Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia

Danilo Maeda Reino

Importância da espessura gengival na formação de retrações gengivais em sítios reabilitados com próteses fixas subgengivais.

PG-PERIO
FORP-USP

Ribeirão Preto

2014

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia

Danilo Maeda Reino

**Importância da espessura gengival na formação de
retrações gengivais em sítios reabilitados com
próteses fixas subgengivais.**

Tese apresentada á Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr

Ribeirão Preto

2014

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Reino, Danilo Maeda

Importância da espessura gengival na formação de retrações gengivais em sítios reabilitados com próteses fixas subgengivais. Ribeirão Preto, 2014.

90p.: il.; 30 cm

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. Retração gengival. 2. Colágeno. 3. Prótese. 4. Enxerto de tecido conjuntivo subepitelial. 5. Vascularização.

Folha de Aprovação

Danilo Maeda Reino

Importância da espessura gengival na formação de retrações gengivais em sítios
reabilitados com próteses fixas subgengivais.

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor.
Área de Concentração: Periodontia

Aprovado em: ____ / ____ / 2014

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À minha família

*As pessoas mais importantes da minha vida, meus pais **Sidney e Marina**, meus irmãos **Diego e Felipe**, minha esposa **Joyce** e minha filha **Livia**.*

Sem o seu apoio não teria sido possível suportar a distância, as privações e a saudade. Obrigado por tudo, vocês são a minha razão de viver!

Agradecimentos

Aos meus pais, **Sidney e Marina** por tudo o que fizeram e por seu exemplo para me propiciar educação uma vida feliz. Por me incentivarem a seguir meus sonhos e me ajudarem a chegar até aqui, verdadeiros exemplos de pais e meus eternos ídolos.

Aos meus irmãos, **Diego e Felipe** pelo suporte e incentivo, nunca me deixando desistir. Agradeço por todos os momentos felizes que tivemos juntos durante nossa vida, pelas risadas, pelas partidas de vídeo game e por me ajudarem a ser uma pessoa melhor. Meus melhores amigos.

A **Joyce**, minha esposa, por suportar tantos anos de distância e saudade. Por estar ao meu lado nas adversidades e no momentos difíceis, pelo incentivo e carinho.

A minha filhinha **Livia**, que me ajuda diariamente a lembrar que a vida não é somente trabalho, por toda a alegria e surpresas que me dá diariamente. É por você que sonho todas as noites.

Ao meu irmão **Glauber e seus pais Maira José e Gilmar**, por todo o apoio, por acreditar em mim desde o início, por todas as batalhas que enfrentamos juntos, por nunca me deixar esmorecer, pelas palavras sinceras e pelas alegrias.

Ao meu grande amigo **Milton**, um verdadeiro irmão mais velho, que através da odontologia tem me ensinado a ser uma pessoa melhor, por me estimular a continuar curioso e a estudar cada vez mais.

Ao meu orientador **Arthur Belém Noves Jr**, pelo apoio, orientação e oportunidades dadas para que eu pudesse me tornar um profissional melhor. Pela compreensão nos momentos mais difíceis que passei durante o doutorado. Um verdadeiro exemplo de professor.

Ao meu amigo **Sérgio Luís Scombatti de Souza**, pelas oportunidades que me ofereceu, por todo o conhecimento de biomateriais e implantodontia compartilhados e pelo incentivo a docência.

Aos docentes do programa de Pós-graduação em Periodontia da FORP-USP. Ao **Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi** por incentivo e exemplo sobre cirurgia plástica e por oportunidades oferecidas. Ao **Prof. Dr. Mário Taba Júnior** pelas conversas agradáveis sobre pesquisa, e estimula a bioestatística. Ao **Prof. Dr. Michel Reis Messoria** pela amizade e apoio durante o doutorado. À Profª. **Drª**.

Daniela Bazan Palioto pela ajuda com o inglês e pela ajuda desde os meus primeiros enxertos gengivais ainda na especialização.

Às minhas amigas de doutorado, **Patrícia e Luciana**, pela companhia e ajuda nas clínicas, nas pesquisas e artigos. Por aguentarem meu entusiasmo, ouvirem minhas ideias e por estarem sempre presentes quando precisei.

Aos amigos de pós graduação, **Mariana, Cristine, Kelly, Felipe, Carolina D, Carolina M, Humberto, Gustavo, Paula, Túlio e André**, por toda a companhia e ajuda.

Ao meu amigo **Marcelo Alves**, pelo incentivo, por acreditar em mim desde o início. Um exemplo de professor, profissional e clínico.

Ao meu amigo **Robson Ribeiro**, por ser um exemplo de profissional, amigo, pelo seu caráter e por todas as oportunidades que me ofereceu.

Ao meu amigo **Rafael Calixto**, pelas oportunidades que me ofereceu, exemplo e incentivo.

Ao meu amigo **Prof. Wilson Matsumoto**, pela ajuda, oportunidades que sempre me deu e pelo conhecimento de prótese.

Ao meu amigo **João Moura**, pelo apoio, e ensinamentos em clínica e na vida.

Aos meus amigos da especialização em Implantodontia da Unaerp **Paulo, Oscar, Rodolpho, Fabrício e Frederico**, pela companhia neste projeto e pela amizade.

À minha amiga **Pérola** pela companhia em clínica.

Aos meus amigos da Gnatus e Bien Air, **Francisco, Gustavo, Bruno, Simone, Jaqueline, Luis Fernando** pela companhia e por acreditarem no meu trabalho.

Aos meus amigos da dentística **Profs Mandarin, Tomé, Tomio, André, Gilson, Laura, Daniel e Álvaro**, pelas oportunidades, amizade e conhecimento.

A **Adriana, Vani e Adréa** pela ajuda com análise histológica e imunohistoquímica.

À todos os professores da FORP-USP que me ajudaram durante minha estadia na FORP. **Profas Takami, Regina Maura, Profs Samuel, Valdir.**

À todos os funcionários da FORP-USP que me ajudaram durante minha estadia na FORP. **Sr. Augusto, Vera, Paulo e Ana** pela simpatia, amizade e confiança. **Tati e Dulce e Dani**, pela amizade e ajuda prestada. **Sueli e Dani** pela companhia diária na clínica, obrigado por toda ajuda.

Aos funcionários do Campus. **Fátima, Rita, Sônia** colegas do restaurante universitário. **Claudemir, Mirian e Cidão** meus amigos da Biblioteca, pela alegria e ajuda. Aos meus amigos do Biotério Edson, Fábio e Aldo pela ajuda durante a parte experimental.

Aos meus amigos que me apadrinharam em Ribeirão Preto, **Dib e Ana**, que me acompanharam desde a minha infância, por tudo que fizeram por mim desde a especialização e por tudo que fazem até hoje.

Á minha amiga **Li**, pela companhia e amizade, ajudando a suportar a distância de Maringá, pelas conversas, risadas e fins de semana agradáveis.

Ao **Vanderlei**, mestre de taekwondo, pela amizade e incentivo, conversas e pelos treinos.

Meus amigos do pensionato. A **Dona Angelina**, pela ajuda.

Á **Ceec** e seus funcionários pelas oportunidades.

A **AORP**, seus funcionários e professores pela companhia. Aos professores **Lilia, Renato Berro, Eliane.**

A **FUNORP**, seus funcionários e professores pela companhia.

Aos meus pacientes, por confiarem em mim e pela ajuda prestada.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA: Análise variância

BSA: Soro bovino contendo albumina

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

EDTA: Ácido etilenodiaminotetra-acético

ETCS: Enxerto de tecido conjuntivo subepitelial

G: Grupo

HE: Hematoxilina e Eosina

MCS: Mucograft

Mm = Milímetros

NCI: Nível clínico de inserção

P: Pré-molar

PBS: Solução salina tamponada fosfatada

PS: Profundidade de sondagem

TM: Tricrômico de Masson

USP: Universidade de São Paulo

µm: Micrômetro

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Justificativa	xii
Resumo	xvii
Abstract	xviii
 1 Introdução	 20
 2 Materiais e Métodos.....	 24
2.1 Seleção dos Animais.....	24
2.2 Grupos Experimentais.....	24
2.3 Procedimentos Clínicos Pré-cirúrgicos.....	25
2.4 Tratamento Cirúrgico	26
2.5 Instalação das Próteses	28
2.6 Sacrifício dos Cães	30
2.7 Processamento das Peças.....	30
2.8 Análises Clínicas e Laboratoriais	32
<i>Análise Clínica</i>	32
<i>Análise Histológica e Histomorfométrica</i>	34
<i>Análise Imunohistoquímica</i>	38
2.9 Análise Estatística.....	43
 3 Resultados	 45
3.1 Resultados Clínicos	45
3.2 Resultados Laboratoriais.....	48
 4 Discussão	 50
 5 Conclusão	 60
 6 Referências bibliográficas	 62
 7 Anexos	 66
 8 Artigo em Inglês	 68

Justificativa

No mundo todo um grande número de pacientes possui algum tipo de prótese fixa, seja para substituir elementos dentários prejudicados por cáries, doença periodontal, fraturas, ou até mesmo por problemas estéticos como imperfeições de forma ou cor. Fabricantes e dentistas se esforçam para tornar as próteses imperceptíveis, objetivando restabelecer função com estética e saúde. Para o sucesso destes tratamentos é fundamental a presença de tecidos moles íntegros ¹.

Embora estudos tenham demonstrado que um controle de biofilme microbiano eficiente é suficiente para a manutenção da saúde periodontal em dentes com uma pequena faixa de gengiva inserida ^{2; 3; 4; 5}, sabe-se que esse controle é muito difícil de ser mantido por longos períodos na maior parte dos pacientes. Inflamação gengival pode ocorrer na presença de restaurações ou próteses subgengivais mesmo quando a adaptação marginal foi considerada clinicamente aceitável ^{6; 7}. Mesmo altos níveis de higiene bucal não são capazes de prevenir a perda de inserção clínica na presença de próteses com margens subgengivais ^{8; 9}.

Infiltrado inflamatório contendo macrófagos, linfócitos CD4 e CD8 ¹⁰ é gerado na presença destas próteses subgengivais, ocupando a maior parte do tecido conjuntivo da gengiva livre, culminando com a proliferação das células epiteliais do epitélio oral para o interior do tecido conjuntivo, desenvolvendo a retração gengival ^{11; 12}. Mas na presença de largas faixas de gengiva queratinizada, o infiltrado inflamatório fica confinado apenas a gengiva livre ¹³. Assim, maiores espessuras e quantidade de tecido queratinizado gengival podem impedir que o infiltrado inflamatório leve a ocorrência de retração gengival. Desta forma procedimentos para

aumento da espessura gengival podem ser indicados para diminuir o risco de desenvolvimento de retrações gengivais ¹⁴.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para aumento da altura e espessura da mucosa queratinizada; como enxerto gengival livre e enxerto de tecido conjuntivo livre ¹⁵. Entretanto a necessidade de utilizar o palato duro como área doadora gera morbidade ¹⁶, o que diminui a aceitação do tratamento por parte dos pacientes. Como alternativa aos enxertos autógenos, enxertos dérmicos acelulares têm sido utilizados com bons resultados ^{17; 18; 19}. No entanto, por ser obtida de cadáveres humanos e por questões éticas, seu uso é ¹⁶.

Atualmente uma nova matriz colágena de origem suína (MCS) (Mucograft) pode ser usada como alternativa para enxerto autógeno e para a matriz dérmica de origem humana. Embora o produto seja novo, existem pesquisas já publicadas, mas até o momento pouco se sabe sobre a sua capacidade de aumento de espessura gengival. Assim, o objetivo deste estudo é verificar se esta a MCS pode aumentar a espessura e altura do tecido queratinizado gengival, se pode influenciar na extensão da inflamação e prevenir a formação de retrações gengivais em pré-molares caninos tratados com próteses com margens subgengivais.

Referências Bibliográficas

- ¹ SANAVI, F.; WEISGOLD, A. S.; ROSE, L. F. Biologic width and its relation to periodontal biotypes. **J Esthet Dent**, v. 10, n. 3, p. 157-63, 1998.
- ² DORFMAN, H. S.; KENNEDY, J. E.; BIRD, W. C. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. **J Clin Periodontol**, v. 7, n. 4, p. 316-24, Aug 1980.
- ³ WENNSTROM, J.; LINDHE, J.; NYMAN, S. Role of keratinized gingiva for gingival health. Clinical and histologic study of normal and regenerated gingival tissue in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 8, n. 4, p. 311-28, Aug 1981.
- ⁴ WENNSTROM, J.; LINDHE, J.; NYMAN, S. The role of keratinized gingiva in plaque-associated gingivitis in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 9, n. 1, p. 75-85, Jan 1982.
- ⁵ WENNSTROM, J.; LINDHE, J. Role of attached gingiva for maintenance of periodontal health. Healing following excisional and grafting procedures in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 10, n. 2, p. 206-21, Mar 1983.
- ⁶ SCHATZLE, M. et al. The influence of margins of restorations of the periodontal tissues over 26 years. **J Clin Periodontol**, v. 28, n. 1, p. 57-64, Jan 2001.
- ⁷ SILNESS, J. Periodontal conditions in patients treated with dental bridges. 2. The influence of full and partial crowns on plaque accumulation, development of gingivitis and pocket formation. **J Periodontal Res**, v. 5, n. 3, p. 219-24, 1970.
- ⁸ FLORES-DE-JACOBY, L.; ZAFIROPOULOS, G. G.; CIANCIO, S. Effect of crown margin location on plaque and periodontal health. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 9, n. 3, p. 197-205, 1989.
- ⁹ KOKE, U. et al. A possible influence of gingival dimensions on attachment loss and gingival recession following placement of artificial crowns. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 23, n. 5, p. 439-45, Oct 2003.
- ¹⁰ ISHIKAWA, I. et al. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 79-111, Jun 1997.
- ¹¹ NOVAES, A. B. et al. The development of the periodontal cleft. A clinical and histopathologic study. **J Periodontol**, v. 46, n. 12, p. 701-9, Dec 1975.
- ¹² BAKER, D. L.; SEYMOUR, G. J. The possible pathogenesis of gingival recession. A histological study of induced recession in the rat. **J Clin Periodontol**, v. 3, n. 4, p. 208-19, Nov 1976.
- ¹³ ERICSSON, I.; LINDHE, J. Recession in sites with inadequate width of the keratinized gingiva. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 11, n. 2, p. 95-103, Feb 1984.
- ¹⁴ MULLER, H. P.; EGER, T. Masticatory mucosa and periodontal phenotype: a review. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 22, n. 2, p. 172-83, Apr 2002.
- ¹⁵ WESSEL, J. R.; TATAKIS, D. N. Patient outcomes following subepithelial connective tissue graft and free gingival graft procedures. **J Periodontol**, v. 79, n. 3, p. 425-30, Mar 2008.

- ¹⁶ SANZ, M. et al. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 10, p. 868-76, Oct 2009.
- ¹⁷ AICHELMANN-REIDY, M. E. et al. Clinical evaluation of acellular allograft dermis for the treatment of human gingival recession. **J Periodontol**, v. 72, n. 8, p. 998-1005, Aug 2001.
- ¹⁸ NOVAES, A. B., JR. et al. Comparative 6-month clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recession. **J Periodontol**, v. 72, n. 11, p. 1477-84, Nov 2001.
- ¹⁹ LUCZYSZYN, S. M. et al. Histologic analysis of the acellular dermal matrix graft incorporation process: a pilot study in dogs. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 27, n. 4, p. 341-7, Aug 2007.

