
	GC-BOC ^(f)	20,21±3,92 (21,57)	48,00±9,27 (50,90)	10,94±0,00 (10,93)	0,94±0,00 (0,94)	0,46±0,12 (0,47)	5,10±1,03 (5,29)
Diferença Intra-grupos (p)*	a/b	ns	ns	ns	P=0,05	ns	ns
	a/c	ns	ns	ns	P=0,05	ns	ns
	b/c	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	d/e	ns	ns	P=0,05	ns	P=0,05	ns
	d/f	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	e/f	ns	ns	ns	ns	P=0,05	ns
Diferença Inter-grupos (p)**	a/d	ns	P=0,04	ns	ns	ns	ns
	b/e	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	c/f	ns	ns	P=0,04	ns	P=0,04	ns

GT-C: Grupo Teste – Coágulo; GT-BO: Grupo Teste Bio-Oss®, GT-BOC: Grupo Teste Bio-Oss® Collagen; GC-C: Grupo Controle – Coágulo; GC-BO: Grupo Controle Bio-Oss®, GC-BOC: Grupo Controle Bio-Oss® Collagen; *: Análise de diferença intragrupos: Teste de Friedmand *post hoc* Teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni ($p \leq 0,05$); **: Análise de diferença entregrupos: Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$); ns: sem diferença estatística. Todos os valores estão dispostos como média ± desvio-padrão (mediana).

4.3. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos

4.3.1. Análise Histológica Qualitativa

A análise microscópica demonstrou que os implantes do grupo teste (GT-I) apresentavam-se bem integrados ao tecido ósseo circundante e que o nível da tábua óssea vestibular encontrava-se ligeiramente apical ao ombro do implante (Figura 15). Já os implantes do grupo controle (GC-I) demonstraram integração comprometida com tecido ósseo e nível da tábua óssea vestibular em bastante abaixo do ombro do implante em função do desenvolvimento de doença periimplantar (Figura 16). Além disso, pode-se observar a presença de infiltrado inflamatório ao redor dos implantes do grupo controle (GC-I) (Figura 17).

Figura 15. Imagem histológica corada em vermelho de alizarina representando os implantes imediatos instalados em sítios que foram descontaminados com TFDa (GT-I). Note o implante integrado ao tecido ósseo adjacente e o nível da tábua vestibular ligeiramente apical ao ombro do implante (Magnificação de 2,5x).

Figura 16. Imagem histológica corada em vermelho de alizarina representando os implantes imediatos instalados em sítios que foram descontaminados com debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina (GC-I). Note o comprometimento da integração do implante ao tecido ósseo adjacente e o nível da tábua vestibular bastante apical ao ombro do implante (Magnificação de 2,5x).

Figura 17. Imagem histológica corada em vermelho de alizarina representando os implantes imediatos instalados em sítios que foram descontaminados com debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina (GC-I). Note a presença de infiltrado inflamatório ao redor da superfície do implante (Magnificação de 10x).

4.3.2. Análise Histomorfométrica

No presente estudo, o grupo que recebeu tratamento de descontaminação alveolar com TFDa, previamente a instalação dos implantes imediatos, apresentou resultados significativamente superiores em todos os parâmetros histomorfométricos avaliados (Tabelas 5 e 6), com exceção da densidade óssea, em que o grupo GT-I apresentou valor numericamente superior em relação ao GC-I (Tabela 6). Na análise da reabsorção vertical da crista óssea vestibular, foi observada reabsorção significativamente superior nos implantes do grupo controle ($5,84 \pm 1,44$) em relação aos do grupo teste ($2,03 \pm 1,76$) (Tabela 5).

A porcentagem média de contato osso-implante (BIC) nos implantes do grupo teste foi de $56,74 \pm 18,02$ e nos implantes do grupo controle foi de $33,91 \pm 12,06\%$. A diferença demonstrou significância estatística ($p = 0,05$), com os implante instalados em

sítios descontaminados previamente com TFDa apresentando maior porcentagem de contato osso-implante (Tabela 6).

Tabela 5. Avaliação histomorfométrica da reabsorção vertical da crista óssea vestibular (RVCO) – Medida linear vertical do ombro do implante ao primeiro contato osso-implante (BIC), comparação inter-grupos

		GT-I	GC-I	p
RVCO (mm)	Média	2,03*	5,84*	0,03*
	DP	1,76	1,44	
	Mediana	1,26	5,96	

GT-I: Grupo Teste – Implante; GC-I: Grupo Controle – Implante; DP: Desvio padrão; *: Diferença estatisticamente significativa; Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,5$).

Tabela 6. Avaliação histomorfométrica do contato osso-implante (BIC) e da densidade óssea (DO), comparação inter-grupos

		GT-I	GC-I	p
BIC (%)	Média	56,74*	33,91*	0,05*
	DP	18,02	12,6	
	Mediana	61,94	39,06	
DO (%)	Média	70,57	58,37	0,12
	DP	8,49	9,55	
	Mediana	73,05	56,79	

GT-I: Grupo Teste – Implante; GC-I: Grupo Controle – Implante; DP: Desvio padrão; *: Diferença estatisticamente significativa; Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,5$).

4.3.3. Análise Microtomográfica (Micro-CT)

Os dados obtidos através da análise de microtomografia computadorizada (Micro-CT) estão apresentados nas tabelas 7 e 8. Em geral, a análise microtomográfica evidenciou resultados significativamente melhores para os implantes do grupo teste em relação aos do grupo controle, tanto na análise bidimensional (RVCO) (Tabela 7) como nas tridimensionais (BV, BV/TV, BS/TV, Tb.TH, Tb.SP, Tb.N) (Tabela 8).

Tabela 7. Avaliação microtomográfica bidimensional da reabsorção vertical da crista óssea vestibular (RVCO) – Medida linear vertical do ombro do implante ao primeiro contato osso-implante (BIC), comparação inter-grupos

		GT-I	GC-I	<i>p</i>
	Média	1,9*	5,71*	
RVCO (mm)	DP	1,38	1,33	0,02*
	Mediana	1,19	6,06	

GT-I: grupo teste – Implante; GC-I: Grupo Controle – Implante; DP: Desvio padrão; *: Diferença estatisticamente significante; Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,5$).

Tabela 8. Avaliação microtomográfica tridimensional em implantes, comparação inter-grupos.

		GT-I	GC-I	<i>p</i>
Volume Ósseo - BV (mm ³)	Média	7,68*	1,18*	
	DP	3,99	1,11	0,02*
	Mediana	8,54	0,79	
Porcentagem Óssea - BV/TV (%)	Média	39,39*	6,8*	
	DP	22,44	6,76	0,02*
	Mediana	41,47	4,48	
Densidade da Superfície Óssea - BS/TV (1/mm)	Média	14,77*	2,95*	
	DP	6,59	2,54	0,02*
	Mediana	16,01	2,19	
Espessura Trabecular - Tb.Th (mm)	Média	0,21*	0,09*	
	DP	0,31	0,11	0,02*
	Mediana	0,08	0,05	
Separação Trabecular - Tb.SP (mm)	Média	0,18*	0,34*	
	DP	0,83	0,22	0,02*
	Mediana	0,17	0,35	
Número de trabéculas - Tb.N (1/mm)	Média	4,86*	0,84*	
	DP	2,48	0,8	0,02*
	Mediana	5,32	0,05	

GT-I: Grupo Teste – Implante; GC-I: Grupo Controle – Implante; DP: Desvio Padrão *: Diferença estatisticamente significante; Teste de Wilcoxon ($p \leq 0,5$).

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito de descontaminação da TFDa em alvéolos pós extração, cronicamente infectados, previamente a instalação de implantes e na cicatrização de alvéolos associados ou não ao uso de enxerto xenógeno. Para tanto, foram selecionados 8 cães, os quais foram submetidos a uma fase de indução de doença periodontal por ligadura, seguida por um período de estabelecimento da doença. Após a exodontia dos pré-molares mandibulares, os alvéolos foram descontaminados por debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina (grupo controle) ou por debridamento mecânico e irrigação com solução salina associados a terapia fotodinâmica antimicrobiana (grupo teste). Subsequentemente, 3 alvéolos em cada hemi-arco mandibular foram submetidos a instalação de implantes imediatos e, aleatoriamente, os demais alvéolos foram submetidos ou não a enxerto com materiais de enxerto xenógenos. Em geral, os grupos teste, tanto dos alvéolos como dos implantes imediatos, apresentaram melhores resultados em relação aos respectivos grupos controles. Contudo, todos os parâmetros avaliados nas análises histomorfométricas e microtomográfica demonstraram resultados significativamente superiores nos implantes do grupo teste em relação aos implantes do grupo controle, com exceção da análise de densidade óssea, que demonstrou-se, apenas, numericamente superior nos implantes do grupo teste. Já na avaliação da cicatrização dos alvéolos pós-extração, os elementos dos grupos teste (GT-C, GT-BO e GT-BOC), demonstraram melhores resultados numéricos quando comparados aos respectivos alvéolos do grupo controle (GC-C, GC-BO e GC-BOC), em relação a altura da crista óssea vestibular e a dimensão buco-lingual. Contudo, diferença estatisticamente relevante só foi observada sob análise microtomográfica bidimensional, entre os alvéolos dos grupos teste e controle que não receberam material de enxerto. No entanto, devido ao tamanho das amostras ($n = 7$) utilizadas em estudos pré-clínicos é bastante difícil atingir diferenças significantes.

O consenso geral dita que após os procedimentos de exodontia dentária, o osso alveolar passa por um processo de cicatrização fisiológico natural, que resulta em uma série de alterações qualitativas e quantitativas levando, na maioria das vezes, a reduções significativas tanto em altura como em espessura buco-lingual, alterando dessa forma o perfil dimensional característico dos alvéolos. Além disso, esse processo resulta na

substituição de osso mineralizado por osso medular alterando, dessa forma, a qualidade tecidual.

Nesse sentido, diversas técnicas como a instalação de implantes imediatos e técnicas de preservação alveolar têm sido sugeridas com o objetivo de limitar as alterações funcionais e volumétricas adversas sofridas pelo processo alveolar em alvéolos livres de lesões inflamatórias. Contudo, frequentemente as perdas dentárias estão associadas a infecções crônicas (López-Martinez *et al.*, 2015), que de acordo com uma série de investigações (Schwartz-Arad & Chaushu, 1997a; Barzilay, 1993; Becker & Becker, 1990; Werbitt & Goldberg, 1992) contraindicariam os procedimentos de enxerto e/ou implantes imediatos, devido a possíveis alterações no processo de cicatrização (Amler, 1999; Rosenquist & Grenthe, 1996; Quirynen *et al.*, 2003), a menos que meticulosos debridamento e irrigação alveolar associados a adequado protocolo antibiótico pré e pós-operatório sejam empregados (Novaes Jr *et al.*, 1998; Novaes Jr *et al.*, 2003; Tehemar *et al.*, 2003; Papalexiou *et al.*, 2004; Kfir *et al.*, 2007, Casap *et al.*, 2007; Mardinger *et al.*, 2009; Mardinger *et al.*, 2012; Meltzer *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2015; Manor *et al.*, 2015). Contudo, diante da crescente preocupação com o desenvolvimento de resistência e seleção bacteriana associadas ao uso indiscriminado de antibióticos, alternativas que venham oferecer possibilidade eficaz de remoção dos patógenos periodontopatogênicos, com um mínimo de danos para a saúde sistêmica do hospedeiro estão sendo pesquisadas e precisam ser elucidadas.

5.1. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na cicatrização de alvéolos pós-extração com ou sem material de enxerto

A presente análise histomorfométrica evidenciou que, em todos os espécimes, a altura da crista óssea vestibular (ACOV) encontrava-se apicalmente à crista óssea lingual correspondente. Todos os grupos demonstraram formação de osso novo acima do nível do osso antigo, reduzindo assim a distância entre as cristas ósseas vestibular e lingual durante o período de cicatrização. Os alvéolos dos grupos teste não demonstraram diferença estatisticamente significativa em relação aos alvéolos dos grupos controle, contudo apresentaram distância numericamente inferior entre as tábuas ósseas vestibular e lingual, principalmente em relação a formação de osso novo (ACOV-ON). Essa diferença, embora seja pequena e observada em um modelo animal, cujo tamanho

da amostra é pequeno, talvez possa apresentar implicações clínicas, principalmente em relação as regiões em que a estética é primordial. Na avaliação microtomográfica 2D pode ser observada a mesma tendência de melhores resultados numéricos entre os grupos teste em relação aos respectivos grupos controle, com os alvéolos do grupo teste que cicatrizaram espontaneamente (GT-C) demonstrando perda significativamente inferior, de altura da crista óssea vestibular, do que os alvéolos do grupo controle que cicatrizaram espontaneamente (GC-C).

Em um estudo em cães, Araújo e colaboradores (2008) avaliaram o efeito da modelação e remodelação óssea em alvéolos de extração livres de contaminação preenchidos com Bio-Oss® Collagen, e observaram que a distância entre as cristas ósseas vestibular e lingual foi de $2.1 \pm 0.5\text{mm}$ nos alvéolos que cicatrizaram espontaneamente e de $1.9 \pm 0.6\text{mm}$ nos alvéolos que receberam o material de enxerto, após um período de cicatrização de 12 semanas. Apesar do presente estudo ter sido conduzido em alvéolos infectados e sem a prescrição de antibioticoterapia, os resultados demonstraram-se superiores aos apresentados por Araújo *et al.* (2008) tanto nos grupos teste (GT-C: 1.38 ± 0.45 ; GT-BO: 0.97 ± 0.62 ; GT-BOC: 1.07 ± 0.54) quanto nos controle (GC-C: 1.79 ± 0.49 , GC-BO: 1.36 ± 1.07 , GC-BOC: 1.46 ± 0.65). Assim como no presente estudo, Araújo e colaboradores (2008) utilizaram abordagem com elevação de retalho, porém diferindo com relação a utilização de terapia antibiótica pré e pós cirúrgica em alvéolos livres de doença. Dessa forma, a diferença observada entre os estudos pode ser atribuída ao tamanho dos cães, o biotipo gengival e portanto, a espessura inicial da tabua óssea vestibular.

Em contrapartida, outros estudos comparativos em modelo animal, recentemente reportados na literatura (Suaid *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2015), relataram resultados sensivelmente melhores àqueles obtidos no presente estudo, com relação a distância entre as cristas ósseas vestibular e lingual. Após um período de cicatrização de 3 meses, Suaid e colaboradores (2013) avaliaram a remodelação da tábua óssea vestibular de alvéolos recentes preenchidos ou não com material de enxerto sintético e puderam observar perda vertical na tábua óssea vestibular de 0.26 mm nos alvéolos que receberam material de enxerto e de 0.80 mm nos alvéolos que cicatrizaram espontaneamente. Maia e colaboradores (2015) observaram que a crista óssea vestibular dos sítios com biótipo delgado encontrava-se 0.64 mm e 0.40 mm apicalmente à crista óssea lingual nos sítios que receberam Bio-Oss® Collagen e nos

alvéolos que cicatrizaram espontaneamente, respectivamente. A diferença evidenciada pode ser atribuída primeiramente ao fato de que no presente estudo foram utilizados alvéolos de extração resultantes da exodontia de dentes com doença periodontal crônica avançada, que foram submetidos a descontaminação por debridamento associado a irrigação com solução salina no caso dos grupos controle ou por debridamento associado a irrigação com solução salina seguidos por aplicação de TFDa nos grupos teste, sem associação antibiótica, fator comum entre os demais trabalhos citados que utilizaram alvéolos livre de contaminação (Suaid *et al.*, 2012; Maia *et al.*, 2015). Além disso, no presente estudo foi utilizada uma abordagem com elevação de retalho, diferente daquela preconizada por Maia *et al.* (2015) e Suaid *et al.* (2012) em que os procedimentos foram realizados sem a elevação de retalhos, o que poderia, por si só, influenciar nos maiores índices de reabsorção da crista óssea vestibular demonstrados no presente estudo. Fickl *et al.* (2008b, 2008c) demonstraram o efeito prejudicial que a abordagem envolvendo elevação de retalhos exerce sobre o processo de remodelação óssea em alvéolos pós-extração submetidos a técnicas de preservação alveolar ou não. Quando o retalho mucoperiosteal foi elevado, o efeito da preservação alveolar com Bio-Oss® Collagen foi anulado, exibindo contração adicional de 0.7 mm particularmente no aspecto vestibular. Dessa forma, pode-se sugerir que a maior reabsorção da tábua óssea vestibular, observada no presente estudo, pode estar associada a abordagem com elevação de retalho mucoperiosteal, que altera significativamente o padrão de cicatrização (Blanco *et al.*, 2008; Novaes Jr *et al.*, 2011), e que a TFDa foi capaz de descontaminar os alvéolos previamente infectados, não interferindo no processo de cicatrização.

