Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia

**Avaliação do uso da matriz dérmica acelular como barreira na
regeneração óssea guiada. Estudo clínico, radiográfico e
histomorfométrico em cães.**

Germana Jayme Borges

Ribeirão Preto

2008

Germana Jayme Borges

**Avaliação do uso da matriz dérmica acelular como barreira na
regeneração óssea guiada. Estudo clínico, radiográfico e
histomorfométrico em cães.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto – USP como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Periodontia.

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís
Scombatti de Souza**

Ribeirão Preto

2008

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

BORGES, Germana Jayme

Avaliação do uso da matriz dérmica acelular como barreira na regeneração óssea guiada. Estudo clínico, radiográfico e histomorfométrico em cães. Ribeirão Preto, 2008.

108p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Souza, Sérgio Luís Scombatti de

1. Matriz dérmica acelular; 2. Membrana; 3. Regeneração Óssea Guiada.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Germana Jayme Borges

Avaliação do uso da matriz dérmica acelular como barreira na regeneração óssea guiada. Estudo clínico, radiográfico e histomorfométrico em cães.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Periodontia

Aprovado em: ____ / ____ / 2009

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Dedico este trabalho às pessoas mais importantes e essenciais em
minha vida...*

Meus pais, José Sizenando e Maria Helena.

*Por vocês tenho os mais profundos sentimentos... Amor, respeito,
admiração, gratidão...*

*Obrigada por nosso lar estruturado, pelo amor que sempre me
dedicaram, pelo exemplo de fé, por estarem ao meu lado em todos os
momentos.*

Agradecimientos

À Deus,

O Senhor é o meu pastor e nada me faltará;

Ele me dá novas forças;

e me guia no caminho certo

Ainda que eu caminhe por um vale escuro

não temerei.

Pois Deus está comigo,

Tu me proteges e me diriges.

Sei que a tua bondade e o teu perdão

ficarão comigo enquanto eu viver.

E todos os dias da minha vida

morarei na tua casa

Salmo 23

Aos meus irmãos, *Líana e Gabriel*, pelo amor, incentivo e amizade. Vocês são meus melhores amigos e eternos companheiros.

Ao meu querido avô, *Leyde Jayme*, por ser meu exemplo, minha alegria...por estar ao meu lado em todos os momentos...mesmo agora quando sua presença física não é sentida.

À minha querida avó *Terezinha*, por ser nossa fortaleza! Vó, amo muito a senhora e estarei sempre ao seu lado cuidando de você.

Aos meus avós *José Randolfo e Esther*, pelo exemplo de vida, pelos bons momentos que juntos compartilhamos.

Ao meu orientador Profº.Dr. *Sérgio Luís Scombatti de Souza*,

Professor...muito obrigada por tudo!

Por acreditar em meu potencial e por ter estado sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando.

Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e por fazer parte direta dessa importante conquista em minha vida!

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação *Profº. Dr. Arthur Belém*

Novaes Jr., Profº. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi,

Prof^a. Dr^a. Daniela Bazan Palhoto, Prof^o. Dr. Mário Taba

Jr. pela formação e exemplo.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação – Área de Periodontia *Prof^o.Dr.*

Arthur Belém Novaes Jr., pela competência, dedicação, responsabilidade e apoio.

Ao professor *Márcio Grisi*, cujo entusiasmo pela profissão sempre me inspirou e estimulou a lutar por meus ideais como cirurgiã-dentista.

Aos *anímaís* envolvidos nessa pesquisa, que sempre me transmitiram lealdade e com os quais muito aprendi....

À *Patrícia*, amiga e companheira. Pat, não tenho palavras para expressar o quanto foi importante conviver e aprender com você ao longo desses anos. Obrigada pela ótima convivência em casa, pela cumplicidade e carinho. Seu apoio e incentivo foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Você sempre estará em minhas orações .Com certeza nossa parceria não termina aqui!

Às colegas de mestrado, *Flávia, Adriana, Priscila, Annelissa e Priscila Paganini*, que se tornaram minhas grandes amigas e companheiras.

Juntas vencemos à distância da família, as dificuldades do curso e agora,

novamente juntas, celebramos a alegria da vitória. Cada uma, de uma forma especial contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional. Serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim ao longo desses anos. Contem comigo sempre! Amo vocês.

Aos colegas de doutorado, *Rafael, Guilherme e Raquel*. Muito obrigada pelas oportunidades que me proporcionaram, pela confiança e atenção. Vocês são um exemplo de esforço, superação e dedicação. Sucesso!

Ao veterinário *Fábio* que se tornou um importante e querido amigo. Sua competência, disponibilidade, e dedicação são um exemplo e foram indispensáveis para o sucesso dessa pesquisa.

Aos funcionários do biotério, *Aldo e Edson*, pelo apoio incondicional com os cães, e por tornarem meus momentos no biotério mais alegres e divertidos.

Às queridas funcionárias *Tatí, Dulce, Sueli e Zilda*, pelo auxílio, atenção e sobretudo pelo carinho e amizade!

Ao professor *Luís Fernando Naldi Ruiz*, cuja competência e habilidade profissional despertaram em mim o interesse pela Periodontia. Agradeço ainda o incentivo para que seguisse a carreira acadêmica.

Às minhas fiéis amigas *Marlei e Karina*, que mesmo à distância fizeram parte dessa etapa de minha vinha.

À amiga *Paulinha*, que sempre me apoiou e proporcionou momentos de alegria e diversão.

Aos meus pacientes, aqui representados pela *Elíana Xicatto*, que se tornou uma querida amiga.

*“Tua caminhada ainda não terminou...
A realidade te acolhe
dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita
de tuas palavras
e do teu silêncio.
Se amanhã sentires saudades,
lembra-te da fantasia e
sonha com tua próxima vitória.
Vitória que todas as armas do mundo
jamais conseguirão obter,
porque é uma vitória que surge da paz
e não do ressentimento.
É certo que irás encontrar situações
tempestuosas novamente,
mas haverá de ver sempre
o lado bom da chuva que cai
e não a faceta do raio que destrói.
Tu és jovem.
Atender a quem te chama é belo,
lutar por quem te rejeita
é quase chegar à perfeição.
A juventude precisa de sonhos
e se nutrir de lembranças,
assim como o leito dos rios
precisa da água que rola
e o coração necessita de afeto.
Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.”*

Charles Chaplin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GT: grupo teste

GC: grupo controle

ROG: regeneração óssea guiada

MDA: matriz dérmica acelular

PTFE-e: politetrafluoretileno expandido

RTG: regeneração tecidual guiada

EMQ: espessura de mucosa queratinizada

EMQ-V: espessura de mucosa queratinizada vestibular

EMQ-O: espessura de mucosa queratinizada oclusal

EM-L: espessura de mucosa queratinizada lingual

AMQ: altura de mucosa queratinizada

AMQ-V: altura de mucosa queratinizada vestibular

AMQ-L: altura de mucosa queratinizada lingual

AO: altura óssea máxima

ANT: área de novos tecidos

ANO: área de novo osso

NO: novo osso

DO: densidade óssea

IR: imagem radiográfica

ARD: área radiográfica do defeito

ANO-R: área radiográfica de novo osso

DO-R: densidade óssea radiográfica

DO-R Co: densidade óssea radiográfica coronal

DO-R C: densidade óssea radiográfica central

DOR-A: densidade óssea radiográfica apical

DOR-Cr: densidade óssea radiográfica controle

PO-R: preenchimento ósseo radiográfico

Mm: milímetros

Mm²: milímetros quadrados

µm: micrometros

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA	xvii
RESUMO.....	xxv
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS	48
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ARTIGO EM INGLÊS	77

Justificativa

JUSTIFICATIVA

Vários estudos em animais e clínicos em humanos demonstraram a possibilidade de neoformação óssea através da regeneração óssea guiada (ROG) ¹⁻⁶. Essa técnica se baseia na utilização de uma barreira física, com o intuito de impedir a migração de células indesejáveis, oriundas dos tecidos conjuntivo e epitelial de origem gengival, e dessa maneira viabilizar a formação óssea. Classicamente, são utilizadas como barreira membranas não-absorvíveis de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e)* ^{7, 8}. No entanto, esse tipo de membrana apresenta algumas desvantagens, como alto risco de exposição e contaminação e necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, com possibilidade de um conseqüente distúrbio nos tecidos em neoformação ^{9, 10}.

Membranas absorvíveis também têm sido utilizadas ^{11 12-14}, apresentando resultados histológicos e clínicos semelhantes ao das membranas de PTFE-e ¹⁵⁻¹⁷ e com a vantagem da não necessidade de uma segunda etapa cirúrgica para sua remoção. Em conseqüência dos bons resultados baseados, sobretudo, no baixo índice de complicações, as membranas absorvíveis também se tornaram um padrão para várias situações clínicas. Normalmente, essas membranas são constituídas de colágeno ou por dois diferentes tipos de poliésteres, isto é, por ácido poliláctico ou poliglicólico ou ainda pela combinação de ambos. A membrana feita pelo copolímero de ácido poliláctico e poliglicólico é absorvida através de um processo de hidrólise em ácido láctico e poliglicólico, os quais são eliminados através do ciclo de Krebs em gás carbônico e água ^{17, 18}. Este processo de absorção, o qual se inicia por volta da quarta e sexta semanas e parece se completar aproximadamente oito meses após a

* Gore-Tex, W.L. Gore & Assoc., Flagstaff, AZ, USA)

sua colocação provoca uma reação inflamatória crônica, moderada e de curto prazo que parece não interferir na regeneração dos tecidos^{16, 17, 19, 20}

Entretanto, determinadas condições clínicas, como por exemplo, a presença de vestíbulo raso e/ou uma pequena quantidade e espessura do tecido gengival, aumentam o risco de exposição das membranas na cavidade bucal no período pós-operatório, levando a uma contaminação destas, o que pode prejudicar os resultados regenerativos^{19, 21}.

Inúmeros estudos têm utilizado a matriz dérmica acelular, biomaterial de origem alógena, em procedimentos mucogengivais, enquanto outros têm sugerido a capacidade deste biomaterial em atuar como membrana nos procedimentos de RTG e ROG^{18, 22-27}. Além disso, a literatura tem demonstrado a eficácia da MDA em proporcionar aumento da quantidade e espessura do tecido gengival²⁸⁻³², e contaminação não significativa, mesmo quando exposta na cavidade bucal no período pós-operatório.^{33, 34}

Embora relatos prévios tenham apontado vantagens na utilização da MDA como barreira, tanto em RTG²⁷ como em ROG²³, não há um estudo controlado, em modelo animal, avaliando histologicamente o uso deste biomaterial em comparação a um padrão-ouro da literatura. Deste modo, parece ser interessante e justificada a realização do presente trabalho de pesquisa.

Referências Bibliográficas:

1. Dahlin C, Sennerby, L., Lekholm, U., Linde, A. & Nyman, S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1989;4:19–25.
2. Becker W, Becker, B., Handelsman, M., Ochsenein, C., Albrektsson, T. . Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets: a study in dogs. *Journal of periodontology* 1991;62:703–709.
3. Lang NP, Hämmerle, C.H.F., Brägger, U., Lehmann, B. & Nyman SR. Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement. *Clinical oral implants research* 1994;5:92–97.
4. Nyman S, Lang NP, Buser D, Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 1990;5:9-14.
5. Hammerle CH, Jung RE, Feloutzis A. A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients. *Journal of clinical periodontology* 2002;29 Suppl 3:226-231; discussion 232-223.
6. Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T. Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration. *Clinical oral implants research* 2005;16:133-139.
7. Dahlin C, Andersson, L. & Linde, A. . Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clinical Oral Implants Research* 1991;2:159–165.

8. Nevins MM, J.T. . Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: a combination of allograft and the Gore-Tex membrane. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 1992 12:97–111.
9. Simion M, Baldoni, M., Rossi, P. & Zaffe, D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 1994;14:167–180.
10. Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. . *Journal of periodontology* 2001 72:512–516
11. Lundgren D, Mathisen, T. & Gottlow, J. , . The development of a bioresorbable barrier for guided tissue regeneration. *Journal of the Swedish Dental Association* 1994;86:741–756.
12. Mayfield L, Nobreus N, Attstrom R, Linde A. Guided bone regeneration in dental implant treatment using a bioabsorbable membrane. *Clinical oral implants research* 1997;8:10-17.
13. Simion M, Misitano, U., Gionso, L. & Salvato, A. . Treatment of dehiscences and fenestrations around dental implants using resorbable and nonresorbable membranes associated with bone autografts: a comparative clinical study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1997;12:159–167
14. Llambes F, Silvestre FJ, Caffesse R. Vertical guided bone regeneration with bioabsorbable barriers. *Journal of periodontology* 2007;78:2036-2042.

15. Schenk RK BD, Hardwick WR, Dahlin C. . Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 1994;9:13-29.
16. Rocchietta I, Fontana F, Simion M. Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: a systematic review. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:203-215.
17. Fiorellini JP NM. Localized ridge augmentation/preservation. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:321-327.
18. Fowler EB, Breault LG, Rebitski G. Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and demineralized freeze-dried bone allograft: Part II. Immediate endosseous implant placement. *Journal of periodontology* 2000;71:1360-1364.
19. Anderegg CR MD, Nicoll BK. . Gingiva thickness in guided tissue regeneration and associated recession at facial furcation defects. *J Periodontol* 1995;66:397-402.
20. von Arx T, Broggini N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2005;20:843-853.
21. Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. *Journal of periodontology* 2001;72:512-516.