Resumo

Objetivo: Próteses subgengivais aumentam a incidência de inflamação gengival, principalmente em periodontos delgados, culminando com o desenvolvimento de retrações gengivais em dentes e implantes. A proposta deste trabalho foi avaliar se o aumento da espessura gengival pode prevenir a formação de retrações gengivais.

Materiais e Métodos: Modelo de boca dividida foi utilizado em 8 cães, retalho dividido foi realizado para inserir a matriz colágena suína (MCS) para aumento da espessura gengival e após três meses, próteses subgengivais foram instaladas para gerar inflamação gengival e depois de três meses os animais foram sacrificados. Os grupos: Grupo 1 (G1): MCS adaptada na região de Pré-molar 2 (P2), Pré-molar 3 (P3) e Pré-molar 4 (P4), com próteses subgengivais; Grupo 2 (G2): sem MCS na região de P2, P3 e P4, com próteses subgengivais; Grupo 3 (G3): controle do grupo 1, MCS adaptada na região de Pré-molar 1 (P1), sem próteses e Grupo 4 (G4): controle do grupo 2, sem MCS na região de P1 e sem próteses. Foram realizadas medidas clínicas de espessura e altura do tecido gengival queratinizado, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção em três tempos (antes do aumento gengival, antes da instalação das próteses e após o sacrifício). Análise imunohistoquímica foi realizada para detectar a presença de células de defesa e padrão de queratinização gengival. Análise histomorfométrica foi realizada para quantificar as diferenças dos tecidos duros e moles entre os diferentes grupos de tratamento.

Resultados: Durante os períodos de avaliação não houve variação na altura do tecido queratinizado entre os grupos, no entanto, G1 e G2 apresentaram maior espessura gengival quando comparados a G3 e G4. A profundidade de sondagem foi superior em G3 e G4 quando comparada a G1 e G2. Houve perda de inserção clínica somente em G1 e G2. As análises histomorfométricas para tecido mole e duro confirmaram os resultados clínicos. A análise imunohistoquímica não encontrou diferenças na contagem das células de defesa.

Conclusão: A MCS foi capaz de aumentar a espessura gengival e prevenir a ocorrência de retrações gengivais em dentes que receberam próteses subgengivais em modelo experimental canino.

Palavras chave: colágeno, retração gengival, prótese.

Abstract

Aim: Subgingival prosthesis increases the gingival inflammation incidence, especially in thin gingival biotype, leading to the development of gingival recessions. The purpose of this study was to evaluate whether the increase in gingival thickness can prevent the formation of gingival recession.

Materials and Methods: Eight dogs received porcine collagen matrix to increase gingival thickness, which was then followed by subgingival prosthesis placement in order to generate gingival inflammation. Group 1: gingival thickness increase from second to fourth premolars, using subgingival prostheses; Group 2: subgingival prosthesis placement from second to fourth molars; Group 3: gingival thickness increase in the first premolar, no prostheses; Group 4: control. Clinical measurements of gingival thickness and height, clinical probing depth and clinical attachment levels were performed. Immunohistochemical analyses were performed to detect defense cells, keratinization patterns and differences between soft and mineralized tissues.

Results: There was no variation in keratinized tissue height. Thicker gingiva was encountered in Groups 1 and 2, which developed gingival recession, which did not occur in Groups 3 and 4. Probing depth was more pronounced in Groups 3 and 4. Histomorphometric analysis for soft and mineralized tissues confirmed clinical findings. Immunohistochemical analysis did not show differences in defense cell counting.

Conclusion: The increase in gingival thickness may minimize gingival recessions when associated with subgingival prosthesis.

Palavras chave: collagen, gingival recession, prosthesis.

1 Introdução

Até hoje a odontologia tem feito muito esforço para desenvolver próteses que sejam capazes de mimetizar forma, cor, tamanho, aparência de dentes naturais e que possam restabelecer a função. O sucesso de tais tratamentos depende de muitos fatores, dentre estes a integridade e aparência do tecido mole ¹. Por muitos anos, existiu a controvérsia em relação a necessidade de tecidos queratinizados mais largos ² e gengiva mais espessa ³ para preservar a saúde periodontal e prevenir a retração gengival.

Alguns estudos clássicos sugerem que dentes que apresentam margens subgengivais e reduzida quantidade de mucosa queratinizada (<2mm) estão mais propensos a desenvolver gengivite e retração gengival, quando comparados com dentes que apresentam margens protéticas supragengivais ⁴. Foi sugerido que uma quantidade mínima de 3mm de mucosa queratinizada é necessária para a manutenção da saúde periodontal caso a margem protética vá estar dentro do sulco gengival ⁵. Retrações gengivais são mais pronunciadas em áreas com estreita faixa de tecido queratinizado, do que em áreas com maior quantidade ⁶. Também tem sido mencionado que a espessura do tecido queratinizado é adequada quando a sonda periodontal não pode ser vista por transparência quando inserida no sulco gengival ⁵. Desta forma procedimentos para aumento da espessura gengival podem ser indicados para diminuir o risco de desenvolvimento de retrações gengivais ³.

Entretanto muitos estudos demonstraram que quando o controle de biofilme microbiano eficiente é executado, uma pequena largura de gengiva inserida é suficiente para a manutenção da saúde periodontal ^{7; 8; 9; 10}. Controle de biofilme microbiano é muito importante para o sucesso dos tratamentos reabilitadores, mas

pode ser muito difícil manter todos os dentes dos pacientes livres de biofilme microbiano durante longos períodos. Estimativas demonstram que nos Estados Unidos da América 50% dos adultos apresentam gengivite em pelo menos três ou quatro dentes ¹¹.

Além disto, estudos histológicos mostraram o desenvolvimento de inflamação gengival através da presença de restaurações subgengivais mesmo quando a adaptação marginal foi considerada clinicamente aceitável ¹²). Atualmente é aceito que próteses ocasionam acúmulo local de biofilme microbiano ¹³, causando a modificação da microbiota subgengival, favorecendo a colonização de microrganismos Gram negativos e anaeróbios ¹⁴. Isto poderia promover o desenvolvimento de gengivite com maior severidade ^{12; 15; 16}. Alguns estudos clínicos demonstraram que mesmo altos níveis de higiene bucal não são capazes de prevenir a perda de inserção clínica gengival quando próteses estão inseridas subgengivalmente ^{6; 17}.

Quando uma prótese é inserida subgengivalmente em uma área com estreita faixa de gengiva queratinizada, o acúmulo de biofilme microbiano produzirá uma resposta imunológica com infiltrado inflamatório, contendo macrófagos, linfócitos CD4 e CD8 ¹⁸. Este infiltrado inflamatório ocupará a maior parte do tecido conjuntivo da gengiva livre, gerando a proliferação das células epiteliais do epitélio oral para o interior do tecido conjuntivo, desenvolvendo a retração gengival ^{19; 20}. Mas em áreas com largas faixas de gengiva queratinizada o infiltrado inflamatório fica confinado apenas na área da gengiva livre ¹⁶. Esta diferença na espessura e quantidade de tecido queratinizado pode determinar a resistência gengival contra o infiltrado inflamatório, evitando o desenvolvimento de retração gengival.

Devido ao maior benefício existente em gengivas espessas e com maior largura do tecido queratinizado, diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a altura e/ou espessura da mucosa queratinizada; como enxerto gengival livre e enxerto de tecido conjuntivo livre ²¹. Ambos os procedimentos estão associados com significativa morbidade ao paciente devido a necessidade de utilizar o palato duro como área doadora ². Na tentativa de evitar esta morbidade, enxertos dérmicos acelulares têm sido utilizados com bons resultados, como substitutos para os tecidos removidos do palato ^{22; 23; 24}. No entanto, esta matriz é obtida de cadáveres humanos e está associada com questões éticas, limitando seu uso ².

Recentemente, uma nova matriz colágena de origem suína (MCS) (Mucograft)¹ foi desenvolvida como uma alternativa para o uso de enxerto autógeno ou da matriz dérmica de origem humana. Um estudo clínico recente comparou esta nova MCS com enxerto de tecido conjuntivo livre, objetivando criar um tecido gengival queratinizado e clinicamente saudável. Os resultados mostraram que este novo produto foi tão eficiente e previsível quanto o tecido conjuntivo autógeno, para formar uma faixa de tecido queratinizado gengival, e reduziu significativamente a morbidade do paciente.

Assim, o objetivo deste estudo é verificar se esta nova MCS pode aumentar a espessura do tecido queratinizado gengival, se pode influenciar na extensão da inflamação e prevenir a formação de retrações gengivais em pré-molares caninos tratados com próteses com margens subgengivais.

¹ Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland

2 Materiais e Métodos

2.1 Seleção dos Animais

Foram utilizados 8 cães adultos jovens, de raça definida (raça Beagle), de aproximadamente 12 kg de peso. Os animais foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: apresentar maxilas intactas, sem trauma oclusal, sem lesões bucais virais ou fúngicas e apresentar boa saúde geral, sem envolvimento sistêmico comprovado por um médico veterinário. Todos os procedimentos clínicos foram acompanhados por médico veterinário. Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram submetidos à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP e aprovado (protocolo nº 10.1.1027.53.2 – anexo1).

2.2 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram aleatorizados através do software Microsoft Excel 2010, sendo os seguintes (figura 1):

- Grupo 1: tratamento com retalho dividido e inserção da MCS adaptada na região de P2, P3 e P4, com posterior instalação das próteses.
- Grupo 2: tratamento com retalho dividido sem inserção da MCS na região de P2, P3 e P4, com posterior instalação das próteses.
- Grupo 3: controle do grupo 1, tratamento com retalho dividido e inserção da MCS adaptada na região de P1, sem posterior instalação das próteses.
- Grupo 4: controle do grupo 2 tratamento com retalho dividido, sem inserção da MCS na região de P1 e sem posterior instalação das próteses.

Figura 1: Ilustração dos diversos grupos com os tratamentos propostos

2.3 Procedimentos Clínicos Pré-cirúrgicos

Quinze dias antes da primeira cirurgia, os animais receberam complexos vitamínicos, vacinas (V-10 e rábica) e tratamento antiparasitário, e foram submetidos à preparo básico com profilaxia e raspagem supra gengival de seus dentes com o uso do ultrassom e taça de borracha para remoção de biofilme microbiano e cálculo dentários. Os procedimentos foram realizados com os animais medicados através de pré-anestesia (Zolazepan 0,10 ml/kg e Acepromazina 0,2% - 0,05 mg/kg), para posteriormente serem devidamente anestesiados (Thiopental 2,5% - 5 a 8 mg/Kg IV). A manutenção da anestesia foi realizada com anestesia volátil e sendo assim os cães receberam intubação traqueal com sonda de Magill para adaptação do aparelho de anestesia e aplicação de Isoflurano (2V%).

2.4 Tratamento Cirúrgico

Os animais foram mantidos em jejum desde a noite anterior ao ato cirúrgico. Receberam injeção intramuscular do pré-anestésico conforme descrito previamente. Após a realização da indução e a manutenção anestésica com anestésico volátil diluído em oxigênio, foram executados os procedimentos cirúrgicos.

O grupo 1 e 3 receberam incisões intrasulculares nas faces vestibulares dos dentes P1, P2, P3 e P4 mandibulares e retalhos parciais foram elevados. Em seguida, após a elevação dos retalhos, as coroas foram raspadas e alisadas com curetas tipo Gracey, com posterior irrigação abundante de solução salina estéril. Posteriormente, foi adaptada a MCS sobre o periósteo da área correspondente aos pré-molares mandibulares P1 a P4, sendo da mesial do primeiro pré-molar à distal do quarto pré-molar, cerca de 1,0mm abaixo da margem gengival padronizados com o auxílio de sonda periodontal milimetrada e com 5mm de altura no sentido ocluso-apical. A MCS foi suturada através de suturas suspensórias com fios absorvíveis 5.0 (figura 2).

Figura 2: Lado teste A) início, B) incisões realizadas, C) Biomaterial removido da embalagem, D) Biomaterial inserido no leito receptor, E) biomaterial incorporando coágulo, E) suturas realizadas

No lado referente ao grupo 2 e grupo 4, retalhos parciais foram elevados e mantidos abertos pelo mesmo tempo operatório ocorrido no outro lado. Não houve inserção de biomaterial nestes grupos (figura 3). Os retalhos foram reposicionados e suturados com sutura suspensória com o mesmo tipo de fio. As suturas foram removidas após 10 dias.

Após 8 semanas nova intervenção cirúrgica foi realizada, sendo inserida a MCS mais uma vez no grupo 1 e grupo 3, conforme a descrição já realizada, com o objetivo de promover maior aumento a espessura gengival.

Figura 3: Lado controle A) pré-operatório, B) incisão realizada entre P1, P2, P3 e P4, retalho dividido elevado sem inserção do biomaterial, C) suturas realizadas

Cuidados pós-operatórios

Após a remoção das suturas, os cães receberam ração pastosa e foi administrado antibiótico Espiramicina na proporção de 1comprimido/10kg durante 10 dias e antiinflamatório na proporção de 1comprimido/20Kg durante 3 dias. Semanalmente os cães foram anestesiados para remoção do biofilme mineralizado com ultra-som e uso diário (através de spray) do digluconato de clorexidina a 0,12%.

2.5 Instalação das Próteses

Oito semanas após a realização dos procedimentos cirúrgicos, os mesmos procedimentos de sedação e anestesia foram realizados, próteses confeccionadas

em resina acrílica foram adaptadas nos P2, P3 e P4 mandibulares de ambos os lados (Grupo 1 e Grupo 2) (figura 4). As margens das próteses ficaram 1,0mm subgengivais, com o objetivo de favorecer o acúmulo de biofilme microbiano. Objetivando posterior análise histomorfométrica, foram realizadas as marcações (“*notches*”) ao nível da altura da margem gengival, nas próteses e na estrutura dental dos pré-molares, com broca esférica nº33 sob abundante irrigação com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril. Posteriormente, durante as 12 semanas seguintes os cães deixaram de receber cuidados de higiene bucal, para favorecer o acúmulo de biofilme microbiano e o desenvolvimento de retrações gengivais.

Figura 4: A) vista inicial, 8 semanas após a realização do procedimento cirúrgico, B) vista após a realização dos preparos subgengivais, C) Moldagem e produção das próteses acrílicas, D) Próteses cimentadas

2.6 Sacrifício dos Cães

Doze semanas após a inserção das próteses os cães foram sacrificados com overdose de Thiopental sódico aplicado lentamente por via endovenosa.

2.7 Processamento das Peças

As mandíbulas foram seccionadas com dois blocos ósseos de cada cão e foram fixados por no mínimo 24 horas em solução de formalina a 10% em ph 7,0 a 4°C. Posteriormente foram submetidas a banhos de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 4% em ph 7,4 sob agitação magnética frequente, com trocas da solução a cada 3 dias até a descalcificação das peças (figura 5). Constatada a descalcificação das peças, estas foram lavadas por 12 horas em água corrente seguidas por três lavagens em água destilada, depois foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool a 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% por duas horas cada. Posteriormente foram inseridas em uma solução contendo uma mistura de partes iguais de álcool e xilol, para realizar a diafanização, trocando a solução a cada duas horas Depois de totalizar três trocas foi realizada a inclusão em parafina.