Recentemente, em uma abordagem mais parecida com a adotada no presente estudo, Kim *et al.* (2016) avaliaram o processo de cicatrização em alvéolos infectados enxertados com Bio-Oss® Collagen, e puderam observar distância entre as cristas ósseas vestibular e lingual de 2.22 mm nos alvéolos que cicatrizaram em presença de coágulo e de 2.02 mm nos alvéolos que receberam o material de enxerto. No presente estudo, a remodelação da tábua óssea vestibular resultou em menor perda de altura tanto nos alvéolos dos grupos teste quanto nos dos grupos controle. Contudo, não fica claro na metodologia do estudo de Kim *et al.* (2016) se os alvéolos receberam algum tratamento de descontaminação e se houve ou não o uso de antibioticoterapia pré e pós-cirúrgica na

etapa do procedimento de exodontia e subsequente preservação alveolar ou não. Dessa forma, não é possível discutir as diferenças apresentadas entre os estudos.

A dimensão buco-lingual média do rebordo alveolar, avaliada 1mm abaixo da maior formação óssea no interior do alvéolo, foi bastante similar entre os alvéolos dos grupos controle, com os alvéolos que receberam material de enxerto (GC-BO: $4,62 \pm 0,99$ e GC-BOC: $4,93 \pm 0,66$) apresentando discreta vantagem numérica em relação aos alvéolos que cicatrizaram espontaneamente (GC-C: $4,32 \pm 0,61$). Já nos grupos teste, os alvéolos que receberam material de enxerto (GT-BO: $5,78 \pm 0,75$ e GT-BOC: $5,71 \pm 0,81$) apresentaram menor perda de espessura numérica do que os alvéolos que cicatrizaram espontaneamente (GT-C: $4,70 \pm 1,29$). Interessantemente, os alvéolos dos grupos teste, que receberam material de enxerto, apresentaram melhores dimensões buco-linguais, sugerindo melhores resultados associados a TFDa.

Mesmo que muitos dos estudos realizados com a finalidade de avaliar o efeito do uso de materiais de enxerto em alvéolos de extração, tenham falhado em demonstrar diferenças significativas entre os sítios enxertados e não-enxertados (Araújo *et al.*, 2008; Suaid *et al.*, 2012; Bashara *et al.*, 2012; Maia *et al.*, 2015), a maior parte deles demonstra menor redução numérica, tanto em altura quanto em espessura, nos sítios que receberam material de enxerto. Esse padrão de cicatrização pode ser claramente observado em ambos os grupos do presente estudo, contudo com os alvéolos dos grupos teste, tanto os que receberam material de enxerto como os que não receberam, apresentando melhores resultados numéricos quando comparados aos respectivos alvéolos dos grupos controle, evidenciando o efeito de descontaminação da TFDa. Recentes revisões da literatura (Ten Heggeler *et al.*, 2011; Horváth *et al.*, 2013; MacBeth *et al.*, 2015) concluíram que os procedimentos de preservação alveolar não apresentam potencial para evitar completamente a reabsorção alveolar sofrida após os procedimentos de exodontia. Contudo, podem limitá-la, o que leva a redução na contração dos alvéolos, favorecendo assim o posterior posicionamento adequado de implantes, tanto funcional como esteticamente, com mínima (Fiorellini *et al.*, 2005; Kfir *et al.*, 2007; Gholami *et al.*, 2012; Mardas *et al.*, 2015) ou nenhuma (Barone *et al.*, 2008; Pelegrine *et al.*, 2010) necessidade de procedimentos adicionais para ganho de volume ósseo.

Alguns estudos (Marcaccini *et al.*, 2003; Ahn & Shin, 2008) têm relatado que alvéolos resultantes de sítios infectados demonstram um processo de cicatrização mais

lento e complexo quando comparado àquele observado em alvéolos livres de doença. Na presente avaliação histomorfométrica, pode ser observado um atraso similar no processo de cicatrização dos alvéolos do grupo controle que cicatrizaram espontaneamente (GC-C), evidenciado pela composição tecidual, onde os alvéolos encontravam-se preenchidos por tecido ósseo mineralizado (45.69%) e área medular (54.30%). Esses resultados quando comparados aos alvéolos livres de contaminação descritos por Cardaropoli e colaboradores (2003), em que os alvéolos encontravam-se preenchidos por tecido mineralizado (37%) e por osso medular (63%), demonstram um atraso no processo de cicatrização. Por outro lado, os alvéolos que cicatrizaram espontaneamente pertencentes ao grupo teste (GT-C) do presente estudo demonstraram-se preenchidos por tecido mineralizado ($38.97 \pm 9.70\%$) e osso medular (61.02 ± 9.70), resultados esses similares àqueles observados por Cardaropoli *et al.* (2003), demonstrando, dessa forma, que o potencial de cicatrização dos alvéolos do GT-C não foi comprometido pela presença de infecção prévia, em função do efeito de descontaminação da TFDa.

Uma série de estudos têm relatado atraso no padrão de cicatrização associado ao emprego de materiais de enxerto com a finalidade de preservar os alvéolos de extração (Wetzel *et al.*, 1995; Diès *et al.*, 1996; Berglundh & Lindhe, 1997; Zitzmann *et al.*, 1997; Cardaropoli *et al.*, 2003; Carmagnola *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2008; Lindhe *et al.*, 2014). Em acordo com estes resultados, a comparação entre os alvéolos dos grupos teste, com relação a composição tecidual, no presente estudo, indicou que o processo de remodelação tecidual progrediu mais nos alvéolos que não receberam material de enxerto do que nos alvéolos que receberam, com os alvéolos enxertados demonstrando volume significativamente inferior de área medular do que os alvéolos que cicatrizaram espontaneamente. O volume de área medular foi numericamente superior no GT-BO quando comprado ao GT-BOC o que sugere estar relacionada a única diferença existente entre a composição dos dois tipos de enxerto ósseo bovino mineral desproteínizado, que consiste no acréscimo de 10% de colágeno suíno no BOC, com a finalidade de unir o espaço existente entre as partículas e após sua reabsorção, que ocorre após a 1ª semana de cicatrização, de acordo com Araújo *et al.* (2010), facilitar a penetração de células, vasos sanguíneos e formação de espaços medulares. De acordo com Araújo *et al.* (2008) o menor volume de osso medular nos grupos enxertados indica que durante o processo de cicatrização as partículas de Bio-Oss® ocupam a área que seria ocupada pelo osso

medular, dessa forma, embora o uso do biomaterial promova formação óssea e resolução do defeito, o material de enxerto, de fato, atrasa a cicatrização. Já nos alvéolos do grupo controle, embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos, o processo de cicatrização parece ter progredido discretamente mais rápido nos alvéolos não enxertados do que nos enxertados. Os alvéolos do grupo controle que receberam material de enxerto demonstraram volume significativamente superior de área medular do que os respectivos alvéolos do grupo teste, pelo fato dos alvéolos do grupo controle apresentarem menores quantidades de partículas residuais de enxerto.

Em um estudo recente, Kim e colaboradores (2014) reportaram que 72.2% dos casos de alvéolos que cicatrizaram espontaneamente associados a cicatrização deficiente, ou seja que resulta no preenchimento alveolar por tecido conjuntivo fibroso ao invés de novo osso, ocorreram principalmente em sítios portadores de inflamações crônicas de origem periodontal. No presente estudo, esse fato não pode ser observado nos alvéolos, tanto nos alvéolos do grupo teste como nos do controle, que cicatrizaram espontaneamente. Por outro lado, em presença do material de enxerto xenógeno, pode ser observada a presença de cicatrização deficiente em alguns espécimes do GC-BOC, evidenciando maior eficiência da TFDa na descontaminação alveolar quando comparada a descontaminação realizada apenas com debridamento alveolar associado a irrigação com solução salina.

No presente estudo, em todos os espécimes que receberam material de enxerto pode ser observado a presença de partículas residuais em toda a extensão do alvéolo, com os alvéolos do grupo teste demonstrando 24.74% e 10.35% de Bio-Oss® e Bio-Oss® Collagen, respectivamente, e os alvéolos do grupo controle demonstrando 13,80% e 8,05% de Bio-Oss e Bio-Oss Collagen, respectivamente. Alguns autores têm sugerido que partículas do enxerto ósseo bovino desproteínizado, utilizadas no preenchimento de defeitos ósseos, não são reabsorvidas por completo e permanecem como um corpo estranho inerte circundadas por tecido ósseo neoformado (Traini *et al.*, 2007; Traini *et al.*, 2008). Em contrapartida, outros autores têm relatado, tanto em estudos clínicos (Skoglund *et al.*, 1997; Piattelli *et al.*, 1999; Carmagnola *et al.*, 2003, Artzi *et al.*, 2004; Traini *et al.*, 2007, 2008) como experimentais (Jensen *et al.*, 1996, 2006; Artzi *et al.*, 2004), que o processo de reabsorção do Bio-Oss® é bastante lento, e que ao longo do tempo suas partículas remanescentes sofrem remodelação e formam novo tecido ósseo, já que após meses de cicatrização atividade osteoclástica pode ser observada ao redor

das partículas (Pinholt *et al.*, 1991; Klinge *et al.*, 1992). Esse processo lento de reabsorção associado a boa propriedade osteocondutiva, característicos do osso bovino desproteínizado, são considerados vantajosos, embora associados ao atraso na cicatrização, uma vez que proporcionam melhor manutenção das características dimensionais dos alvéolos de extração. Consideramos que a maior dimensão buco-lingual dos rebordos que receberam material de enxerto pode ser considerada benéfica, mesmo associada a atraso no processo de cicatrização, pois permite melhor posicionamento do implante e consequentemente melhores resultados estéticos.

Na análise histológica do presente estudo, pode ser observado com bastante frequência a presença de osteoclastos ao redor das partículas remanescentes dos grupos que receberam biomaterial, assim como camadas de osteoblastos depositando matriz osteóide, caracterizando um processo ativo de modelação e remodelação, nos alvéolos em que o processo de cicatrização ocorreu normalmente. Além disso, as partículas remanescentes de biomaterial estavam bem integradas e contínuas com o tecido ósseo imaturo formado, tornando difícil a determinação dos limites entre as partículas do enxerto e o novo osso formado em vários espécimes. Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por uma série de estudos experimentais (Skoglund *et al.*, 1997; Cardaropoli *et al.*, 2003) demonstrando a ocorrência de um íntimo contato entre as partículas do osso desproteínizado bovino e o tecido ósseo neoformado, caracterizando a propriedade osteocondutora do enxerto bovino desproteínizado.

A arquitetura da estrutura do tecido ósseo cortical e trabecular, durante muito tempo, vem sendo avaliada através de técnicas histológicas quantitativas, consideradas como “padrão ouro” (Lespessaille *et al.*, 2006; Arlot *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2010). No entanto, embora essas técnicas forneçam informações únicas sobre a celularidade e os índices dinâmicos de remodelação óssea, apresentam limitações em relação a avaliação da microarquitetura óssea, visto que os parâmetros estruturais são limitados à análise bidimensional (Bouxsein *et al.*, 2010). Por outro lado, técnicas de alta resolução tridimensional, como a microtomografia computadorizada (micro-CT), medem diretamente a microarquitetura óssea. Em geral, a avaliação dos índices morfométricos utilizados no presente estudo, demonstram resultados similares relacionados ao volume ósseo (BV) e porcentagem óssea (BV/TV) entre os grupos avaliados, compatíveis com a análise histomorfométrica, demonstrando maior porcentagem óssea somente entre os alvéolos do grupo teste e controle que cicatrizaram espontaneamente, onde os alvéolos

que receberam TFDa apresentam maior BV/TV, mais uma vez sugerindo ser este tipo de tratamento de descontaminação superior ao debridamento associado a irrigação com solução salina. A presença de maior densidade óssea de superfície (BS/TV) poderia indicar um tecido mais mineralizado durante a cicatrização dos alvéolos, o que não se traduz necessariamente em maior resistência, pois para tal constatação seria necessário a aplicação de outros tipos de testes (Kim *et al.*, 2016). No presente estudo, pode ser observado valores numericamente superiores de BS/TV nos alvéolos que receberam material de enxerto em relação aos que cicatrizaram espontaneamente nos grupos teste e controle, com exceção do GC-BOC. Esse fato sugere estar associado aos espécimes do GC-BOC que não cicatrizaram normalmente, devido ao encapsulamento das partículas residuais de enxerto em tecido conjuntivo, diminuindo, dessa forma, a densidade de superfície óssea.

5.2. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos

Os resultados do presente estudo demonstraram que implantes imediatos inseridos em sítios cronicamente infectados, previamente descontaminados com protocolo associado a TFDa sem administração de antibióticoterapia sistêmica concomitante, apresentaram resultados significativamente melhores, não apenas em termos de preservação da altura do tecido ósseo marginal que circunda os implantes imediatos, mas também em determinar melhor qualidade do tecido ósseo. Os implantes pertencentes ao grupo teste (GT-I) demonstraram menores níveis de reabsorção óssea vertical, evidenciados pela análise histomorfométrica e confirmados por análise microtomográfica bidimensional. Ademais, a análise microtomográfica tridimensional demonstrou, através de alguns dos parâmetros avaliados, como o volume ósseo (BV) e a porcentagem óssea (BV/TV) maior quantidade de tecido ósseo associado ao tratamento de descontaminação envolvendo a aplicação da TFDa. Da mesma forma, o tradicional parâmetro histomorfométrico, utilizado para avaliar o nível de osseointegração (contato osso-implante – BIC), demonstrou resultados significantemente melhores relacionados ao protocolo de descontaminação associado a aplicação da TFDa.

Um dos principais requisitos para que os implantes obtenham sucesso é a manutenção dos tecidos periimplantares, de tal forma que a osseointegração e os

aspectos estéticos não sejam comprometidos. A análise histomorfométrica do presente estudo evidenciou reabsorção vertical da crista óssea vestibular significativamente inferior nos implantes instalados em sítios que receberam tratamento de descontaminação associado a TFDa (GT-I) em relação àqueles instalados em sítios que receberam tratamento de descontaminação apenas com debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina (GC-I) (Tabela x). Suaid *et al.* (2014) em um recente estudo em cães, avaliaram a remodelação da tábua óssea vestibular após a instalação de implantes imediatos ao nível da crista óssea e relataram reabsorção da crista óssea vestibular média de $1,67 \pm 0,82\text{mm}$, após um período de cicatrização de 12 semanas. Comparações diretas com o presente estudo podem ser feitas, contudo com cautela, pois embora ambos os estudos tenham avaliado a remodelação da tábua óssea após a instalação de implantes imediatos, as abordagens utilizadas entre os estudos foram bastante diferentes. Suaid e colaboradores (2014) realizaram a instalação de implantes imediatos em sítios livres de contaminação associado a rígida terapia antibiótica sistêmica pré e pós-operatória. Além disso, utilizaram abordagem sem elevação de retalho, diferentemente do presente estudo que avaliou a instalação de implantes imediatos em sítios infectados, previamente descontaminados com TFDa (GT-I) ou debridamento associado a irrigação com solução salina (GC-I), com a elevação de retalho mucoperiosteal. Esse fato, por si só, poderia justificar a diferença encontrada entre os estudos, com base em uma série de estudos experimentais que demonstraram perda significativamente superior do tecido ósseo marginal associado a abordagem com elevação de retalho (Blanco *et al.*, 2008; Fickl *et al.*, 2008; Novaes Jr *et al.*, 2011). Cardaropoli *et al.* 2007, em um estudo com a finalidade de avaliar a cicatrização de implantes imediatos instalados sem a elevação de retalhos demonstrou reabsorção óssea vertical de 2.11 mm em implantes instalados com elevação de retalho e 0.6 mm nos implantes imediatos do lado teste, instalados sem elevação de retalho. Em um outro estudo com implantes imediatos e abordagem sem elevação de retalhos Negri *et al.*, 2012 observaram uma média de reabsorção vertical de 3.39mm nos implantes instalados ao nível da crista óssea. A perda óssea vertical associada a crista óssea vestibular observada no grupo teste do presente estudo ($2,03 \pm 1,76\text{ mm}$) demonstrou-se bastante similar àquela relatada Cardaropoli *et al.* (2003), no grupo em que os implantes imediatos foram instalados com elevação de retalho. Já o estudo de Negri *et al.*, (2012) demonstrou maiores valores em comparação ao presente estudo, o que pode

estar relacionado ao tempo de cicatrização de 8 semanas, comparado com 12 semanas no presente estudo. Esses resultados sugerem efeito positivo da TFDa na descontaminação de alvéolos previamente a instalação de implantes imediatos, uma vez que os dados do presente estudo, realizado em sítios infectados previamente descontaminados com TFDa sem associação antibiótica, demonstram resultados comparáveis aos demais estudos citados anteriormente (Cardaropoli *et al.*, 2007; Negri *et al.*, 2011; Suaid *et al.*, 2014), realizados em sítios livres de contaminação e associados a antibioticoterapia sistêmica.