22. Fowler EB, Breault LG, Rebitski G. Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and demineralized freeze-dried bone allograft: Part I. A report of 2 cases. *Journal of periodontology* 2000;71:1353-1359.
23. Novaes AB, Jr., Souza SL. Acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration: a case report. *Implant Dent* 2001;10:192-196.
24. Novaes AB, Jr., Papalexiou V, Luczyszyn SM, Muglia VA, Souza SL, Taba Junior M. Immediate implant in extraction socket with acellular dermal matrix graft and bioactive glass: a case report. *Implant Dent* 2002;11:343-348.
25. Griffin TJ, Cheung WS, Hirayama H. Hard and soft tissue augmentation in implant therapy using acellular dermal matrix. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2004;24:352-361.
26. Luczyszyn SM, Papalexiou V, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SL, Taba M, Jr. Acellular dermal matrix and hydroxyapatite in prevention of ridge deformities after tooth extraction. *Implant Dent* 2005;14:176-184.
27. de Andrade PF, de Souza SL, de Oliveira Macedo G, et al. Acellular dermal matrix as a membrane for guided tissue regeneration in the treatment of Class II furcation lesions: a histometric and clinical study in dogs. *Journal of periodontology* 2007;78:1288-1299.
28. Seibert J, Nyman S. Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. *Journal of periodontology* 1990;61:157-165.
29. Lindhe J PR, Berglundh T, Araujo M. . The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *Journal of clinical periodontology* 1995;22:276-283.

30. Novaes AB, Jr., Grisi DC, Molina GO, Souza SL, Taba M, Jr., Grisi MF. Comparative 6-month clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recession. *Journal of periodontology* 2001;72:1477-1484.
31. Andrade PF, Felipe ME, Novaes AB, Jr., et al. Comparison between two surgical techniques for root coverage with an acellular dermal matrix graft. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:263-269.
32. Paolantonio M, Dolci M, Esposito P, et al. Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: a comparative 1-year clinical study. *Journal of periodontology* 2002;73:1299-1307.
33. Aichelmann-Reidy ME, Yukna, R. A., Evans, G. H., Nasr, H. F., Mayer, E. T. Clinical evaluation of acellular allograft dermis for the treatment of human gingival recession. *Journal of periodontology* 2001;72:998-1005.
34. Novaes AB Jr GD, Molina GO, Souza SLS, Taba M Jr, Grisi MFM. Comparative 6- month clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix for the treatment of gingival recession. *Journal of periodontology* 2001;72:1477-1484.

Resumo

RESUMO

Objetivo: O presente estudo avaliou, clínica e histomorfometricamente, a matriz dérmica acelular (MDA) como barreira física na regeneração óssea guiada.

Materiais e Métodos: Inicialmente foram extraídos, em seis cães, os quatro pré-molares mandibulares bilateralmente. Após um período de seis semanas, foram analisadas a quantidade e qualidade de mucosa ceratinizada (Exame Clínico 1). Duas semanas depois, os animais foram submetidos a um segundo procedimento cirúrgico (Confecção do defeito e Regeneração Óssea Guiada – ROG), no qual foi criado um defeito ósseo padronizado em cada lado da mandíbula. Sobre o defeito de um hemiarco, escolhido aleatoriamente, foi posicionada e fixada a membrana absorvível de copolímeros de ácido polilático e poliglicólico e carbonato trimetileno (Grupo Controle - GC) e no defeito do hemiarco oposto, a matriz dérmica acelular - MDA (Grupo Teste - GT). Imediatamente após a sutura, foram feitas tomadas radiográficas padronizadas através de raio-X digital, as quais foram novamente realizadas 8 e 16 semanas após a cirurgia de colocação das membranas. Após quatorze semanas de cicatrização, a quantidade e qualidade da mucosa ceratinizada foram novamente avaliadas (Exame Clínico 2). Dezesesseis semanas depois da ROG os animais foram sacrificados e foi então realizado o preparo histológico das peças. A análise histomorfométrica, em microscopia óptica, avaliou a quantidade e qualidade de osso neoformado. A neoformação óssea também foi quantificada através das imagens radiográficas.

Resultados: Em relação aos parâmetros clínicos, o GT e o GC apresentaram aumento na EMQ e redução na AMQ. Na análise radiográfica, após o período de 16 semanas, as radiografias de subtração apresentaram ganho médio de área

radiopaca em relação ao defeito inicial de 83,38 % para o GT e de 83,68% para o GC. Houve um aumento progressivo da densidade radiográfica para ambos os grupos, sem diferenças estatisticamente significantes. Histologicamente, após 16 semanas o tecido ósseo apresentou características de um osso predominantemente maduro. Histomorfometricamente, a ANO correspondeu a 58,99% da ANT no GT e a 61 % da ANT no GC. A altura óssea máxima no GT foi de $7,21 \pm 0,80$ mm e no GC de $7,70 \pm 1,21$ mm. A porcentagem de osso cortical na ANO foi de 42,47 % no GT e 38,08 % no GC. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para nenhum destes parâmetros.

Conclusão: A MDA atuou como barreira mecânica na ROG com resultados clínicos, radiográficos e histomorfométricos similares aos obtidos com a membrana absorvível.

Palavras-chave: regeneração óssea guiada; matriz dérmica acelular, membrana absorvível

Introdução

INTRODUÇÃO

Na prática da odontologia, os profissionais encontram dificuldades na execução do tratamento de seus pacientes em razão de qualidade e quantidade insuficientes de tecido ósseo. Isto é uma constante, sobretudo, na área da implantodontia. Cada vez mais pacientes procuram os implantes osseointegrados como forma de reabilitar ausências dentárias. Contudo, um número considerável destes pacientes necessita de reconstruções ósseas para viabilizar o sucesso estético-funcional dos implantes. Nestes casos, pode-se lançar mão das técnicas de regeneração óssea guiada (ROG)¹⁻⁵. A ROG também está indicada para regeneração óssea em alvéolos frescos, para formar osso ao redor de implantes imediatos e para correção de perdas ósseas que ocorreram durante ou depois da osseointegração dos implantes^{1, 6-11}.

A ROG obedece ao mesmo princípio biológico da técnica de regeneração tecidual guiada (RTG.), que consiste na utilização de barreiras físicas para evitar que os tecidos periodontais incapazes de promover regeneração entrem em contato com a superfície radicular durante o processo de cura¹². O objetivo principal da regeneração óssea guiada é direcionar a neoformação óssea, evitando que células do tecido conjuntivo denso proliferem rapidamente, ocupando o espaço destinado ao preenchimento ósseo^{13 14, 15}.

Os materiais utilizados como barreira (membrana) devem ser biocompatíveis, a fim de não induzir respostas imunogênicas. Devem também permitir a passagem de nutrientes e gases e ter uma adequada integração tecidual. As características estruturais destes materiais devem fazer com que impeçam a proliferação apical de células indesejáveis (células epiteliais e do tecido conjuntivo gengival) para a área a

ser regenerada, além de permitir a criação e manutenção de um espaço destinado ao coágulo, que posteriormente será ocupado por células provenientes do ligamento periodontal e do osso alveolar. É importante também que as barreiras sejam fáceis de manipular e adaptar sobre o defeito a ser regenerado ¹⁶.

Membranas absorvíveis e não absorvíveis podem ser utilizadas nos procedimentos de ROG ¹⁷⁻¹⁹. No entanto, o emprego da membrana não absorvível requer a realização de um segundo procedimento cirúrgico para removê-la, o que gera desconforto ao paciente e risco de perturbar os tecidos neoformados sob a barreira ^{20, 21}. As membranas absorvíveis apresentam a vantagem de eliminar a fase cirúrgica de remoção; entretanto, uma vez expostas e infectadas, são difíceis de serem removidas ²². Segundo alguns autores, o uso de membranas absorvíveis deve estar associado à utilização de substitutos ósseos ou materiais de preenchimento para garantir a manutenção do espaço destinado à regeneração ^{23, 24}. Membranas absorvíveis podem ser constituídas de colágeno ou por diferentes tipos de poliésteres como o ácido polilático ou poliglicólico, ou ainda pela combinação de ambos. Estudos clínicos e experimentais em animais têm demonstrado bons resultados regenerativos e poucas complicações pós-operatórias com a utilização de barreira absorvível composta por um copolímero de ácidos polilático-poliglicólico em defeitos infra-ósseos ^{25, 26}, lesões de bifurcação grau II ^{27, 28} e tratamento de recessões gengivais ^{29, 30}. A literatura revela não haver diferenças clínicas e histológicas significantes entre membranas não absorvíveis de politetrafluoretileno expandido (PTFEe) e absorvíveis[†], mesmo a longo prazo ^{16, 31, 32}.

Problemas associados ao período de cura, como exposição prematura da membrana na cavidade oral e possível contaminação desta, poderão ocorrer com o

[†] Gore Resolut, W. L. Gore and Associates, Inc., Flagstaff, Arizona, E.U.A

emprego das membranas absorvíveis e não absorvíveis. A infecção da barreira poderá gerar complicações pós-cirúrgicas graves como abscessos e dor, sendo necessária a sua remoção^{22, 33}. Alguns autores associaram a contaminação da membrana a menores ganhos ósseos^{34, 35}. Entretanto, alguns estudos relataram que o uso adequado de antibióticos e de agentes químicos locais para controle de placa até a remoção da barreira poderá ser eficiente no controle da infecção, de modo que os resultados não serão afetados³⁶⁻³⁸.

A matriz dérmica acelular (MDA) é um material derivado de pele humana, obtido em bancos de tecidos, do qual são removidos os componentes celulares, responsáveis pela resposta imunológica e incompatibilidade de antígenos, permanecendo a matriz extracelular constituída por fibras colágenas e elásticas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas como laminina e fibronectina. Foi introduzida na Periodontia na década de 1990, como um potencial substituto dos enxertos autógenos nas cirurgias mucogengivais. A MDA tem sido indicada para casos de recobrimento radícula^{29, 39, 40}, aumento de mucosa queratinizada^{17, 41}, correção de deformidades de rebordos edêntulos⁴² e remoção de manchas melânicas^{43, 44}. Recentemente, Andrade et al. (2007)⁴⁵, demonstraram sua capacidade em atuar como barreira física na RTG, propiciando também o aumento da espessura da mucosa queratinizada. Além disso, este biomaterial foi utilizado em humanos como barreira em regeneração óssea guiada, demonstrando vantagens em relação às membranas convencionais¹⁷. A MDA pode ficar exposta à cavidade oral, uma vez que a contaminação desta parece não ocorrer de forma significativa, e também tem a capacidade de proporcionar aumento da faixa de mucosa queratinizada e da espessura gengival^{17, 41}.

Entretanto, embora clinicamente a MDA pareça funcionar adequadamente como barreira para a ROG, com algumas vantagens em relação às membranas, não existem estudos controlados em animais que permitam uma comparação histológica e um melhor entendimento dos processos biológicos envolvidos.

Desse modo, este estudo teve como objetivo avaliar a MDA como barreira na Regeneração Óssea Guiada, comparando-a com uma membrana absorvível de copolímeros de ácido polilático e poliglicólico e carbonato de trimetileno, analisando clínica, radiográfica e histomorfometricamente a qualidade e quantidade de regeneração óssea obtida.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP (protocolo nº 06.1.420.53.8). Todos os procedimentos experimentais foram realizados subsequentemente a esta aprovação.

Seqüência Cirúrgica do Experimento

As etapas de desenvolvimento do trabalho obedeceram à seguinte seqüência: Preparo inicial, Cirurgia 1 (extração dos pré-molares mandibulares P1, P2, P3 e P4, criando um espaço edêntulo de aproximadamente 50 mm); após 6 semanas avaliação da mucosa queratinizada (Exame clínico 1); 2 semanas após, realização da Cirurgia 2 (criação de um defeito ósseo retangular bilateralmente e colocação da membrana absorvível[‡] e da matriz dérmica acelular[§]); avaliação radiográfica controle, 8 semanas após a Cirurgia 2; segunda avaliação da mucosa queratinizada (Exame clínico 2), avaliação radiográfica final e sacrifício dos cães 16 semanas após a Cirurgia 2.

Seleção dos Animais

Foram selecionados inicialmente 7 cães adultos jovens, de raça indefinida, com peso variando entre 25 a 35 Kg. Os animais apresentavam dentes

[‡] Osseoquest, Gore and Associates, Inc., Flagstaff, Arizona, E.U.A.

[§] Alloderm, Life Cell Corporation, New Jersey, EUA.

mandibulares e maxilares hígidos, não possuíam lesões bucais de origem viral e/ou fúngica, ausência de doença periodontal e gozavam de boa saúde geral.

Preparo Inicial

Inicialmente, os cães receberam tratamento anti-parasitário, complexos polivitamínicos, vacinas e foi realizada profilaxia com ultra-som^{**}. As profilaxias e os procedimentos cirúrgicos de todo o experimento eram realizados após sedação dos animais.

Cirurgia 1 – Extração dos quatro pré-molares mandibulares bilateralmente

Os cães foram mantidos em jejum desde a noite anterior ao ato cirúrgico. Receberam injeção intramuscular do pré-anestésico Zolazepan a 0,10 ml/kg e Acepromazina a 0,10ml/kg. A manutenção anestésica foi realizada com anestésico volátil diluído em oxigênio- Isoflurano[°]- até o fim do ato cirúrgico.