Com o micrótomo, foram realizados cortes no plano vestibulo/lingual com espessura de 7 μ m (figura 6).

Figura 5: Descalcificação com EDTA, a 4% em pH 7,4 sob agitação magnética frequente, com trocas da solução a cada 3 dias até a decalcificação das peças.

Figura 6: Lâminas montadas após as peças serem cortadas no micrótomo com espessura de 7 μ m.

2.8 Análises Clínicas e Laboratoriais

Análise Clínica

Previamente aos procedimentos cirúrgicos para inserção das MCS, foram realizadas moldagens bilaterais dos elementos dentários, para posterior confecção de duas placas de acetato de 1mm de espessura, uma para cada lado da mandíbula e com extensão de molar a canino. Nas placas, foram realizadas três marcações na vestibular do P1, P2, P3 e P4, com o objetivo de estabelecer de forma padronizada os locais para as medições da espessura de mucosa queratinizada, que foi realizada com o auxílio de uma agulha anestésica com marcador de silicone (“stop”) (figura 7 e 8). Esta perfurou a mucosa até tocar o tecido ósseo, sendo esta medida transferida para um paquímetro digital. Foram feitas marcações no centro de cada dente, para determinar a altura do tecido queratinizado, altura e largura das retrações gengivais sendo estas medidas realizadas com paquímetro digital.

Figura 7: Ilustração referente as perfurações realizadas no centro de cada dente, nas placas de acetato, para permitir padronizar as tomadas das espessuras gengivais..

Medidas de espessura gengival foram realizadas em três pontos diferentes, sempre no centro da face livre de cada elemento dentário avaliado. Logo, estas medidas foram tomadas a 1mm abaixo da margem gengival (espessura 1), 1mm acima da linha mucogengival (espessura 2) e 1mm abaixo da linha mucogengival (espessura 3). Estas medidas clínicas em pontos diferentes são importantes para detectar mudanças em tecido gengival que possam acontecer após os procedimentos cirúrgicos e instalação das próteses, pois, podem ocasionar mudança da posição da linha mucogengival e também da margem gengival em relação à junção cimento-esmalte. Desta maneira pode-se padronizar as medidas de espessura de acordo com a margem gengival e linha mucogengival.

Figura 8: A) antes da inserção do guia para realização da medida de espessura, B) instalação do guia, C) medida realizada com uso de agulha e “stop” de silicone.

Também foi quantificada a profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e altura do tecido queratinizado. Todas as medidas foram realizadas no pré-operatório, 8 semanas após a cirurgia, sendo este o momento da inserção da prótese e 12 semanas após o procedimento protético (momento da eutanásia).

Análise Histológica e Histomorfométrica

A histologia e histomorfometria foram realizadas por um único examinador, cego para os grupos de estudo. Cinco cortes representativos de cada área foram selecionados a uma distância de 70 μm entre eles (figura 9). Foram realizadas colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) (figura 9) e Tricrômico de Masson (TM) (figura 10) e Sirius Red (figura 11). As imagens desses cortes foram obtidas por microscópio de luz e captadas por um programa de computador apropriado – Leica Qwin², onde as medidas foram feitas pelo programa Image Tool³ e os dados armazenados.

² Leica DC 300F, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany.

³ Image-Pro Plus, Media Cybernetics, LP, Silver Spring, USA.

Figura 9: Coloração em Hematoxilina e Eosina. Lado direito grupo 1 e lado esquerdo grupo 2.

Figura 10: Coloração em Tricrômico de Masson. Lado direito grupo 1 e lado esquerdo grupo

Figura 11: Coloração Sirius Red sem luz polarizada A- grupo 1, B- grupo 2. Com luz polarizada, evidenciando as fibras colágenas e estruturas mineralizadas C- grupo 1, D- grupo2.

Figura 12: Coloração em Hematoxilina e Eosina. A- grupo 1, B- grupo 2, C- grupo 3, D- grupo 4. A linha preta representa o comprimento da retração gengival, a linha verde representa a medida do epitélio juncional e a linha azul representa o comprimento da inserção conjuntiva.

Os parâmetros histomorfométricos avaliados em tecido mole neste estudo foram: distância da margem gengival ao *notch*, distância do *notch* até a crista óssea, comprimento da inserção conjuntiva, comprimento do epitélio juncional, espessura do tecido conjuntivo abaixo do epitélio oral ao nível do sulco gengival, espessura do tecido conjuntivo abaixo do epitélio oral ao nível apical do epitélio juncional e espessura do tecido conjuntivo abaixo do epitélio oral ao nível da crista óssea.

Os parâmetros histomorfométricos avaliados em tecido mineralizado neste estudo foram: distância da margem gengival até a crista óssea, área óssea total

(soma da área óssea medular e cortical), área óssea medular e área óssea cortical a 1mm da crista óssea, espessura óssea total 1mm abaixo da crista óssea, espessura do tecido ósseo medular a 1mm abaixo da crista óssea, espessura do tecido ósseo cortical a 1mm abaixo da crista óssea.

Figura 13: Aplicativo utilizado para a realizações das medidas lineares e de área para as variáveis em tecido mole e mineralizado.

Análise Imunohistoquímica

Dois cortes não corados de cada elemento dentário de cada grupo foram preparados imunohistoquimicamente com anticorpos para CD4, CD8 e para macrófagos, objetivando determinar a quantidade destas células de defesa e sua relação com a inflamação causada pelo acúmulo de biofilme microbiano nos grupos estudados. Anticorpos para citoqueratina 4, citoqueratina 10 também foram usados para quantificar e qualificar a queratinização dos tecidos do periodonto de proteção.

Para isto a parafina foi removida dos cortes selecionados com xilol e os cortes foram hidratados com soluções alcoólicas em concentrações decrescentes (três minutos cada: 100% com xilol e depois soluções puras de álcool a 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%). Os cortes foram então lavados em água destilada (três banhos de um minuto), depois foram lavados em solução salina tamponada fosfatada (PBS) (três banhos de cinco minutos cada) e foram tratados com soro bovino contendo albumina (BSA) a 2% em PBS (dez minutos) e BSA a 1% em PBS (dez minutos).

Figura 14: Lâminas separadas para receber as colorações com anticorpos

Foi realizada a titulação dos anticorpos, para determinar a melhor proporção a ser utilizada dos mesmos. Assim os anticorpos (antígeno anti-cão CD14 de camundongo⁴, antígeno anti- cão CD8 de camundongo⁵, antígeno anti- cão CD4 de camundongo⁶, antígeno anti- cão citoqueratina 4 de camundongo e antígeno anti- cão citoqueratina 10 de camundongo) foram incubados em PBS + BSA por uma hora

⁴ Lifespan Biosciences, Seattle, WA, EUA

⁵ Lifespan Biosciences, Seattle, WA, EUA

⁶ Lifespan Biosciences, Seattle, WA, EUA

de acordo com a proporção determinada pela titulação. Os cortes foram lavados em PBS (três banhos de 5 minutos cada), e os anticorpos secundário foram aplicados (antígeno anti-camundongo⁷). A incubação foi realizada na proporção de 1:50 PBS por trinta minutos. Os cortes foram novamente lavados em PBS (três banhos de cinco minutos cada), incubados com uma solução reveladora por dez minutos, banhadas em água corrente por dez minutos e contra corados com hematoxilina por trinta minutos. Posteriormente foram aplicados os respectivos anticorpos secundários e se efetuada a revelação.

Figura 15: Aplicação dos anticorpos primários.

⁷ Lifespan Biosciences, Seattle, WA, EUA

Figura 16: Aplicação dos anticorpos secundários.

Depois de corados, os cortes foram desidratados em uma série de banhos em soluções de concentração crescente de etanol (dois minutos para cada concentração de etanol): 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Finalmente, os cortes foram limpos com xilol (cinco minutos, feito duas vezes) e montados com Permount⁸.

Figura 17: Marcação para CD4.

⁸ Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA

Figura 18: Marcação para CD8.

Figura 19: Marcação para macrófago.

Figura 20: Marcação para citoqueratina 10 no nível do sulco gengival.

Figura 21: Marcação para citoqueratina 10 maior aumento. Ausência de marcação abaixo da linha mucogengival.

Posteriormente a contagem das células coradas positivamente foi feita em dois campos microscópicos, em aumento de 400 vezes. Foram selecionados campos microscópicos contíguos e sucessivos na área correspondente ao sulco gengival, epitélio juncional e crista óssea, próximo às próteses e as marcações realizadas (“*notches*”). Somente foram contadas as células que apresentaram marcação completa da membrana citoplasmática e do núcleo celular. A partir da contagem de cada campo, foi obtida a média da lâmina, a qual foi utilizada na análise estatística.

As medidas lineares foram realizadas através do software já citado para determinar os valores das variáveis analisadas na histomorfometria.

2.9 Análise Estatística

Dados quantitativos foram registrados como média e desvios-padrão. A normalidade dos dados foi confirmada pelas curvas de curtose e distorção. Dados considerados normais (dados clínicos) para os parâmetros analisados receberam o teste ANOVA de um fator - utilizado para comparações entre grupos e intra grupos. No caso de significância, o subteste de Tukey foi utilizado para comparação múltipla. Um nível de significância de 0,05 foi empregado para todas comparações estatísticas. Para dados considerados anormais (dados histomorfométricos e imunohistoquímicos) foi utilizado o teste de Kruskal Wallis - utilizado para comparações entre grupos e intra grupos. No caso de significância, o subteste de Dunn foi utilizado para comparação múltipla.

3 Resultados

3.1 Resultados Clínicos

No total 64 dentes foram operados em modelo de boca dividido em 8 cães, divididos em 4 Grupos. Os resultados clínicos obtidos em três tempos diferentes (antes da cirurgia para aumento de espessura gengival, antes da instalação da prótese e antes do sacrifício), de acordo com as diversas variáveis estão dispostas nas tabelas abaixo (tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Tabela 1 – Espessura gengival medida 1mm abaixo da margem gengival, análise entre e intra Grupos.

Espessura 1		p entre grupos									
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
	Baseline (A)	1.53±0.24	1.48±0.12	1.30±0.17	1.46±0.19	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Prótese (B)	2.94±0.23	1.83±0.09	2.42±0.43	1.50±0.20	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.05	ns	< 0.01
	Sacrifício (C)	2.76±0.23	1.76±0.08	2.00±0.22	1.58±0.34	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns	ns	ns
p intra grupos	A x B	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns						
	A x C	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns						
	B x C	ns	ns	ns	ns						

Tabela 2 – Espessura gengival medida 1mm acima da linha muco-gengival, análise entre e intra Grupos.

Espessura 2		p entre grupos									
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
	Baseline (A)	1.54±0.25	1.64±0.25	1.47±0.23	1.53±0.20	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Prótese (B)	3.12±0.23	1.84±0.11	3.15±0.25	1.71±0.14	< 0.01	ns	< 0.01	< 0.01	ns	< 0.01
	Sacrifício (C)	2.83±0.36	1.89±0.07	2.46±0.29	1.81±0.33	< 0.01	ns	< 0.01	< 0.01	ns	< 0.01
p intra grupos	A x B	< 0.01	ns	< 0.01	ns						
	A x C	< 0.01	ns	< 0.01	ns						
	B x C	ns	ns	< 0.01	ns						

Tabela 3 – Espessura gengival medida 1mm abaixo da linha muco-gengival, análise entre e intra Grupos.

Espessura 3		p entre grupos									
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
p intra grupos	Baseline (A)	1.52±0.15	1.32±0.07	1.57±0.25	1.54±0.24	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Prótese (B)	2.87±0.26	1.64±0.11	3.14±0.23	1.71±0.14	< 0.01	ns	< 0.01	< 0.01	ns	< 0.01
	Sacrifício (C)	2.60±0.19	1.52±0.14	2.46±0.29	1.81±0.33	< 0.01	ns	< 0.01	< 0.01	ns	< 0.01
	A x B	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns						
	A x C	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns						
	B x C	ns	ns	< 0.01	ns						

Tabela 4 – Altura do tecido queratinizado, análise entre e intra Grupos.

Altura do tecido queratinizado		p entre grupos									
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
p intra grupos	Baseline (A)	4.65±0.32	4.79±0.74	2.88±0.22	3.06±0.48	ns	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns
	Prótese (B)	4.83±0.50	5.08±0.73	2.63±0.63	3.50±0.75	ns	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns
	Sacrifício (C)	4.92±0.50	5.08±0.67	2.63±0.67	3.00±0.50	ns	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns
	A x B	ns	ns	ns	ns						
	A x C	ns	ns	ns	ns						
	B x C	ns	ns	ns	ns						

Tabela5 – Profundidade de sondagem, análise entre e intra Grupos.

Profundidade de sondagem		p entre grupos									
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
p intra grupos	Baseline (A)	1.54±0.29	1.54±0.38	2.13±0.22	2.00±0.00	ns	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns
	Prótese (B)	1.79±0.26	1.67±0.33	1.88±0.22	2.25±0.38	ns	ns	ns	ns	< 0.05	ns
	Sacrifício (C)	2.00±0.00	2.00±0.00	2.13±0.44	2.00±0.00	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	A x B	ns	ns	ns	ns						
	A x C	< 0.05	< 0.05	ns	ns						
	B x C	ns	ns	ns	ns						

Tabela 6 – Nível clínico de inserção, análise entre e intra Grupos.

Nível clínico de inserção		p entre grupos									
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
p intra grupos	Baseline (A)	1.54±0.29	1.54±0.38	2.13±0.22	2.00±0.00	ns	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.05	ns
	Prótese (B)	1.79±0.26	1.67±0.33	1.88±0.22	2.25±0.38	ns	ns	ns	ns	< 0.05	ns
	Sacrifício (C)	2.00±0.00	3.06±0.09	2.13±0.44	2.13±0.22	ns	ns	ns	< 0.01	< 0.01	ns
	A x B	ns	ns	ns	ns						
	A x C	< 0.05	< 0.01	ns	ns						
	B x C	ns	< 0.01	ns	ns						

As tabelas abaixo (tabelas 7, 8, e 9) apresentam em porcentagem o aumento da espessura de acordo com o tempo em que as medidas foram realizadas, quando comparadas com o valor inicial (baseline).

Tabela 7 – Aumento da espessura gengival medida 1 mm abaixo da margem gengival em porcentagem através da comparação entre o valor inicial e o tempo de análise.

	Espessura 1	%	±	p entre grupos									
				Grupo 1 (teste)	Grupo 2 (controle)	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
p intra grupos	Prótese - Baseline (A)	96.77±28.87	24.52±9.93	93.80±56.11	4.87±17.46	< 0.05	ns	< 0.05	ns	ns	< 0.05		
	Sacrificio - Baseline (B)	85.00±23.85	20.57±10.35	56.26±19.04	8.30±17.86	< 0.05	ns	< 0.05	ns	ns	< 0.05		
	Sacrificio - Prótese (C)	-5.65±7.97	-3.07±4.55	-13.80±17.24	7.35±24.16	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
	A x B	ns	ns	ns	ns								
	A x C	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ns								
	B x C	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ns								

Tabela 8 – Aumento da espessura gengival medida 1 mm acima da linha muco gengival em porcentagem através da comparação entre o valor inicial e o tempo de análise.