Tanto o contato osso-implante (BIC) como a perda óssea marginal afetam o sucesso de um implante dentário, contudo o BIC fornece informações sobre a capacidade de integração de um implante e é considerado o determinante principal de estabilidade do implante após a cicatrização inicial (Buser, 1999). A porcentagem média de osseointegração (BIC) encontrada neste estudo foi de 56,74% para os implantes do grupo teste (GT-I) e de 33,91% para os implantes do grupo controle (GC-I), diferença essa estatisticamente significativa, evidenciando melhores resultados para o GT-I. A porcentagem média de BIC, observada no GT-I do presente estudo, está de acordo com os dados relatados por outros estudos que avaliaram implantes imediatos, contudo que foram instalados em sítios livres de contaminação e sob rígido protocolo antibiótico pré e pós-cirúrgico, e variaram entre 47,9% e 75% (Barzilay *et al.*, 1992; Ettinger *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1993; Wilson, 1998; Novaes Jr *et al.*, 2002). Os dados do presente estudo demonstraram que entre os implantes do GT-I, o BIC variou entre 58,87 e 70,18% com apenas um implante demonstrando BIC de 20%, já nos implantes do GC-I o BIC variou entre 32,23 e 42,73% com um implante demonstrando BIC de 9,33%. O que reforça o melhor efeito de descontaminação exercido pelo protocolo associado a aplicação da TFDa.

Uma outra observação importante foi a densidade óssea, avaliada a partir do primeiro contato osso-implante em ambos os grupos experimentais. No processo de cicatrização óssea, a densidade óssea, ou seja, a qualidade óssea, depende da estabilização do coágulo ao redor da superfície do implante, e essa condição pode ser afetada adversamente pela presença de contaminação. Embora O GT-I (70,57%) não tenha apresentado valores significativamente superiores em relação ao GC-I (58,37%), apresentou valores numéricos sensivelmente superiores, podendo sugerir melhor efeito de descontaminação associado a TFDa.

Embora alguns estudos clínicos sugiram que a instalação de implantes em sítios associados a infecção periodontal aumentam o risco de falhas e/ ou perda óssea marginal (Karoussis *et al.*, 2003; Casap *et al.*, 2007). Esse risco aumentado pode estar associado ao efeito negativo imposto pelas lesões periodontais na osseointegração (Werbitt & Goldberg, 1992). Além disso, têm sido sugerido que os implantes podem tornar-se potencialmente contaminados devido a remanescentes de infecção que também podem levar a falha nos implantes (Polizzi *et al.*, 2000). Apesar do presente estudo ter sido executado em sítios periodontalmente infectados, os implantes do grupo teste (GT-I) cujos alvéolos foram descontaminados pela ação da TFDa apresentaram índice de sobrevivência de 95,24% (1/21), compatíveis àqueles de implantes imediatos instalados em sítios livres de doença (Schwartz-Arad & Chaushu, 1997a,b), sugerindo mais uma vez os efeitos benéficos da TFDa na descontaminação de alvéolos periodontalmente contaminados. Por outro lado, os implantes do grupo teste (GT-I) demonstraram menor índice de sobrevivência 85% (3/20), com a maior parte dos implantes remanescentes exibindo sinais doença periimplantar.

Uma série de estudos conduzidos em animais (Marcaccini *et al.*, 2003; Novaes Jr *et al.*, 2003, 2004; Papalexiou *et al.*, 2004) falharam em demonstrar diferenças relevantes entre a instalação de implantes imediatos em sítios infectados quando comparados àqueles instalados em sítios livres de contaminação, tanto em relação a falhas relacionadas ao implante (contato osso-implante - BIC e a densidade óssea - DO), como em alterações nos níveis do osso marginal, mesmo sob associação de debridamento mecânico e irrigação alveolar a terapia antibiótica sistêmica pré e pós-operatória. Por outro lado, o presente estudo, igualmente conduzido em sítios infectados, embora tenha utilizado um protocolo de descontaminação local associado a aplicação de TFDa (GT-I), não associado a qualquer tipo de antibioticoterapia, demonstrou diferenças relevantes em relação ao grupo controle (GC-I) e resultados compatíveis a outros estudos conduzidos em sítios livre de contaminação associados a terapia antibiótica sistêmica pré e pós-operatória.

Nos últimos tempos, o uso da microtomografia computadorizada (MicroCT) de alta resolução de imagem a fim de avaliar a morfologia óssea cortical e trabecular em espécimes animais ou humanas cresceu imensamente. Embora as análises histológicas forneçam informações únicas sobre celularidade e índices dinâmicos de remodelação óssea, apresentam limitações a respeito da avaliação da microarquitetura óssea, uma

vez que parâmetros estruturais são derivados de análises estereológicas de poucas secções bidimensionais. Por outro lado, técnica tridimensionais de alta resolução, como o Micro-CT, medem diretamente a microarquitetura óssea, além de apresentar uma série de vantagens, entre as quais destacam-se: 1 – permite a realização de medidas tridimensionais diretas da morfologia trabecular, 2 – comparada com a histologia bidimensional, permite a análise de um volume significativamente superior, 3 – as medidas podem ser realizadas de forma bem mais rápida do que as análises histomorfométricas de espécimes ósseos descalcificados, e 4 – a análise é não destrutiva, dessa forma, as amostras podem ser utilizadas subsequentemente para outras análises, como histológicas ou testes mecânicos (Bouxsein *et al.*, 2010). Como esperado, a avaliação dos parâmetros microtomográficos propostos no presente estão em acordo com os achados histomorfométricos, com os implantes imediatos do grupo teste (GT-I) apresentando resultados significativamente superiores em relação àqueles observados nos implantes imediatos do grupo controle (GC-I), indicando que houve diferenças no nível de trabecularidade e qualidade óssea entre os grupos experimentais e, dessa forma, suportando o efeito benéfico da TFDa na descontaminação de alvéolos pós-extração cronicamente infectados previamente a instalação de implantes imediatos.

Em pesquisas básicas sobre o tecido ósseo os parâmetros: número de trabéculas (Tb.N), espessura trabecular (Tb. TH) e separação trabecular (Tb. SP) são considerados medidas fundamentais para a caracterização tridimensional (3D) da estrutura do osso esponjoso. Uma série de estudos realizados com a finalidade relacionar esses índices com a resistência óssea e com a alteração relacionada a idade pela ação de algumas intervenções medicamentosas (Parfitt *et al.*, 1999) têm sido realizados e demonstrado que um dos processos mais importantes relacionados a perda óssea é a perda das trabéculas ósseas. Assim, a diminuição do osso trabeculado é causada pelo estreitamento das trabéculas, e além disso a diminuição no número de trabéculas (Tb.N) e aumento da separação trabecular (Tb.SP) estão frequentemente relacionados a diminuição da porcentagem de tecido ósseo (BV/TV), correlação essa coerente com os dados obtidos no grupo GC-I do presente estudo (Tabela 9). Por outro lado, a presença de trabéculas mais numerosas e espessas irão resultar em um maior volume ósseo e conseqüentemente em um BIC mais alto (Ichikawa *et al.*, 2000 e Trisi *et al.*, 2002), corroborando os achados do presente estudo em relação aos implantes do grupo teste

(GT-I) e sugerindo mais uma vez um efeito benéfico da TFDa na descontaminação de alvéolos infectados previamente a instalação de implantes imediatos.

Com o desenvolvimento da TFDa e evidências científicas de sua efetividade em reduzir os microorganismos periodontopatogênicos *in vitro* (Chan & Lai, 2003; Eick *et al.*, 2013; Alvarenga *et al.*, 2015; Theodoro *et al.*, 2015), uma série de estudos com o objetivo de avaliar seu efeito *in vivo* têm sido realizados tanto no tratamento de doenças periimplantares (Dörtbudak *et al.*, 2001; Shibli *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2016b) como de doenças periodontais (Kömerik *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2010; de Oliveira *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2015, Ramos *et al.*, 2016a), demonstrando capacidade significativa em reduzir a quantidade dos principais patógenos, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, envolvidos no desenvolvimento e manutenção dessas doenças inflamatórias. No presente estudo, a TFDa foi realizada com um *laser* de diodo de mão de comprimento de onda vermelho de 660nm, dentro do intervalo de ressonância dos corantes da família das fenotiazinas, permitindo dessa forma compatibilidade entre a TFDa e o corante (Prates *et al.*, 2011). Foi selecionado um fotossensibilizador a base de cloreto de fenotiazina, pois parecem ser os mais indicados para o tratamento de infecções de origem periodontal, por apresentarem um maior poder de penetração (Kömerik *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2008; de Almeida *et al.*, 2008). A utilização de um *laser* de baixa intensidade permite diferenciar os tecidos do hospedeiro das bactérias pela administração de fotossensibilizadores, os quais se unem aos microorganismos alvo. Além disso, o intervalo de pré-irradiação de 5 minutos foi selecionado, pois tem demonstrado ser mais efetivo na redução de bactérias periodontopatogênicas alvo (Chan & Lai, 2003; Qin *et al.*, 2008).

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana apresenta potencial como agente de descontaminação de alvéolos pós extração, cronicamente infectados, previamente a instalação de implantes imediatos e na cicatrização de alvéolos associado ou não a material de enxerto, com vantagens numéricas porém, sem significância estatística frente ao tratamento de descontaminação de debridamento associado a irrigação com solução salina em alvéolos pós extração associados ou não a enxertos xenógenos e com relevância estatística em relação a instalação de implantes imediatos. Contudo, esses resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que, embora o protocolo de descontaminação associado a TFDa tenha demonstrado resultados favoráveis em relação àqueles observados no protocolo de descontaminação com debridamento mecânico associado a irrigação com solução salina, e apresente resultados comparáveis aos de outros estudos em que o procedimento de instalação imediata de implantes ou material de enxerto foi realizada em sítios não associados a infecção crônica e sob rígida terapia antibiótica pré e pós-operatória, o presente estudo demonstrou um desvio padrão muito alto, evidenciando resultados não muito previsíveis e dependentes da resposta individual de cada hospedeiro. Além disso, outros estudos com o mínimo de fatores que possam sobrepor o efeito dessa terapia, como por exemplo o uso de abordagem sem elevação de retalho devem ser conduzidos para melhor elucidar essa questão.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981;10(6):387-416.

Ahn JJ, Shin HI. Bone tissue formation in extraction sockets from sites with advanced periodontal disease: a histomorphometric study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23(6):1133-1138.

Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981;52(2):155-170.

Altintas NY, Taskesen F, Bagis B, Baltacioglu E, Cezairli B, Senel FC. Immediate implant placement in fresh sockets versus implant placement in healed bone for full-arch fixed prostheses with conventional loading. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2016;45(2):226-231.

Alvarenga LH, Prates RA, Yoshimura TM, Kato IT, Suzuki LC, Ribeiro MS, Ferreira LR, Pereira SA, Martinez EF, Saba-Chujfi E. Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2015;12(1):131-135.

Alwaeli HA, Al-Khateeb SN, Al-Sadi A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci* 2015;30(2):801-807.

Amler MH. Disturbed healing of extraction wounds. *J Oral Implantol* 1999;25(3):179-184.

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969;27(3):309-318.

Araújo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(1):55-64.

Araújo MG, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(1):1-6.

Araújo MG, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28(2):123-135.

Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin periodontol* 2005;32(2): 212-218.

Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(5):433-440.

Araújo MG, Lindhe J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2011;22(1):9-13.

Ardila CM, Granada MI, Guzmán IC. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontol Res* 2010;45(4):557-563.

Arlot ME, Jiang Y, Genant HK, Zhao J, Burt-Pichat B, Roux JP, Delmas PD, Meunier PJ. Histomorphometric and μ CT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. *J Bone Miner Res* 2008;23(2):215-222.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: Histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol* 2000;71(6):1015-1023.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 2: Histochemical observations at 9 months. *J Periodontol* 2001;72(2):152-159.

Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(3): 357-368.

Barone A, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado JL, Covani U. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. *J Periodontol* 2008;79(8):1370-1377.

Bartee BK. Extraction site reconstruction for alveolar ridge preservation. Part I: rationale and materials selection. *J Oral Implantol* 2001;27(4):187-193.

Barzilay I. Immediate implants: Their current status. *Int J Prosthodont* 1993;6(2):169-175.

Barzilay I, Graser GN, Iranpour B, Natiella JR. Immediate implantation of a pure titanium implant into an extraction socket: report of a pilot procedure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1991;6(3):277-284.

Bashara H, Wohlfahrt JC, Polyzois I, Lyngstadaas SP, Renvert S, Claffey N. The effect of permanent grafting materials on the preservation of the buccal bone plate after tooth extraction: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(8):911-917.

Becker W, Becker BE. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1990;10(5):376-391.

Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1997;8(2):117-124.

Bhola M, Neely AL, Kolhatkar S. Immediate implant placement: clinical decisions, advantages, and disadvantages. *J Prosthodont* 2008;17(7):576-581.

Betsy J, Prasanth CS, Baiju KV, Prasanthila J, Subhash N. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2014;41(6):573-581.

Blanco J, Nuñez V, Aracil L, Muñoz F, Ramos I. Ridge alterations following immediate implant placement in the dog: flap versus flapless surgery. *J Clin Periodontol* 2008;35(7):640-648.

Borg TD, Mealey BL. Histologic healing following tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus combined mineralized-demineralized freeze-dried bone allograft: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 2015;86(3):348-355.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *J Bone Miner Res* 2010;25:1468-1486.

Braham P, Herron C, Street C, Darveau R. Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol* 2009;80(11):1790-1798.

Buser D. (1999) Effect of various titanium surface configurations on osseointegration and clinical implant stability. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J (eds). Proceedings of the Third European Workshop on Periodontology Implant Dentistry. Berlin: Quintessence, 88-101.

Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Klokkevold PR, Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M, Jancovic S, Orsini M. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90(5):581-586.

Camelo M, Nevins ML, Lynch SE, Schenk RK, Simion M, Nevins M. Periodontal regeneration with an autogenous bone-Bio-Oss composite graft and a Bio-Gide membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001;21(2):109-19.

Cardaropoli GMF, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2003;30(9): 809-818.

Cardaropoli GMF, Osorio R, Toledano M, Pisani Proença T, Thomsen P, Tarnow D. Healing following tooth extraction and immediate implant installation with flapless surgery. *Clin Oral Implant Res* 2007; 18.

Carlsson GE, Ericson S. Chances in the soft tissue profile of the face following tooth extraction and denture treatment. A longitudinal x-ray cephalometric study. *Odontol Tidskr* 1967;75(2):69-98.

- Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(2):137-143.
- Casap N, Zeltser C, Wexler A, Tarazi E, Zeltser R. Immediate placement of dental implants into debrided infected dentoalveolar sockets. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(3):384-392.
- Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003;18(1):51-55.
- Clozza E, Pea M, Cavalli F, Moimas L, Di Lenarda R, Biasotto M. Healing of fresh extraction sockets filled with bioactive glass particles: histological findings in humans. *Clin Implant Dent Relat Res* 2014;16(1):145-153.
- de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008;79(11):2156-2165.
- de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2007;78(3):566-575.
- de Barros RR, Novaes AB Jr, de Carvalho JP, de Almeida AL. The effect of a flapless alveolar ridge preservation procedure with or without a xenograft on buccal bone crest remodeling compared by histomorphometric and microcomputed tomographic analysis. *Clin Oral Implants Res* 2016 Jun 16. doi: 10.1111/clr.12900. [Epub ahead of print].
- de Oliveira RR, Novaes AB Jr, Garlet GP, de Souza RF, Taba M Jr, Sato S, de Souza SL, Palioto DB, Grisi MF, Feres M. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Lasers Med Sci* 2011;26(3):359-67.
- de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, Scombatti de Souza SL, Ribeiro FJ. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol* 2009;80(1):98-105.
- de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78(6):965-973.
- Denissen HW, Kalk W, Veldhuis HA, van Waas MA. Anatomic consideration for preventive implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8(2):191-196.
- Deng F, Zhang H, Zhang H, Shao H, He Q, Zhang P. A comparison of clinical outcomes for implants placed in fresh extraction sockets versus healed sites in periodontally compromised patients: a 1-year follow-up report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25(5):1036-1040.

Diès F, Etienne D, Bou Abboud N, Ouhayoun J. Bone regeneration in extraction sites after immediate placement of an e-PTFE membrane with or without a biomaterial. A report on 12 consecutive cases. *Clin Oral Implants Res* 1996;7(3):277-285.

Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; 11(4):318-326.

Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(2):104-108.

Eick S, Markauskaite G, Nietzsche S, Laugisch O, Salvi GE, Sculean A. Effect of photoactivated disinfection with a light-emitting diode on bacterial species and biofilms associated with periodontitis and peri-implantitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013;10(2):156-167.

Ettinger RL, Spivey JD, Han DH, Koobusch GF. Measurement of the interface between bone and immediate endosseous implants: a pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8(4):420-427.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Kebschull M, Hürzeler MB. Hard tissue alterations after socket preservation with additional buccal overbuilding: a study in the beagle dog. *J Clin Periodontol* 2009;36(10):898-904.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Stappert CFJ, Stein JM, Hürzeler MB. Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. *J Clin Periodontol* 2008;35(10):906-913.

Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, Toljanic J, Jones A, Nevins M. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol* 2005;76(4):605-613.

Froum S, Cho SC, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J Periodontol* 2002;73(1):94-102.

Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 1992;63(4):338-355.

Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(6):2173-2178.

Gholami GA, Najafi B, Mashhadiabbas F, Goetz W, Najafi S. Clinical, histologic and histomorphometric evaluation of socket preservation using a synthetic nanocrystalline hydroxyapatite in comparison with a bovine xenograft: a randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(10):1198-1204.