Após anestesia local, retalhos de espessura total foram realizados bilateralmente na região dos 4 pré-molares mandibulares. Os dentes foram seccionados no sentido vestibulo-lingual na região de bifurcação para extração individual das raízes, sem prejuízo a nenhuma das paredes ósseas. Após as extrações, os sítios foram debridados com remoção de todo tecido de granulação e ativação dos espaços medulares (reservatórios de células ósseas endoteliais), através da raspagem da cortical óssea com cinzéis. Em seguida, os retalhos foram reposicionados e suturados com fio absorvível 4-0. (Figuras 1, 2,3).

Os animais foram mantidos sob dieta pastosa por 14 dias para evitar ruptura da sutura. Semanalmente foi realizado o controle da cicatrização através de aplicações de digluconato de clorexidina a 0,12%.

^{**} Cavitron 3000, Dentsply Mfg. Co., York, PA, E.U.A.

[°] Isoflurano, Instituto Bioquímico, Atibaia-SP.

Análise clínica da quantidade e qualidade da mucosa ceratinizada

Seis semanas após a Cirurgia 1 foram feitas as medidas iniciais (Exame clínico 1) da altura e espessura de mucosa queratinizada (AMQ e EMQ, respectivamente). Para tal, foram confeccionadas placas de acetato sob medida para cada hemiarco mandibular dos cães, nas quais foram realizadas marcações, visando estabelecer de forma padronizada os locais para as medições da AMQ e EMQ (Figura 1A). As marcações eram feitas na região do defeito a ser confeccionado, sendo uma na vestibular, uma na oclusal e uma na lingual. Um único pesquisador realizou todas as medidas clínicas do estudo.

A AMQ foi avaliada por vestibular (AMQ-V) e lingual (AMQ-L), sendo, respectivamente, a distância entre a marcação oclusal e a linha mucogengival por vestibular ou lingual. Foi utilizado um compasso de ponta seca e posteriormente essas medidas foram transferidas para um paquímetro (Figuras 1B, 1C e 1D).

A EMQ foi verificada em três locais, por vestibular (EMQ-V), oclusal (EMQ-O) e lingual (EMQ-L) (Figuras 1E, 1F e 1G), nos pontos correspondentes às marcações da placa. Estas medidas foram realizadas com o auxílio de uma sonda periodontal milimetrada associada a um “stop” de borracha. A sonda era posicionada perpendicularmente à superfície da mucosa queratinizada, penetrando através do tecido mole até que uma superfície dura fosse sentida; o “stop” de borracha era então colocado em contato direto com a superfície externa da mucosa posteriormente, a sonda era removida, de forma cuidadosa, para que a profundidade da penetração registrada pudesse ser medida por um paquímetro (Figura 1H). As medidas da EMQ-V, EMQ-O e EMQ-L foram verificadas 3 vezes, sendo calculada uma média dos valores obtidos.

FIGURA 1 - **A**: placas de acetato confeccionadas sob medida para cada hemiarco mandibular dos cães; **B**: compasso de ponta seca e paquímetro; **C** medida de AMQ = distância entre a marcação oclusal e a linha mucogengival por vestibular ou lingual; **D**: registro da altura de mucosa ceratinizada; **E, F e G** : registro de medida de EMQ por oclusal, vestibular e lingual com o auxílio de uma sonda periodontal milimetrada e stop de borracha; **G**: registro da espessura de mucosa queratinizada

Cirurgia 2 – Confeção dos Defeitos e colocação da Membrana e da Matriz Dérmica Acelular

Decorrido o período de cicatrização de 8 semanas, os animais foram submetidos a este segundo procedimento cirúrgico. Previamente foi realizada profilaxia com ultra-som e aplicação do digluconato de clorexidina a 0,12% com gaze. Após a repetição da seqüência de sedação e anestesia anteriormente citadas, foi realizada uma incisão no rebordo alveolar com extensão de canino a molar (Figura 2A e 2B). Com o auxílio de um sindesmótomo, um retalho de espessura total foi cuidadosamente elevado por vestibular e lingual, expondo todo o rebordo alveolar. Próximo à base da mandíbula, foi feita a dissecação de um retalho parcial, para facilitar a mobilização deste retalho misto (parcial na base + total) quando da sutura. Em seguida, um defeito ósseo retangular envolvendo a crista do rebordo foi confeccionado bilateralmente com o auxílio de brocas diamantadas em baixa rotação e instrumentos manuais, sob irrigação constante e abundante com soro fisiológico (Figura 2C). A dimensão de cada defeito foi de 8 mm no sentido ápico-coronal, 12 mm no sentido méso-distal e 10 mm no sentido buco-lingual, medidas que configuram um defeito crítico⁴⁶ (Figuras 2D, 2E e 2F). Nas extremidades mesial e distal de cada defeito, a uma distância de 3 mm da base, foi fixado um parafuso não-absorvível de titânio como uma marcação.

Em um hemiarco, selecionado aleatoriamente, foi adaptada a membrana absorvível (Osseoquest), sendo este definido como Grupo Controle (GC). A membrana foi devidamente recortada de acordo com o formato do defeito e posicionada de maneira a recobri-lo todo, ultrapassando suas margens de 2 a 3 mm. A membrana foi mantida em posição através dos parafusos de titânio fixados pelo lado vestibular e por dois parafusos fixados pelo lado lingual (Figura 2G). Na

seqüência, o retalho foi reposicionado e suturado com fio absorvível, de modo a recobrir totalmente a membrana. A matriz dérmica acelular foi adaptada no defeito ósseo do hemiarco oposto (Figura 2H) seguindo toda a seqüência anteriormente descrita para a membrana, constituindo o Grupo Teste (GT)

Após a colocação da matriz dérmica acelular e sutura do retalho, foram realizadas tomadas radiográficas dos defeitos ósseos, com o auxílio de posicionador individualizado, previamente confeccionado, e de um sensor digital de imagens.

Tratamento pós-operatório:

Foram administrados por três dias o analgésico Cloridrato de tramadol (50mg/ml)^{††} na proporção de 3mg/kg, a cada 12 horas e o antiinflamatório Ketofen 20^Θ na proporção de 1 comprimido /20 Kg. Além disso, os animais receberam por 10 dias o antibiótico Espiramicina[‡] na proporção de 1 comprimido /10 Kg. O controle da cicatrização foi periódico, com controle diário de placa bacteriana através de aplicações de digluconato de clorexidina a 0,12%. Após 15 dias do ato cirúrgico as suturas foram removidas e neste período os cães foram alimentados com ração pastosa.

^{††}Tramal®, Laboratórios Pfizer Ltda, São Paulo,sp.

^Θ Ketofen, Merial Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP.

[‡] Stomorgyl 10, Merial Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP.

Figura 2: A Incisão de canino a molar; B – Dimensões do defeito ósseo no sentido vestibulo-lingual 10 mm; C - Dimensões do defeito ósseo no sentido méso-distal = 12 mm; D - Dimensões do defeito ósseo no sentido ápico-coronal; E - Membrana absorvível posicionada, adaptada e fixada; F: suturas; G - Matriz Dérmica Acelular posicionada, adaptada e fixada; H: suturas

Avaliação Radiográfica Controle

Oito semanas após a Cirurgia 2, os animais foram sedados conforme descrito anteriormente, e foram realizadas novas tomadas radiográficas dos defeitos ósseos, do mesmo modo previamente citado .

Sacrifício dos cães

Os animais foram sacrificados 16 semanas após a Cirurgia 2, com uma alta dose de thiopental sódico e posteriormente cloreto de potássio. Previamente ao sacrifício, as medidas da altura e espessura de mucosa ceratinizada (Exame clínico 2) foram novamente realizadas, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Foram também obtidas as tomadas radiográficas finais do rebordo mandibular, bilateralmente.

Seqüência Laboratorial do Experimento

As etapas laboratoriais seguiram a seguinte seqüência: preparo das peças; confecção das lâminas histológicas; análise histomorfométrica, avaliação radiográfica e análise estatística.

Preparo das peças

Inicialmente, foi realizada a dissecação das mandíbulas para remoção dos blocos ósseos e dos tecidos circunvizinhos envolvidos na pesquisa . Em seguida, cada bloco ósseo foi seccionado ao meio, tendo como referência os parafusos de titânio que foram fixados nas extremidades mesial e distal de cada defeito ósseo. A metade mesial do bloco ósseo foi destinada para preparo de corte descalcificado.

Para tal, primeiramente foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (pH 7) por 48 horas e, em seguida, lavadas em água corrente. Na seqüência, foram descalcificadas em banhos múltiplos de ácido tricloroacético a 10% por cerca de 60 dias e neutralizadas com solução de sulfato de sódio a 5%; posteriormente, as peças foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool a 70% (durante a noite), 80%, 85%, 90%, 95%, 100% e finalmente pela combinação de álcool mais xilol. Em seguida, foram diafanizadas em xilol, com três trocas de solução a cada duas horas e por fim, embebidas em parafina.

A metade distal de cada bloco ósseo foi fixada em uma solução a 4% de formalina (pH 7), por 10 dias e transferida para uma solução de etanol a 70%. Futuramente esses espécimes serão preparados para corte não-descalcificado.

Confecção das Lâminas para Análises Histológica e Histomorfométrica

Após o preparo das peças, com o auxílio de um micrótomo^{††}, foram obtidos cortes semi-seriados, da metade mesial dos blocos ósseos. Estes cortes, de 6 µm de espessura cada, foram feitos no plano méso-distal e até que fosse atingido o parafuso de titânio, fixado na extremidade mesial do defeito ósseo.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou tricrômico de Mallory (TM): a cada quinze lâminas, a primeira foi corada com HE, e a seguinte com TM (por exemplo, a primeira com HE e a segunda com TM, a décima quinta com HE e a décima sexta com TM, e assim sucessivamente). Desse modo, houve um intervalo de ao menos 84 µm entre dois cortes com mesma coloração.

^{††} Rotary Microtome HM 335 E, MICROM Laborgeräte GmbH, Carl-Zeiss, Alemanha.

Análise Histomorfométrica

Nove cortes histológicos da metade mesial do defeito ósseo foram examinados através de microscopia óptica sob luz convencional e polarizada, a fim de avaliar os tecidos neoformados. Destes nove cortes, três correspondiam ao terço inicial (mais mesial) do defeito ósseo, três ao terço central e os outros três ao terço final (mais distal – próximos à porção mediana do defeito cirúrgico confeccionado) do defeito.

Uma câmera de vídeo^{§§}, associada a um microscópio^{***}, possibilitou a realização das medidas histomorfométricas. As imagens visualizadas no microscópio eram registradas pela câmera, enviadas a um computador e processadas através de um programa específico^{†††}; em seguida, a histomorfometria foi realizada com o auxílio do programa Image Tool^{†††}. Foram obtidas medidas de área, em milímetros quadrados (mm²), e medida linear em milímetros (mm). Como medidas de área foram avaliadas a área de novos tecidos (ANT) e a área de novo osso (ANO) e como medida linear a altura óssea máxima (AO) (distância entre o osso mais coronal e a base do defeito – Figura 3). A densidade óssea (DO) do osso neoformado também foi analisada. Essa medida foi calculada e expressa em porcentagem, subtraindo-se a área dos espaços ósseos medulares da área total de nova formação óssea.

Todos os parâmetros histomorfométricos foram avaliados nos nove cortes e a média destas medidas foi calculada, representando assim a medida do defeito ósseo.

^{§§} Leica DC300, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Nussloch, Alemanha.

^{***} Leica DMLB, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Nussloch, Alemanha.

^{†††} Leica IM 50, Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, Inglaterra.

^{†††} UTHSCSA Image Tool for Windows, Version 3.00.

Figura 3: **N:** Note (marcação da base do defeito) ; **AO:** altura óssea máxima; **ANT:** área de novos tecidos; **ANO:** área de novo osso.

Avaliação Radiográfica

Todas as radiografias foram obtidas por um mesmo examinador, através de um sensor digital de imagens^{§§§} (Figura 4A) e de um aparelho de RX digital^{****}. O tempo de exposição foi fixado em 0,35 segundos e foi utilizada a técnica do paralelismo. Para padronização das imagens, utilizou-se ainda um posicionador radiográfico^{††††} e um registro de mordida em silicona de condensação^{††††}, previamente confeccionado para cada animal (Figura 4 B).

Com o objetivo de identificar mudanças ósseas, foi realizada a subtração digital nas imagens radiográficas (IR) adquiridas, com o auxílio do programa

^{§§§} RVG Trophy, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA.

^{****} Spectro 70X Seletronic (coluna móvel), Dabi Atlante, RP, Brasil.

^{††††} Rinn/ XCP filmholders and InSight®, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA.

^{††††} Optosil® Comfort Putty, Heraeus Kulzer South America Ltda., SP, Brasil

Emago[£]. Essa subtração foi feita aos pares, sendo: IR inicial (Figura 4C) e IR 8 semanas (Figura 4D) (Imagem I-8), IR inicial e IR 16 semanas (Figura 4E) (Imagem I-16) , IR 8 semanas e IR 16 semanas (Imagem 8-16) (Figura 4). Inicialmente, os pares de imagens foram abertos e alinhados, utilizando-se para isso quatro pontos em comum entre as duas imagens. Em seguida, foi feita a subtração linear entre os pares de imagens e uma nova imagem, representativa da diferença entre elas, foi obtida ⁴⁷. A partir dessas três novas imagens (I-8, I-16 e 8-16) (Figuras 4F, 4G e 4H), obtidas com a subtração, foi avaliada a área radiográfica de novo osso (ANO-R), em mm². A área radiográfica do defeito ósseo (ARD) foi mensurada, em mm², na IR inicial. A partir das medidas de ARD e ANO-R foi calculado o PO-R em 8 semanas (PO-R 8) e em 16 semanas (PO-R 16). Também foi avaliada radiograficamente a densidade óssea (DO-R), analisada em níveis de cinza, a partir das imagens radiográficas Inicial, 8 semanas e 16 semanas. Para análise da DO-R foram traçadas em cada imagem duas linhas imaginárias, uma horizontal e outra vertical, com o objetivo de se encontrar o centro da imagem. A partir desse ponto central (C), foram determinados outros três pontos: um coronal ao ponto central (Co), outro apical (A) ao ponto central e um ponto na base da mandíbula, externo ao defeito ósseo, o qual serviu como controle (Cr). Em cada ponto, foi posicionado um quadrado de 16 pixels² de área. A DO-R foi então calculada nos quatro pontos, nos quadrados de área conhecida ⁴⁸, sendo: DO-R-Co, DO-R-C, DO-R-A e DO-R-Cr. A DO-R total de cada imagem foi obtida pela média entre as DO-R-Co, DO-R-C e DO-R-A. As medidas de ARD, ANO-R, DO-R e PO-R, em cada imagem, foram realizadas com o auxílio do programa Image Tool [¥].