Espessura 2	%	±	p entre grupos									
			Grupo 1 (teste)	Grupo 2 (controle)	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
p intra grupos	Prótese - Baseline (A)	109.82±32.60	15.66±19.89	121.35±32.47	14.54±14.75	< 0.05	ns	< 0.05	ns	ns	ns	
	Sacrificio - Baseline (B)	90.64±41.23	19.22±19.78	78.06±49.16	20.25±23.18	< 0.05	ns	ns	< 0.05	ns	< 0.05	
	Sacrificio - Prótese (C)	-9.46±8.15	3.69±9.01	-21.10±12.03	6.60±21.41	ns	ns	ns	< 0.05	ns	ns	
	A x B	ns	ns	ns	ns							
	A x C	< 0.05	ns	< 0.05	ns							
	B x C	< 0.05	ns	< 0.05	ns							

Tabela 9 – Aumento da espessura gengival medida 1 mm abaixo da linha muco gengival em porcentagem através da comparação entre o valor inicial e o tempo de análise.

	Espessura 3	%	±	p entre grupos									
				Grupo 1 (teste)	Grupo 2 (controle)	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
p intra grupos	Prótese - Baseline (A)	92.64±23.99	25.04±11.33	72.73±28.13	14.60±18.15	< 0.05	ns	< 0.05	ns	ns	< 0.05		
	Sacrificio - Baseline (B)	75.51±26.86	16.01±10.54	33.26±11.38	18.73±18.99	< 0.05	ns	< 0.05	ns	ns	ns		
	Sacrificio - Prótese (C)	-8.36±9.35	-6.73±9.24	-20.77±11.79	6.60±21.41	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
	A x B	ns	ns	ns	ns								
	A x C	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ns								
	B x C	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ns								

3.2 Resultados Laboratoriais

Os resultados obtidos nas análises histomorfométricas e imunohistoquímicas estão apresentados nas tabelas abaixo (tabelas 10, 11 e 12).

Tabela 10 – Parâmetros histomorfométricos (tecido mole).

	Grupo 1	Grupo2	Grupo 3	Grupo 4	p					
					G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
Distância margem gengival ao notch (retração gengival)	0.24 ± 0.21	0.94 ± 0.25	0.46 ± 0.05	0.55 ± 0.18	< 0.05	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Distância do notch ate crista óssea	2.60 ± 0.58	2.93 ± 0.54	2.98 ± 0.21	2.15 ± 0.433	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05
Tamanho da inserção conjuntiva	1.07 ± 0.14	1.09 ± 0.28	1.59 ± 0.02	0.61 ± 0.17	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05
Tamanho do epitélio juncional	1.00 ± 0.35	1.16 ± 0.27	0.68 ± 0.02	2.06 ± 0.39	Ns	Ns	< 0.05	Ns	Ns	< 0.05
Espessura do conjuntivo abaixo do epitélio oral - nível sulco	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.07	0.11 ± 0.05	0.41 ± 0.11	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05
Espessura do conjuntivo abaixo do epitélio oral - nível apical do ep. juncional	1.30 ± 0.26	1.23 ± 0.16	0.96 ± 0.13	1.66 ± 0.13	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05
Espessura do conjuntivo abaixo do epitélio oral - nível crista óssea	1.73 ± 0.42	1.49 ± 0.36	1.07 ± 0.44	2.39 ± 0.67	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05	< 0.05

Tabela 11 – Parâmetros histomorfométricos (tecido duro).

	1	2	3	4	p					
	Grupo 1	Grupo2	Grupo 3	Grupo 4	G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
Margem gengival até a crista óssea	2.81 ± 0.34	2.81 ± 0.27	3.32 ± 0.29	2.922 ± 0.21	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Área óssea total	0.36 ± 0.09	0.41 ± 0.09	0.60 ± 0.20	0.38 ± 0.09	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Osso Medular	0.29 ± 0.08	0.33 ± 0.10	0.47 ± 0.17	0.29 ± 0.09	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Osso Cortical	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.10 ± 0.02	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Espessura óssea total 1mm abaixo da crista	0.58 ± 0.14	0.55 ± 0.08	0.89 ± 0.23	0.64 ± 0.16	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Espessura óssea Medular 1mm abaixo da crista	0.51 ± 0.14	0.47 ± 0.08	0.78 ± 0.21	0.55 ± 0.15	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Espessura óssea Cortical 1mm abaixo da crista	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.01	NS	< 0.05	NS	NS	NS	NS

Tabela 12 – Quantificação das células inflamatórias.

	Grupo 1	Grupo2	Grupo 3	Grupo 4	p					
					G1 x G2	G1 x G3	G1 x G4	G2 x G3	G2 x G4	G3 x G4
CD4	22.42 ± 8.08	22.00 ± 8.05	19.00 ± 7.00	22.47 ± 8.84	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
CD8	2.89 ± 0.59	2.50 ± 0.50	4.45 ± 0.23	5.19 ± 2.7	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Macrófagos	13.08 ± 7.92	24.00 ± 1.33	16.17 ± 3.56	11.64 ± 5.47	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05	Ns

4 Discussão

A perda de elementos dentários leva a necessidade de sua reposição seja com próteses ou implantes osseointegráveis. A união destas próteses em dentes ou implantes frequentemente fica subgingival levando a inflamação gengival que pode causar retrações gengivais, principalmente quando a quantidade de mucosa queratinizada é inferior a 2mm⁴. Embora tenha sido demonstrado que em áreas sem inflamação não existe uma quantidade mínima de tecido queratinizado para manter a inserção clínica^{7; 8; 25; 26}, sabe-se que mesmo populações bem instruídas e com alto grau de higiene bucal possuem inflamação gengival em áreas com próteses subgingivais^{6; 17}. Desta forma a questão sobre a quantidade suficiente de tecido queratinizado ao redor de dentes para a manutenção periodontal, a longo prazo, com saúde ainda é controversa^{27; 28}.

Atualmente tem sido relatado que tecidos gengivais queratinizados ao redor de dentes ou na presença de próteses subgingivais são importantes para a saúde bucal²⁸. Outros autores^{25; 29; 30} sugerem no mínimo 2mm de tecido queratinizado ao redor de dentes para que seja mantido 1mm de gengiva inserida e seja possível manter saúde periodontal. Em um estudo prospectivo de 10 anos³¹ demonstraram que a falta de tecido queratinizado aumenta significativamente a taxa de inflamação gengival, perda de inserção clínica e retração gengival. Em próteses fixas parciais sobre dentes com menos de 1mm de tecido queratinizado, o uso de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial (ETCS) aumenta significativamente a espessura gengival, favorecendo o controle do acúmulo de placa, reduzindo inflamação gengival e perda de inserção clínica quando comparado com dentes na mesma situação sem enxertos gengivais³². A matriz colágena suína (MCS) que já tem

mostrado resultados promissores para aumento da faixa de tecido queratinizado ^{2; 28;} ³³, assim como para ganho de espessura ^{33; 34} e para recobrimento radicular ^{35; 36; 37}, pode ser indicada como um substituto de ETCS para prevenir inflamação gengival em próteses fixas subgengivais.

Neste trabalho a altura do tecido queratinizado não foi modificada após os tratamentos clínicos (tabela 4), no entanto, o Grupo 1 e 2 apresentaram em todos os tempos clínicos maior quantidade de tecido queratinizado em espessura quando comparados aos Grupos 3 e 4. Isto ocorre devido os primeiros pré-molares (Grupo 3 e 4) dos cães apresentarem menor altura de tecido queratinizado do que os demais dentes tratados durante a pesquisa, o que foi sugerido por Lorenzo e colaboradores em 2012 ²⁸, e devido as áreas mandibulares apresentarem inserções musculares altas que limitam a quantidade de tecido queratinizado e até mesmo os ganhos com enxertos gengivais caso fossem utilizados. No entanto, a MCS tem mostrado aumento da quantidade de tecido queratinizado em outros trabalhos. Jung e colaboradores em 2011³³ em modelo suíno deixaram duas formulações diferentes de MCS expostas ao meio bucal com o objetivo de criar uma faixa de tecido queratinizado e afirmou que a MCS pode atuar como um arcabouço para permitir que fibroblastos, vasos sanguíneos e epitélio cresçam sobre a mesma, se transformando em tecido queratinizado. Herford e colaboradores em 2010 ³⁸ em modelo humano deixaram a MCS exposta ao meio bucal e afirmaram que a MCS é uma alternativa viável para enxertos gengivais autógenos para ganho de tecido queratinizado. Lorenzo e colaboradores em 2012 ²⁸ também em modelo humano comparou ETCS e MCS para ganho de tecido queratinizado, mostrando que a MCS pode ser um substituto eficiente para ETCS quando o objetivo é formar tecido queratinizado. Outros autores mostraram que a MCS usada para recobrimento

radicular foi capaz de aumentar a faixa de tecido queratinizado ^{35; 36; 37}. As diferenças entre os resultados obtidos neste trabalho com os demais da literatura podem ser devido às diferenças inerentes aos modelos clínicos testados, pois os resultados obtidos em animais não podem ser extrapolados diretamente para o modelo humano e vice versa. Além do mais, os trabalhos que mostraram ganho de tecido queratinizado em modelo animal, utilizaram a MCS exposta ao meio bucal, diferente deste trabalho que a utilizou subgengivalmente.

Quando a MCS foi usada em modelo suíno para o tratamento de retrações gengivais classe I de Miller, a MCS foi inserida subgengivalmente ³⁹, após 3 meses não houve ganho de tecido queratinizado, corroborando os resultados obtidos por este trabalho. As análises imunohistoquímicas realizadas, para citoqueratina 4 e 10 podem detectar a presença de queratinização nos tecidos. O tecido gengival expressa as citoqueratinas 1, 2, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 16 e 17 ⁴⁰(. No entanto, a mucosa oral, não queratinizada expressa em maior parte a citoqueratina 4, enquanto a gengiva de proteção, queratinizada, expressa em maior quantidade a citoqueratina 10 ⁴¹. Nas regiões onde a MCS foi inserida cirurgicamente neste estudo, compreendendo da margem gengival até abaixo da linha mucogengival, pode-se constatar que a citoqueratina 4 ficou presente abaixo da linha mucogengival e a citoqueratina 10 expressa acima da linha mucogengival. Desta maneira a MCS tanto nos Grupos que receberam a MCS (Grupo 1 e 3) assim como os demais Grupos que não a receberam (Grupo 2 e 4), não aumentou ou diminuiu a queratinização dos tecidos, confirmando os achados clínicos. Possivelmente a MCS não é capaz de gerar a queratinização espontaneamente, pelo menos quando inserida subgengivalmente, ou seja, depende de células pré-existentes no leito receptor, as quais precisam estar presentes mais superficialmente, o que explicaria seus

resultados positivos para queratinização quando é utilizada exposta ao meio bucal. Até o presente momento não existem trabalhos que tenham feito testes similares através do uso de citoqueratinas em análise imunohistoquímica, para verificar o padrão de queratinização da MCS, para que seja possível comparação direta dos dados.

Existem indícios clínicos que a espessura gengival é tão importante ou até mesmo mais importante que a altura do tecido queratinizado como parâmetro a ser avaliado para prevenir a incidência de inflamação gengival e retrações gengivais. Tecidos gengivais espessos são desejáveis por afetar positivamente o resultado de implantes, devido aos tecidos gengivais espessos serem mais resistentes aos desafios mecânicos e químicos, sendo menos suscetíveis a retrações gengivais e por permitir manipulação tecidual com próteses ^{42; 43}.

Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas em espessura gengival 1, 2 e 3, demonstrando que o uso da MCS foi capaz de aumentar a espessura gengival no Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3, o que não aconteceu no Grupo 4. Quando os resultados obtidos neste trabalho são tratados para expressar os valores em porcentagem (tabelas 7, 8 e 9), pode-se confirmar que houve aumento da espessura gengival. O Grupo 1 apresentou aumentos superiores a 75% em todas as análises. A presença de prótese subgengival é capaz de gerar uma hiperplasia gengival como resposta inflamatória à presença da prótese, mesmo sem o uso da MCS (Grupo 2). Mas esse ganho em espessura foi menor do que o obtido no Grupo 1 e 3 nos quais a MCS foi utilizada. O Grupo 1 apresentou maior ganho de espessura que os demais Grupos, o que pode ser devido a associação da MCS com a prótese subgengival. Estes resultados diferem-se dos apresentados por Thoma e colaboradores em 2011⁴⁴ que objetivaram aumentar o volume do rebordo com a

MCS em modelo canino, comparando com o ETCS como controle. Os resultados destes autores mostraram que a MCS apresenta resultado limitado quando usada para aumento de volume de tecido conjuntivo, sendo insuficiente para correção de deformidades de rebordo. Embora não tenha ocorrido aumento da quantidade de tecido conjuntivo em espessura, houve aumento do volume, pois a MCS permitiu a formação de novo tecido ósseo, logo este tecido ósseo junto ao tecido conjuntivo formado foram capazes de aumentar o volume do rebordo. Por outro lado, outros estudos demonstraram ganhos de espessura, em modelo humano em estudo multicêntrico para recobrimento radicular, Jepsen e colaboradores em 2013 ³⁷ mostraram que houve maior ganho de espessura gengival e de tecido queratinizado quando se usou MCS em recobrimento radicular, quando comparada com o mesmo tratamento sem o seu uso. Jung e colaboradores em 2010 ³³ em miniporcós mostraram que mesmo após 6 meses houve aumento da espessura e da faixa de tecido queratinizado quando a MCS foi utilizada.

Em relação à profundidade de sondagem (tabela 5) os Grupos 3 e 4 possuíram maiores valores do que os Grupos 1 e 2, mas com valores inferiores a 3mm e sem sinal de doença, possivelmente devido a falta de tecido queratinizado e presença de inserção muscular. Os Grupos 1 e 2 também não apresentaram sinais de doença, mesmo quando apresentaram aumento da profundidade de sondagem isto é, no momento do sacrifício, eles foram inferiores a 3mm. A ausência de diferenças estatísticas na profundidade de sondagem após o uso da MCS também foi relatada em modelo humano por Lorenzo e colaboradores em 2012 ²⁸, Cardarapoli e colaboradores em 2012 ³⁶, McGuire e colaboradores em 2010 ³⁵ e Sanz colaboradores em 2009 ². Embora as próteses subgengivais não tenham gerado aumento da profundidade de sondagem, houve perda de inserção clínica nos

Grupos 1 e 2 (tabela 6). Clinicamente apenas no grupo 1 não foram presenciadas formações de retrações gengivais, mesmo com a perda de inserção clínica, por outro lado ocorreu retração gengival em 100% dos casos no grupo 2. Desta forma, o aumento da espessura gengival pode ter influenciado positivamente, evitando a percepção clínica da retração gengiva. Em contrapartida isso não ocorreu nos Grupos 3 e 4, os quais não receberam próteses. Esta perda de inserção clínica é identificada clinicamente como retração gengival nos Grupos 1 e 2, sendo os valores inferiores a 3mm para o Grupo 1, mas superiores a 3mm para o Grupo 2. Devido à ausência de trabalhos similares na literatura, principalmente em modelo animal, não é possível comparações diretas, mas estes resultados demonstram que o uso da MCS foi capaz de aumentar a espessura gengival, sendo capaz de diminuir a incidência e gravidade de retrações gengivais quando próteses fixas subgengivais são utilizadas, em modelo animal. Este resultado pode ser possível devido a maior espessura gengival ser capaz de prevenir perda de inserção clínica assim como pelas propriedades da MCS que poderiam atuar, com efeito, barreira permitindo a ocorrer regeneração tecidual guiada.