- Haas R, Donath K, Fodiger M, Watzek G. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: Comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(2):107-116.
- Hanser T, Khoury F. Extraction site management in the esthetic zone using autogenous hard and soft tissue grafts: a 5-year consecutive clinical study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2014;34(3):305-12.
- Heberer S, Al-Chawaf B, Hildebrand D, Nelson JJ, Nelson K. Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(12):1219-1225.
- Hising P, Bolin A, Branting C. Reconstruction of severely resorbed alveolar ridge crests with dental implants using a bovine bone mineral for augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16(1):90-97.
- Horváth A, Mardas N, Mezzomo LA, Needleman IG, Donos N. Alveolar ridge preservation. A systematic review. *Clin Oral Investig* 2013;17(2):341-363.
- Horváth A, Windisch P, Gera I. Post-extraction site management by a novel nanoporous polytetrafluoroethylene barrier. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(10):1121.
- Houser BE, Mellonig JT, Brunsvold MA, Cochran DL, Meffert RM, Alder ME. Clinical evaluation of anorganic bovine bone xenograft with a bioabsorbable collagen barrier in the treatment of molar furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001;21(2):161-169.
- Hürzeler MB, Quiñones CR, Kirsch A, Gloker C, Schüpbach P, Strub JR, Caffesse RG. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res* 1997;8(6):476-486.
- Iasella JM, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Drisko C, Bohra AA, Scheetz JP. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: A clinical and histologic study in humans. *J Periodontol* 2003;74(7):990-999.
- Ichikawa T, Hanawa T, Ukai H, Murakami K. Three-dimensional bone response to commercially pure titanium, hydroxyapatite, and calcium-ion-mixing titanium in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15(2):231-238.
- Jenkins WM, MacFarlane TW, Gilmour WH. Longitudinal study of untreated periodontitis (I). Clinical findings. *J Clin Periodontol* 1988;15(5):324-330.
- Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjörting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. The International J Oral Maxillofac Implants 1996;11(1): 55-66.

Johnson KA. A study of the dimensional change occurring in the maxilla following tooth extraction. *Aust Dent J* 1969;14(4):241-244.

Kfir E, Kfir V, Kaluski E. Immediate bone augmentation after infected tooth extraction using titanium membranes. *J Oral Implantol* 2007;33(3):133-138.

Karaca Ç, Er N, Gülşahi A, Köseoğlu OT. Alveolar ridge preservation with a free gingival graft in the anterior maxilla: volumetric evaluation in a randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015;44(6):774-780.

Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Brägger U, Hämmerle CH, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(3):329-339.

Kim JJ, Schwarz F, Song HY, Choi Y, Kang KR, Koo KT. Ridge preservation of extraction sockets with chronic pathology using Bio-Oss® Collagen with or without collagen membrane: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2016 May 18. doi: 10.1111/clr.12870. [Epub ahead of print].

Kim JH, Susin C, Min JH, Suh HY, Sang EJ, Ku Y, Wikesjö UM, Koo KT. Extraction sockets: erratic healing impeding factors. *J Clin Periodontol* 2014;41(1):80-85.

Kinaia BM, Shah M, Neely AL, Goodis HE. Crestal bone level changes around immediately placed implants: A systematic review and meta-analyses with at least 12 months follow-up after functional loading. *J Periodontol* 2014;85:1537-1548.

Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 2001;59(3):154-160.

Kleinfelder JW, Müller RF, Lange DE. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1999;26(6):347-351.

Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jönsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50(3):241-249.

Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, Hopper C, Speight PM, Wilson M. Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci* 2002;17(2):86-92.

Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(3):932-940.

Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72(5):676-680.

- Krump JL, Barnett BG. The immediate implant: a treatment alternative. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991 Spring 1991;6(1):19-23.
- Lam R. Contour changes of the alveolar process following extraction. *J Prosthet Dent* 1960;10(1):25-32.
- Lazzara RJ. Immediate implant placement into extraction sites: Surgical and restorative advantages. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(5):332-343.
- Lekovic V, Camargo PM, Klokkevold PR, Weinlaender M, Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol* 1998;69(9):1044-1049.
- Lekovic V, Kenney EB, Weinlaender M, Han T, Klokkevold P, Nedic M, et al. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. *J Periodontol* 1997;68(6):563-570.
- Lespessailles E, Chappard C, Bonnet N, Benhamou CL. Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture. *Joint Bone Spine* 2006;73(3):254-261.
- Lindhe J, Araújo MG, Bufler M, Liljenberg B. Biphasic alloplastic graft used to preserve the dimension of the edentulous ridge: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2013;24(10):1158-1163.
- Lindhe J, Cecchinato D, Donati M, Tomasi C, Liljenberg B. Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res* 2014;25(7):786-790.
- Lopes BM, Theodoro LH, Melo RF, Thompson GM, Marcantonio RA. Clinical and microbiologic follow-up evaluations after non-surgical periodontal treatment with erbium:YAG laser and scaling and root planning. *J Periodontol* 2010;81(5):682-91.
- López-Martínez F, Moreno GG, Olivares-Ponce P, Jaramillo DE, de Val JES, Calvo-Guirado JL. Implants failures related to endodontic treatment. An observational retrospective study. *Clin Oral Implants Res* 2015; 26(9):992-995.
- Lu Y, Jiao R, Chen X, Zhong J, Ji J, Shen P. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa cell. *J Cell Biochem* 2008;105(6):1451-1460.
- Lundgren D, Nyman S. Bone regeneration in 2 stages for retention of implants. *Clin Oral Implants Res* 1991;2(4):203-207.
- MacBeth N, Trullenque-Eriksson A, Donos N, Mardas N. Hard and soft tissue changes following alveolar ridge preservation: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2016 Jul 26. doi: 10.1111/clr.12911. [Epub ahead of print] Review.
- Maia LP, Reino DM, Novaes Junior AB, Muglia VA, Taba Junior M, Grisi MF, Souza SL, Palioto DB. Influence of periodontal biotype on buccal bone remodeling after tooth extraction using the flapless approach with a xenograft: a histomorphometric and fluorescence study in small dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015;17(1):e221-235.

Maiorana C, Sommariva L, Brivio P, Sigurtà D, Santoro F. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma: preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23(3):227-235.

Manor Y, Alkasem A, Mardinger O, Chaushu G, Greenstein RB. Levels of bacterial contamination in fresh extraction sites after a saline rinse. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015;30(6):1362-1368.

Marcaccini AM, Novaes AB Jr, Souza SL, Taba M Jr, Grisi MF. Immediate placement of implants into periodontally infected sites in dogs. Part 2: A fluorescence microscopy study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18(6):812-819.

Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(7):688-698.

Mardas N, Trullenque-Eriksson A, MacBeth N, Petrie A, Donos N. Does ridge preservation following tooth extraction improve implant treatment outcomes: a systematic review: Group 4: Therapeutic concepts & methods. *Clin Oral Implants Res* 2015;26(11):180-201.

Mardinger O, Chaushu G, Ghelfan O, Nissan J. Intrasocket reactive soft tissue for primary closure after augmentation of extraction sites with severe bone loss before implant placement. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(6):1294-1299.

Mardinger O, Vered M, Chaushu G, Nissan J. Histomorphometrical analysis following augmentation of infected extraction sites exhibiting severe bone loss and primarily closed by intrasocket reactive soft tissue. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012;14(3):359-365.

Milani S, Dal Pozzo L, Rasperini G, Sforza C, Dellavia C. Deproteinized bovine bone remodeling pattern in alveolar socket: a clinical immunohistological evaluation. *Clin Oral Implants Res* 2016;27(3):295-302.

Missika P. Immediate placement of an implant after extraction. *Int J Dent Symp* 1994;2(1):42-45.

Meltzer AM. Immediate implant placement and restoration in infected sites. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012;32(5):e169-73.

Moreira AL, Novaes AB Jr, Grisi MF, Taba M Jr, Souza SL, Palioto DB, de Oliveira PG, Casati MZ, Casarin RC, Messori MR. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* 2015;86(3):376-386.

Mosca A, Miragliotta L, Iodice MA, Abbinante A, Miragliotta G. Antimicrobial profiles of *Prevotella* spp. and *Fusobacterium nucleatum* isolated from periodontal infections in a selected area of southern Italy. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30(6):521-524.

Müller R, Hildebrand T, Häuselmann HJ, Rügsegger P. In vivo reproducibility of three-dimensional structural properties of noninvasive bone biopsies using 3D-pQCT. *J Bone Miner Res* 1996;11(11):1745-50.

Negri B, Calvo-Guirado JL, Pardo-Zamora G, Ramírez-Fernández MP, Delgado-Ruíz RA, Muñoz-Guzón F. Peri-implant bone reactions to immediate implants placed at different levels in relation to crestal bone. Part I: a pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(2):228-235.

Nevins M, Camelo M, De Paoli S, Friedland B, Schenk RK, Parma-Benfenati S, Simion M, Tinti C, Wagenberg B. A study of the fate of the buccal wall of extraction sockets of teeth with prominent roots. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006;26(1):19-29.

Nogueira LP, Braz D, Barroso RC, Oliveira LF, Pinheiro CJ, Dreossi D, Tromba G. 3D histomorphometric quantification of trabecular bones by computed microtomography using synchrotronradiation. *Micron* 2010;41(8):990-996.

Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(6):775-783.

Novaes Jr AB, de Barros RRM, Papaexiou V, de Almeida ALG. Buccal bone loss after immediate implantation can be reduced by the flapless approach. *J of Osseointegration* 2011;3(3):45-55.

Novaes AB Jr, Marcaccini AM, Souza SL, Taba M, Grisi MF. Immediate placement of implants into periodontally infected sites in dogs: A histomorphometric study of bone-implant contact. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003(3);18:391-398.

Novaes AB Jr, Novaes AB. Immediate implants placed into infected sites: A clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10:609-613.

Novaes AB Jr, Souza SL, de Oliveira PT, Souza AM. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(3):377-83.

Novaes AB Jr, Vidigal GM Jr, Novaes AB, Grisi MF, Polloni S, Rosa A. Immediate implants placed into infected sites: A histomorphometric study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(3):422-427.

Paolantonio M, Dolci M, Scarano A, d'Archivio D, di Placido G, Tumini V, Piattelli A. Immediate implantation in fresh extraction sockets. A controlled clinical and histological study in man. *Journal of Periodontology* 2001;72(11): 1560-1571.

Papalexiou V, Novaes AB Jr, Grisi MF, Souza SS, Taba M Jr, Kajiwarra JK. Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(1):44-53.

Papalexiou V, Novaes AB Jr, Ribeiro RF, Muglia V, Oliveira RR. Influence of the interimplant distance on crestal bone resorption and bone density: a histomorphometric study in dogs. *J Periodontol* 2006;77(4):614-621.

Parr GR, Steflik DE, Sisk AL. Histomorphometric and histologic observations of bone healing around immediate implants in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8(5):534-540.

Pelegrine AA, da Costa CE, Correa ME, Marques JF Jr. Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(5):535-542.

Piattelli, A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic longterm report of 20 cases in humans. *The International J Oral Maxillofac Implants* 1999;14(6): 835-840.

Pietrovski J, Massler M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *J Prosthet Dent* 1967;17(1):21-27.

Pinholt EM, Bang G, Haanaes HR. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scand J Dent Res* 1991;99(2):154-161.

Polizzi G, Grunder U, Goene R, Hatano N, Henry P, Jackson WJ, Kawamura K, Renouard F, Rosenberg R, Triplett G, Werbitt M, Lithner B. Immediate and delayed implant placement into extraction sockets: a 5-year report. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000;2(2):93-99.

Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, França CM, Cai S, Mayer MP, Ribeiro AC, Ribeiro MS. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed Laser Surg* 2011;29(12):835-844.

Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2008;43(2):162-167.

Quirynen M, Gijbels F, Jacobs R. An infected jawbone site compromising successful osseointegration. *Periodontol 2000* 2003;33:129-144.

Ramos UD, Ayub LG, Reino DM, Grisi MF, Taba M Jr, Souza SL, Palioto DB, Novaes AB Jr. Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics. *J Clin Periodontol* 2016a;43(2):147-55.

Ramos UD, Suaid FA, Wikesjö UME, Susin C, Taba Jr M, Novaes Jr AB. Comparison between two antimicrobial protocols with or without guided bone regeneration in the treatment of peri-implantitis. A histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Impl Res* 00, 2016b, 1-8 doi: 10.1111/clr.12998.

Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol* 2014;85(1):160-169.

Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Prevalence of β -lactamase-producing bacteria in human periodontitis. *J Periodontal Res* 2013;48(4):493-499.

Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B* 2009;96(1):1-8.

Rosenquist B, Grenthe B. Immediate placement of implants into extraction sockets: implant survival. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11(2):205-209.

Schliephake H, Kracht D. Vertical ridge augmentation using polylactic membranes in conjunction with immediate implants in periodontally compromised extraction sites: An experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:325-334.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int Periodontics Restorative Dent* 2003;23(4): 313-323.

Schulte W, Heimke G. The Tübinger immediate implant. *Quintessenz* 1976;27(6):17-23.

Schwartz-Arad D, Chaushu G. Placement of implants into fresh extraction sites: 4 to 7 years retrospective evaluation of 95 immediate implants. *J Periodontol* 1997b;68(11):1110-6.

Schwartz-Arad D, Chaushu G. The ways and wherefores of immediate placement of implants into fresh extraction sites: A literature review. *J Periodontol* 1997a;68(10):915-923.

Serino G, Biancu S, Iezzi G, Piattelli, A. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(5):651-658.

Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH Jr, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(3):273-281.

Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RFM, GarciaVG, Marcantonio Jr E. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Science* 2003;45(1): 17-23.

Skoglund A, Hising P, Young C. A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12(2):194-199.

Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, Misch C, Rosenlicht JL, Tatum OH Jr, Wagner JR. Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* 1992;36(1):151-86.

Suaid F, Grisi MF, Souza SL, Palioto DB, Taba M Jr, Novaes AB Jr. Buccal bone remodeling after tooth extraction using the flapless approach with and without synthetic bone grafting. A histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2013;24(4):407-413.

Suaid FA, Novaes AB Jr, Queiroz AC, Muglia VA, Almeida AL, Grisi MF. Buccal bone plate remodeling after immediate implants with or without synthetic bone grafting and flapless surgery: a histomorphometric and fluorescence study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2014;25(2):e10-21.

Tal H. Autogenous masticatory mucosal grafts in extraction socket seal procedures: a comparison between sockets grafted with demineralized freeze-dried bone and deproteinized bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(4):289-296.

Tehemar S, Hanes P, Sharawy M. Enhancement of osseointegration of implants placed into extraction sockets of healthy and periodontally diseased teeth by using graft material, an ePTFE membrane, or a combination. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5(3):193-211.

Ten Heggeler JM, Slot DE, Van der Weijden GA. Effect of socket preservation therapies following tooth extraction in non-molar regions in humans: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2011;22(8):779-788.

Theodoro LH, Pires JR, Fernandes LA, Gualberto Júnior EC, Longo M, de Almeida JM. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. *Lasers Med Sci* 2015;30(2):677-683.

Tischler M, Misch CE. Extraction site bone grafting in general dentistry. Review of applications and principles. *Dent Today* 2004;23(5):108-113.

Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piattelli A. Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *J Periodontol* 2008;79(7): 955-961.

Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piattelli A. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *J Periodontol* 2007;78(5):955-961.

Trisi P, Lazzara R, Rao W, Rebaudi A. Bone-implant contact and bone quality: evaluation of expected and actual bone contact on machined and osseotite implant surfaces. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22(6):535-545.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001;29(2):165-173.

Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): a clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17(3):232-241.

- Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M, Schenk R. Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20(3):245-253.
- Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2009;36(12):1048-1058.
- van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005;32(8):893-898.
- Von Toppeiner H. Über die Wirkung der photodynamischen (fluore-scierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Dtsch Arch Klin Med* 1904;80:427-487.
- Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42(1):13-28.
- Watzek G, Haider R, Mensdorf-Pouilly N, Haas R. Immediate and delayed implantation for complete restoration of the jaw following extraction of all residual teeth: A retrospective study comparing different types of serial immediate implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10(5):561-567.
- Wagenberg B, Froum SJ. A retrospective study of 1925 consecutively placed immediate implants from 1988 to 2004. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21(1):71-80.
- Werbitt MJ, Goldberg, PV. The immediate implant: bone preservation and bone regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1992;12(3):206-217.
- Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 1995;6(3):155-163.
- Wilson TG Jr, Schenk R, Buser D, Cochran D. Implants placed in immediate extraction sites: a report of histologic and histometric analyses of human biopsies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(3):333-341.
- Wood RA, Mealey BL. Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freeze-dried bone allograft. *J Periodontol* 2012;83(3):329-336.
- Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16(1):23-33.
- Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12(6):844-852.
- Zitzmann NU, Schärer P, Marinello CP. Factors influencing the success of GBR. Smoking, timing of implant placement, implant location, bone quality and provisional restoration. *J Clin Periodontol* 1999;26(10):673-682.

Anexos

ANEXO – ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE

Title: Effect of aPDT on the decontamination of infected alveoli on post extraction socket healing with or without xenogeneic graft. A histomorphometric and computed micro tomography study in dogs.