[£] Emago ® / Advanced 3.43 ,Oral DiagnosticSystems, Louwesweg, Amsterdam, Holanda.

[¥] UTHSCSA Image Tool for Windows, Version 3.00.

Figura 4: **A:** Sensor digital de imagens; **B:** Posicionador radiográfico e registro de mordida em silicone de condensação; **C:** IR inicial; **D:** IR 8 semanas; **E:** IR 16 semanas; **F:** Imagem obtida com a subtração entre IR inicial e IR 8 semanas (I-8); **G:** Imagem obtida com a subtração entre IR inicial e IR 16 semanas (I-16); **H:** Imagem obtida com a subtração entre IR 8 semanas e IR 16 semanas (8-16)

Análise Estatística

Seis animais (n=6) foram utilizados como unidade experimental. Os dados quantitativos foram registrados como média $\pm$ desvio padrão. A ocorrência ou não de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os GT e GC (inter-grupos), em relação aos parâmetros clínicos, histomorfométricos, e radiográficos, bem como as diferenças intra-grupos para os parâmetros clínicos e radiográficos foi avaliada através de análise estatística não paramétrica, para duas amostras relacionadas (Wilcoxon Sing Rank Test), com auxílio do programa SPSS^{§§§§}.

^{§§§§} SPSS, version 10.0, SPSS, Chicago, IL.

Resultados

RESULTADOS

Resultados Clínicos

Todos os procedimentos cirúrgicos foram bem tolerados pelos animais e nenhuma complicação sistêmica trans ou pós-operatória foi observada. Contudo, em dois cães da amostra (cães 1 e 5), ocorreu exposição da membrana. No cão 1, dez dias após a realização da cirurgia 2, foi observada abertura do retalho com grande exposição, deslocamento e ruptura da membrana, tendo esta perdido as suas funções de barreira física e manutenção de espaço. Em função disso, esse animal foi excluído da amostra avaliada, motivo pelo qual para todas as análises estatísticas foi utilizado um “n” = 6. No cão 5, por sua vez, uma semana após a cirurgia 2, notou-se pequena deiscência da ferida cirúrgica, com conseqüente exposição da membrana, sendo realizada sutura no local da exposição. Dez dias após, foi observada nova pequena abertura do retalho, com degradação parcial da membrana no local da exposição - a parte exposta da membrana foi então removida. Para controlar a contaminação da membrana, foi aplicado sobre a ferida digluconato de clorexidina a 0,12% e estabelecida antibioticoterapia sistêmica, procedimento que se repetiu diariamente nos próximos quinze dias. No décimo quinto dia, o animal foi então novamente sedado e notou-se que a área previamente exposta estava totalmente cicatrizada - dessa forma, esse cão permaneceu na amostra estudada.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à AMQ-V, AMQ-L, EMQ-V, EMQ-O e EMQ-L no exame Clínico 1 (Tabela 1), demonstrando a similaridade pré-operatória entre GT e GC. No Exame clínico 2, a comparação entre os grupos revelou diferença estatisticamente significativa entre eles somente em relação à AMQ-V ($p= 0.028$), tendo o GT apresentado média de $3,21 \pm 0,85$ e o GC média de $4,41 \pm 1,05$ (Tabela 1).

Comparações intra-grupos entre as medidas realizadas no exame clínico 1 e 2 demonstraram que ambos os grupos tiveram um aumento na EMQ e redução na AMQ. No GT foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para a EMQ-L ($p=0,027$), AMQ-V ($p=0,028$) e AMQ-L ($p=0,028$). No GC, por sua vez, a diferença estatística foi significativa apenas na AMQ-L ($p=0,028$) (Tabela 2).

Tabela 1. Comparações entre os grupos teste (GT) e controle (GC) das médias (mm) dos parâmetros clínicos nos exames 1 e 2.

Parâmetros	GT	GC	Valor de $p^{\dagger}$	GT	GC	Valor de $p^{\dagger}$
	Exame 1	Exame 1		Exame 2	Exame 2	
EMQ-V	1,27 ± 0,53	1,28 ± 0,53	0,916	1,75 ± 0,36	2,14 ± 0,72	0,173
EMQ-O	1,60 ± 0,43	1,49 ± 0,56	0,917	1,88 ± 0,31	1,88 ± 0,64	0,686
EMQ-L	0,97 ± 0,17	1,01 ± 0,28	0,752	1,44 ± 0,24	1,22 ± 0,66	0,60
AMQ-V	3,90 ± 0,75	4,77 ± 0,98	0,173	3,21 ± 0,85	4,41 ± 1,05	0,028*
AMQ-L	6,78 ± 1,63	6,98 ± 0,65	1,0	5,19 ± 1,55	4,19 ± 1,55	0,249

EMQ-V: Espessura da mucosa queratinizada vestibular; EMQ-O: Espessura da mucosa queratinizada oclusal; EMQ-L: Espessura da mucosa queratinizada lingual; AMQ-V: Altura da mucosa queratinizada por vestibular; AMQ-L: Altura da mucosa queratinizada por lingual.

† Teste de Wilcoxon;

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2. Comparações entre os exames 1 e 2 das médias (mm) dos parâmetros clínicos nos grupos teste e controle (comparações intra-grupos).

Parâmetros	Grupo Teste			Grupo Controle		
	Exame 1	Exame 2	Valor de $p^{\dagger}$	Exame 1	Exame 2	Valor de $p^{\dagger}$
EMQ-V	1,27 ± 0,53	1,75 ± 0,36	0,075	1,28 ± 0,53	2,14 ± 0,72	0,075
EMQ-O	1,60 ± 0,43	1,88 ± 0,31	0,463	1,49 ± 0,56	1,88 ± 0,64	0,463
EMQ-L	0,97 ± 0,17	1,44 ± 0,24	0,027*	1,01 ± 0,28	1,22 ± 0,66	0,345
AMQ-V	3,90 ± 0,75	3,21 ± 0,85	0,028*	4,77 ± 0,98	4,41 ± 1,05	0,463
AMQ-L	6,78 ± 1,63	5,19 ± 1,55	0,028*	6,98 ± 0,65	4,19 ± 1,55	0,028*

EMQ-V: Espessura da mucosa queratinizada vestibular; EMQ-O: Espessura da mucosa queratinizada oclusal; EMQ-L: Espessura da mucosa queratinizada lingual; AMQ-V: Altura da mucosa queratinizada por vestibular; AMQ-L: Altura da mucosa queratinizada por lingual.

† Teste de Wilcoxon;

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Resultados Histológicos

Em ambos os grupos foram observadas lamelas concêntricas a canais de Havers, indicando a presença de osso lamelar (maduro, secundário) (Figura 5C) Eram também observadas áreas de matriz óssea exibindo aspectos de feixes colágenos em diferentes direções, interpretadas como osso imaturo (woven bone) residual. Foi verificada a pavimentação de osteoblastos tanto na superfície interna das lamelas quanto na superfície externa do osso formado. Também pôde ser observada a presença de matriz osteóide em algumas áreas da superfície externa do novo osso, lamelas interrompidas/parcialmente reabsorvidas, indicando remodelação do osso maduro formado (Figura 5D) bem como de linhas incrementais no interior da matriz óssea .

Em dois sítios do GC, foram observados remanescentes da membrana absorvível Osseoquest (figura 5E) associada a uma mínima reação inflamatória, caracterizada pela presença de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. Além disso, em um sítio do grupo controle, no qual houve exposição da membrana no período pós-operatório (cão 5), foi observada pequena migração de tecido conjuntivo para o interior do defeito ósseo (Figura 5F)

Figura 5: Imagem histológica grupo controle; **B:** Imagem histológica grupo teste; **C:** Lamelas concêntricas indicando presença de osso lamelar; **D:** Lamelas interrompidas/parcialmente reabsorvidas, indicando remodelação do osso maduro formado; **E:** Remanescentes da membrana absorvível Osseoquest; **F:** Migração de tecido conjuntivo para o interior do defeito ósseo.

Resultados Histomorfométricos

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para nenhum dos parâmetros histomorfométricos avaliados (Wilcoxon Sing Rank Test, $p < 0,05$) (Tabela 3). A média da área de novos tecidos (ANT) no GT foi de $73,04 \pm 0,96 \text{ mm}^2$ e no GC de $69,42 \pm 7,45 \text{ mm}^2$ ($p=0,114$). A média da área de novo osso (ANO) foi de $42,05 \pm 5,37 \text{ mm}^2$ para o Grupo Teste e de $43,96 \pm 9,26 \text{ mm}^2$ no Grupo Controle ($p=0,917$). A média de ANO no GT correspondeu a 58,99 % e no GC a 61,00 % da ANT. Em relação à altura óssea máxima (AO), a média do Grupo Teste foi de $7,21 \pm 0,80 \text{ mm}$ e do Grupo Controle de $7,70 \pm 1,21 \text{ mm}$ ($p=0,463$). No GT a área de novo osso cortical (densidade óssea – DO), correspondeu em média a 42,47% da ANO, enquanto no GC a densidade óssea observada foi de 38,08% da ANO ($p=0,463$).

Resultados Radiográficos

Radiograficamente, pode-se observar após 8 e 16 semanas da Cirurgia 2, uma imagem sugestiva de neoformação óssea, tanto no GT como no GC.

Inicialmente, para se verificar a padronização entre as radiografias, foi realizada uma análise estatística (Friedman Test) entre a média da DO-R-Cr nas radiografias inicial, 8 semanas e 16 semanas, em ambos os grupos. Essa análise confirmou a padronização entre as imagens radiográficas, não sendo verificada para a DO-R Cr diferença estatisticamente significativa entre elas (GT, $p= 0,4437$; GC, $p= 0,4378$)

Na IR inicial foi encontrada para o Grupo Teste uma média de ARD de $125,18 \pm 18,36 \text{ mm}^2$ e no Grupo Controle de $126,10 \pm 10,16 \text{ mm}^2$, não havendo entre os grupos diferença estatística significativa ($p = 0,916$). Na imagem subtraída entre IR

inicial e IR 8 semanas foi encontrada uma média de ANO-R para o GT de $98,43 \pm 24,33 \text{ mm}^2$ e para o GC de $102,30 \pm 16,51 \text{ mm}^2$. As diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes ($p= 0, 752$). A porcentagem de preenchimento ósseo radiográfico (PO-R) após 8 semanas da Cirurgia 2 foi para o Grupo Teste de $78,41 \pm 11,06\%$ e para o Grupo Controle de $79,42 \pm 7,58 \%$, não havendo significativa diferença entre eles ($p=0,752$). Na avaliação entre IR inicial e IR 16 semanas, por sua vez, foi obtida uma média de ANO-R no GT de $103,54 \pm 19,69 \text{ mm}^2$ e no GC de $108,12 \pm 21,96 \text{ mm}^2$. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p= 0, 599$). O PO-R em 16 semanas foi para o GT e o GC respectivamente de $83,38 \pm 7,85 \%$ e $83,68 \pm 11,03 \%$ ($p= 0, 916$). Todos esses dados estão sintetizados na Tabela 3. Em ambos os grupos, através da subtração de imagens entre IR 8 semanas e IR 16 semanas, não houve diferença radiográfica detectável. Desse modo, não foi possível calcular a ANO-R.

Em uma análise intra-grupo, tanto para o GT como para o GC, não foi notada diferença estatisticamente significativa entre a ANO-R inicial e após 8 semanas e ANO-R inicial e após 16 semanas, sendo $p=0,115$ para os dois grupos.

Em relação à DO-R, na avaliação radiográfica de 8 semanas, a média da DO-R total (média entre DO-R-Co, DO-R-C e DO-R-A) no GT foi de $116,44 \pm 16,37$ e no GC de $119,77 \pm 26,88$, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,463$). Após 16 semanas da Cirurgia 2, a média desse mesmo parâmetro subiu para $129,11 \pm 15,70$ no GT e para $125,77 \pm 13,35$ no CG. A diferença entre os grupos também não foi significativa estatisticamente, com $p=0, 686$. (Gráfico 1)

Avaliando-se separadamente a média da DO-R em cada um dos pontos selecionados, ou seja, DO-R-Co, DO-R-C e DO-R-A, em 8 e 16 semanas, observou-

se uma similaridade entre o GT e GC não sendo detectada diferença estatística entre eles. (Tabela 4).

Tabela 3. Comparações entre os grupos teste (GT) e controle (GC) das médias da ANO-R e da % de PO-R nos tempos de 8 e 16 semanas.