A possibilidade de a MCS atuar como barreira e poder gerar o efeito regenerativo foi descrita por Ghanaati e colaboradores⁴⁵. Em modelo animal foi verificado histologicamente que a MCS era capaz de bloquear as células epiteliais, atuando como arcabouço e permitindo o crescimento de fibroblastos, vasos sanguíneos e até mesmo osteoblastos, regenerando tecido conjuntivo e tecido ósseo. Esta capacidade da MCS foi confirmada por Vignoletti e colaboradores em 2011³⁹ em modelo suíno, onde histologicamente a MCS permitiu em recobrimento radicular a formação de cemento radicular e diminuição do epitélio juncional, caracterizando a regeneração tecidual.

A análise histomorfométrica dos tecidos moles (tabela 10) confirmou os achados clínicos, detectando que houve perda de inserção conjuntiva, ou seja, retração gengival, a qual foi superior no Grupo 2 quando comparada ao Grupo 1. O Grupo 3 e 4 apresentaram perda de inserção que pode ser devido a inserção muscular e menor quantidade de tecido queratinizado dos primeiros pré molares dos cães. Logo a MCS permitiu aumento de espessura gengival que preveniu a formação de retração gengival no Grupo 1 quando comparado ao Grupo 2, confirmando os achados clínicos. O Grupo 3 apresentou menor epitélio juncional e maior inserção conjuntiva que os demais Grupos, possivelmente a MCS pode ter favorecido a ocorrência de regeneração tecidual guiada na região confirmando os achados de outros autores ^{33; 34; 45}. Porém estes benefícios não foram detectados no Grupo 1 o qual recebeu prótese subgengival. Em relação à espessura de tecido gengival nas três regiões medidas, pode-se verificar que o Grupo 4 apresentou maiores valores, o que poderia ser devido a própria capacidade de formação de tecido quando um retalho é elevado e devolvido ao local de origem, como já descrito na literatura ^{46; 47}.

A análise histomorfométrica dos tecidos mineralizados (tabela 11) não apresentou diferença estatística para os parâmetros estudados, no entanto, comparando-se o Grupo 1 e Grupo 3 houve maior espessura óssea cortical 1 mm abaixo da crista óssea. Este resultado pode estar de acordo os achados de outros autores ^{44; 45} sobre a capacidade de regeneração tecidual da MCS quando aplicada subepitelialmente. Além disto, a falta de diferença estatística nas variáveis estudadas na análise histomorfométrica dos tecidos mineralizados permite inferir que a quantidade e qualidade do tecido ósseo, não foi capaz de favorecer ou dificultar a incidência de retrações gengivais. Quanto a presença de CD4 e CD8 não

houve diferença estatística entre os Grupos. Mesmo nos Grupos 1 e 2 que receberam próteses subgengivais, a presença das próteses 1mm abaixo da margem gengival pode ter gerado processo inflamatório em períodos anteriores ao sacrifício, por isso estas células não puderam ser identificadas durante a análise imunohistoquímica. A literatura relata que a cicatrização dos tecidos gengivais quando a MCS é inserida submersa é mais rápida do que quando deixada exposta ao meio bucal ⁴⁸. Além disso, em análise histológica foi demonstrado que aos 30 dias não existe mais MCS quando submersa ^{39; 48}. Segundo Thoma e colaboradores em 2011 ⁴⁴ a remodelação dos tecidos adjacentes a MCS ocorre entre 28 e 84 dias, ou seja, em até 84 dias irá ocorrer uma cicatrização dos tecidos modificados, o que explicaria a perda do volume ganho com a MCS após 3 a 6 meses em modelo animal ³⁴ e até mesmo humano.

O número de macrófagos só apresentou diferença estatística entre os Grupos 2 e 4, a hipótese que poderia explicar este resultado seria o aumento de espessura que a MCS permitiu no Grupo 1 e 3 assim como o possível efeito regenerativo da mesma, benefícios que não se aplicaram ao Grupo 2 e 4 por não ter sido usada a MCS. Logo o maior número de macrófagos presente no Grupo 2 poderia ser explicado por um processo de defesa inespecífico contra biofilme microbiano, pois este Grupo foi o que apresentou maior retração gengival, o que facilitaria acúmulo de biofilme. No entanto, não existe diferença estatística entre a contagem destas células entre os Grupo 1, 2 e 3. Em geral a presença de linfócitos, macrófagos e demais células de defesa tem sido associadas à presença de próteses ou restaurações subgengivais, devido à capacidade de acúmulo de biofilme microbiano e modificação da microbiota subgengival, tornando-a anaeróbia e Gram negativa ¹⁴.

A falta de diferença estatística obtida neste estudo pode ter ocorrido devido ao menor número de amostras. No entanto, este estudo não seria passível de execução em ratos, cobaias ou demais animais de pequeno porte. Estudos com metodologias diferentes, futuramente poderão complementar os resultados obtidos neste estudo.

Conclusão

5 Conclusão

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que o uso da MCS não causou nenhum prejuízo aos tecidos periodontais e foi eficaz na redução da ocorrência de retrações gengivais em dentes que receberam próteses subgengivais em modelo experimental canino. A MCS foi capaz de aumentar a espessura gengival clinicamente, mas não apresentou diferenças estatísticas significantes nas análises histológicas. A MCS não causou problemas inflamatórios e pode atuar como barreira em processos de regeneração tecidual guiada para tecidos moles.

Referências Bibliográficas

6 Referências bibliográficas

- ¹ SANAVI, F.; WEISGOLD, A. S.; ROSE, L. F. Biologic width and its relation to periodontal biotypes. **J Esthet Dent**, v. 10, n. 3, p. 157-63, 1998.
- ² SANZ, M. et al. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 10, p. 868-76, Oct 2009.
- ³ MULLER, H. P.; EGER, T. Masticatory mucosa and periodontal phenotype: a review. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 22, n. 2, p. 172-83, Apr 2002.
- ⁴ STETLER, K. J.; BISSADA, N. F. Significance of the width of keratinized gingiva on the periodontal status of teeth with submarginal restorations. **J Periodontol**, v. 58, n. 10, p. 696-700, Oct 1987.
- ⁵ MAYNARD, J. G., JR.; WILSON, R. D. Physiologic dimensions of the periodontium significant to the restorative dentist. **J Periodontol**, v. 50, n. 4, p. 170-4, Apr 1979.
- ⁶ KOKE, U. et al. A possible influence of gingival dimensions on attachment loss and gingival recession following placement of artificial crowns. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 23, n. 5, p. 439-45, Oct 2003.
- ⁷ DORFMAN, H. S.; KENNEDY, J. E.; BIRD, W. C. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. **J Clin Periodontol**, v. 7, n. 4, p. 316-24, Aug 1980.
- ⁸ WENNSTROM, J.; LINDHE, J. Role of attached gingiva for maintenance of periodontal health. Healing following excisional and grafting procedures in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 10, n. 2, p. 206-21, Mar 1983.
- ⁹ WENNSTROM, J.; LINDHE, J.; NYMAN, S. Role of keratinized gingiva for gingival health. Clinical and histologic study of normal and regenerated gingival tissue in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 8, n. 4, p. 311-28, Aug 1981.
- ¹⁰ WENNSTROM, J.; LINDHE, J.; NYMAN, S. The role of keratinized gingiva in plaque-associated gingivitis in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 9, n. 1, p. 75-85, Jan 1982.
- ¹¹ OLIVER, R. C.; BROWN, L. J.; LOE, H. Periodontal diseases in the United States population. **J Periodontol**, v. 69, n. 2, p. 269-78, Feb 1998.
- ¹² SCHATZLE, M. et al. The influence of margins of restorations of the periodontal tissues over 26 years. **J Clin Periodontol**, v. 28, n. 1, p. 57-64, Jan 2001.
- ¹³ SILNESS, J. Periodontal conditions in patients treated with dental bridges. 2. The influence of full and partial crowns on plaque accumulation, development of gingivitis and pocket formation. **J Periodontal Res**, v. 5, n. 3, p. 219-24, 1970.
- ¹⁴ LANG, N. P.; KIEL, R. A.; ANDERHALDEN, K. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. **J Clin Periodontol**, v. 10, n. 6, p. 563-78, Nov 1983.
- ¹⁵ SILNESS, J. Periodontal conditions in patients treated with dental bridges. **J Periodontal Res**, v. 5, n. 1, p. 60-8, 1970.
- ¹⁶ ERICSSON, I.; LINDHE, J. Recession in sites with inadequate width of the keratinized gingiva. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 11, n. 2, p. 95-103, Feb 1984.

- 17 FLORES-DE-JACOBY, L.; ZAFIROPOULOS, G. G.; CIANCIO, S. Effect of crown margin location on plaque and periodontal health. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 9, n. 3, p. 197-205, 1989.
- 18 ISHIKAWA, I. et al. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. **Periodontol** 2000, v. 14, p. 79-111, Jun 1997.
- 19 BAKER, D. L.; SEYMOUR, G. J. The possible pathogenesis of gingival recession. A histological study of induced recession in the rat. **J Clin Periodontol**, v. 3, n. 4, p. 208-19, Nov 1976.
- 20 NOVAES, A. B. et al. The development of the periodontal cleft. A clinical and histopathologic study. **J Periodontol**, v. 46, n. 12, p. 701-9, Dec 1975.
- 21 WESSEL, J. R.; TATAKIS, D. N. Patient outcomes following subepithelial connective tissue graft and free gingival graft procedures. **J Periodontol**, v. 79, n. 3, p. 425-30, Mar 2008.
- 22 LUCZYSZYN, S. M. et al. Histologic analysis of the acellular dermal matrix graft incorporation process: a pilot study in dogs. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 27, n. 4, p. 341-7, Aug 2007.
- 23 NOVAES, A. B., JR. et al. Comparative 6-month clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recession. **J Periodontol**, v. 72, n. 11, p. 1477-84, Nov 2001.
- 24 AICHELMANN-REIDY, M. E. et al. Clinical evaluation of acellular allograft dermis for the treatment of human gingival recession. **J Periodontol**, v. 72, n. 8, p. 998-1005, Aug 2001.
- 25 LANG, N. P.; LOE, H. The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. **J Periodontol**, v. 43, n. 10, p. 623-7, Oct 1972.
- 26 KENNEDY, J. E. et al. A longitudinal evaluation of varying widths of attached gingiva. **J Clin Periodontol**, v. 12, n. 8, p. 667-75, Sep 1985.
- 27 NEVINS, M. et al. The use of mucograft collagen matrix to augment the zone of keratinized tissue around teeth: a pilot study. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 31, n. 4, p. 367-73, Jul-Aug 2011.
- 28 LORENZO, R. et al. Clinical efficacy of a xenogeneic collagen matrix in augmenting keratinized mucosa around implants: a randomized controlled prospective clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 3, p. 316-24, Mar 2012.
- 29 WILSON, R. D. Marginal tissue recession in general dental practice: a preliminary study. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 3, n. 1, p. 40-53, 1983.
- 30 WENNSTROM, J. L. Mucogingival therapy. **Ann Periodontol**, v. 1, n. 1, p. 671-701, Nov 1996.
- 31 VALDERHAUG, J.; BIRKELAND, J. M. Periodontal conditions in patients 5 years following insertion of fixed prostheses. Pocket depth and loss of attachment. **J Oral Rehabil**, v. 3, n. 3, p. 237-43, Jul 1976.
- 32 ORSINI, M. et al. Esthetic and dimensional evaluation of free connective tissue grafts in prosthetically treated patients: a 1-year clinical study. **J Periodontol**, v. 75, n. 3, p. 470-7, Mar 2004.
- 33 JUNG, R. E. et al. Local tolerance and efficiency of two prototype collagen matrices to increase the width of keratinized tissue. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 2, p. 173-9, Feb 2011.

- 34 THOMA, D. S. et al. Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrices: a volumetric analysis. **J Clin Periodontol**, v. 37, n. 7, p. 659-66, Jul 2010.
- 35 MCGUIRE, M. K.; SCHEYER, E. T. Xenogeneic collagen matrix with coronally advanced flap compared to connective tissue with coronally advanced flap for the treatment of dehiscence-type recession defects. **J Periodontol**, v. 81, n. 8, p. 1108-17, Aug 2010.
- 36 CARDAROPOLI, D. et al. Treatment of gingival recession defects using coronally advanced flap with a porcine collagen matrix compared to coronally advanced flap with connective tissue graft: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 83, n. 3, p. 321-8, Mar 2012.
- 37 JEPSEN, K. et al. Treatment of gingival recession defects with a coronally advanced flap and a xenogeneic collagen matrix: a multicenter randomized clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 1, p. 82-9, Jan 2013.
- 38 HERFORD, A. S. et al. Use of a porcine collagen matrix as an alternative to autogenous tissue for grafting oral soft tissue defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 7, p. 1463-70, Jul 2010.
- 39 VIGNOLETTI, F. et al. Clinical and histological healing of a new collagen matrix in combination with the coronally advanced flap for the treatment of Miller class-I recession defects: an experimental study in the minipig. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 9, p. 847-55, Sep 2011.
- 40 OUHAYOUN, J. P. et al. Cytokeratin patterns of human oral epithelia: differences in cytokeratin synthesis in gingival epithelium and the adjacent alveolar mucosa. **Differentiation**, v. 30, n. 2, p. 123-9, 1985.
- 41 OUHAYOUN, J. P. et al. Re-epithelialization of a palatal connective tissue graft transplanted in a non-keratinized alveolar mucosa: a histological and biochemical study in humans. **J Periodontal Res**, v. 23, n. 2, p. 127-33, Mar 1988.
- 42 SMALL, P. N.; TARNOW, D. P.; CHO, S. C. Gingival recession around wide-diameter versus standard-diameter implants: a 3- to 5-year longitudinal prospective study. **Pract Proced Aesthet Dent**, v. 13, n. 2, p. 143-6, Mar 2001.
- 43 FU, J. H.; LEE, A.; WANG, H. L. Influence of tissue biotype on implant esthetics. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 26, n. 3, p. 499-508, May-Jun 2011.
- 44 THOMA, D. S. et al. Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrices in the dog mandible -- a histological analysis. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 11, p. 1063-70, Nov 2011.
- 45 GHANAATI, S. et al. Evaluation of the tissue reaction to a new bilayered collagen matrix in vivo and its translation to the clinic. **Biomed Mater**, v. 6, n. 1, p. 015010, Feb 2011.
- 46 FAGAN, F. Clinical comparison of the free soft tissue autograft and partial thickness apically positioned flap--preoperative gingival or mucosal margins. **J Periodontol**, v. 46, n. 10, p. 586-95, Oct 1975.
- 47 MOHAMMADI, M.; SHOKRGOZAR, M. A.; MOFID, R. Culture of human gingival fibroblasts on a biodegradable scaffold and evaluation of its effect on attached gingiva: a randomized, controlled pilot study. **J Periodontol**, v. 78, n. 10, p. 1897-903, Oct 2007.
- 48 ROCCHIETTA, I. et al. Soft tissue integration of a porcine collagen membrane: an experimental study in pigs. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 32, n. 1, p. e34-40, Feb 2012.