RUNNING TITLE: Immediate infected post extraction socket preservation

AUTHORS: Carolina de Moraes Rego MANDETTA¹, Umberto Demoner RAMOS¹, Mário TABA JR², Michel Messoria REIS², Daniela Bazan PALIOTO², Arthur Belém NOVAES Jr³.

1. Doctoral student of the Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
2. Associate Professor of the Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
3. Chairman of the Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Key-words: post extraction alveoli; infected sockets, xenograft, antimicrobial photodynamic therapy, bone regeneration.

Corresponding author:

Arthur B. Novaes Jr.

Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Traumatology and Periodontology,
Ribeirão Preto Dental School, University of São Paulo

Avenida do Café, S/N, 14040-904. Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Tel: +55-16-3315-3979. Fax: +55-16-3315-4788. E-mail: novaesjr@forp.usp.br

ABSTRACT

Objectives: The aim of the present study was to evaluate the aPDT decontamination effect and regenerative healing potential on infected post-extraction sockets associated or not to immediate deproteinized mineral bone graft, comparing microcomputed tomographic (micro-CT) and histomorphometric data.

Material and Methods: In the first surgical phase, the mandibular premolars of 8 mongrel dogs were submitted to ligature-induced periodontal disease. After 3 months, the mandibular premolars were extracted and the sockets were immediately randomly assigned to the test group (aPDT decontamination) grafted with Bio-OSS (TG-BO), Bio-Oss Collagen (TG-BOC) or blood clot (TG-BC) and control group (debridement associated to saline solution irrigation decontamination) grafted with Bio-OSS (CG-BO), Bio-Oss Collagen (CG-BOC) or blood clot (CG-BC). Following a healing period of 12 weeks, buccal bone crest, buco-lingual dimension and tissue composition were evaluated by microtomographic and histomorphometric analyzes.

Results: Histomorphometric and microtomographic two- and three-dimensional analyses showed a tendency of better numerical results in the groups submitted to aPDT post extraction decontamination.

Conclusion: Antimicrobial Photodynamic Therapy is a potential decontamination agent of infected post extraction sockets prior to the use of graft materials or not. However, studies with a greater number of samples, and with a minimum of factors that may overlap the effect of this therapy, such as the use of a non-flap approach, should be conducted to better elucidate this question.

INTRODUCTION

The healing of an extraction socket involves a sequence of cellular and tissue changes that takes place immediately after tooth extraction. It leads to a marked qualitative and quantitative change as consequence of the natural modeling and remodeling process, resulting in a bone volume reduction of up to 50% after 1 year, specially at buccal plate (Pietrokovski & Massler 1967; Cardaparoli et al. 2003; Araújo et al. 2005). This process results in a narrower and shorter alveolar ridge, leading to the displacement of the bony crest to a more lingual /palatal position (Petrovski & Massler, 1967), that consequently interferes in the placement of implants in a suitable three-dimensional position without the occurrence of dehiscences and / or fenestrations (Iasella et al. 2003).

In order to preserve or minimize the alveolar changes following tooth loss, different approaches have been proposed including guided bone regeneration (Iasella et al. 2003; Barone et al. 2008; Horváth et al. 2010; Mardas et al. 2010), immediate implant placement (Lazzara 1989; Kinaia et al. 2014), and socket preservation (Tal et al. 1999) and bone substitutes (Araújo et al. 2008; Araújo et al. 2009; Suaid et al. 2013; Maia et al. 2015).

The placement of bone substitutes in post extraction sockets has the objective of stabilize blood clot, maintaining space, act as a scaffold for cell migration, and provide source of minerals and collagen for bone formation (Araújo et al. 2008; Araújo et al. 2009). Several biomaterials including homogenous bone (Wood & Mealey 2012), bovine bone mineral (Lindhe et al. 2014), and synthetic materials (Serino et al. 2003; Mardas et al. 2010) have been proposed as fillers. However, bovine bone mineral (BBM) is the most frequently reported in the literature and has presented satisfactory outcomes in alveolar preservation procedures (Tal 1999; Artzi et al. 2000; Carmagnola et al. 2003; Norton et al. 2003; Nevins et al. 2006; Araújo & Lindhe 2009; Maia et al. 2015). BBM consists of a deproteinized bovine hidroxiapatite, chemically and physically similar to human bone, with natural and non-antigenic porosity. The same BBM combined with porcine collagen fibers has also been evaluated in several studies, especially in alveolar ridge preservation procedures (Araújo & Lindhe 2008; Araújo et al. 2009; Fickl et al. 2008a; Fickl et al. 2009; Maia et al. 2015) with promising results.

Over the past 20 years, preclinical studies evaluated disease free extraction sockets, providing a promising healing condition. However, tooth loss is frequently associated with periodontal (69.20%) (López-Martínez et al. 2015), resulting in infected implant sites with a risk of postoperative infection and erratic healing (Werbitt & Goldberg 1992; Darby et al. 2008) (Rosenquist & Grenthe 1996; Quirynen et al. 2003). Therefore, in order to avoid this, the use of biologics for regeneration 6 to 8 weeks after tooth extraction has been proposed (Darby et al. 2008). However, this option may incur in additional bone loss since the critical dimensional changes involves the first 8 weeks after tooth loss (Araújo et al., 2005).

The use of immediate implants in previous infected alveoli has been proved to be successful with the adjunctive use of a systemic antibiotic protocol (Novaes Jr et al. 1998; Novaes Jr et al. 2004; Marcaccini et al. 2003). However, there is an increasing tendency of avoid the use of systemic antibiotics due to development of antimicrobial resistance (Levy and Marshall, 2004).

New alternatives that offer an effective possibility of oral pathogens removal, with a minimal damage to the host systemic health are being studied. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has potential to eliminate several microorganisms, including species of the oral cavity (Alvarenga et al. 2015; Theodoro et al. 2015). Furthermore, aPDT can suppress periodontal pathogens in a short period of time, and is not associated to bacterial resistance and bacterial selectivity (Hamblin & Hasan 2004). The principle of aPDT is the eradication of cells by photosensitizer, represented by an optical absorption agent by a light source (Von Tappeiner & Jodlbauer, 1904). Thus, it has been suggested as a new promising approach for both periodontal (Kömerik 2003; de Almeida et al. 2007; de Oliveira et al. 2007; de Almeida et al. 2008; Betsy et al. 2014; Moreira et al. 2015; Ramos et al., 2016).

Based on these informations and on the lack of studies, in the relevant literature, that evaluates the effects of aPDT as a decontamination treatment modality prior to post extraction socket preservation in areas suffering from chronic periodontitis. The aim of the present microtomographic and histomorphometric study was to evaluate if aPDT was able to decontaminate and change the regenerative potential of post extraction sockets with or without xenografts.

MATERIAL AND METHODS

Study design

The study protocol was reviewed and approved by the Animal Experimental Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (protocol number 2013.1.992.58.0). Eight dogs, with normal mandibles, no generalized occlusal trauma, no viral or fungal mouth lesions, good overall health, and no systemic compromises attested by veterinary examination. The dogs were immunized with vaccines, received antiparasitic treatment, and were submitted to dental prophylaxis using ultrasonic points (Cavitron 3000, Dentisply York, PA, USA) for removal of dental calculus and biofilm. This report was prepared in harmony with the ARRIVE guidelines for reporting animal research (Kilkenny *et al.* 2010).

Animals

Eight male purpose-bred Beagle dogs, 18-24 months old, approximate weight 15 kg, obtained from a licensed vendor (Instituto Royal, São Roque, São Paulo, Brazil) were used. The animals were individually housed in 1.6 x 5.0 m runs and had *ad libitum* access to water and standard laboratory dog-food-diet (Royal Canin, Descalvado-SP, Brazil) throughout the study.

Surgical procedures

A single experienced surgeon (UDR) performed all the surgical procedures. The animals were preanesthetized with acepromazine (0,2%; 0.1 mg/Kg) and 10% zolazepam (0.10 mL/kg – Vibrac, São Paulo, São Paulo, Brazil). Following, the anesthesia was maintained using volatile anesthetics, so the animals were submitted to tracheal intubation with a Magill probe for adaptation of the anesthetic device and for administration of oxygen-diluted volatile isoflurane (2% v/v; Isothane®, Baxter Hospitalar, São Paulo, São Paulo, Brazil). Additionally, local anesthesia (mepivacaine 2% norepinephrine 1:100,000) was used at the operated regions. For the postoperative care, tramadol chlorydrate (50 mg/ml; Tramal®, União Química Farmacêutica Nacional, Pouso alegre, Minas Gerias, Brazil) was used at a dose of 3 mg/kg every 12 h for 3 days as analgesic therapy, and meloxicam (2mg/20kg; Meloxicam®, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, São Paulo, Brazil) was used for 5 days as anti-inflammatory therapy. The experiment was separated in two phases:

First Surgical Phase: Periodontal disease induction

Local anesthesia was used at the bicuspid (pre-molars - P1, P2, P3, and P4) regions. Surgery was carried out by quadrants in each animal and periodontitis was induced according to the technique described by Schliephake & Kracht. Briefly, a mucoperiosteal flap was raised in the region of the four mandibular bicuspids (premolars) and a shallow notch of approximately 1 mm in depth was placed on the mesial and distal surfaces of each tooth with a ½ bur to act as a retentive groove for the ligature. Double ligatures of 3.0 silk sutures were positioned around the premolars bilaterally of each dog and then the flaps were repositioned and sutured with absorbable 4.0 sutures. The dogs were fed with a plaque-promoting diet of water-moistened dog chow (Shibutani et al., 1997). The ligatures were checked weekly and any lost ligatures were replaced immediately. The experimental periodontitis was induced for 8 weeks and confirmed by clinical and radiographic examination. At the end of 8 weeks when approximately 25–30% of the initial bone support was lost, the ligatures were removed. For the next 2 weeks, natural bacterial plaque was allowed to accumulate and the periodontal disease was established. During this period, the progression of the disease was observed by clinical and radiographic examination. No dental cleaning was performed in this phase.

Second Surgical Phase: Tooth extraction, Implant placement and Socket Preservation

After 2 months of periodontal disease induction, periodontal infection was confirmed by the presence of deep periodontal pockets, bleeding on probing, exudation after soft tissue compression, and radiographic evidence of bone loss and furcation involvement. The animals were then anesthetized and mucoperiosteal flaps were raised on both mandible sides in the region of the first to fourth mandibular premolars. The teeth were sectioned in a buccolingual direction at the furcation, so that the roots could be individually removed without damaging the bone walls. After extraction, randomly, one hemi-mandible was treated only with alveoli debridement with thoroughly curettage and rinsing of the alveoli with sterile saline to remove all soft tissue tags and slightly decorticalization to stimulate resorption of the cortical lining, so as to expose the marrow cavities (Novaes Jr & Novaes, 1995). The other side of the jaw received additional treatment with aPDT.

The distal sockets of the second (P2), third (P3) and fourth (P4) premolars were selected for the experiment, totaling three sockets in each side of the mandible. This procedure was also part of another study, and the remaining sockets were used for immediate implantation evaluation. The post extraction sockets were used to study the dynamics of the healing process in disinfected sites, with or without the use of deproteinized bovine bone. Randomly, one socket in each mandible was grafted with Bio-Oss® (deproteinized bovine bone, Geistlich Pharma AG., Wolhusen, Switzerland), the other socket was grafted with BioOss® Collagen (comprised of Bio-Oss® spongoisa granules with the addition of 10% highly purified porcine Collagen; Geistlich Pharma AG., Wolhusen, Switzerland) and finally the last socket healed solely with the aid of a blood clot. On the opposing side of the mandible, the sites were reversed according to the type of treatment respecting the random cross-location method (Papalexious et al., 2006). Following, the wounds were sutured with 4.0-bioabsorbable sutures (4-0 Vycril Ethicon, São José dos Campos, Brazil) on both sides of the mandible. Crisscross sutures were used to close the margins and support coagulum and graft material placed in the socket.

Antimicrobial photodynamic therapy

A dye/laser system was applied before biomaterial graft and implant placement, for the group that received aPDT. The system consists of a hand-held battery-operated diode laser (HELBO®; TheraLite Laser, Bredent Medical, Senden, Germany). The photosensitizer was applied in the socket placing the applicator at the bottom of the alveoli and continuously deposited in a coronal direction until the soft tissue for 5 min followed by copious irrigation with distilled water to remove the excess. Then a softlaser with 660 nm of wavelength and a power of 100mW/cm² and fluency of 212.23 J/cm² was applied with the aid of 8.5-cm-long flexible fiber optic tip curved at an angle of 60° with a spot size 0.06 cm in diameter (HELBO

3D Pocket Probe®; Bredent Medical, Senden, Germany). Light was applied in the entire length and circumference of the alveoli totaling 1 min of treatment (6 points around alveoli, 10 seconds each) an additional 1 min of light was applied both the buccal and the lingual inner surfaces of the soft tissues.

For the postoperative care, tramadol chlorydrate (50 mg/ml; Tramal®, União Química Farmacêutica Nacional, Pouso alegre, Minas Gerias, Brazil) was used at a dose of 3 mg/kg every 12 h for 3 days as analgesic therapy, and meloxicam (2mg/20kg; Meloxicam®, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, São Paulo, Brazil) was used for 5 days as anti-inflammatory therapy. The animals were maintained on a soft ration diet for 15 days, and a healing control was performed three times per week with toothbrush and dental floss and with a topical application of 0.12% chlorexidine to limit microbial film adherence. Healing was evaluated periodically, and the remaining teeth were cleaned monthly with ultrasonic points. Seven days later, sutures were removed, prosthetic connections were adapted, and temporary metallic prostheses were installed at the same time, thus characterizing the presence of early load.

Euthanasia

Twelve weeks after the second surgical procedure, the animals were sacrificed by induction of deep anesthesia with a subsequent intravenous sodium thiopental and potassium chloride overdose. The hemi-mandibles were removed, dissected and fixed in 4% phosphate-buffered formalin (pH7) until processing.

Computed microtomographic analysis

After the fixation of the specimens, a commercially available desktop, Micro-Sky Scanner (SkyScan 1172 micro-CT, SkyScan N. V., Kontich, Belgium), was used to perform the micro-computerized tomography (Micro-CT) analysis. All scans were acquired with an aluminum-copper filter to optimize the contrast, at identical settings (100 kV, 100 µA, using a 360° rotation). The reconstruction software (NRecon v.1.4.4, SkyScan N. V.) was used to perform the micro-tomographic reconstruction and then create the images.

To perform the linear two-dimensional (2D) measurements the Data Viewer software was used. Therefore, the images were positioned in their long axis, and then the alveolar ridge bucco-lingual dimension (BLD) and the buccal bone crest level (BBC - distance between the buccal and lingual crests) were determined. To the three-dimensional (3D) analysis the CTan software (CTan., v. 1.8.1.2, SkyScan N.V.) was used. After image reconstruction, the region of interest (ROI) was selected as a rectangle positioned in the middle portion of the socket from the highest coronal formed bone, measuring 3mm in width

and 7 mm in depth for P3 and P4 sockets and 3mm in width and 5mm in depth for P2 sockets. To determine the volume of interest (VOI), representing the selected 3D volume, the collective sum of all ROIs over a contiguous set of crosssectional was performed. To perform the quantitative characterization (bone volume fraction of the region of interest, percentage of the total bone volume of the region of interest, bone surface density), the cross-section images were binarized using the grey scale and determining the threshold value defined by a density of 40-90 for bone and 90-255 for biomaterial.

Histomorfometric analysis

The specimens were dehydrated in increasing concentrations of alcohol up to 100%, infiltrated, and embedded in LR White resin (London Resin Company, Berkshire, UK) and hard-sectioned using the technique described by Donath & Breuner (1982). From each experimental site, one bucco-lingual section, representing the central area of the site, was acquired. And analyzed on a Leica DM LB2 microscope outfitted with a Leica DF310FX digital camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A single blinded examiner (CMRM), with no knowledge of the experimental groups, analyzed the images through the LAS v 4.1 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

The buccal bone crest level (BBC) was determined as a linear vertical measurement in two different positions: 1- BBC-BN: as an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of new bone formed in the buccal bone crest, and 2 – BBC-OB: as an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of “old bone” in the buccal crest.

The alveolar ridge bucco-lingual dimension (BLD) was determined as a linear horizontal measurement, between the buccal and lingual bone crest external walls, as an imaginary line 1mm below the most coronal point of bone in the socket.

The bone area was determined within a rectangle that comprised the region of the socket, with 3mm in width and 7 mm in depth for P3 and P4 sockets and 3mm in width and 5mm in depth for P2 sockets, from the most coronal point of the socket. The bone area measurement evaluated the percentages of mineralized bone in relation to bone marrow spaces. The medullar area (MA), total bone area (TBA) and residual biomaterial particles (RBP) were evaluated.

Statistical analysis

Quantitative data are presented as mean and standard deviation (median). The dog was considered as the experimental unit ($n = 7$). The mean differences within the groups and for the RGP parameter were analyzed through the Friedman Test. Wilcoxon matched pairs test was also used with Bonferroni post-test correction to detect where significant statistical

differences had occurred. The mean differences between the groups and for RGP parameter were analyzed through the Wilcoxon matched pairs.