	8 semanas			16 semanas		
	GT	GC	$P^{\dagger}$	GT	GC	$P^{\dagger}$
ARD (mm ²)	125,18 $\pm$ 18,36	126,10 $\pm$ 10,16	0,91	125,18 $\pm$ 18,36	126,10 $\pm$ 10,16	0,91
ANO-R (mm ²)	98,43 $\pm$ 24,33	102,30 $\pm$ 16,51	0,75	103,54 $\pm$ 19,69	108,12 $\pm$ 21,96	0,59
% PO-R	78,41 $\pm$ 11,06	79,42 $\pm$ 7,58	0,75	83,38 $\pm$ 7,85	83,68 $\pm$ 11,03	0,91

ARD: área radiográfica do defeito ósseo inicial; ANO-R : área radiográfica de novo osso; % PO-R : porcentagem de preenchimento ósseo radiográfico

† Teste de Wilcoxon;

DO-R: densidade óssea radiográfica

Gráfico 1. Comparações entre os grupos teste (GT) e controle (GC) das médias da DO-R total , nos tempos de 8 e 16 semanas.

Tabela 4. Comparação entre os grupos teste (GT) e controle (GC) das médias da DO-R-Co, DO-R-C, DO-R-A em 8 e 16 semanas

8 semanas	DOR-Co	DOR-C	DO-RA
GT	73,16 ± 18,55	124,83 ± 17,81	151,33 ± 15,24
GC	73,16 ± 24,84	131,66 ± 32,90	154,50 ± 35,10
Valor de $P^{\dagger}$	0,917	0,6	0,917
16 semanas	DOR-Co	DOR-C	DO-RA
GT	93,50 ± 22,73	137,16 ± 17,92	156,66 ± 18,29
GC	84,16 ± 15,87	135,33 ± 18,65	157,83 ± 14,02
Valor de $P^{\dagger}$	0,08	0,893	0,893

DO-R-Co: Densidade óssea radiográfica coronal; DO-R-C: Densidade óssea radiográfica central; DO-R-A: Densidade óssea radiográfica apical

† Teste de Wilcoxon.

Estatisticamente significante $p < 0,05$

Discussão

DISCUSSÃO

A Regeneração óssea guiada tem sido usada com sucesso no tratamento de vários tipos de defeitos ósseos. Vários materiais, não-absorvíveis e absorvíveis, têm sido utilizados como membrana, apresentando resultados similares em relação à quantidade de neoformação óssea ^{24, 49-52}.

Em 1994, foi introduzida na Periodontia a Matriz Dérmica Acelular. Este biomaterial derivado de pele humana foi inicialmente indicado para procedimentos mucogengivais como uma alternativa aos enxertos de epitélio e tecido conjuntivo autógeno ^{40, 53-55}. Assim a MDA passou a ser largamente utilizada nos procedimentos para recobrimento radicular e correção de tecido mole em rebordo, demonstrando resultados positivos, sobretudo em relação ao ganho de mucosa queratinizada em espessura e altura ^{21, 42}. Em função desses resultados e de suas características estruturais, foram realizados trabalhos utilizando a matriz dérmica acelular nos procedimentos de ROG ^{17, 18, 42 19, 56 57}. Dessa maneira, como uma alternativa às membranas, a MDA foi utilizada na regeneração de alvéolos frescos, em associação à colocação de implantes e nos procedimentos para preservação de rebordo alveolar, demonstrando resultados satisfatórios. Andrade et al. em 2007⁴⁵, comprovaram a habilidade da MDA em atuar como uma membrana em procedimentos de RTG. No entanto, nenhum estudo controlado e randomizado em ROG havia sido realizado até o momento com o intuito de comprovar esses resultados clínicos positivos e avaliar a quantidade e qualidade do tecido ósseo neoformado.

Os resultados deste estudo demonstraram que a matriz dérmica acelular foi efetiva na função de barreira em ROG, sendo capaz de manter o espaço, excluir os

tecidos gengivais, permitindo assim adequada neoformação óssea, com resultados similares aos obtidos com a membrana absorvível de copolímeros de ácidos poliglicólico e polilático e carbonato trimetileno. Os defeitos ósseos cirurgicamente criados neste estudo tinham dimensões críticas (12x8x10mm), não sendo possível sua completa regeneração sem a utilização de uma barreira mecânica, como demonstrado por Schenk et al. em 1994⁴⁶. Esses autores verificaram que o grupo controle negativo exibiu uma cicatrização óssea incompleta, com defeito ósseo persistente, enquanto nos grupos teste, onde se utilizou membrana não-absorvível de PTFE-e, foi notada uma melhor cicatrização, com preenchimento ósseo satisfatório, embora a regeneração óssea não estivesse completa após 16 semanas. Bornstein et al. (2007)⁵⁸, por sua vez, não notaram diferença entre o grupo controle negativo e o grupo teste em relação ao ganho ósseo quando utilizaram uma membrana absorvível de colágeno – ambos os grupos não apresentaram neoformação óssea significativa. A análise histológica do presente estudo evidenciou, em ambos os grupos, após o período de cicatrização de 16 semanas, um tecido ósseo maduro, com lamelas concêntricas a canais de Havers e exibindo regiões de remodelação óssea, sobretudo nas bordas do defeito, mas ainda com a presença de um osso trabecular em processo de formação e osso imaturo residual de dimensões variadas, como já observado em outros estudos^{46, 58}. Desta maneira, como sugerido por Schenk et al.(1994) e²³, talvez um tempo de cicatrização superior a 4 meses seja necessário para que a regeneração óssea esteja completa.

Histomorfometricamente, os grupos apresentaram resultados similares. A quantidade de osso neoformado no grupo teste correspondeu a 58,99 % da área de novos tecidos, enquanto no grupo controle essa porcentagem foi de 61%. Esses resultados são similares aos obtidos por Schenk et al (1994)⁴⁶, que relatou que o

osso ocupava 55% do volume do defeito no mesmo período de tempo. A média da área de novo osso no grupo tratado com a MDA foi de 42,05 mm² e no grupo que recebeu a membrana essa área média foi de 43,96 mm², resultado numericamente superior ao relatado por Bornstein et al (2007)⁵⁸ (39,09 mm² de área de novo osso em defeitos tratados com uma membrana de colágeno experimental após 4 meses de cicatrização). A altura óssea máxima observada no GT e GC foi respectivamente de 7,21 mm e 7,70 mm⁵⁹, o que representa 90,12% e 96,25 % da altura do defeito ósseo cirurgicamente confeccionado. A porcentagem de tecido ósseo cortical após 4 meses de cicatrização foi 42,47% do ANO no GT e 38,08% no GC ($p=0,463$), corroborando os resultados de Schenk et al⁴⁶, que encontraram aproximadamente 38% de osso cortical. Jovanovic et al. (2007)²³, por sua vez, relataram uma densidade óssea variando entre 50 e 57% nos sítios controle ou tratados com ROG.

As radiografias de subtração retratam como uma área mais radiopaca as diferenças entre duas tomadas radiográficas. Em linguagem computacional, as imagens radiográficas são constituídas por pixels. Na subtração radiográfica digital, a subtração de dois pixels iguais resultaria no valor 0, gerando uma imagem preta. Para que isso não ocorra, o sistema automaticamente adiciona a cada subtração, pixel a pixel, o valor 128, o que resulta em uma imagem com um tom de cinza médio. Para as áreas em que a subtração dos pixels não for 0, o valor pode ser acima de 128, resultando em uma área mais clara, ou abaixo de 128, resultando em uma área mais escura^{47, 60}. Dessa forma, as áreas mais radiopacas nas radiografias de subtração foram interpretadas como uma possível neoformação óssea. Assim, após 8 semanas o GT mostrou uma taxa de preenchimento ósseo de 78,41 % e o GC de 79,42 % em relação à área radiográfica inicial do defeito. Já em 16 semanas de pós-operatório a imagem subtraída sugeriu uma porcentagem de novo osso igual

a 83,38 % quando se utilizou a MDA e a 83,68 % no grupo em que a Osseoquest foi utilizada. Novamente, os grupos demonstraram uma similaridade de resultados não havendo diferenças estatísticas entre eles. Jovanovic et al 2007²³ relataram completo preenchimento ósseo radiográfico; no entanto, eles avaliaram imagens convencionais e não de subtração.

Para os dois grupos, observou-se um aumento significativo da média dos níveis de cinza quando se comparou a radiografia inicial com as imagens de avaliação de 8 e 16 semanas, o que pode ser interpretado como uma crescente formação ou mineralização do tecido ósseo. Entretanto, não houve diferença estatística entre os dois tempos pós-operatórios (8 e 16 semanas). Isso parece mostrar que a maior parte do ganho ósseo detectável radiograficamente ocorre nas primeiras 8 semanas, não havendo mudanças significativas no intervalo desse período até 16 semanas.

Os resultados clínicos encontrados neste estudo foram similares em ambos os grupos. Tanto o GT como o GC apresentaram um aumento na espessura de mucosa queratinizada. No grupo teste foi notado um aumento significativo para EMQ lingual ($p=0,027$), fato que está de acordo com estudos anteriores que demonstraram a capacidade da MDA em aumentar a espessura de mucosa^{29, 53, 56, 61-63 64}. Em relação à altura de mucosa queratinizada, ambos os grupos demonstraram redução nesse parâmetro. No GT foi notada redução significativa na AMQ vestibular e lingual ($p=0,028$ em ambas). No GC, por sua vez, a diferença entre antes e depois da ROG foi significativa apenas para AMQ lingual. Em ambos os grupos foi realizada uma divisão do retalho apicalmente à base do defeito ósseo criado cirurgicamente, de modo a permitir o deslocamento passivo do retalho em direção coronal, garantindo a cobertura total da MDA e da membrana. Devido ao

deslocamento coronal do retalho, a linha mucogengival ficou posicionada mais coronalmente em relação à sua posição original, fato que pode explicar uma certa redução da altura de mucosa queratinizada em ambos os grupos. Sabe-se que a linha mucogengival tende a voltar à sua posição original no período pós-operatório⁶⁵, entretanto, 4 meses parece ter sido um tempo insuficiente para que isso ocorresse. Além disso, esse período de cicatrização de 4 meses pode ter sido insuficiente para que a MDA por si só proporcionasse um aumento da AMQ, fato que está de acordo com o estudo de Souza et al (2008)⁶⁶. Estes autores, em procedimento de recobrimento radicular, observaram que 6 e 12 meses não foi um tempo suficiente para se identificar um aumento significativo na altura de mucosa. Vale ressaltar ainda, que no relato de caso de Novaes Jr e Souza (2001)¹⁷, a matriz dérmica acelular foi propositalmente deixada exposta com o objetivo de se aumentar a largura de mucosa queratinizada, procedimento não realizado neste estudo, onde a MDA foi totalmente recoberta. A literatura de fato mostra resultados divergentes em relação à altura de mucosa queratinizada após a utilização da matriz dérmica acelular^{30, 63, 64}, visto que este aumento é dependente da migração de células com capacidade de estimular a diferenciação em mucosa queratinizada, o que é variável entre espécies e dentro de uma mesma espécie⁵³.

Apesar da semelhança entre os grupos em todos os resultados apresentados neste estudo, pôde-se observar que o período pós-operatório do grupo tratado com a MDA foi mais satisfatório, livre de intercorrências. No grupo controle, ocorreu exposição da membrana em dois animais, sendo um deles excluído da amostra. No cão que permaneceu no estudo, a contaminação da membrana foi controlada mediante a aplicação tópica de digluconato de clorexidina e administração sistêmica de antibioticoterapia, como descrito por diversos autores em estudos em humanos³⁷,

^{38, 67}. Clinicamente notou-se neste animal a degradação da porção exposta da membrana e histologicamente pequena migração dos tecidos gengivais para o interior do defeito ósseo, evidenciando que neste caso a membrana Osseoquest não exerceu adequadamente a função de barreira. Esses achados estão de acordo com vários estudos que demonstraram que as membranas absorvíveis, quando expostas na cavidade bucal, se degradam precocemente no período pós-operatório ^{22, 68-70}. Entretanto, essa intercorrência no período de cicatrização não se refletiu nos resultados finais do grupo controle – os resultados apresentados pelo animal em questão não diferiram substancialmente dos outros da amostra.

Os resultados clínicos, histomorfométricos e radiográficos obtidos neste estudo demonstram que a técnica de ROG foi efetiva em ambos os grupos (Matriz Dérmica Acelular e Membrana Absorvível), não havendo diferença entre eles. Desse modo, indicam que a matriz dérmica acelular tem capacidade de atuar como barreira física na regeneração óssea guiada.