7 Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1027.53.2) intitulado "Importância da Espessura Gengival na Formação de Retrações Gengivais em Sítios Reabilitados com Próteses Fixas Subgengivais", de autoria de **Arthur Belém Novaes Junior** e de **Danilo Maeda Reino**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 02.02.2011.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.1027.53.2), entitled: "Importância da Espessura Gengival na Formação de Retrações Gengivais em Sítios Reabilitados com Próteses Fixas Subgengivais" by **Arthur Belém Novaes Junior** and **Danilo Maeda Reino**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, February 02, 2011

Ribeirão Preto, 4 de fevereiro de 2011

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

8 Artigo em Inglês

Carta de submissão

11/5/2014

Imprimir

Assunto: Manuscript ID CPE-05-14-5063 – Journal of Clinical Periodontology

De: CPEedoffice@wiley.com (CPEedoffice@wiley.com)

Para: danilomr2005@yahoo.com.br;

Data: Terça-feira, 6 de Maio de 2014 23:01

06-May-2014

Dear Dr. Danilo Reino,

Your manuscript entitled "The importance of gingival thickness in the formation of gingival recessions following the placement of fixed prosthesis" has been successfully submitted online. Within the next few days your manuscript will be checked for its compliance with the journal's requirements. If any required part is found missing, you will be notified by email that your manuscript has been unsubmitted and returned to your Author Centre. The email will include detailed explanation of the changes to be made before your manuscript can be resubmitted for review in Journal of Clinical Periodontology.

Your manuscript ID is CPE-05-14-5063.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when contacting the editorial office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) at <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>.

Please note that authors receive a 25% discount on all Wiley books. Just follow this link to register for your book discount now: <http://www.wiley.com/WileyCDA/Section/id-302237.html>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Clinical Periodontology.

Yours sincerely,
Verity Butler
Journal of Clinical Periodontology Editorial Office

The importance of gingival thickness in the formation of gingival recessions following the placement of fixed prosthesis

Journal:	<i>Journal of Clinical Periodontology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Animal Experiment
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Reino, Danilo; School of Dentistry of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Maia, Luciana; School of Dentistry of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Palioto, Daniela; School of Dentistry of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Muglia, Valdir; School of Dentistry of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, 2. Department of Dental Materials and Prosthetics</p> <p>Grisi, Márcio Fernando; School of Dentistry of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Taba, Mario, Jr; School of Dentistry of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Souza, Sergio; School of Dentistry of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p> <p>Novaes Jr., Arthur; School of Dentistry of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology</p>
Topic:	Treatment
Keywords:	gingival recession, periodontal plastic surgery, tissue graft
Main Methodology:	Animal Model

80x85mm (300 x 300 DPI)

91x121mm (300 x 300 DPI)

The importance of gingival thickness in the formation of gingival recessions following the placement of fixed prosthesis

Reino DM *, Maia LP*, Palioto DB **, Muglia VA***, Grisi MFM**, Taba M Jr**, Souza SLS **, Novaes AB Júnior**.

*DDS, Department of Surgery, Oral-Maxillo-Facial Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

**PhD, Professor of Periodontology, Department of Surgery, Oral-Maxillo-Facial Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

***PhD, Professor of Prosthesis, Department of Dental Materials and Prosthesis, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Running title: Gingival thickness preventing gingival recessions

Key words: Gingival Recession, periodontal plastic surgery, tissue graft.

Corresponding Author: Arthur Belém Novaes Jr. FORP-USP – Depto. CTBMF e Periodontia. Av. do Café, s/n, Monte Alegre, CEP: 14040-904, Ribeirão Preto, SP - Brazil. Daytime Telephone: +55-16- 3602-3980; Fax: +55-16-3602-4788

E-mail: novaesjr@forp.usp.br

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study. This study was financial supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP protocol number: 2010/12777-1).

Abstract

Aim: Gingival inflammation may lead to gingival recession. This study has evaluated if an increase in gingival thickness affects the formation of gingival recessions following the placement of fixed prostheses.

Materials and Methods: Eight dogs received porcine collagen matrix to increase gingival thickness, which was then followed by subgingival prosthesis placement in order to generate gingival inflammation. Group 1: gingival thickness increase from second to fourth premolars, using subgingival prostheses; Group 2: subgingival prosthesis placement from second to fourth molars; Group 3: gingival thickness increase in the first premolar, no prostheses; Group 4: control. Clinical measurements of gingival thickness and height, clinical probing depth and clinical attachment levels were performed. Immunohistochemical analyses were performed to detect defense cells, keratinization patterns and differences between soft and mineralized tissues.

Results: There was no variation in keratinized tissue height. Thicker gingiva was encountered in Groups 1 and 2, which developed gingival recession, which did not occur in Groups 3 and 4. Probing depth was more pronounced in Groups 3 and 4. Histomorphometric analysis for soft and mineralized tissues confirmed clinical findings. Immunohistochemical analysis did not show differences in defense cell counting.

Conclusion: The increase in gingival thickness may minimize gingival recession in teeth with subgingival prosthesis.

Clinical Relevance**Scientific rationale for study:**

Increased keratinized gingival tissue is related with reduced gingival recession risk. However, there is no data correlating gingival thickness and gingival recession.

Main findings:

An increase in gingival thickness may help reduce the incidence and severity of gingival recession even for teeth where subgingival prostheses are used.

Practical implications:

Procedures to increase gingival thickness may be indicated to reduce the risk of gingival recession development.

Introduction

In the whole world, a large number of patients wear some kind of fixed dental prosthesis, be it to replace teeth lost to caries, periodontal diseases or even to solve aesthetic problems. The success of this treatment intimately depends on the presence of healthy gingival tissues(Aichelmann-Reidy et al. 2001).

Even though studies have demonstrated that efficient biofilm control is enough for periodontal health maintenance in teeth with a narrow band of attached gingiva(Baker and Seymour 1976, Dorfman et al. 1980, Ericsson and Lindhe 1984, Flores-de-Jacoby et al. 1989), it is well known that such control is usually not maintained for an extended period by most patients. Gingival inflammation may occur in the presence of restorations or prostheses with subgingival margins, even when marginal fit was considered clinically acceptable (Ishikawa et al. 1997, Koke et al. 2003). Even careful oral hygiene is not capable of preventing gingival attachment loss in the presence of prostheses with subgingival margins (Lang et al. 1983, Luczynszyn et al. 2007).

Subgingival margins favor the appearance of inflammatory infiltrations containing macrophages, leading to the migration of lymphocytes (Maynard and Wilson 1979)¹⁰ and the proliferation of oral epithelial cells towards the connective tissue, causing gingival recession (Muller and Eger 2002, Novaes et al. 2001). However, in the presence of large bands of keratinized gingiva, the inflammatory infiltration is confined within the free gingiva (Novaes et al. 1975). Therefore, thicker and wider bands of keratinized gingiva may impede the inflammatory infiltrate from causing gingival recession and, therefore, procedures that increase gingival thickness may be indicated to reduce the risk of gingival recession (Oliver et al. 1998).

Several techniques have been used to increase the height and thickness of keratinized mucosa, such as free gingival grafts and free connective tissue grafts (Sanavi et al. 1998). However, having to use the hard palate area as a donor site increases morbidity (Sanz et al. 2009), thus reducing patient acceptance. Alternatively to autogenous grafts, a cellular dermal graft has yielded good results (Schatzle et al. 2001, Silness 1970a, Silness 1970b). However, because of the latter's origin from human cadavers its use may face resistance from patients (Sanz et al. 2009).

Currently, a new kind of porcine collagen matrix (PCM) (Mucrograft collagen matrix, Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland.) can be used to replace autogenous grafts or human dermal matrix grafts. Even though it is a new commercially available product and few studies have already been published, little is known about its capacity to increase gingival thickness. Therefore, the aim of this study was to verify if PCM can increase the thickness and height of gingival keratinized tissue, if it may influence inflammation

extension and prevent gingival recession formation in canine premolars where prostheses with subgingival margins were placed.

Materials and Methods

For this study, 8 adult young male beagle dogs weighting approximately 12 kg were used. All of them had perfect oral and overall health conditions attested by a veterinarian. All procedures carried out within this research were approved by the Ethics Committee for Animal Use from the University of São Paulo – School of dentistry of Ribeirão Preto (protocol number 10.1.1027.53.2)

Clinical Procedures

Experimental groups were randomized using a software program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), which generated the following sets: Group 1: PCM placed in premolars P2, P2 and P4, with prostheses; Group 2: surgical flap elevation in P2, P3 and P4, with prostheses, Group 3: PCM adapted in the P1 region, without prostheses and Group 4: no PCM and no prostheses.

Fifteen days prior to the first surgery, the animals received vitamins, all needed vaccination as well as prophylaxis and supragingival scaling. For the surgery, the animals were submitted to general anesthesia, and intrasulcular incisions were performed on the buccal surface of mandibular P1, P2, P3 and P4 and partial-thickness flaps were elevated (figure 1). PCM was placed in double layer over the corresponding periosteum of P1, P2, P3 and P4 -which correspond to Groups 1 and 3 - at about 1.0mm below the gingival margin. Depths were standardized using a calibrated periodontal probe. On the sides referring to Groups 2 and 4, partial-thickness flaps were elevated and kept raised for the same operatory time as the other side. There was no biomaterial placement in these groups. Flaps were repositioned and sutured. Sutures were removed after 10 days. Dogs received oral prophylaxis weekly. Eight weeks later, the same procedures were repeated and PCM was again inserted in a double layer to increase gingival thickness.

Eight weeks following the final surgical procedures (figure 1), acrylic resin prostheses were placed in mandibular P2, P3 and P4 from both sides (Group 1 and Group 2). Prosthetic margins were subgingivally placed at 1.0mm as to favor biofilm accumulation. Notches were made at the gingival margin of premolars, both on prostheses and crowns, using a diamond bur for later histomorphometric analysis. For the next 12 weeks, the dogs did not receive any oral hygiene care to favor biofilm accumulation and development of gingival recession. Dogs were then euthanized using sodium thiopentali.

Laboratories procedures

1 Mandibles were divided into two parts and fixated for 24 hours in 10% formalin at pH 7,0 under 4°C.
2
3 They were then submitted to 4% EDTA baths at pH 7,4 under magnetic agitation, having solutions being
4
5 changed every 3 days until parts were decalcified.
6

7 Clinical Analysis

8
9 Acetate templates measuring 1mm were used to standardize keratinized gingival thickness
10 measurement, which was carried out using an anesthesia needle with a silicon stop. Mucosa was perforated
11
12 as far as the bone and this measurement was then transferred to a digital caliper. Notches were engraved in
13
14 the central surface of each tooth to determine the height of keratinized tissue, as well as the height and
15
16 thickness of gingival recession. These measurements were also transferred to the digital caliper.
17

18 Histological Analysis

19
20 These analyses were carried out by a single operator, unaware of which group was being analyzed.
21
22 Five samples from each area were selected 70 µm apart from each other. Samples were stained with
23
24 hematoxylin and eosin and analyzed under light microscopy (Leica DC 300F, Leica Microsystems GmbH,
25
26 Nussloch, Germany). An appropriate software (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, LP, Silver Spring, USA)
27
28 for such analysis was utilized and measurements conducted.
29

30
31 Evaluated histomorphometric parameters for soft tissue were: distance from gingival margin to the
32
33 notch, junctional epithelium and connective tissue attachment length, connective tissue thickness below
34
35 gingival sulcus (figure 2), distance from notch to bone crest, in relation to junctional epithelium's apical level
36
37 and bone crest level.
38

39
40 The parameters evaluated in mineralized tissue for this study were: distance from gingival margin to
41
42 the bone crest, total bone area (the sum of medullary and cortical bone areas), medullary bone area and
43
44 cortical bone area 1mm from the bone crest, total bone thickness 1mm below the bone crest, medullary and
45
46 cortical bone 1mm below the bone crest.
47

48 Immunohistochemical analysis

49
50 Two non-stained samples from each tooth from each group were Immunohistochemically prepared
51
52 with CD4 and CD8 antibodies for macrophages, as to determine the number of these defense cells and their
53
54 relationship with inflammation caused by biofilm accumulation in the studied groups. Antibodies for
55
56 cytokeratin 4, cytokeratin 10 were also used to quantify and qualify keratinization of protective periodontal
57
58 tissues.
59
60

Positively stained cell quantification was performed in two microscopic fields under 400X magnification. Selected microscopic fields were contiguous and sequential in terms of site location in the gingival sulcus, junctional epithelium and bone crest. They were also close to the placed prostheses and engraved notches. Cells were only counted if their cytoplasmic membrane and cell nucleus were completely stained. From the quantification of each field, a mean value from the slide was obtained.

Statistical Analysis

Quantitative data were registered as mean value and standard deviation. Datum normality was confirmed by kurtosis curve and distortion. Data considered normal (clinical data) underwent one-way ANOVA test – used for intra and intergroup comparison with Tukey subtest for multiple comparison. A significant level of 0.05 was used for all statistical analyses. For data considered abnormal, (histomorphometric and immunohistochemic data) Kruskal Wallis test were employed – used for intra and intergroup analyses with Dunn subtest for multiple comparison.

Results

A total of 64 teeth were operated on and divided into 4 groups. Clinical results were obtained at three different periods according to the many variables shown in the tables below (Tables 1 and 2). Table 1 and 2 shows an increase in gingival thickness according to the treatment periods related to each treatment type. Table 1 and 2 shows variation in keratinized gingival height, with higher values for Groups 1 and 2. Also demonstrate variation in probing depth and clinical attachment level according to each group and clinical evaluation time.

The percentage of gingival thickness increase according to evaluation time, when compared to an initial baseline value. Higher thickness values are present in those groups which received PCM (Groups 1 and 2), especially when dental prostheses were also utilized (Group 1).

Results obtained from histomorphometric and immunohistochemic analyses are shown in the tables below (Tables 3 and 4). Table 3 contains several linear measurements drawn from non-mineralized tissues, such as connective tissue attachment, junctional epithelium length, among others. In this same table, linear histomorphometric measurement related to gingival recession is also added. Table 4 informs linear measurement results related to mineralized tissues, demonstrating that the executed treatment caused little variation in mineralized tissue.

Table 5 quantifies the presence of CD4 and CD8 defense cells and macrophages, according to each group, demonstrating little variation in cell count, according to each performed treatment.