RESULTS

Clinical findings

Of the 8 dogs selected for the present study, only 7 completed it. One animal presented problems with the fixed anesthesia, after the execution of the second surgical phase, and died. In the first surgical phase, periodontal disease was successfully induced, with the presence of bleeding on probing, exudation after tissue compression, deep periodontal pocket and radiographic evidence of bone loss. In the second surgical phase the healing following periodontal disease tooth extraction and post extraction socket preservation or not was uneventful, and there were not complication during entire experimental period.

Histologic observations

In general, all the control and test groups showed the presence of the dense hard tissue walls surrounding a central area that was occupied by medullar area (MA), newly formed bone (NFB) and residual graft particles (RGP) in the sockets that was submitted to alveolar preservation procedure with xenografts. The presence of parent lamellar bone (PLB) representing the old bone (OB) and newly formed bone area (NFB) characterized as parallel-fibered bone (PFB) with areas of interlaced fibers (woven bone) was present in all the experimental groups. In some areas an osteoid matrix (OM) was observed, and it was paved with osteoblasts representing the bone formation process.

All the test and control groups exhibited the newly formed bone extending from the apical and lateral walls of the post extraction sockets and migrating to the central area. The interface between this structure (NFB) and the parent lamellar bone is evident. The coronal portion of the sockets was occupied by a bridge of newly formed bone in the nongrafted sites, while in the grafted sites the bridge was composed of newly formed (NFB) and residual graft particles (RGP).

The residual particles of the grafted sites were dispersed mainly in the central portion and were surrounded by newly formed bone with a direct contact between the structures. In fact, in some specimens it was very difficult to evidence the interface between them. There were many evidences of the deproteinized bovine bone particles being replaced by newly formed bone, including osteoclastic activity around the graft material. However, some specimens of the control group filled by Bio-Oss Collagen (GC-BOC) and one specimen filled by Bio-Oss (GC-BO) did not showed the coronal portion occupied by a bridge of newly

formed bone associated to residual graft particles. In this case, the particles were frequently surrounded by connective tissue.

The percentage of residual graft particles observed in both test ($24,74 \pm 6,04\%$) and control ($13,80 \pm 3,31\%$) Bio-Oss grafted sites was numerically superior than in both test ($15,94 \pm 7,84$) and control ($8,05 \pm 5,97\%$) Bio-Oss Collagen grafted sites. However, only TG-BO showed statistically superior amounts of RGP than CG-BO ($p = 0,03$) (Table 2).

Histomorphometric results

The evaluation of each experimental group was performed in order to explore the maintenance capacity of the vestibular bone crest and the bone formation in the post extraction sockets according to the buccal crest level (BCL) related to the new bone (BCL-NB) and to the old bone (BCL-OB), bucco-lingual dimension (BLD), medullar area (MA), and total bone area (TBA).

In general, it was observed that all experimental and control groups presented similar results in relation to linear measurement, with no statically significant relevance in any of the parameters evaluated (Table 1). BCL-NB in the control groups was numerically better when compared with the test groups, but with no statistical significance. No relevant differences between the grafted and nongrafted sites were observed, however the test and control grafted sites (TG-BO, Tg-BOC, CG-BO and CG-BOC) demonstrated numerically better results as compared to the nongrafted sites (TG-BC and CG-BC).

The BLD was measured 1 mm above the highest point of bone in the socket. In general, the sockets of the test group were able to better maintain the bucco-lingual thickness than the respective control groups. The grafted and nongrafted sockets of the test and control groups exhibited better BLD maintenance in relation to the respective control grafted groups, however there was no statistically significant difference (Table 1).

The total area of the frame (100%) was divided into medullar area, total bone area and residual graft particles. The grafted sockets of the test groups demonstrated significantly less medullar area than the respective control sockets, whereas the nongrafted control and test sites exhibited similar amounts. In the test groups the frame exhibited medullar area of 61,02%, 24,10% and 36,43% in the TG-BC, TG-BO and TG-BOC respectively. A statistically inferior amount of medullar area was observed in the TG-BO in relation to TG-C ($p = 0,05$) and TG-BOC ($p = 0,05$). On the other hand, the control groups demonstrated similar amounts of medullar area, although the grafted sockets showed numerically inferior values. In general the total bone area was similar between all experimental sites (Table 2).

Computed tomographic results

The microtomographic analysis was performed in order to analyze the level of the buccal bone crest (BBC) using the lingual bone crest as a reference and the bucco-lingual dimension (BLD) of the alveoli through two-dimensional linear measurements (2D). To analyze the three-dimensional bone microarchitecture (3D) in the alveoli, three basic morphometric indices were used: bone volume (BV), total volume of interest (TV) and bone surface (BS). From these measurements, the evaluation variables can be described as: bone volume (BV), which relates to the volume of the segmented region as bone, measured in mm^3 ; Fraction of bone volume (BV/TV), which consists of the ratio of bone volume to total volume, expressed in%; (BS/TV), which corresponds to the ratio of the bone surface area to the volume of the region of interest (1/mm).

The evaluation of the two-dimensional parameters (BBC and BLD) showed numerically better values for the sockets of the test groups in relation to those of the control groups. However, only the nongrafted test post extraction sockets (TG-BC) demonstrated a significantly lower distance between the buccal and lingual bone ridges than the respective control ones (CG-BC) (Table 3).

In the analysis of the three-dimensional bone microarchitecture parameters, a numerical tendency of higher bone volume (BV) could be observed in the sockets of the test groups in relation to the control groups, however without statistic significance. When the fraction of bone tissue obtained by the ratio of bone tissue volume to total volume (BV/TV), expressed as %, was evaluated, a significantly higher amount of mineralized tissue was evident in the nongrafted sockets of the test groups (TG-BC) than in the respective sockets of the control groups (CG-BC). The grafted sockets of the test groups (TG-BO and TG-BOC) demonstrated a numerically greater amount of mineralized tissue than the respective specimens of the control groups (CG-BO and CG-BOC), however without statistical significance. In the BS/TV parameter analysis, the sockets of the test groups that received Bio-Oss graft (TG-BO) had a significantly higher surface density than the respective sockets of the control groups (CG-BO) (Table 4).

DISCUSSION

The present study evaluated the aPDT decontamination effect and capacity to change the regenerative potential of infected post-extraction sockets associated or not to xenografts. Therefore, 8 mongrel dogs were selected and submitted to ligature induced periodontal disease phase, followed by a period of disease establishment. After tooth extraction the sockets were decontaminated by mechanic debridement associated to saline solution irrigation (control group) or mechanic debridement and saline solution irrigation associated to

aPDT (test group). Thereafter, the sockets were submitted or not to an alveolar preservation procedure with xenografts. Although the aPDT decontaminated alveoli showed better results in relation to the buccal alveolar ridge height, the difference was only significant between nongrafted test and control sockets on the microtomographic two-dimensional analyses. However, preclinical studies rarely demonstrate significant differences due to sample size ($n = 7$).

The general consensus is that following tooth extraction procedures, post extraction sockets undergoes a physiological healing process, which leads to series of qualitative and quantitative changes resulting, in most cases, in reductions in both height and bucco-lingual width, changing the socket characteristic dimensional profile. In addition, this process results in the replacement of mineralized bone by bone marrow, altering the tissue quality.

Different socket preservation procedures have been suggested in order to limit the functional and volumetric adverse changes suffered by the alveolar process in sockets free of inflammatory lesions. However, frequently tooth loss is associated to chronic infections such as periodontal disease (López-Martínez et al. 2015) that according to series of investigations (Schwartz-Arad & Chaushu 1997; Barzilay 1993; Becker & Becker 1990; Werbitt & Goldberg 1992) contraindicates grafting procedures or immediate implant placement, mainly because of the risk of changes in the healing process (Amler, 1999; Rosenquist & Grenthe 1996; Quirynen et al. 2003) unless meticulous debridement and alveolar irrigation associated to an adequate pre-and post-operative antibiotic protocol are employed (Novaes Jr et al., 1998; Novaes Jr et al. 2003; Tehemer et al. 2003; Papalexidou et al. 2004; Kfir et al. 2007; Casap et al. 2007; Mardinger et al. 2009; 2012; Meltzer et al. 2012; Deng et al. 2015; Manor et al. 2015). However, in view of the growing concern about bacterial resistance and selection, associated to indiscriminate antibiotic usage, alternatives that may offer the effective possibility of periodontopathogenic pathogens removal with minimal damage to the host systemic health are being researched and need to be elucidated.

The present histomorphometric analyses showed that in all specimens the height of the buccal alveolar crest was apically to the respective lingual one. All experimental groups demonstrated new bone formation above the old bone level, thus reducing the distances between the buccal and lingual crests during the healing period. The test groups did not show significant difference in relation to the control groups, however they presented a numerically inferior distance between the buccal and lingual bone plates, especially in relation to new bone formation. This difference, although small and observed in an animal model, which sample size is small, may have clinical implications particularly in regions where esthetics is primordial. In the 2D microtomographic analyses, the same trend to numerically better results between test and control groups were observed, with the

nongrafted test sockets (TG-BC) demonstrating a significantly lower loss of buccal alveolar crest height in relation to the respective control sockets (CG-C).

In a preclinical study, Araújo et al. (2008) evaluated the effect on bone modeling and remodeling following the placement of Bio-Oss® Collagen in disease free extraction sockets in dogs. The authors observed that the distance between the buccal and lingual bone crests level was $2.1 \pm 0.5\text{mm}$ in the nongrafted sockets and $1.9 \pm 0.6\text{mm}$ in the grafted sockets after a healing period of 12 weeks. Although the present study has been conducted in infected sockets and without antibiotic therapy, the results were better than those demonstrated by Araújo et al. (2008) on both test (TG-BC: 1.38 ± 0.45 ; TG-BO: 0.97 ± 0.62 ; TG-BOC: 1.07 ± 0.54) and control groups (CG-BC: 1.79 ± 0.49 , CG-BO: 1.36 ± 1.07 , CG-BOC: 1.46 ± 0.65). Likewise, as in the present study, Araújo et al. (2008) used a flapped approach, but differed regarding the use of pre-and post-operative antibiotic therapy in disease free sockets. Therefore, the differences between the studies can be attributed to the use of pré-operative systemic antibiotics that was used in Araujo's et al. (2008) study and not on the present study. In addition, the animal size, the gingival biotype and then, the initial buccal bone plate width also may have influenced the observed difference.

In contrast, other comparative animal studies recently reported in the literature (Suaid et al. 2013; Maia et al. 2015) showed noticeably better results than those obtained in the present study in relation to the distance between buccal and lingual bone crests. Following a healing period of 3 months, Suaid and co-workers evaluated the buccal bone remodeling of post extraction sockets with or without a synthetic graft and observed a mean buccal plate vertical loss of 0.26 mm in the grafted sites and of 0.80 mm in the nongrafted sites. Maia and colleagues (2015) showed that the buccal bone crest of regions with thin biotype was 0.64mm and 0.40 mm apically to the lingual bone crest in sites treated with Bio-Oss® Collagen and in sites that healed with a blood clot, respectively. First of all, the highlighted difference could be attributed to the fact that in the present study was used fresh sockets of hopeless teeth demonstrating chronic periodontal disease that decontaminated by debridement associated to saline solution irrigation in control groups and by debridement associated and saline solution irrigation associated to aPDT in test groups, without antibiotic therapy, a common factor between the other studies, that used disease free fresh sockets. Furthermore, the present study was conducted with the elevation of a mucoperiosteal flap, different from that advocated by Maia et al. (2015) and Suaid et al. (2013) in which the procedures were with a flapless approach, wich could itself influence the higher reabsorption rates demonstrated in the present study. Fickl et al. (2008 a, b) demonstrated the prejudicial effect that tooth removal with flap elevation exerts on the bone remodeling process in fresh socket that were or not submitted to socket preservation techniques. When a mucoperiosteal flap was raised, the socket preservation effect was canceled, exhibiting an additional socket

contraction of about 0.7 mm particularly in the buccal aspect of the bone crest. Thus, it can be suggested that the greater buccal bone crest reabsorption observed in the present study, could be associated with the flapped approach, which significantly alters the healing pattern (Blanco et al. 2008; Novaes Jr et al. 2012), and that the aPDT was able to decontaminate the previously infected sockets, not interfering in the healing process.

The mean bucco-lingual dimension (BLD) of the alveolar ridge, measured 1 mm above to the highest bone formation inside the socket, was quite similar between the alveoli of the control and test groups, with the socket that were grafted (CG-BO: 4.62 ± 0.99 e CG-BOC: 4.93 ± 0.66) showing a discrete numerical advantage over the socket spontaneously healed (CG-BC: 4.32 ± 0.61). In the test groups, the grafted sockets (TG-BO: 5.78 ± 0.75 e TG-BOC: 5.71 ± 0.81) demonstrated a numerically smaller width loss than the ungrafted sockets (TG-BC: 4.70 ± 1.29). Interestingly, the test groups had better bucco-lingual dimensions suggesting better results associated with aPDT.

It is important to emphasize that although many studies conducted to evaluate the effect of the use of a graft material in post extraction sockets have failed to demonstrate statistically significant differences between grafted and nongrafted sites (Araújo et al. 2008; Bashara et al. 2012; Suaid et al. 2013; Maia et al. 2015), most of them demonstrated an better numerical numbers for the groups that received graft material. This healing pattern could be clearly noted in both control and test groups of the present study, however with the test groups demonstrating better numerical results when compared to the respective control groups, highlighting the aPDT decontamination role. Moreover, recent systematic reviews (Ten Heggeler et al. 2011; Horváth et al. 2013; MacBeth et al. 2015) concluded that socket preservation procedures do not completely avoid changes in bone dimension following tooth extraction. However, they may limit it, leading to a reduction in alveolar contraction, thus favoring adequate implant placement, both functionally and statistically, with minimal (Fiorellini et al. 2005; Kfir et al. 2007; Gholami et al. 2012; Mardas et al. 2015) or none (Barone et al. 2008; Pelegri et al. 2010) additional bone augmentation procedures.

Indeed, it has been suggested by some authors (Marcaccini et al. 2003; Ahn & Shin 2008) that infected post extraction sockets demonstrate a slower and more complex healing procedure than disease free sockets. The present histomorphometric evaluation revealed a similar delay in the healing process of control sockets that healed with a clot (CG-BC), evidenced by the tissue composition, where sockets were filled by mineralized bone tissue (45.69%) and medullar area (54.30%). These results show a delay in the healing process when compared to disease free sockets composed by mineralized bone tissue (37%) and medullar area (63%) described by Cardaparo et al. (2003). On the other hand, the nongrafted test sockets of the present study were filled by mineralized tissue ($38.97 \pm 9.70\%$) and medullar bone ($61.02 \pm 9.70\%$), similarly to those results demonstrated by Cardaparo et al.

al. (2003), thus demonstrating that the healing potential of TG-BC sockets were not compromised by the presence of previous infection due to the decontamination potential of aPDT.

Previous studies have reported a delay in healing process associated to graft materials used in ridge preservation process (Wetzel et al. 1995; Diès et al. 1996; Berglundh & Lindhe 1997; Zitzmann et al. 1997; Cardaparoli et al. 2003; Carmagnola et al. 2003; Araújo et al. 2008; Lindhe et al. 2014). In agreement to this, in the present study the comparison between test group sockets, in relation to tissue composition, indicated that the healing process progressed faster on nongrafted sockets than in the grafted sockets, with the last ones demonstrating a significantly lower volume of medullar area than the nongrafted ones. The volume of medullar area was numerically higher in TG-BO than in TG-BOC and suggests to be related to the only difference existing between the composition of the two types of deproteinized mineral bovine bone graft, used in the present study, which consists of the addition of 10% of porcine collagen, aiming to join the spaces between the particles and after its reabsorption, that according to Araújo et al. (2010) occurs after the first week of healing and favour cell and blood vessels penetration and formation of medullary spaces. According to Araújo et al. (2008) the lower volume of bone marrow in the grafted groups indicates that during the healing process the Bio-Oss® particles occupy an area that otherwise house the bone marrow, thus the use of the biomaterial promotes bone formation and defect resolution and the biomaterial, in fact, delay healing.

In a recent study, Kim et al. (2014) claimed that 72.2% of the nongrafted post extraction sockets associated to erratic healing, which results in alveolar filling by fibrous connective tissue rather than new bone even after meticulous debridement and prolonged healing time of at least 12 weeks, are related mainly to chronic inflammation of periodontal origin. In the present study, this fact could not be observed in both nongrafted control and test groups, emphasizing the efficiency of both decontamination procedures used previously to immediate graft or not in chronic infected sockets. In contrast, in the presence of the xenograft, the erratic healing could be noted in some CG-BOC specimens, evidencing greater aPDT efficiency in alveolar decontamination than in that performed only with alveolar debridement associated to irrigation with saline solution.