Conclusão

CONCLUSÃO

A MDA apresentou resultados qualitativos e quantitativos similares à membrana absorvível de copolímeros de ácido polilático e poliglicólico e carbonato trimetileno quando avaliada, através de parâmetros clínicos, radiográficos e histomorfométricos na técnica de ROG, em defeitos ósseos de rebordo em cães.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Seibert J, Nyman S. Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. *Journal of periodontology* 1990;61:157-165.
2. Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the rat mandible using guided tissue regeneration. *Clinical oral implants research* 1994;5:75-82.
3. Kostopoulos L, Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. *Clinical oral implants research* 1994;5:66-74.
4. Blanco J, Alonso A, Sanz M. Long-term results and survival rate of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year case series prospective study. *Clinical oral implants research* 2005;16:294-301.
5. Barcelos MJ, Novaes Junior AB, Conz MB, Harari ND, Vidigal Junior GM. Diagnosis and treatment of extraction sockets in preparation for implant placement: report of three cases. *Brazilian dental journal* 2008;19:159-164.
6. Dahlin C, Sennerby, L., Lekholm, U., Linde, A. & Nyman, S. . Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1989;4:19–25.
7. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 1993;13:29-45.
8. Mecall RA, Rosenfeld AL. Influence of residual ridge resorption patterns on fixture placement and tooth position, Part III: Presurgical assessment of ridge

- augmentation requirements. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 1996;16:322-337.
9. Fiorellini JP, Nevins ML. Localized ridge augmentation/preservation. A systematic review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 2003;8:321-327.
 10. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clinical oral implants research* 2006;17 Suppl 2:136-159.
 11. Moses O, Pitaru S, Artzi Z, Nemcovsky CE. Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clinical oral implants research* 2005;16:210-219.
 12. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *Journal of clinical periodontology* 1984;11:494-503.
 13. Buser D, Bragger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clinical oral implants research* 1990;1:22-32.
 14. Nevins MM, J.T. . Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: a combination of allograft and the Gore-Tex membrane. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 1992 12:97–111.
 15. Aslan M, Simsek G, Dayi E. Guided bone regeneration (GBR) on healing bone defects: a histological study in rabbits. *The journal of contemporary dental practice* 2004;5:114-123.

16. Caffesse RG, Mota LF, Quinones CR, Morrison EC. Clinical comparison of resorbable and non-resorbable barriers for guided periodontal tissue regeneration. *Journal of clinical periodontology* 1997;24:747-752.
17. Novaes AB, Jr., Souza SL. Acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration: a case report. *Implant Dent* 2001;10:192-196.
18. Novaes AB, Jr., Papalexiou V, Luczyszyn SM, Muglia VA, Souza SL, Taba Junior M. Immediate implant in extraction socket with acellular dermal matrix graft and bioactive glass: a case report. *Implant Dent* 2002;11:343-348.
19. Griffin TJ, Cheung WS, Hirayama H. Hard and soft tissue augmentation in implant therapy using acellular dermal matrix. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2004;24:352-361.
20. Lindhe J PR, Berglundh T, Araujo M. . The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *Journal of clinical periodontology* 1995;22:276-283.
21. Barros RR, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SL, Taba M, Jr., Palioto DB. New surgical approach for root coverage of localized gingival recession with acellular dermal matrix: a 12-month comparative clinical study. *J Esthet Restor Dent* 2005;17:156-164; discussion 164.
22. Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. *Journal of periodontology* 2001;72:512-516.
23. Jovanovic SA, Hunt DR, Bernard GW, Spiekermann H, Wozney JM, Wikesjo UM. Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone

- regeneration in canine alveolar ridge defects. *Clinical oral implants research* 2007;18:224-230.
24. Trombelli L, Farina R, Marzola A, Ito A, Calura G. GBR and autogenous cortical bone particulate by bone scraper for alveolar ridge augmentation: a 2-case report. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2008;23:111-116.
 25. Yoshinari N, Tohya T, Mori A, et al. Inflammatory cell population and bacterial contamination of membranes used for guided tissue regenerative procedures. *Journal of periodontology* 1998;69:460-469.
 26. Stavropoulos A, Sculean A, Karring T. GTR treatment of intrabony defects with PLA/PGA copolymer or collagen bioresorbable membranes in combination with deproteinized bovine bone (Bio-Oss). *Clinical oral investigations* 2004;8:226-232.
 27. Hurzeler MB, Quinones CR, Caffesse RG, Schupbach P, Morrison EC. Guided periodontal tissue regeneration in Class II furcation defects following treatment with a synthetic bioabsorbable barrier. *Journal of periodontology* 1997;68:498-505.
 28. Giusto TJ. Bioactive glass and bioabsorbable membrane in the treatment of a maxillary class II furcation defect: case report with 6-month re-entry. *Compend Contin Educ Dent* 2005;26:41-42, 44, 46 passim; quiz 52-43.
 29. Aichelmann-Reidy ME, Yukna, R. A., Evans, G. H., Nasr, H. F., Mayer, E. T. Clinical evaluation of acellular allograft dermis for the treatment of human gingival recession. *Journal of periodontology* 2001;72:998-1005.
 30. Novaes AB Jr GD, Molina GO, Souza SLS, Taba M Jr, Grisi MFM. Comparative 6-month clinical study of a subepithelial connective tissue graft

- and acellular dermal matrix for the treatment of gingival recession. *Journal of periodontology* 2001;72:1477-1484.
31. Pontoriero R, Wennstrom J, Lindhe J. The use of barrier membranes and enamel matrix proteins in the treatment of angular bone defects. A prospective controlled clinical study. *Journal of clinical periodontology* 1999;26:833-840.
 32. Caffesse RG, Nasjleti CE, Morrison EC, Sanchez R. Guided tissue regeneration: comparison of bioabsorbable and non-bioabsorbable membranes. Histologic and histometric study in dogs. *Journal of periodontology* 1994;65:583-591.
 33. Newman MG. The role of infection and anti-infection treatment in regenerative therapy. *Journal of periodontology* 1993;64:1166-1170.
 34. Nowzari H, Slots J. Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. *Journal of clinical periodontology* 1994;21:203-210.
 35. Rossa ML, Lima LA, Pustiglioni FE, et al. SEM analyses of bacterial contamination of e-PTFE membranes and GTR clinical results. *Journal of the International Academy of Periodontology* 2006;8:115-124.
 36. Tonetti MS, Pini-Prato G, Cortellini P. Periodontal regeneration of human intrabony defects. IV. Determinants of healing response. *Journal of periodontology* 1993;64:934-940.
 37. Villaca JH, Rodrigues DC, Novaes AB, Jr., Taba M, Jr., Souza SL, Grisi MF. Root trunk concavities as a risk factor for regenerative procedures of class II furcation lesions in humans. *Journal of periodontology* 2004;75:1493-1499.
 38. Simonpietri CJ, Novaes AB, Jr., Batista EL, Jr., Filho EJ. Guided tissue regeneration associated with bovine-derived anorganic bone in mandibular

- class II furcation defects. 6-month results at re-entry. *Journal of periodontology* 2000;71:904-911.
39. Tal H. Subgingival acellular dermal matrix allograft for the treatment of gingival recession: a case report. *Journal of periodontology* 1999;70:1118-1124.
 40. Novaes AB, Jr., Grisi DC, Molina GO, Souza SL, Taba M, Jr., Grisi MF. Comparative 6-month clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recession. *Journal of periodontology* 2001;72:1477-1484.
 41. Wei PC LL, Geivelis M, Lingen MW, Maddalozzo D. . Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *Journal of periodontology* 2000;71 1297-1305.
 42. Batista EL, Jr., Batista FC, Novaes AB, Jr. Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *Journal of periodontology* 2001;72:265-273.
 43. Novaes AB, Jr., Pontes CC, Souza SL, Grisi MF, Taba M, Jr. The use of acellular dermal matrix allograft for the elimination of gingival melanin pigmentation: case presentation with 2 years of follow-up. *Pract Proced Aesthet Dent* 2002;14:619-623; quiz 624.
 44. Pontes AE, Pontes CC, Souza SL, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Taba M, Jr. Evaluation of the efficacy of the acellular dermal matrix allograft with partial thickness flap in the elimination of gingival melanin pigmentation. A comparative clinical study with 12 months of follow-up. *J Esthet Restor Dent* 2006;18:135-143; discussion 143.
 45. de Andrade PF, de Souza SL, de Oliveira Macedo G, et al. Acellular dermal matrix as a membrane for guided tissue regeneration in the treatment of Class

- II furcation lesions: a histometric and clinical study in dogs. *Journal of periodontology* 2007;78:1288-1299.
46. Schenk RK BD, Hardwick WR, Dahlin C. . Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 1994;9:13-29.
 47. Bittar-Cortez JA, Passeri LA, Boscolo FN, Haiter-Neto F. Comparison of hard tissue density changes around implants assessed in digitized conventional radiographs and subtraction images. *Clinical oral implants research* 2006;17:560-564.
 48. Hwang YJ, Fien MJ, Lee SS, et al. Effect of scaling and root planing on alveolar bone as measured by subtraction radiography. *Journal of periodontology* 2008;79:1663-1669.
 49. Hockers T, Abensur D, Valentini P, Legrand R, Hammerle CH. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clinical oral implants research* 1999;10:487-498.
 50. Polimeni G, Koo KT, Pringle GA, Agelan A, Safadi FF, Wikesjo UM. Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. *Clinical implant dentistry and related research* 2008;10:99-105.
 51. Thomaidis V, Kazakos K, Lyras DN, et al. Comparative study of 5 different membranes for guided bone regeneration of rabbit mandibular defects beyond critical size. *Med Sci Monit* 2008;14:BR67-73.

52. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, et al. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clinical oral implants research* 2008;19:402-415.
53. Paolantonio M, Dolci M, Esposito P, et al. Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: a comparative 1-year clinical study. *Journal of periodontology* 2002;73:1299-1307.
54. Yan JJ, Tsai AY, Wong MY, Hou LT. Comparison of acellular dermal graft and palatal autograft in the reconstruction of keratinized gingiva around dental implants: a case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2006;26:287-292.
55. Cummings LC, Kaldahl WB, Allen EP. Histologic evaluation of autogenous connective tissue and acellular dermal matrix grafts in humans. *Journal of periodontology* 2005;76:178-186.
56. Fowler EB, Breault LG, Rebitski G. Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and demineralized freeze-dried bone allograft: Part I. A report of 2 cases. *Journal of periodontology* 2000;71:1353-1359.
57. Luczyszyn SM, Papalexiou V, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SL, Taba M, Jr. Acellular dermal matrix and hydroxyapatite in prevention of ridge deformities after tooth extraction. *Implant Dent* 2005;14:176-184.
58. Bornstein MM, Bosshardt D, Buser D. Effect of two different bioabsorbable collagen membranes on guided bone regeneration: a comparative histomorphometric study in the dog mandible. *Journal of periodontology* 2007;78:1943-1953.

59. Kikuchi M, Koyama Y, Yamada T, et al. Development of guided bone regeneration membrane composed of beta-tricalcium phosphate and poly (L-lactide-co-glycolide-co-epsilon-caprolactone) composites. *Biomaterials* 2004;25:5979-5986.
60. Bittar-Cortez JA, Passeri LA, de Almeida SM, Haider-Neto F. Comparison of peri-implant bone level assessment in digitized conventional radiographs and digital subtraction images. *Dento maxillo facial radiology* 2006;35:258-262.
61. Araujo MG, Berglundh T, Lindhe J. GTR treatment of degree III furcation defects with 2 different resorbable barriers. An experimental study in dogs. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:253-259.
62. Mellonig JT, Nevins M, Sanchez R. Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part II. Material and a bone replacement graft. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 1998;18:129-137.
63. Felipe ME, Andrade PF, Grisi MF, et al. Comparison of two surgical procedures for use of the acellular dermal matrix graft in the treatment of gingival recessions: a randomized controlled clinical study. *Journal of periodontology* 2007;78:1209-1217.
64. Andrade PF, Felipe ME, Novaes AB, Jr., et al. Comparison between two surgical techniques for root coverage with an acellular dermal matrix graft. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:263-269.
65. Ainamo A, Bergenholtz A, Hugoson A, Ainamo J. Location of the mucogingival junction 18 years after apically repositioned flap surgery. *Journal of clinical periodontology* 1992;19:49-52.

66. de Souza SL, Novaes AB, Jr., Grisi DC, Taba M, Jr., Grisi MF, de Andrade PF. Comparative clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recessions: six- to 12-month changes. *Journal of the International Academy of Periodontology* 2008;10:87-94.
67. dos Anjos B, Novaes AB, Jr., Meffert R, Barboza EP. Clinical comparison of cellulose and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of class II furcations in mandibular molars with 6-month re-entry. *Journal of periodontology* 1998;69:454-459.
68. Simion M, Misitano, U., Gionso, L. & Salvato, A. . Treatment of dehiscences and fenestrations around dental implants using resorbable and nonresorbable membranes associated with bone autografts: a comparative clinical study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1997;12:159–167
69. Lorenzoni M, Pertl C, Polansky RA, Jakse N, Wegscheider WA. Evaluation of implants placed with barrier membranes. A retrospective follow-up study up to five years. *Clinical oral implants research* 2002;13:274-280.
70. Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Nemcovsky CE, Moses O. Cross-linked and non-cross-linked collagen barrier membranes disintegrate following surgical exposure to the oral environment: a histological study in the cat. *Clinical oral implants research* 2008;19:760-766.

Artigo em Inglês

Acellular dermal matrix as a barrier in guided bone regeneration: A clinical, radiographic and histomorphometric study in dogs.

Germana Jayme Borges* DDS, MSc

Sérgio Luís Scombatti de Souza* DDS, PhD

Arthur Belém Novaes Júnior* DDS, PhD

Márcio Fernando de Moraes Grisi* DDS, PhD

Daniela Bazan Palioto* DDS, PhD

Mário Taba Júnior* DDS, PhD

*Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Financial support: FAPESP

Correspondence: Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza, Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP - Brazil.

E-mail: scombati@forp.usp.br (ok to print).

Short running title: Acellular dermal matrix as membrane for GBR.

Abstract

Objective: The purpose of this study was to evaluate the acellular dermal matrix (ADM) as membrane for guided bone regeneration (GBR), comparing it to a bioabsorbable membrane.