Discussion

The margins for prostheses in teeth or implants are usually subgingival, leading to gingival inflammation which may cause gingival recession, especially when there is less than 2mm of keratinized mucosa (Stetler and Bissada 1987). The lack of keratinized tissue increases gingival inflammation, and loss of clinical attachment which contributes to gingival recession (Valderhaug and Birkeland 1976). In fixed prostheses placed in teeth with less than 1mm of keratinized tissue, the use of subepithelial connective tissue grafts (SCTG) increases gingival thickness, favoring plaque control, reducing gingival inflammation and loss of clinical attachment, when compared to teeth under the same conditions, but without the use of gingival grafts (Orsini et al. 2004). Porcine collagen matrix has shown promising results in increasing the height of keratinized tissue band (Sanz et al. 2009, Jung et al. 2011, Lorenzo et al. 2012), as well as its thickness (Thoma et al. 2010, Jung et al. 2011). It has also been used for dental root coverage (McGuire and Scheyer 2010, Cardaropoli et al. 2012, Jepsen et al. 2013), it can be indicated as a replacement for SCTG to increase keratinized tissue width and to treat gingival recessions.

In the present study, the height of keratinized tissue was not modified after clinical treatments (Table 1 and 2), but Groups 1 and 2 presented increased quantities of keratinized tissue in terms of thickness, when compared to Groups 3 and 4. This is due to the fact that in the first premolars (Groups 3 and 4) of dogs, there is a reduced band of keratinized tissue, when compared to the other teeth, because of higher muscle attachments which occur in this particular area, and which can even limit gains in gingival height when gingival grafts are used (Lorenzo et al. 2012). However, PCM has shown an increase in keratinized tissue in other studies for its scaffolding role allowing fibroblasts, blood vessels and epithelium to grow on top of it, transforming it in keratinized tissue (Jung et al. 2011, Herford et al. 2010, Lorenzo et al. 2012). Even when PCM was used for root coverage, it was capable of increasing the band of keratinized tissue (McGuire and Scheyer 2010, Cardaropoli et al. 2012, Jepsen et al. 2013). The differences between results obtained in this study and other studies from current literature may have originated from inherent discrepancies in the tested models; for results achieved in animals cannot be directly extrapolated to humans. Furthermore, studies that have shown an increase in keratinized tissues in animal models have used PCM exposed to the oral cavity, largely differing from this particular study, which has utilized it as a subepithelial graft.

When PCM was used in pig models for Miller Class I gingival recession treatment, the matrix was kept submerged (Vignoletti et al. 2011), and after 3 months there was no increase in keratinized tissue, which corroborates with the results obtained in this study. Immunohistochemical analyses for cytokeratin 4 and 10 can detect keratinization in tissues (Ouhayoun et al. 1985). However, non-keratinized oral mucosa

has higher expression of cytokeratin 4, while keratinized protective gingiva expresses cytokeratin 10 more intensely (Ouhayoun et al. 1988). In this study, in the regions where PCM was inserted, comprising from gingival margin to mucogingival junction, it could be verified that cytokeratin 4 was present below the mucogingival junction and cytokeratin 10 was found above the mucogingival junction. This way, there was neither an increase or loss in tissue keratinization, confirming encountered clinical findings (Table 1 and 2). PCM is not capable of generating keratinization spontaneously, at least when subepithelially inserted, depending upon pre-existing cells on the receptor site; cells which must be more superficially present, which could help explain its positive results for keratinization when the membrane is exposed in the oral cavity. Until now, there are no studies which have conducted similar tests through the use of cytokeratins in Immunohistochemical analysis to verify PCM keratinization patterns, so that direct data comparison may be performed.

There is clinical indication that gingival thickness is as important as, or even more important than keratinized tissue height as a parameter to prevent gingival recession. Thick gingival tissues are more resistant to mechanical and chemical adversities, thus, being less susceptible to gingival recession (Small et al. 2001, Fu et al. 2011).

PCM was capable of increasing gingival thickness in Groups 1 and 3 (Table 1 and 2). When results are expressed in the form of percentage (Table 1 and 2), it can be confirmed that there was gingival thickness increase. Group 1 had thickness increase of more than 75%. Subgingival prostheses can lead to gingival hyperplasia as an inflammatory response, due to prostheses presence, even without using PCM (Group 2); however, thickness increase was inferior to what was obtained in Groups 1 and 3 in which PCM was used. Group 1 showed thickness increase than the other Groups, which may have been caused by the association of PCM and subgingival prostheses. Different findings have already been published which indicate that PCM offers limited results when used to increase connective tissue volume, being insufficient to correct bone ridge defects (Thoma et al. 2011). Even though there has been no connective tissue thickness increase, there has been volume increase, because PCM allowed new bone formation which, when added to new connective tissue formation, was capable of increasing the bone ridge volume. Other studies have demonstrated gains in thickness (Jepsen et al. 2013, Jung et al. 2011), corroborating with the results of this study.

In relation to probing depth (Table 1 and 2), Groups 3 and 4 showed higher values than Groups 1 and 2, but they were still lower than 3mm and had no disease symptoms, possibly due to the lack of keratinized tissue and the presence of muscle attachments. Groups 1 and 2 did not exhibit any disease symptoms, even when higher probing depths were found. The absence of statistically significant differences

in probing depth after PCM use was also reported in other studies (Lorenzo et al. 2012, Cardaropoli et al. 2012, McGuire and Scheyer 2010, Sanz et al. 2009). Subgingival prostheses led to clinical attachment loss in Groups 1 and 2 (Table 1 and 2) that could be interpreted as gingival recession, which did not occur in Groups 3 and 4, and did not receive prostheses. Gingival recession was not detectable to the naked eye in Group 1, even when considering the loss of clinical attachment. On the other hand, gingival recession occurred in 100% of Group 2. There might have been a positive influence from the increase in gingival thickness, thus, making it difficult to notice gingival recession. Due to the absence of similar studies in current scientific literature, mainly when considering animal models, direct comparison cannot be made. However, these results demonstrate that PCM could increase gingival thickness, being capable of reducing the incidence and gravity of gingival recessions when subgingival prostheses are used.

Histomorphometric analysis of soft tissues (Table 3) confirmed clinical findings, detecting that there has been loss of connective tissue attachment, in other words, gingival recession, which was higher in Group 2 when compared to Group 1. Even though, clinically, gingival recession had not been detected in Group 1, histologically, it was present, however, with low values, which could only be detected under light microscopy. Groups 3 and 4 presented loss of attachment, which may have been caused by the muscle attachment and quantity of keratinized tissue in P1 in the studied dogs. PCM allowed an increase in gingival thickness, preventing the occurrence of gingival recession in Group 1 when compared to Group 2, thus, confirming our clinical findings. Group 3 presented shorter junctional epithelium and more pronounced connective tissue attachment than the other Groups. PCM may have possibly favored guided tissue regeneration in the region, confirming clinical findings from other authors (Thoma et al. 2010, Ghanaati et al. 2011). Nevertheless, these benefits were not detected in Group 1, possibly due to the subgingival prostheses. When it comes to connective tissue length, it could be verified that Group 4 showed higher values, because, in these analyses, epithelial length values were disregarded. This may have resulted from the capacity of connective tissue to form when a flap is raised (Fagan 1975, Mohammadi et al. 2007).

Histomorphometric analysis of mineralized tissues (Table 4) did not show statistically significant differences for the evaluated parameters. Groups 1 and 3 exhibited thicker cortical bone 1 mm below bone crest. This result may be in accordance with the findings of other authors (Ghanaati et al. 2011, Thoma et al. 2011) about the regenerative capacity of PCM when used sub epithelially. Furthermore, the lack of statistically significant differences in the studied variables during histomorphometric analysis of mineralized tissues allows us to infer that the quantity and quality of bone tissue was not capable of favoring or preventing gingival recession. There were also no statistically significant differences between Groups (Table 5) when it comes to the presence of CD4 and CD8, even when considering Groups 1 and 2, which received

1 subgingival prostheses. The presence of prostheses with subgingival margins 1mm deep may have
2 generated an inflammatory process in times preceding the euthanasia of the animals, and, for this reason,
3 these cells may not have been identified during the Immunohistochemical analysis. Literature reports that
4 gingival tissue healing is faster when PCM is kept submerged, than when it is exposed to the oral cavity
5 (Rocchietta et al. 2012). Furthermore, in histological analysis, it was demonstrated that PCM no longer exists
6 after 30 days if it is kept submerged (Vignoletti et al. 2011, Rocchietta et al. 2012). Tissue remodeling
7 following PCM insertion occurs between 28 and 84 days (Thoma et al. 2011). This explains the loss in
8 volume obtained with PCM after 3 to 6 weeks in animal models (Thoma et al. 2010).

9
10 The number of macrophages only showed statistically significant differences between Groups 2 and
11 4 (Table 5). This may have been caused by a possible regenerative effect of PCM in Groups 1 and 3;
12 benefits that did not apply to Groups 2 and 4. Therefore, the larger number of macrophages in Group 2 could
13 be explained by a specific defense mechanism against biofilm, because this Group presented the highest
14 gingival recession, which would facilitate biofilm accumulation. However, there was no statistically significant
15 difference between the count of these cells for Groups 1, 2 and 3. In general, the presence of lymphocytes,
16 macrophages and other defense cells has been associated with the use of prostheses or restorations with
17 subgingival margins, which lead to biofilm accumulation and subgingival flora modification, which then
18 becomes anaerobic and gram-negative (Lang et al. 1983).

34 Conclusion

35
36 The results from this study demonstrated that the use of PCM did not do any harm to the periodontal
37 tissues and was able to help reduce the occurrence of gingival recession in teeth that received subgingival
38 prostheses in a canine experimental model. PCM was able to clinically and histologically increase gingival
39 thickness. PCM did not cause inflammatory problems.

47 Acknowledgements

48
49 The authors thank the State of São Paulo Research Foundation for the financial support of this
50 study, and Geistlich Pharma for the donation of the PCM used in this study.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- Aichelmann-Reidy, M. E., Yukna, R. A., Evans, G. H., Nasr, H. F. & Mayer, E. T. (2001) Clinical evaluation of acellular allograft dermis for the treatment of human gingival recession. *J Periodontol* 72, 998-1005.
- Baker, D. L. & Seymour, G. J. (1976) The possible pathogenesis of gingival recession. A histological study of induced recession in the rat. *J Clin Periodontol* 3, 208-219.
- Cardaropoli, D., Tamagnone, L., Roffredo, A. & Gaveglione, L. (2012) Treatment of gingival recession defects using coronally advanced flap with a porcine collagen matrix compared to coronally advanced flap with connective tissue graft: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 83, 321-328.
- Dorfman, H. S., Kennedy, J. E. & Bird, W. C. (1980) Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. *J Clin Periodontol* 7, 316-324.
- Ericsson, I. & Lindhe, J. (1984) Recession in sites with inadequate width of the keratinized gingiva. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 11, 95-103.
- Fagan, F. (1975) Clinical comparison of the free soft tissue autograft and partial thickness apically positioned flap--preoperative gingival or mucosal margins. *J Periodontol* 46, 586-595.
- Flores-de-Jacoby, L., Zafiropoulos, G. G. & Ciancio, S. (1989) Effect of crown margin location on plaque and periodontal health. *Int J Periodontics Restorative Dent* 9, 197-205.
- Fu, J. H., Lee, A. & Wang, H. L. (2011) Influence of tissue biotype on implant esthetics. *Int J Oral Maxillofac Implants* 26, 499-508.
- Ghanaati, S., Schlee, M., Webber, M. J., Willershausen, I., Barbeck, M., Balic, E., Gorlach, C., Stupp, S. I., Sader, R. A. & Kirkpatrick, C. J. (2011) Evaluation of the tissue reaction to a new bilayered collagen matrix in vivo and its translation to the clinic. *Biomed Mater* 6, 015010.
- Herford, A. S., Akin, L., Cicciu, M., Maiorana, C. & Boyne, P. J. (2010) Use of a porcine collagen matrix as an alternative to autogenous tissue for grafting oral soft tissue defects. *J Oral Maxillofac Surg* 68, 1463-1470.
- Ishikawa, I., Nakashima, K., Koseki, T., Nagasawa, T., Watanabe, H., Arakawa, S., Nitta, H. & Nishihara, T. (1997) Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 14, 79-111.
- Jepsen, K., Jepsen, S., Zucchelli, G., Stefanini, M., de Sanctis, M., Baldini, N., Greven, B., Heinz, B., Wennstrom, J., Cassel, B., Vignoletti, F. & Sanz, M. (2013) Treatment of gingival recession defects with a coronally advanced flap and a xenogeneic collagen matrix: a multicenter randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 40, 82-89.
- Jung, R. E., Hurzeler, M. B., Thoma, D. S., Khraisat, A. & Hammerle, C. H. (2011) Local tolerance and efficiency of two prototype collagen matrices to increase the width of keratinized tissue. *J Clin Periodontol* 38, 173-179.
- Koke, U., Sander, C., Heinecke, A. & Muller, H. P. (2003) A possible influence of gingival dimensions on attachment loss and gingival recession following placement of artificial crowns. *Int J Periodontics Restorative Dent* 23, 439-445.
- Lang, N. P., Kiel, R. A. & Anderhalden, K. (1983) Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. *J Clin Periodontol* 10, 563-578.
- Lorenzo, R., Garcia, V., Orsini, M., Martin, C. & Sanz, M. (2012) Clinical efficacy of a xenogeneic collagen matrix in augmenting keratinized mucosa around implants: a randomized controlled prospective clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 23, 316-324.
- Luczyszyn, S. M., Grisi, M. F., Novaes, A. B., Jr., Palioto, D. B., Souza, S. L. & Taba, M., Jr. (2007) Histologic analysis of the acellular dermal matrix graft incorporation process: a pilot study in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 27, 341-347.
- Maynard, J. G., Jr. & Wilson, R. D. (1979) Physiologic dimensions of the periodontium significant to the restorative dentist. *J Periodontol* 50, 170-174.
- McGuire, M. K. & Scheyer, E. T. (2010) Xenogeneic collagen matrix with coronally advanced flap compared to connective tissue with coronally advanced flap for the treatment of dehiscence-type recession defects. *J Periodontol* 81, 1108-1117.