In the present study, the presence of residual particles throughout the sockets was observed in all grafted specimens, with the sockets of the test group demonstrating 24.74% and 10.35% of Bio-Oss® and Bio-Oss® Collagen, respectively, and the sockets of the control group showing 13.80% and 8.05% of Bio-Oss® and Bio-Oss Collagen®, respectively. It has been suggested by some authors that deproteinized bovine bone particles, used to fill bone defects, fail to resorb completely and remains as an inert foreign body surrounded by new bone (Traini et al. 2007; Traini et al. 2008). In contrast, other authors reported in both clinical

(Skoglund et al. 1997; Piattelli et al. 1999; Carmagnola et al. 2003, Artzi et al. 2004; Traini et al. 2007, 2008) and pre-clinical (Jensen et al. 1996, 2006; Artzi et al. 2004; Bashara et al. 2012) studies that the Bio-Oss® healing process is quite slow, and over time the remaining particles undergo remodeling and form new bone tissue, since osteoclastic activity could be observed around the particles after months of healing (Pinholt et al. 1991; Klinge et al. 1992). This slow process of reabsorption associated with the osteoconductive characteristic property of the deproteinized bovine bone, is considered advantageous, although it is associated with the delay in healing, as they provide better maintenance of the dimensional characteristics of the post extraction sockets. The greater bucco-lingual dimension of the grafted post extraction sockets, mainly in the aesthetic area, may be considered beneficial because of the better tridimensional placement of the implants and consequently better aesthetic results.

In the histologic analyses of the present study, osteoclasts around biomaterial residual particles were oftentimes recognized, as well as osteoblasts establishing an osteoid matrix, characterizing an active modeling and remodeling process. Moreover, as well as in a series of clinical (REF) and preclinical studies (Skoglund et al. 1997; Cardaparoli et al. 2003), the biomaterial residual particles were well integrated and continuous with the newly formed bone, making it difficult to define the limits between the graft and new bone in almost all specimens, evidencing the osteoconductive property of the deproteinized bovine bone (REF).

With the development of aPDT and scientific evidences of its *in vivo* effectiveness in the reduction of periodontopathogenic microorganisms (Chan & Lai 2003; Eick et al. 2013; Alvarenga et al. 2015; Theodoro et al. 2015), several studies have investigated its *in vivo* effect in the treatment of periodontal (Kömerik et al. 2003; Lopes et al. 2010; de Oliveira et al. 2011; Moreira et al. 2015) and peri-implant disease (Dörtbudak et al. 2001; Shibli et al. 2003; Ramos et al. 2016), demonstrating significant capacity in the reduction of the major pathogens, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*, involved in the development and maintenance of these inflammatory diseases. In the present study, the aPDT was performed with a 660nm red wavelength hand diode laser, within the methylene blue resonance range, thereby allowing compatibility between aPDT and the dye (Prates et al. 2011). A photosensitizer from the family of phenothiazides (methylene blue) was selected, as these seem to be the most indicated for the treatment of infections of periodontal origin, due to its greater penetration power (Kömerik et al. 2002; Qin et al. 2008; de Almeida et al. 2008). Furthermore, the use of a low intensity laser allows differentiation of host tissues from bacteria by administration of photosensitizers, which bind to target microorganisms. In addition, the 5-minute pre-irradiation interval was selected due to it has been shown to be more effective in reducing target periodontopathogenic bacteria (Qin et al.

2008a, b).

Until recently, quantitative histologic techniques, considered as “gold standard”, have been used to evaluate the cortical and trabecular bone structure (Lespessaille et al. 2006; Arlot et al. 2008; Nogueira et al. 2010). However, although these techniques provide unique information about cellularity and dynamic rates of bone remodeling, they present limitations in relation to the bone microarchitecture evaluation, since the structural parameters are limited to two-dimensional analyses (Bouxsein et al 2010). In contrast, tridimensional high-resolution techniques, such as computerized microtomography (Micro-CT), assessed the bone microarchitecture directly. In general, the evaluation of the morphometric indices used in the present study demonstrated similar results in relation to bone volume (BV) and bone volume fraction (BV/TV), between analyzed groups, and these results were compatible with the histologic evaluation. However, the nongrafted sockets of the test group (TG-BC) demonstrated significantly better BV/TV than the respective control group, once again suggesting better decontamination potential associated to the aPDT protocol. A high bone density could indicate more mineralized tissue during the healing of the post extraction socket, which does not necessarily translate to greater strength (Kim et al. 2016). In the present study, numerically higher values could be observed in the grafted post-extraction sockets in relation to nongrafted sockets in both test and control groups, with the exception of the CG-BOC. This fact is probably due to the erratic healing observed in some specimens of CG-BOC, where the residual graft particles were surrounded by connective tissue.

CONCLUSION

Based on these findings, it can be speculated that the Antimicrobial Photodynamic Therapy is a potential decontamination agent of infected post extraction sockets prior to the use of graft materials or not, with numerical advantages however, without statistical significance when compared to the decontamination treatment of debridement associated with irrigation with saline solution. This is probably due to sample size ($n=7$), which is common with dog studies. Further studies with a minimum of factors that may overlap the effect of this therapy, such as the use of a flapless approach, should be conducted to better elucidate this question.

ACKNOWLEDGMENTS:

The authors thank the Coordination for the improvement of Graduated Personnel (CAPES) for the scholarship that supported Mrs. Mandetta, the State of São Paulo Research Foundation for the financial support of the present study (FAPESP process number 13/24.324-0) and bredent medical GmbH & Co.KG for the donation of the aPDT kit.

REFERENCES

- Ahn, J.J. & Shin, H.I. (2008) Bone tissue formation in extraction sockets from sites with advanced periodontal disease: a histomorphometric study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* **23**: 1133-1138.
- Alvarenga, L.H., Prates, R.A., Yoshimura, T.M., Kato, I.T., Suzuki, L.C., Ribeiro, M.S., Ferreira, L.R., Pereira, S.A., Martinez, E.F. & Saba-Chujfi, E. (2015) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **12**:131-135.
- Alwaeli, H.A., Al-Khateeb, S.N., Al-Sadi, A. (2015) Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci* **30**:801-7.
- Amler, M.H. (1999) Disturbed healing of extraction wounds. *J Oral Implantol* **25**: 179-184.
- Ardila, C.M., Granada, M.I. & Guzmán, I.C. (2010) Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontol Res* **45**: 557-63.
- Artzi, Z., Tal, H. & Dayan, D. (2001) Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. *J Periodontol* **72**:152-9.
- Artzi, Z., Weinreb, M., Givol, N., Rohrer, M.D., Nemcovsky, C.E., Prasad, H.S. & Tal, H. (2004) Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* **19**: 357–368.
- Araújo, M.G., Liljenberg, B. & Lindhe, J. (2010) Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **21**: 55-64.
- Araújo, M., Linder, E. & Lindhe, J. (2009) Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res* **20**:1-6.
- Araújo, M., Linder, E., Wennström, J. & Lindhe, J. (2008) The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent* **28**: 123-1235.
- Araújo, M.G. & Lindhe, J. (2011) Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **22**(1): 9-13.
- Barzilay, I. (1993) Immediate implants: Their current status. *Int J Prosthodont* **6**: 169-175.
- Barone, A., Aldini, N.N., Fini, M., Giardino, R., Calvo Guirado, J.L. & Covani, U. (2008) Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. *J Periodontol* **79**: 1370-1377.
- Bartee, B.K. (2001) Extraction site reconstruction for alveolar ridge preservation. Part I: rationale and materials selection. *J Oral Implantol* **27**: 187–193.
- Bashara, H., Wohlfahrt, J.C., Polyzois, I., Lyngstadaas, S.P., Renvert, S. & Claffey, N. (2012) The effect of permanent grafting materials on the preservation of the buccal bone plate after tooth extraction: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **23**: 911-917.

- Becker, W. & Becker, B.E. (1990) Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* **10**: 376-391.
- Berglundh, T. & Lindhe, J. (1997) Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **8**: 117-124.
- Betsy, J., Prasanth, C.S., Baiju, K.V., Prasanthila, J. & Subhash, N. (2014) Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **41**: 573-81.
- Blanco, J., Nuñez, V., Aracil, L., Muñoz, F. & Ramos, I. (2008) Ridge alterations following immediate implant placement in the dog: flap versus flapless surgery. *J Clin Periodontol* **35**: 640-648.
- Borg, T.D. & Mealey, B.L. (2015) Histologic healing following tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus combined mineralized-demineralized freeze-dried bone allograft: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* **86**:348-55.
- Camargo, P.M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Klokkevold, P.R., Kenney, E.B., Dimitrijevic, B., Nedic, M., Jancovic, S. & Orsini, M. (2000) Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **90**:581-6.
- Camelo, M., Nevins, M.L., Lynch, S.E., Schenk, R.K., Simion, M. & Nevins, M. (2001) Periodontal regeneration with an autogenous bone-Bio-Oss composite graft and a Bio-Gide membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent* **21**: 109-19.
- Cardaparoli, G., Araújo, M. & Lindhe, J. (2003) Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* **30**: 809-818.
- Carlsson, G.E. & Ericson, S. (1967) Changes in the soft tissue profile of the face following tooth extraction and denture treatment. A longitudinal x-ray cephalometric study. *Odontol Tidskr* **75**:69-98.
- Carmagnola, D., Adriaens, P. & Berglundh, T. (2003) Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res* **14**: 137-143.
- Casap, N., Zeltser, C., Wexler, A., Tarazi, E. & Zeltser, R. (2007) Immediate placement of dental implants into debrided infected dentoalveolar sockets. *J Oral Maxillofac Surg* **65**: 384-392.
- Chan, Y. & Lai, C.H. (2003) Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **18**: 51-55.
- Clozza, E., Pea, M., Cavalli, F., Moimas, L, Di Lenarda, R. & Biasotto, M. (2014) Healing of fresh extraction sockets filled with bioactive glass particles: histological findings in humans. *Clin Implant Dent Relat Res* **16**:145-53.
- Darby, I, Chen, S. & De Poi, R. (2008) Ridge preservation: what is it and when should it be considered. *Aust Dent J* **53**: 11- 21.
- de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Oshiiwa, M. & Garcia, V.G. (2007) Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* **78**:566-75.

de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Bonfante, S. & Garcia, V.G. (2008) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol* **79**: 2156-2165.

Denissen, H.W., Kalk, W., Veldhuis, H.A. & van Waas, M.A. (1993) Anatomic consideration for preventive implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants* **8**:191-196.

Deng, F., Zhang, H., Zhang, H., Shao, H., He, Q. & Zhang, P. (2010) A comparison of clinical outcomes for implants placed in fresh extraction sockets versus healed sites in periodontally compromised patients: a 1-year follow-up report. *Int J Oral Maxillofac Implants* **25**: 1036-1040.

de Oliveira, R.R., Novaes, A.B. Jr, Garlet, G.P., de Souza, R.F., Taba, M. Jr, Sato, S., de Souza, S.L., Palioto, D.B., Grisi, M.F. & Feres, M. (2011) The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Lasers Med Sci*, **26**: 359-367.

Diès, F., Etienne, D., Bou Abboud, N. & Ouhayoun, J. (1996) Bone regeneration in extraction sites after immediate placement of an e-PTFE membrane with or without a biomaterial. A report on 12 consecutive cases. *Clin Oral Implants Res* **7**: 277-285.

Dörtbudak, O., Haas, R., Bernhart, T. & Mailath-Pokorny, G. (2001) Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* **12**: 104-108.

Eick, S., Markauskaite, G., Nietzsche, S., Laugisch, O., Salvi, G.E. & Sculean, A. (2013) Effect of photoactivated disinfection with a light-emitting diode on bacterial species and biofilms associated with periodontitis and peri-implantitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **10**:156-167.

Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Bolz, W. & Huerzeler, M.B. (2008a) Hard tissue alterations after socket preservation: an experimental study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* **19**: 1111-1118.

Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Bolz, W. & Huerzeler, M.B. (2008b) Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: a volumetric study in the beagle dog. *J Clin Periodontol* **35**: 356-363.

Fiorellini, J.P., Howell, T.H., Cochran, D., Malmquist, J., Lilly, L.C., Spagnoli, D., Toljanic, J., Jones, A. & Nevins, M. (2005) Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol* **76**: 605-613.

Froum, S., Cho, S.C., Rosenberg, E., Rohrer, M. & Tarnow, D. (2002) Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J Periodontol* **73**: 94-102.

Gad, F., Zahra, T., Hasan, T. & Hamblin, M.R. (2004) Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2173-8.

Gholami, G.A., Najafi, B., Mashhadiabbas, F., Goetz, W. & Najafi, S. (2012) Clinical, histologic and histomorphometric evaluation of socket preservation using a synthetic nanocrystalline hydroxyapatite in comparison with a bovine xenograft: a randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **23**: 1198-1204.

Haas, R., Donath, K., Fodiger, M. & Watzek, G. (1998) Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: Comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res* **9**: 107–116.

Hamblin, M.R. & Hasan, T. (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* **3**:436-450.

Hanser, T. & Khoury, F. (2014) Extraction site management in the esthetic zone using autogenous hard and soft tissue grafts: a 5-year consecutive clinical study. *Int J Periodontics Restorative Dent* **34**:305-12.

Heberer, S., Al-Chawaf, B., Hildebrand, D., Nelson, J.J. & Nelson, K. (2008) Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* **19**: 1219-25.

Hising, P., Bolin, A., Branting, C. (2001) Reconstruction of severely resorbed alveolar ridge crests with dental implants using a bovine bone mineral for augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* **16**: 90-7.

Horváth, A., Mardas, N., Mezzomo, L.A., Needleman, I.G. & Donos, N. (2013) Alveolar ridge preservation. A systematic review. *Clin Oral Investig* **17**: 341-363.

Horváth, A., Windisch, P. & Gera, I. (2010) Post-extraction site management by a novel nanoporous polytetrafluoroethylene barrier. *Clin Oral Implants Res* **21**:1121.

Houser, B.E., Mellonig, J.T., Brunsvold, M.A., Cochran, D.L., Meffert, R.M. & Alder, M.E. (2001) Clinical evaluation of anorganic bovine bone xenograft with a bioabsorbable collagen barrier in the treatment of molar furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* **21**:161-9.

Hürzeler, M.B., Quiñones, C.R., Kirsch, A., Gloker, C., Schüpbach, P., Strub, J.R. & Caffesse, R.G. (1997) Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res* **8**: 476-86.

Iasella, J.M., Greenwell, H., Miller, R.L., Hill, M., Drisko, C., Bohra, A.A., Scheetz, J.P. (2003) Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: A clinical and histologic study in humans. *J Periodontol* **74**:990–999.

Jensen, S.S., Aaboe, M., Pinholt, E.M., Hjørting-Hansen, E., Melsen, F. & Ruyter, I.E. (1996) Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* **11**: 55–66.

Johnson, K. (2007) A study of the dimensional changes occurring in the maxilla after tooth extraction. Part I. Normal healing. *Aust Dent J* 1963;8(5): 428–433.

Karaca, Ç., Er, N., Gülşahi, A. & Köseoğlu, O.T. (2015) Alveolar ridge preservation with a free gingival graft in the anterior maxilla: volumetric evaluation in a randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg* **44**:774-80.

Kfir, E., Kfir, V. & Kaluski, E. Immediate bone augmentation after infected tooth extraction using titanium membranes. *J Oral Implantol* **33**:133-138.

Kim, J.H., Susin, C., Min, J.H., Suh, H.Y., Sang, E.J., Ku, Y., Wikesjö, U.M. & Koo, K.T. (2014) Extraction sockets: erratic healing impeding factors. *J Clin Periodontol* **41**:80-85.

Kim, J.J., Schwarz, F., Song, H.Y., Choi, Y., Kang, K.R. & Koo, K.T. (2016) Ridge preservation of extraction sockets with chronic pathology using Bio-Oss® Collagen with or without collagen membrane: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* May **18**. doi: 10.1111/clr.12870. [Epub ahead of print].

Kinaia, B.M., Shah, M., Neely, A.L., Goodis, H.E. (2014) Crestal bone level changes around immediately placed implants: a systematic review and meta-analyses with at least 12 months' follow-up after functional loading. *J Periodontol* **85**:1537-48.

Kleinfelder, J.W., Müller, R.F. & Lange, D.E. (1999) Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **26**: 347-51.

Klinge, B., Alberius, P., Isaksson, S. & Jönsson, J. (1992) Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* **50**: 241-249.

Kömerik, N., Curnow, A., MacRobert, A.J., Hopper, C., Speight, P.M. & Wilson, M. (2002) Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci* **17**: 86-92.

Kömerik, N., Nakanishi, H., MacRobert, A.J., Henderson, B., Speight, P. & Wilson, M. (2003) In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:932-940.

Lazzara, R.J. (1989) Immediate implant placement into extraction sites: Surgical and restorative advantages. *Int J Periodontics Restorative Dent* **9**:332–343.

Lekovic, V., Camargo, P.M., Klokkevold, P.R., Weinlaender, M., Kenney, E.B., Dimitrijevic, B. & Nedic, M. (1998) Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol* **69**: 1044–1049.

Lekovic, V., Kenney, E.B., Weinlaender, M., Han, T., Klokkevold, P., Nedic, M., Orsini, M. (1997) A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. *J Periodontol* **68**:563-570.

Lindhe, J., Araújo, M.G., Bufler, M. & Liljenberg, B. (2013) Biphasic alloplastic graft used to preserve the dimension of the edentulous ridge: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **24**:1158-63.

Lindhe, J., Cecchinato, D., Donati, M., Tomasi, C. & Liljenberg, B. (2014) Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res* **25**: 786-790.