Material and Methods: In six dogs, the mandibular premolars were extracted. After 8 weeks, bone defects were surgically created bilaterally and the GBR was performed. Each side was randomly assigned to the control group (CG: bioabsorbable membrane made of glycolide and lactide copolymer) or test group (TG: ADM as a membrane). Immediately following GBR, standardized digital X-Ray radiographs were taken, and were repeated at 8 and 16 weeks post-operatively. Previously to the GBR and to euthanasia, clinical measurements of the width and thickness of the keratinized tissue (WKT and TKT, respectively) were performed. The dogs were sacrificed 16 weeks following GBR, and histomorphometric analysis was made. Area measurements of new tissue and new bone, and linear measurements of bone height were performed.

Results: There were no statistically significant differences between groups for any histomorphometric measurement. Clinically, both groups showed an increase in the TKT and reduction program in the WKT. Radiographically, it could be observed an image suggestive of new bone formation in both groups 8 and 16 weeks following GBR.

Conclusion: ADM acted as a mechanical barrier in GBR, with clinical, radiographic and histomorphometric results similar to those obtained with the bioabsorbable membrane.

Introduction

Guided bone regeneration(GBR) has been used as a treatment for alveolar ridge deformities, bone defects associated to implants and in prevention of ridge deformities after tooth extraction (Seibert & Nyman 1990, Buser, et al. 1993, Mecall & Rosenfeld 1996, Fiorellini & Nevins 2003, Chiapasco, et al. 2006). A variety of biocompatible materials, non-absorbable or absorbable, have been used as membranes in GBR to inhibit the apical migration of the epithelium and penetration of the gingival connective tissue from the flap, and thus allow the regeneration of the alveolar bone (Nevins 1992). The literature indicates that from a clinical and histological stand point, similar results can be achieved in GBR, whether bioabsorbable or non-bioabsorbable barriers are applied (Novaes & Souza 2001, Novaes, et al. 2002, Griffin, et al. 2004). However, the bioabsorbable membrane does not require a second surgery for its retrieval and it can be assumed that a single-step surgical procedure is more economical and comfortable for the patient.

Several studies showed that exposed membranes may be heavily colonized by bacteria and that a negative relationship exists between bone formation and plaque colonization of the barrier material(Nowzari & Slots 1994, Rossa, et al. 2006) (Machtei 2001). Thus, it an ideal barrier should be made of material less susceptible for membrane exposure or that cannot be significantly colonized by periodontogenic bacteria, when exposed in the oral cavity. Furthermore, a membrane that could lead to an increase in width and thickness of the keratinized tissue could be an advantage.

The acellular dermal matrix (ADM), material obtained from human skin, has been used as a substitute for palatal connective tissue to increase the width of keratinized tissue around teeth or implants(de Andrade, et al. 2007) for the treatment of alveolar

ridge deformities(Batista, et al. 2001), for root coverage procedures (Aichelmann-Reidy 2001, Novaes AB Jr 2001) and for the removal of melanin pigmentation(Pontes, et al. 2006, Novaes, et al. 2002) Recently, Andrade et al. (2007)(de Andrade, de Souza, de Oliveira Macedo, Novaes, de Moraes Grisi, Taba & Palioto 2007), evaluated the ADM as membrane for guided tissue regeneration (GTR) in the treatment of mandibular class II furcation lesions, and compared it to a bioabsorbable membrane. In this study, the ADM demonstrated similar histomorphometric results to the bioabsorbable membrane and resulted in an increase of the thickness of keratinized tissue greater than that showed by the bioabsorbable membrane. Some clinical studies have also used the ADM as a membrane for guided bone regeneration in edentulous ridges and in association with immediate implants, suggesting that this material may be able to act as barrier(Novaes, Papalexiou, Luczyszyn, Muglia, Souza & Taba Junior 2002, Griffin, Cheung & Hirayama 2004, Fowler, et al. 2000) However, animal controlled studies are necessary to evaluate the ADM as membrane in GBR, comparing it to other membrane materials.

The ADM is probably not significantly colonized by periodontogenic bacteria because when this material is exposed in the oral cavity, the healing is uneventful. This would probably not occur if there was a significant bacterial colonization(Buser, et al. 1990, Caffesse RG 1997). In addition, the ADM leads to an increase in width and thickness of the keratinized tissue after surgery as has been demonstrated by several studies (Seibert & Nyman 1990, Lindhe J 1995, Novaes, et al. 2001).

To the best of our knowledge, there are no controlled studies using the ADM as membrane in the guided bone regeneration. The purpose of this study was to clinically, radiographically and histomorphometrically evaluate the use of acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration in the treatment of surgically created bone defects in dogs, comparing it to a bioabsorbable membrane.

Material and Methods

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Use of the University of São Paulo (USP) – Ribeirão Preto

Surgical Sequence

This study had the following experimental steps: Animal selection and preparation, Surgery 1 (extraction of P1, P2, P3 and P4, mandibular pre-molars, which created an edentulous space of approximately 50mm); 6 weeks later, the keratinized tissue was evaluated (Clinical Exam 1); 2 weeks later, Surgery 2 was carried out (rectangular bilateral bone defects were prepared, absorbable membrane^{*****} and acellular dermal matrix^{††††} were applied); control radiographic evaluation 8 weeks following surgery 2; second keratinized tissue evaluation (Clinical Exam 2), final radiographic evaluation and sacrifice of the animals (16 weeks following Surgery 2).

Animal selection and preparation

Seven young male dogs mongrel dogs were selected weighting from 25 to 35kg. The animals presented intact superior and inferior teeth, no viral or fungal oral lesions, no periodontal disease and were in good general health, with no systemic involvement, as determined by a veterinarian following clinical examination. The dogs received antiparasitary treatment, multivitamins, a complete series of vaccines and prophylactic treatment with ultrasonic instruments^{‡‡‡‡}. All prophylactic treatment and surgical procedures were carried out after the animals had been anesthetized.

Surgery 1 – Bilateral extraction of all 4 mandibular pre-molars

***** Osseoquest, Gore and Associates, Inc., Flagstaff, Arizona, E.U.A.

†††† Alloderm, Life Cell Corporation, New Jersey, EUA.

‡‡‡‡ Cavitron 3000, Dentsply Mfg. Co., York, PA, E.U.A.

The animals were not fed the night prior to the surgical procedure. They were pre-anesthetized with Zolazepan at 0.10mL/kg and Acepromazine at 0.10mL/kg. Anesthesia was maintained with the oxygen-diluted volatile anesthetic Isoflurane^δ until the surgical procedure was concluded.

Following anesthesia, mucoperiosteal flaps were released bilaterally in the region of the 4 inferior pre-molars. The teeth were sectioned in the buccal-lingual direction at the furcation, and the roots were individually extracted using a periotome in order to not damage the bone walls. The flaps were then repositioned and sutured with absorbable sutures.

Animals were fed only with water-softened dog food to prevent rupture of the suture for 14 days. Healing evaluation control was performed weekly. In addition, by topical application of 0.12% chlorhexidine.

Clinical analysis of keratinized tissue

Six weeks after Surgery 1, clinical measurements (Clinical Exam 1) were made to evaluate the thickness and width of keratinized tissue (TKT and WKT respectively). A custom-made acetate stent extending from canine to molar teeth was used to determine the exact site for the measurements. Three reference marks in the area corresponding to the bone defect were made in the stent: one vestibular, one occlusal and one lingual. All clinical measurements were taken by the same operator. The WKT was measured in the buccal (B-WKT) and lingual (L-WKT) surfaces, corresponding, respectively, to the distance between a reference mark on the occlusal face and the vestibular or lingual mucogingival junction (MGJ). The measurements were taken using a compass and transferred to a slide caliper

^δ Isoflurano, Instituto Bioquímico, Atibaia-SP.

The TKT was performed at the buccal (B-TKT), occlusal (O-TKT) and lingual (L-TKT) surfaces, in the corresponding markings of the guide. These measurements were taken using a periodontal probe associated to a silicone disk stop. The probe was positioned perpendicularly to the keratinized tissue surface and introduced into the soft tissue with light pressure until a hard surface was felt. The silicone disk stop was then placed in tight contact with the external soft tissue surface. After carefully removing the periodontal probe, penetration depth was measured with a slide caliper. The measurements of B-TKT, O-TKT and L-TKT were taken three times and the mean value was calculated for each site.

Surgery 2 - Bone defects creation and GBR

Eight weeks after tooth extraction, the animals underwent the second surgical procedure (Surgery 2). After repeating the same sedation and anesthesia described for Surgery 1, horizontal crestal incisions were bilaterally made from the distal region of the canine to the mesial region of the first molar to gain access to the alveolar ridge, and a mucoperiosteal flap was raised buccally and lingually, exposing the alveolar ridge. One rectangular bone defect was surgically created bilaterally in the area of the previously extracted premolars, using low-speed rotary burs and hand instruments. Copious sterile saline irrigation was used during preparation of the bone defects. Defect dimensions were 8 mm apico-coronal, 12 mm mesio-distal, and 10 mm bucco-lingual, measurements that comprise a critical defect (Schenk RK 1994). In the mesial and distal edges of each defect, 3mm from the base, a titanium screw was attached to serve as a landmark for locating the defect areas radiographically and during the histological preparation of the specimens.

In one side of the mandible, randomly assigned by a coin toss, the defect was covered by a bioabsorbable membrane (Ossequest), comprising the Control Group

(CG). The membrane was trimmed to shape, adapted over the ridge to completely cover the defect, and extended beyond the defect margins by 2 to 3 mm. The membrane was kept in position by the attached titanium screws in the buccal and lingual walls. Subsequently, the flap was repositioned and sutured with horizontal and interrupted e-PTFE sutures, so the membrane would be completely covered and protected. On the opposite hemiarch, the acellular dermal matrix was adapted on the bone defect following the same sequence described for the membrane, and was selected for the Test Group (TG). After placing the acellular dermal matrix and suturing the flaps to completely cover the ADM, standardized digital radiographs of bone defects were obtained, bilaterally, with a digital imaging sensor^{§§§§§}

Post-operative treatment

Tramadol Chloridrate (50mg/mL)^{*****} was used at 3mg/kg every 12 hours as analgesic therapy and Ketofen[™] 20[⊖] at 1 pill/20kg was used as anti-inflammatory therapy. The animals also received Espiramicine[Ⓜ] at 1pill/10kg for 10 days as antibiotic therapy. The animals were maintained on a soft ration diet for 15 days, and then the sutures were removed. Healing control was performed daily with topical application of 0.12% chlorhexidine to limit biofilm production. The remained teeth were cleaned monthly with ultrasonic points

Radiographic Evaluation

Eight weeks after Surgery 2, the animals were sedated as previously described and radiographs of the bone defects were obtained following the same described procedures.

Sacrifice of the animals

^{§§§§§} Trophy system (Trophy-Radiologie, Vincennes, France).

^{*****} Tramal®, Laboratórios Pfizer Ltda, São Paulo, sp.

[⊖] Ketofen, Merial Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP.

[Ⓜ] Stomorgyl 10, Merial Saúde Animal Ltda, Paulínia, SP.

Sixteen weeks following Surgery 2, the animals were sacrificed, by induction of deep anesthesia with subsequent intravenous sodium thiopental and potassium chloride overdose. Before the sacrifice, measurements of width and thickness of keratinized tissue were again taken (Clinical Exam 2) following the same protocol as previously described. Radiographs were also taken bilaterally from the mandibular ridge.

Histological preparation

After euthanasia, the mandibles were dissected and the block sections containing the experimental specimens were obtained. Subsequently, each bone block was sectioned in half, considering as reference the titanium screws attached in the mesial and distal edges of bone defect. The mesial halves were prepared for decalcified sectioning. Thus, they were fixed in a 10% formalin solution and decalcified in multiple baths of 10% trichloroacetic acid for approximately 60 days and neutralized using a 5% sodium sulfate solution. After decalcification and dehydration, the blocks were immersed in paraffin, and semi-serial 6- μ m wide buccal-lingual histological sections were obtained from the mesial half of the bone blocks using a microtome⁺⁺⁺⁺⁺. These histological sections were stained either with hematoxylin-eosin (HE) or Mallory's trichrome stain (MT).

Histomorphometric analysis

Nine non-serial histological sections of the mesial half of the bone defect were analyzed under conventional and polarized light microscopy in order to evaluate newly-formed tissues. Among these 9 sections, three belonged to the initial third of the defect (mesial area), three belonged to the middle third of the defect and the remaining three belonged to the final third of the defect (distal area).

⁺⁺⁺⁺⁺ Rotary Microtome HM 335 E, MICROM Laborgeräte GmbH, Carl-Zeiss, Alemanha.

A video camera⁺⁺⁺⁺⁺ attached to a microscope^{§§§§§} allowed histomorphometric measurements. The images were processed with Leica IM 50^{*****}. Histomorphometric analysis was then performed using the software Image Tool⁺⁺⁺⁺⁺, with area, in square millimeters (mm²), and linear, in millimeters (mm), measurements. Area measurements assessed were: area of new tissues (ANT) and area of new bone (ANB). Linear measurement was the maximum bone height (BH) (distance between the most coronally-formed bone and the base of the defect). The bone density, expressing the cortical bone area (CBA), was also measured, by the subtraction of the new bone marrow area from the new bone area, and expressed in percentage. All histomorphometric parameters were analyzed in the nine sections and arithmetic average was calculated, thus representing the measure of the bone defect.

Radiographic analysis

All radiographs were acquired by a single examiner, using a digital imaging sensor⁺⁺⁺⁺⁺ and a digital X-Ray unit^{§§§§§}. Exposure time was set to 0.35 seconds and paralleling technique was used. To standardize the geometry, an individual silicone^{*****} made bite-block with occlusal registration was used, for each animal.