- 1 Mohammadi, M., Shokrgozar, M. A. & Mofid, R. (2007) Culture of human gingival fibroblasts on a
2 biodegradable scaffold and evaluation of its effect on attached gingiva: a randomized, controlled pilot
3 study. *J Periodontol* 78, 1897-1903.
- 4 Muller, H. P. & Eger, T. (2002) Masticatory mucosa and periodontal phenotype: a review. *Int J Periodontics*
5 *Restorative Dent* 22, 172-183.
- 6 Novaes, A. B., Jr., Grisi, D. C., Molina, G. O., Souza, S. L., Taba, M., Jr. & Grisi, M. F. (2001) Comparative
7 6-month clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for
8 the treatment of gingival recession. *J Periodontol* 72, 1477-1484.
- 9 Novaes, A. B., Ruben, M. P., Kon, S., Goldman, H. M. & Novaes, A. B., Jr. (1975) The development of the
10 periodontal cleft. A clinical and histopathologic study. *J Periodontol* 46, 701-709.
- 11 Oliver, R. C., Brown, L. J. & Loe, H. (1998) Periodontal diseases in the United States population. *J*
12 *Periodontol* 69, 269-278.
- 13 Orsini, M., Orsini, G., Benlloch, D., Aranda, J. J., Lazaro, P. & Sanz, M. (2004) Esthetic and dimensional
14 evaluation of free connective tissue grafts in prosthetically treated patients: a 1-year clinical study. *J*
15 *Periodontol* 75, 470-477.
- 16 Ouhayoun, J. P., Gosselin, F., Forest, N., Winter, S. & Franke, W. W. (1985) Cytokeratin patterns of human
17 oral epithelia: differences in cytokeratin synthesis in gingival epithelium and the adjacent alveolar
18 mucosa. *Differentiation* 30, 123-129.
- 19 Ouhayoun, J. P., Sawaf, M. H., Gofflaux, J. C., Etienne, D. & Forest, N. (1988) Re-epithelialization of a
20 palatal connective tissue graft transplanted in a non-keratinized alveolar mucosa: a histological and
21 biochemical study in humans. *J Periodontol Res* 23, 127-133.
- 22 Rocchietta, I., Schubach, P., Ghezzi, C., Maschera, E. & Simion, M. (2012) Soft tissue integration of a
23 porcine collagen membrane: an experimental study in pigs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 32,
24 e34-40.
- 25 Sanavi, F., Weisgold, A. S. & Rose, L. F. (1998) Biologic width and its relation to periodontal biotypes. *J*
26 *Esthet Dent* 10, 157-163.
- 27 Sanz, M., Lorenzo, R., Aranda, J. J., Martin, C. & Orsini, M. (2009) Clinical evaluation of a new collagen
28 matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed
29 prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. *J Clin Periodontol* 36, 868-876.
- 30 Schatzle, M., Land, N. P., Anerud, A., Boysen, H., Burgin, W. & Loe, H. (2001) The influence of margins of
31 restorations of the periodontal tissues over 26 years. *J Clin Periodontol* 28, 57-64.
- 32 Silness, J. (1970a) Periodontal conditions in patients treated with dental bridges. *J Periodontol Res* 5, 60-68.
- 33 Silness, J. (1970b) Periodontal conditions in patients treated with dental bridges. 2. The influence of full and
34 partial crowns on plaque accumulation, development of gingivitis and pocket formation. *J Periodontol*
35 *Res* 5, 219-224.
- 36 Small, P. N., Tarnow, D. P. & Cho, S. C. (2001) Gingival recession around wide-diameter versus standard-
37 diameter implants: a 3- to 5-year longitudinal prospective study. *Pract Proced Aesthet Dent* 13, 143-
38 146.
- 39 Stetler, K. J. & Bissada, N. F. (1987) Significance of the width of keratinized gingiva on the periodontal status
40 of teeth with submarginal restorations. *J Periodontol* 58, 696-700.
- 41 Thoma, D. S., Hammerle, C. H., Cochran, D. L., Jones, A. A., Grolach, C., Uebersax, L., Mathes, S., Graf-
42 Hausner, U. & Jung, R. E. (2011) Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based
43 matrices in the dog mandible -- a histological analysis. *J Clin Periodontol* 38, 1063-1070.
- 44 Thoma, D. S., Jung, R. E., Schneider, D., Cochran, D. L., Ender, A., Jones, A. A., Grolach, C., Uebersax, L.,
45 Graf-Hausner, U. & Hammerle, C. H. (2010) Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-
46 based matrices: a volumetric analysis. *J Clin Periodontol* 37, 659-666.
- 47 Valderhaug, J. & Birkeland, J. M. (1976) Periodontal conditions in patients 5 years following insertion of fixed
48 prostheses. Pocket depth and loss of attachment. *J Oral Rehabil* 3, 237-243.
- 49 Vignoletti, F., Nunez, J., Discepoli, N., De Sanctis, F., Caffesse, R., Munoz, F., Lopez, M. & Sanz, M. (2011)
50 Clinical and histological healing of a new collagen matrix in combination with the coronally advanced
51 flap for the treatment of Miller class-I recession defects: an experimental study in the minipig. *J Clin*
52 *Periodontol* 38, 847-855.

Tables

Table 1: Clinical parameters (mean value $\pm$ SD) at baseline, time of insertion of the prostheses and before the euthanasia – intra-group comparison

Parameters	Group 1						Group 2					
	Baseline (A)	Prostheses (B)	Euthanasia (C)	A x B	A x C	B x C	Baseline (A)	Prostheses (B)	Euthanasia (C)	A x B	A x C	B x C
Gingival Thickness	1.53 $\pm$ 0.24	2.94 $\pm$ 0.23	2.76 $\pm$ 0.23	< 0.01	< 0.01	ns	1.48 $\pm$ 0.12	1.83 $\pm$ 0.09	1.76 $\pm$ 0.08	< 0.01	< 0.01	ns
Gingival Thickness (%)	96.77 $\pm$ 28.87	85.00 $\pm$ 23.85	-5.65 $\pm$ 7.97	ns	< 0.05	< 0.05	24.52 $\pm$ 9.93	20.57 $\pm$ 10.35	-3.07 $\pm$ 4.55	ns	< 0.05	< 0.05
Height of keratinized tissue	4.65 $\pm$ 0.32	4.83 $\pm$ 0.50	4.92 $\pm$ 0.50	ns	ns	ns	4.79 $\pm$ 0.74	5.08 $\pm$ 0.73	5.08 $\pm$ 0.67	ns	ns	ns
Probing Depth	1.54 $\pm$ 0.29	1.79 $\pm$ 0.26	2.00 $\pm$ 0.00	ns	< 0.05	ns	1.54 $\pm$ 0.38	1.67 $\pm$ 0.33	2.00 $\pm$ 0.00	ns	< 0.05	ns
Clinical attachment level	1.54 $\pm$ 0.29	1.79 $\pm$ 0.26	2.00 $\pm$ 0.00	ns	< 0.05	ns	1.54 $\pm$ 0.38	1.67 $\pm$ 0.33	3.06 $\pm$ 0.09	ns	< 0.01	< 0.01
	Group 3						Group 4					
	Baseline (A)	Prostheses (B)	Euthanasia (C)	A x B	A x C	B x C	Baseline (A)	Prostheses (B)	Euthanasia (C)	A x B	A x C	B x C
Gingival Thickness	1.30 $\pm$ 0.17	2.42 $\pm$ 0.43	2.00 $\pm$ 0.22	< 0.01	< 0.01	ns	1.46 $\pm$ 0.19	1.50 $\pm$ 0.20	1.58 $\pm$ 0.34	ns	ns	ns
Gingival Thickness (%)	93.80 $\pm$ 56.11	56.26 $\pm$ 19.04	-13.80 $\pm$ 17.24	ns	< 0.05	< 0.05	4.87 $\pm$ 17.46	8.30 $\pm$ 17.86	7.35 $\pm$ 24.16	ns	ns	ns
Height of keratinized tissue	2.88 $\pm$ 0.22	2.63 $\pm$ 0.63	2.63 $\pm$ 0.67	ns	ns	ns	3.06 $\pm$ 0.48	3.50 $\pm$ 0.75	3.00 $\pm$ 0.50	ns	ns	ns
Probing Depth	2.13 $\pm$ 0.22	1.88 $\pm$ 0.22	2.13 $\pm$ 0.44	ns	ns	ns	2.00 $\pm$ 0.00	2.25 $\pm$ 0.38	2.00 $\pm$ 0.00	ns	ns	ns
Clinical attachment level	2.13 $\pm$ 0.22	1.88 $\pm$ 0.22	2.13 $\pm$ 0.44	ns	ns	ns	2.00 $\pm$ 0.00	2.25 $\pm$ 0.38	2.13 $\pm$ 0.22	ns	ns	ns

ns = not significant

Table 2: Clinical parameters (mean value $\pm$ SD) at baseline, time of insertion of the prostheses and before the euthanasia – inter-group comparison

Parameters	Baseline									
	Group 1 (A)	Group 2 (B)	Group 3 (C)	Group 4 (D)	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
Gingival Thickness	1.53 $\pm$ 0.24	1.48 $\pm$ 0.12	1.30 $\pm$ 0.17	1.46 $\pm$ 0.19	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Gingival Thickness (%)	96.77 $\pm$ 28.87	24.52 $\pm$ 9.93	93.80 $\pm$ 56.11	4.87 $\pm$ 17.46	< 0.05	ns	< 0.05	ns	ns	< 0.05
Height of keratinized tissue	4.65 $\pm$ 0.32	4.79 $\pm$ 0.74	2.88 $\pm$ 0.22	3.06 $\pm$ 0.48	ns	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns
Probing Depth	1.54 $\pm$ 0.29	1.54 $\pm$ 0.38	2.13 $\pm$ 0.22	2.00 $\pm$ 0.00	ns	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns
Clinical attachment level	1.54 $\pm$ 0.29	1.54 $\pm$ 0.38	2.13 $\pm$ 0.22	2.00 $\pm$ 0.00	ns	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.05	ns
Prostheses										
	Group 1 (A)	Group 2 (B)	Group 3 (C)	Group 4 (D)	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
Gingival Thickness	2.94 $\pm$ 0.23	1.83 $\pm$ 0.09	2.42 $\pm$ 0.43	1.50 $\pm$ 0.20	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.05	ns	< 0.01
Gingival Thickness (%)	85.00 $\pm$ 23.85	20.57 $\pm$ 10.35	56.26 $\pm$ 19.04	8.30 $\pm$ 17.86	< 0.05	ns	< 0.05	ns	ns	< 0.05
Height of keratinized tissue	4.83 $\pm$ 0.50	5.08 $\pm$ 0.73	2.63 $\pm$ 0.63	3.50 $\pm$ 0.75	ns	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns
Probing Depth	1.79 $\pm$ 0.26	1.67 $\pm$ 0.33	1.88 $\pm$ 0.22	2.25 $\pm$ 0.38	ns	ns	ns	ns	< 0.05	ns
Clinical attachment level	1.79 $\pm$ 0.26	1.67 $\pm$ 0.33	1.88 $\pm$ 0.22	2.25 $\pm$ 0.38	ns	ns	ns	ns	< 0.05	ns
Euthanasia										
	Group 1 (A)	Group 2 (B)	Group 3 (C)	Group 4 (D)	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
Gingival Thickness	2.76 $\pm$ 0.23	1.76 $\pm$ 0.08	2.00 $\pm$ 0.22	1.58 $\pm$ 0.34	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns	ns	ns
Gingival Thickness (%)	-5.65 $\pm$ 7.97	-3.07 $\pm$ 4.55	-13.80 $\pm$ 17.24	7.35 $\pm$ 24.16	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Height of keratinized tissue	4.92 $\pm$ 0.50	5.08 $\pm$ 0.67	2.63 $\pm$ 0.67	3.00 $\pm$ 0.50	ns	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	ns
Probing Depth	2.00 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.00	2.13 $\pm$ 0.44	2.00 $\pm$ 0.00	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Clinical attachment level	2.00 $\pm$ 0.00	3.06 $\pm$ 0.09	2.13 $\pm$ 0.44	2.13 $\pm$ 0.22	ns	ns	ns	< 0.01	< 0.01	ns

ns = not significant

Table 3: Histological parameters for soft tissue (mean value $\pm$ SD) inter-group and intra-group comparison

Parameters	p									
	Group 1 (A)	Group 2 (B)	Group 3 (C)	Group 4 (D)	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
Distance from gingival margin to the notch	0.24 $\pm$ 0.21	0.94 $\pm$ 0.25	0.46 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.18	< 0.05	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Distance from notch to bone crest	2.60 $\pm$ 0.58	2.93 $\pm$ 0.54	2.98 $\pm$ 0.21	2.15 $\pm$ 0.43	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05
Connective tissue attachment length	1.07 $\pm$ 0.14	1.09 $\pm$ 0.28	1.59 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.17	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05
Junctional epithelium length	1.00 $\pm$ 0.35	1.16 $\pm$ 0.27	0.68 $\pm$ 0.02	2.06 $\pm$ 0.39	Ns	Ns	< 0.05	Ns	Ns	< 0.05
Connective tissue thickness below gingival sulcus	0.22 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.11	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05
Connective tissue thickness below gingival sulcus in relation to junctional epithelium's apical level	1.30 $\pm$ 0.26	1.23 $\pm$ 0.16	0.96 $\pm$ 0.13	1.66 $\pm$ 0.13	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05
Connective tissue thickness below gingival sulcus in relation to bone crest level	1.73 $\pm$ 0.42	1.49 $\pm$ 0.36	1.07 $\pm$ 0.44	2.39 $\pm$ 0.67	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05	< 0.05

ns = not significant

Table 4: Histological parameters for mineralized tissue (mean value $\pm$ SD) inter-group and intra-group comparison

Parameters	p									
	Group 1 (A)	Group 2 (B)	Group 3 (C)	Group 4 (D)	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
Distance from gingival margin to the bone crest	2.81 $\pm$ 0.34	2.81 $\pm$ 0.27	3.32 $\pm$ 0.29	2.922 $\pm$ 0.21	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Total bone area (the sum of medullary and cortical bone areas)	0.36 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.09	0.60 $\pm$ 0.20	0.38 $\pm$ 0.09	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Medullary bone area	0.29 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.10	0.47 $\pm$ 0.17	0.29 $\pm$ 0.09	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cortical bone area	0.07 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.02	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Total bone thickness 1mm below the bone crest	0.58 $\pm$ 0.14	0.55 $\pm$ 0.08	0.89 $\pm$ 0.23	0.64 $\pm$ 0.16	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Medullary bone thickness 1mm below the bone crest	0.51 $\pm$ 0.14	0.47 $\pm$ 0.08	0.78 $\pm$ 0.21	0.55 $\pm$ 0.15	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cortical bone thickness 1mm below the bone crest	0.08 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	NS	< 0.05	NS	NS	NS	NS

ns = not significant

Table 5: Histological parameters for mineralized tissue (mean value $\pm$ SD) at baseline, time of insertion of the prostheses and before the euthanasia – inter-group comparison

Parameters					p					
	Group 1 (A)	Group 2 (B)	Group 3 (C)	Group 4 (D)	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
CD4	22.42 $\pm$ 8.08	22.00 $\pm$ 8.05	19.00 $\pm$ 7.00	22.47 $\pm$ 8.84	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
CD8	2.89 $\pm$ 0.59	2.50 $\pm$ 0.50	4.45 $\pm$ 0.23	5.19 $\pm$ 2.70	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Macrophages	13.08 $\pm$ 7.92	24.00 $\pm$ 1.33	16.17 $\pm$ 3.56	11.64 $\pm$ 5.47	Ns	Ns	Ns	Ns	< 0.05	Ns

ns = not significant

Figures

Figure 1: A- Initial Condition (group 2 and 4), B- Initial Condition (group 1 and 3), C- Partial Flap Elevation (group 2 and 4), D – Partial Flap Elevation (group 1 and 3), E- Flap release (group 2 and 4), F- Biomaterial sutured to the receptor site (group 1 and 3), G- final suture (group 2 and 4), H- final suture (group 1 and 3), I- Group 2 and 4 before the insertion of the prosthesis, J- Group 1 and 3 before the insertion of the prosthesis.

Figure 2: A- Group 1, B- Group 2, C- Group 3, D- Group 4. Blue line represents the connective tissue attachment length, green line represents the junctional epithelium and the black line represents the gingival recession (20x augmentation).