Lopes, B.M., Theodoro, L.H., Melo, R.F., Thompson, G.M. & Marcantonio, R.A. (2010) Clinical and microbiologic follow-up evaluations after non-surgical periodontal treatment with erbium:YAG laser and scaling and root planning. *J Periodontol* **81**: 682-691.

López-Martínez, F., Moreno, G.G., Olivares-Ponce, P., Jaramillo, D.E., de Val, J.E.S. & Calvo-Guirado, J.L. (2015) Implants failures related to endodontic treatment. An observational retrospective study. *Clin Oral Implants Res* **26**: 992-995.

Lundgren, D. & Nyman, S. (1991) Bone regeneration in 2 stages for retention of implants. *Clin Oral Implants Res* **2**: 203–207.

MacBeth, N., Trullenque-Eriksson, A., Donos, N. & Mardas, N. (2016) Hard and soft tissue changes following alveolar ridge preservation: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* Jul **26**. doi: 10.1111/clr.12911. [Epub ahead of print] Review.

Maia, L.P., Reino, D.M., Novaes, A.B. Jr, Muglia, V.A., Taba, M. Jr, Grisi, M.F., Souza, S.L. & Palioto, D.B. (2015) Influence of periodontal biotype on buccal bone remodeling after tooth extraction using the flapless approach with a xenograft: a histomorphometric and fluorescence study in small dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* **17**: e221-235.

Maiorana, C., Sommariva, L., Brivio, P., Sigurtà, D. & Santoro, F. (2003) Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma: preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent* **23**: 227-35.

Manor, Y., Alkasem, A., Mardinger, O., Chaushu, G. & Greenstein, R.B. (2015) Levels of bacterial contamination in fresh extraction sites after a saline rinse. *Int J Oral Maxillofac Implants* **30**: 1362-1368.

Marcaccini, A.M., Novaes, A.B. Jr, Souza, S.L., Taba, M. Jr & Grisi, M.F. (2003) Immediate placement of implants into periodontally infected sites in dogs. Part 2: A fluorescence microscopy study. *Int J Oral Maxillofac Implants* **18**: 812-819.

Mardas, N., Chadha, V. & Donos, N. (2010) Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovinederived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **21**:688–698.

Mardinger, O., Chaushu, G., Ghelfan, O. & Nissan, J. (2009) Intrasocket reactive soft tissue for primary closure after augmentation of extraction sites with severe bone loss before implant placement. *J Oral Maxillofac Surg* **67**:1294-1299.

Meltzer, A.M. (2012) Immediate implant placement and restoration in infected sites. *Int J Periodontics Restorative Dent* **32**: e169-173.

Milani, S., Dal Pozzo, L., Rasperini, G., Sforza, C. & Dellavia, C. (2016) Deproteinized bovine bone remodeling pattern in alveolar socket: a clinical immunohistological evaluation. *Clin Oral Implants Res* **27**:295-302.

Moreira, A.L., Novaes, A.B. Jr, Grisi, M.F., Taba, M. Jr, Souza, S.L., Palioto, D.B., de Oliveira, P.G., Casati, M.Z., Casarin, RC. & Messori, M.R. (2015) Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* **86**: 376-386.

Mosca, A., Miragliotta, L., Iodice, M.A., Abbinante, A. & Miragliotta, G. (2007) Antimicrobial profiles of *Prevotella* spp. and *Fusobacterium nucleatum* isolated from periodontal infections in a selected area of southern Italy. *Int J Antimicrob Agents* **30**: 521-4.

Novaes, A.B. Jr, Marcaccini, A.M., Souza, S.L. Taba, M. Jr & Grisi, M.F. (2003) Immediate placement of implants into periodontally infected sites in dogs: A histomorphometric study of bone-implant contact. *Int J Oral Maxillofac Implants* **18**: 391-398.

Novaes, A.B. Jr, Suaid, F., Queiroz, A.C., Muglia, V.A., Souza, S.L., Palioto, D.B., Taba, M. Jr & Grisi, M.F. (2012) Buccal bone plate remodeling after immediate implant placement with and without synthetic bone grafting and flapless surgery: radiographic study in dogs. *J Oral Implantol* **38**: 687-698.

- Novaes, A.B. Jr, Vidigal, G.M. Jr, Novaes, A.B., Grisi, M.F., Polloni, S. & Rosa, A. (1998) Immediate implants placed into infected sites: A histomorphometric study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* **13**: 422-427.
- Paolantonio, M., Dolci, M., Scarano, A., d'Archivio, D., di Placido, G., Tumini, V., Piattelli, A. (2001) Immediate implantation in fresh extraction sockets. A controlled clinical and histological study in man. *J Periodontol* **72**:1560-1571.
- Papalexiou, V., Novaes, A.B. Jr, Ribeiro, R.F., Muglia, V. & Oliveira, R.R. (2006) Influence of the interimplant distance on crestal bone resorption and bone density: a histomorphometric study in dogs. *J Periodontol* **77**: 614-621.
- Pelegrine, A.A., da Costa, C.E., Correa, M.E. & Marques, J.F. Jr. (2010) Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. *Clin Oral Implants Res* **21**: 535-542.
- Piattelli, M., Favero, G.A., Scarano, A., Orsini, G. & Piattelli, A. (1999) Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* **14**: 835-840.
- Petrovski, J. & Massler, M. (1967) Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *J Prosthet Dent* **17**: 21-27.
- Pinholt, E.M., Bang, G. & Haanaes, H.R. (1991) Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scand J Dent Res* **99**: 154-161.
- Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, França CM, Cai S, Mayer MP, Ribeiro AC, Ribeiro MS. (2011) Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed Laser Surg* **29**: 835-44.
- Qin, Y.L., Luan, X.L., Bi, L.J., Sheng, Y.Q., Zhou, C.N. & Zhang, Z.G. (2008) Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontol Res* **43**: 162-167.
- Quirynen, M., Gijbels, F. & Jacobs, R. (2003) An infected jawbone site compromising successful osseointegration. *Periodontol 2000* **33**: 129-144.
- Rams, T.E., Degener, J.E. & van Winkelhoff, A.J. (2013) Prevalence of β -lactamase-producing bacteria in human periodontitis. *J Periodontol Res* **48**: 493-9.
- Rams, T.E., Degener, J.E. & van Winkelhoff, A.J. (2014) Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol* **85**: 160-9.
- Rosenquist, B. & Grenthe, B. (1996) Immediate placement of implants into extraction sockets: implant survival. *Int J Oral Maxillofac Implants* **11**: 205-209.
- Schwartz-Arad, D. & Chaushu, G. (1997) The ways and wherefores of immediate placement of implants into fresh extraction sites: A literature review. *J Periodontol* **68**: 915-923.
- Serino, G., Biancu, S., Iezzi, G. & Piattelli, A. (2003) Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clin Oral Implants Res* **14**:651-658.

Shibli J.A., Martins, M.C., Ribeiro, F.S., Garcia, V.G., Nociti, F.H. Jr & Marcantonio, E. Jr. (2006) Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* **17**: 273–281.

Shibli, J.A., Martins, M.C., Theodoro, L.H., Lotufo, R.F.M., Garcia, V.G. & Marcantonio, E. Jr. (2003) Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Science* **45**: 17–23.

Skoglund, A., Hising, P. & Young, C. (1997) A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. *Int J Oral Maxillofac Implants* **12**: 194-199.

Smiler, D.G., Johnson, P.W., Lozada, J.L., Misch, C., Rosenlicht, J.L., Tatum, O.H. Jr & Wagner, J.R. (1992) Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* **36**:151-86.

Suaid, F., Grisi, M.F., Souza, S.L., Palioto, D.B., Taba, M. Jr & Novaes, A.B. Jr. (2013) Buccal bone remodeling after tooth extraction using the flapless approach with and without synthetic bone grafting. A histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* **24**: 407-413.

Tal, H. (1999) Autogenous masticatory mucosal grafts in extraction socket seal procedures: a comparison between sockets grafted with demineralized freeze-dried bone and deproteinized bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res* **10**:289-96.

Tehemar, S., Hanes, P. & Sharawy, M. (2003) Enhancement of osseointegration of implants placed into extraction sockets of healthy and periodontally diseased teeth by using graft material, an ePTFE membrane, or a combination. *Clin Implant Dent Relat Res* **5**: 193-211.

Ten Heggeler, J.M., Slot, D.E. & Van der Weijden, G.A. (2011) Effect of socket preservation therapies following tooth extraction in non-molar regions in humans: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* **22**: 779-788.

Theodoro, L.H., Pires, J.R., Fernandes, L.A., Gualberto, Jr E.C., Longo, M. & de Almeida, J.M. (2015) Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. *Lasers Med Sci* **30**:677-683.

Tischler, M. & Misch, C.E. (2004) Extraction site bone grafting in general dentistry. Review of applications and principles. *Dent Today* **23**: 108–113.

Traini, T., Degidi, M., Sammons, R., Stanley, P., Piatelli, A. (2008) Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *J Periodontol* **79**: 955–961.

Traini, T., Valentini, P., Iezzi, G. & Piattelli, A. (2007) A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *J Periodontol* **78**: 955-961.

Usacheva, M.N., Teichert, M.C., Biel, M.A. (2010) Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* **29**: 165-73.

Valentini, P., Abensur, D., Wenz, B., Peetz, M. & Schenk, R. (2000) Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* **20**:245-53.

Wainwright, M. (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* **42**: 13-28.

Watzek, G., Haider, R., Mensdorff-Pouilly, N. & Haas, R. (1995) Immediate and delayed implantation for complete restoration of the jaw following extraction of all residual teeth: A retrospective study comparing different types of serial immediate implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants* **10**:561-567.

Werbitt, M.J. & Goldberg, P.V. (1992) The immediate implant: bone preservation and bone regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent* **12**: 206-217.

Wetzel, A.C., Stich, H., & Caffesse, R.G. (1995) Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* **6**: 155-163.

Wood, R.A. & Mealey, B.L. (2012) Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freeze-dried bone allograft. *J Periodontol* **83**:329-36.

Yildirim, M., Spiekermann, H., Handt, S. & Edelhoff, D. (2001) Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* **16**: 23-33.

Zitzmann, N.U., Naef, R. & Schärer, P. (1997) Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* **12**: 844–852.

Table 1. Intra and intergroup histomorphometric comparisons between test (TG-BC, TG-BO and TG-BOC) and control (CG-BC, CG-BO and CG-BOC) groups - mean±SD (median)

		BCL-ON (mm)	BCL-OA (mm)	BLD (mm)
Test	TG-BC ^(a)	1,38 ± 0,45 (1,49)	1,48 ± 0,45 (1,68)	4,70 ± 1,29 (4,35)
	TG-BO ^(b)	0,97 ± 0,62 (1,10)	1,53 ± 0,89 (1,51)	5,78 ± 0,75 (5,97)
	TG-BOC ^(c)	1,07 ± 0,54 (0,86)	1,61 ± 0,63 (1,76)	5,71 ± 0,81 (5,54)
Control	CG-C ^(d)	1,79 ± 0,49 (1,94)	2,19 ± 0,46 (2,25)	4,32 ± 0,61 (4,44)
	CG-BO ^(e)	1,36 ± 1,07 (1,41)	1,80 ± 1,00 (1,91)	4,62 ± 0,99 (4,98)
	CG-BOC ^(f)	1,46 ± 0,65 (1,28)	1,91 ± 0,40 (1,78)	4,93 ± 0,66 (4,98)
Intragroup (<i>p</i> value)*	a/b	ns	ns	ns
	a/c	ns	ns	ns
	b/c	ns	ns	ns
	d/e	ns	ns	ns
	d/f	ns	ns	ns
	e/f	ns	ns	ns
Intergroup (<i>p</i> value)**	a/d	ns	ns	ns
	b/e	ns	ns	ns
	c/f	ns	ns	ns

SD: Standard deviation; *: Intragroup difference evaluation: Friedman Test *post hoc* Wilcoxon Test with Bonferroni correction ($p \leq 0,05$); **: Intergroup difference evaluation: Wilcoxon matched-pairs test ($p \leq 0,05$); ns: non-significant.

Table 2. Intra and Intergroup comparison between test (TG-BC, TG-BO and TG-BOC) and control (CG-BC, GC-BO and CG-BOC) groups for the percentage-area measurements - mean±SD (median)

		MA (%)	TBA (%)	RGP (%)
Test	TG-BC ^(a)	61,02 ± 9,70 (55,99)	38,97 ± 9,70 (44,00)	–
	TG-BO ^(b)	24,10 ± 5,33 (22,87)	49,22 ± 5,90 (48,93)	24,74 ± 6,04 (25,30)
	TG-BOC ^(c)	36,43 ± 4,10 (35,01)	46,88 ± 8,44 (43,48)	15,94 ± 7,84 (17,16)
Control	CG-C ^(d)	54,30 ± 6,92 (55,28)	45,69 ± 6,92 (44,72)	–
	CG-BO ^(e)	38,97 ± 3,90 (38,93)	50,85 ± 8,40 (48,71)	13,80 ± 3,31 (13,62)
	CG-BOC ^(f)	48,23 ± 9,96 (46,25)	42,69 ± 7,65 (44,62)	8,05 ± 5,97 (5,50)
Intragroup (<i>p</i> value)*	a/b	$P=0,05$	ns	–
	a/c	ns	ns	–
	b/c	$P=0,05$	ns	$P=0,03$
	d/e	ns	ns	–
	d/f	ns	ns	–
	e/f	ns	ns	ns
Intergroup (<i>p</i> value)**	a/d	ns	ns	–
	b/e	$P=0,03$	ns	$P=0,03$
	c/f	$P=0,04$	ns	ns

SD: Standard deviation; *: Intragroup difference evaluation: Friedman Test *post hoc* Wilcoxon Test with Bonferroni correction ($p \leq 0,05$); **: Intergroup difference evaluation: Wilcoxon matched-pairs test ($p \leq 0,05$); ns: non-significant.

Table 3. Two-dimensional Micro-CT analysis (linear measurements) between test (TG-BC, TG-BO and TG-BOC) and control (CG-BC, CG-BO and CG-BOC) groups.

		BBC (mm)	BLD (mm)
Test	GT-C ^(a)	1,32 ± 0,27 (1,20)	4,58 ± 1,04 (4,06)
	GT-BO ^(b)	0,93 ± 0,42 (0,87)	5,75 ± 0,91 (5,88)
	GT-BOC ^(c)	1,01 ± 0,47 (0,79)	5,47 ± 0,66 (5,73)
Control	GC-C ^(d)	2,32 ± 0,42 (2,30)	4,37 ± 0,63 (4,33)
	GC-BO ^(e)	1,26 ± 0,89 (1,46)	5,47 ± 0,95 (5,68)
	GC-BOC ^(f)	1,40 ± 0,79 (1,22)	5,39 ± 1,04 (5,41)
Intragroup (p value)*	a/b	ns	ns
	a/c	ns	ns
	b/c	ns	ns
	d/e	ns	ns
	d/f	ns	ns
	e/f	ns	ns
Intergroup (p value)**	a/d	<i>P=0,03</i>	ns
	b/e	ns	ns
	c/f	ns	ns

SD: Standard deviation; *: Intragroup difference evaluation: Friedman Test *post hoc* Wilcoxon Test with Bonferroni correction ($p \leq 0,05$); **: Intergroup difference evaluation: Wilcoxon matched-pairs test ($p \leq 0,05$); ns: non-significant.

Table 4. Three-dimensional Micro-CT analysis of the investigated parameters: Total bone volume (BV, mm³), Percentage of the total bone volume (BV/TV, %), Bone surface density (BS/TV, 1/mm), in test (TG-BC, TG-BO and TG-BOC) and control (CG-BC, GC-BO and CG-BOC) groups - mean±SD (median)

		BV (mm3)	BV/TV (%)	BS/TV (1/mm)
Test	TG-BC ^(a)	37,67±21,68 (25,14)	51,19±8,21 (53,22)	11,37±2,32 (11,00)
	TG-BO ^(b)	22,27±5,82 (24,56)	50,12±12,53 (53,95)	17,06±5,19 (19,21)
	TG-BOC ^(c)	24,18±3,58 (25,33)	51,08±7,01 (52,14)	16,91±2,20 (17,31)
Control	CG-C ^(d)	24,30±3,70 (24,32)	46,70±10,04 (44,99)	12,63±1,62 (12,54)
	CG-BO ^(e)	22,01±2,63 (22,37)	50,01±6,00 (48,89)	17,28±2,26 (16,74)
	CG-BOC ^(f)	20,21±3,92 (21,57)	48,00±9,27 (50,90)	10,94±0,00 (10,93)
Intragroup (p value)*	a/b	ns	ns	ns
	a/c	ns	ns	ns
	b/c	ns	ns	ns
	d/e	ns	ns	<i>P=0,05</i>
	d/f	ns	ns	ns
	e/f	ns	ns	ns
Intergroup (p value)**	a/d	ns	<i>P=0,04</i>	ns
	b/e	ns	ns	ns
	c/f	ns	ns	<i>P=0,04</i>

SD: Standard deviation; *: Intragroup difference evaluation: Friedman Test *post hoc* Wilcoxon Test with Bonferroni correction ($p \leq 0,05$); **: Intergroup difference evaluation: Wilcoxon matched-pairs test ($p \leq 0,05$); ns: non-significant.