To evaluate bone changes, the digital subtraction of images was performed by using Emago[£] software. The subtraction was calculated in pairs, as follows: initial RI and 8 week RI (I-8 image), initial RI and 16 week RI (I-16 image), 8 week RI and 16 week RI (8-16 image). A new image representing the difference between the two previous images was obtained (I-8, I-16 and 8-16)(Bittar-Cortez, et al. 2006). From these three

+++++ Leica DC300, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberger, Nussloch, Alemanha.

§§§§§ Leica DMLB, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberger, Nussloch, Alemanha.

***** Leica IM 50, Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, Inglaterra.

+++++ UTHSCSA Image Tool for Windows, Version 3.00.

+++++ RVG Trophy, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA.

§§§§§ Spectro 70X Seletronic, Dabi Atlante, RP, Brasil.

***** Optosil® Comfort Putty, Heraeus Kulzer South America Ltda., SP, Brasil

£ Emago ® / Advanced 3.43 ,Oral DiagnosticSystems, Louwesweg, Amsterdam, Holanda.

new subtraction-obtained images, the radiographic area of new bone (ANB-R) was measured in mm². The radiographic area of bone defect (ABD-R) was measured in mm² from initial RI. The radiographic bone fill (BF-R) was calculated in 8 weeks (BF-R 8) and 16 weeks (BF-R 16), as the ratio ANB-R/ABD-R, and expressed in percentage values. The bone density was also radiographically evaluated (BD-R) in grayscale, in the radiographs taken at Initial time, 8 weeks time and 16 weeks time. To analyze BD-R, two lines were drawn (a vertical and an horizontal one), to determine the central point of the image. From this central point (C), three others standardized regions of interest were defined: a coronal one to the central point (Co), an apical one to the central point (A) and another one at the base of the mandible, external to the bone defect, which served as Control (Cr). On these standardized regions, a 16 pixels² square was positioned and the BD-R was then calculated in these squares of known area (Hwang, et al. 2008), comprising: BD-R-Co, BD-R-C, BD-R-A, BD-R-Cr. Total BD-R of each image was obtained with the arithmetic average from BD-R-Co, BD-R-C and BD-R-A. BD-R-Cr was used as a control region and was not expected to demonstrate changes in radiographic density during the study. The measurements of ANB-R, BF-R and BD-R were obtained with Image Tool software[¥].

Statistical Analysis

The experimental unit was the animal (n=6). Quantitative data were recorded as mean $\pm$ standard deviation (SD). A non-parametric statistical analysis for two related sample groups, the Wilcoxon Sing Rank Test (n=6; $P < 0.05$), was carried out to determine clinical, radiographic and histomorphometric differences between TG and CG (inter-groups), as well as the intra-group differences for the clinical (WKT and TKT) and radiographic parameters, using SPSS⁺⁺⁺⁺⁺ software

[¥] UTHSCSA Image Tool for Windows, Version 3.00.
⁺⁺⁺⁺⁺ SPSS, version 10.0, SPSS, Chicago, IL.

Results

Clinical Results

All surgical procedures were well tolerated by the animals and no signs of infection were observed. However, in two dogs, there was exposure of the absorbable membrane. In one dog, one week after GBR, the flap opened leading to a displacement and rupture of the membrane, which lost its functions as a physical barrier and space maintainer. Therefore, this animal was excluded from the study. In another dog, two weeks following surgery, a discrete dehiscence in the surgical wound was noticed, with consequent exposure of the membrane. Approximately one month after the surgery of GBR, the exposed portion of this membrane was completely degraded, and the previously exposed area had completely healed.

No statistically significant differences were observed between groups for B-WKT, L-WKT, B-TKT, O-TKT and L-TKT in Clinical Exam 1 (Table 1), demonstrating pre-operative similarity between TG and CG. In Clinical Exam 2, the comparison between groups revealed statistically significant differences only for B-WKT ($p=0.028$), with TG showing a mean value of 3.21 ± 0.85 and CG a mean value of 4.41 ± 1.05 (Table 1).

Intra-group comparisons between the measurements of Clinical Exam 1 and 2 showed that both groups had an increase in TKT and reduction in WKT. In the TG, statistically significant differences were found for L-TKT ($p=0.027$), B-WKT ($p=0.028$) and L-WKT ($p=0.028$). In the CG there was statistically significant difference only for L-WKT ($p=0.028$) (Table 2).

Histological Evaluation

In both groups, concentric lamellar structures and haversian canals were observed, suggesting the presence of lamellar (mature and secondary) bone. Areas of bone matrix containing collagen fibers projected in several directions were also observed. Such areas were interpreted as residual immature (woven) bone. The internal surface of the lamellae and external surface were lined with osteoblast-like cells. An osteoid matrix was also identified in some areas in the external surface of the newly-formed bone; interrupted/partially resorbed lamellae and incremental lines were frequently observed in the newly formed bone, indicating regions of new bone formation.

In two sites of the CG, the presence of small remnants of the bioabsorbable membranes was found, which was associated with a minimal inflammatory reaction and the presence of scattered foreign-body giant cells. Furthermore, in a site from the control group, in which there was exposure of the membrane during the post-operative period, downgrowth of connective tissue towards the interior of the bone defect was observed.

Histomorphometric Results

No statistically significant differences between groups were found for any histomorphometric measurement (Wilcoxon Sing Rank Test, $p < 0.05$). The mean value for area of new tissues (ANT) was $73.04 \pm 0.96 \text{ mm}^2$ for TG and $69.42 \pm 7.45 \text{ mm}^2$ for CG ($p=0,114$); the mean area of new bone (ANB) was $43.96 \pm 9.26 \text{ mm}^2$ for CG and $42.05 \pm 5.37 \text{ mm}^2$ for TG ($p=0.917$). For bone height (BH), the mean value for CG was $7.70 \pm 1.21 \text{ mm}$, and for TG, it was 7.21 ± 0.80 ($p=0.463$). In CG, the cortical bone area (CBA) corresponded on average to 38.08% of the ANB, while in TG, it was 42.47% of the ANB ($p=0.463$).

Radiographic Results

The statistical analysis (Friedman Test) between the mean values of BD-R-Cr obtained at initial radiograph image, at 8 weeks and 16 weeks post-operatively, for both groups, confirmed that the images were well standardized, since no statistically significant differences were found for this parameter among the radiographic images (TG, $p= 0.444$; CG, $p= 0.438$).

In the initial RI, the mean values of ABD-R for the Test Group was $125.18 \pm 18.36 \text{ mm}^2$ and for the Control Group was $126.10 \pm 10.16 \text{ mm}^2$, with no statistical difference between the groups ($p = 0.916$).

Radiographically, it could be observed an image suggestive of new bone formation in both groups 8 and 16 weeks following GBR.

In the subtracted image between the initial RI and the 8 weeks RI, a mean value of $98.43 \pm 24.33 \text{ mm}^2$ was found for the ANB-R in the TG and $102.30 \pm 16.51 \text{ mm}^2$ in the CG. The differences between groups were not statistically significant ($p= 0.752$). The percentage of bone fill after 8 weeks (BF-R 8) of Surgery 2 for TG was $78.41 \pm 11.06\%$ and for CG was $79.42 \pm 7.58 \%$ ($p= 0.754$). In the evaluation between the initial RI and the 16 weeks RI, a mean value of ANB-R for the TG and for the CG was $103.54 \pm 19.69 \text{ mm}^2$ and $108.12 \pm 21.96 \text{ mm}^2$, respectively. Similarly, no statistically significant differences were observed between groups ($p= 0.599$). The BF-R at 16 weeks (BF-R 16) for TG and CG was $83.38 \pm 7.85 \%$ and $83.68 \pm 11.03 \%$ respectively ($p= 0.916$) (Figure 1).

In both groups, no detectable radiographic differences could be found through imaging subtraction, when considering 8 weeks RI and 16 weeks RI. Using intra-group analysis, both for the TG and CG, no statistically significant differences were

observed between the subtracted images I-8 and I-16: $p=0.115$ for both groups (Table 3).

Considering BD-R, in the 8 weeks radiographic evaluation, the mean value for TG was 116.44 ± 16.37 , and for CG it was 119.77 ± 26.88 , with no statistically significant difference between groups ($p=0.463$). The mean value of BD-R at 16 weeks following GBR was 129.11 ± 15.70 for TG and 125.77 ± 13.35 for CG, and this difference was also not statistically significant ($p=0.686$). (Figure 2).

Discussion

Guided bone regeneration has been successfully used in the treatment of several types of bone defects. A number of materials, non-absorbable and absorbable, have been used as membranes, with similar results in terms of bone neoformation (Hockers, et al. 1999, Polimeni, et al. 2008, Trombelli, et al. 2008, Thomaidis, et al. 2008, Schwarz, et al. 2008).

In 1994, Acellular Dermal Matrix was introduced in Periodontology. This human-skin-derived material was initially recommended to mucogingival procedures as an alternative to autogenous connective tissue grafts (Novaes, Grisi, Molina, Souza, Taba & Grisi 2001, Paolantonio, et al. 2002, Yan, et al. 2006, Cummings, et al. 2005). Therefore, ADM started to be used in procedures for root coverage and soft tissue corrections in alveolar ridges, providing positive results, particularly with regard to gain in thickness and width of keratinized tissue (Batista, Batista & Novaes 2001, Barros, et al. 2005). Considering these results and the structural characteristics of the biomaterial, studies were carried out using the acellular dermal matrix GBR procedures. Therefore, as an alternative to other kinds of membrane, ADM was used in fresh extraction sockets, in association with implants placement and in prevention of ridge deformities, demonstrating satisfactory results (Novaes & Souza 2001, Novaes, Papalexiou, Luczyszyn, Muglia, Souza & Taba Junior 2002, Batista, Batista & Novaes 2001) (Griffin, Cheung & Hirayama 2004, Fowler, et al. 2000) (Luczyszyn, et al. 2005). Andrade et al., in 2007, confirmed the capacity of ADM to act as a membrane in GTR procedures. However, no randomized and controlled study in GBR had been made, to verify these positive clinical results and assess the amount and quality of newly-formed bone.

The results of this study demonstrated that the acellular dermal matrix was effective as a membrane in GBR, maintaining the space, avoiding undesirable tissue migration and allowing bone neoformation, with similar results to those obtained with a bioabsorbable membrane. The bone defects created in this study had critical dimensions (12x8x10mm), as stated by Schenk et al. in 1994(Schenk RK 1994) - there was no adequate bone regeneration without the use of a membrane. These authors verified that the negative control group showed incomplete bone regeneration, with persistent bone defects, whereas in the test groups, it was observed an improved healing process; however total regeneration of these defects had not been reached at the end of 16 weeks. Bornstein et al. (2007)(Bornstein, et al. 2007), nevertheless, didn't find differences between negative control group and test group regarding bone gain when a collagen membrane was used – both groups didn't demonstrate significant bone neoformation. The histological analysis of the present study showed in both groups, after the same healing period, the formation of mature bone with concentric lamellae, haversian canals and also areas of bone remodeling, mainly in the edges of the defects. Trabecular bone and immature bone of varied dimensions were also found, as already observed in other studies (Schenk RK 1994 22, Bornstein, Bosshardt & Buser 2007 61). Thus, as suggested by Shenck et al (1994) and Jovanovic et al (2007) (Jovanovic, et al. 2007), an extended healing period of more than 4 months would be necessary for complete bone regeneration.

Histomorphometrically, both groups showed similar results. The amount of newly-formed bone in the test group corresponded to 58.99% of the area of new tissues, while in the control group this percentage reached 61.00%. These results are similar to those obtained by Schenk, who reported that the newly-formed bone occupied 55% of the defect volume in the same period of time. The mean value of

new bone in the group treated with ADM was 42.05mm² and, in the control group, it was 43.96mm², a numerically superior result than that reported by Bornstein et al (2007)(Bornstein, Bosshardt & Buser 2007) (39,09 mm² of new bone area in defects treated with an experimental collagen membrane after 4 months of healing). The bone height (Kikuchi, et al. 2004) observed in the TG and CG was respectively of 7.21 mm and 7.70 mm, which correspond to 90.12% and 96.25% of the surgically created defect height. The percentage of cortical bone after 4 months of healing was 42.47% of ANB in the TG and 38.08% of ANB in the CG ($p=0.463$), corroborating the results of Schenk et al.(Schenk RK 1994), who observed approximately 38% of cortical bone. Jovanovic et al. (2007)(Jovanovic, Hunt, Bernard, Spiekermann, Wozney & Wikesjo 2007), on the other hand, reported a bone density which varied from 50 to 57% in control sites or in sites treated with GBR.

Radiographically, the areas with higher radiopacity in the subtraction procedure were interpreted as a possible bone neoformation. It was observed that 8 weeks after GBR, the TG showed a bone filling rate of 78.41%, and the CG, a rate of 79.42%, when compared to the initial radiographic area of the defect. After 16 weeks, the subtracted image suggested a newly-formed bone percentage of 83.38% for the TG, and of 83.68% for the CG. Once again, the groups showed similar results with no statistical difference between them. Jovanovic et al 2007(Jovanovic, Hunt, Bernard, Spiekermann, Wozney & Wikesjo 2007) reported complete bone filling radiographically; however, they evaluated conventional images instead of subtraction images

In both groups, a significative increase in gray levels was observed when the initial radiograph was compared with those taken at 8 and at 16 weeks, which can be interpreted as an increase of formation or mineralization of bone tissue. However,

there was no statistically significant difference between the periods of 8 and 16 weeks. These findings suggest that the bone formation was achieved mainly in the first 8 weeks.

The clinical results of this study were similar in both groups – there was an increase in thickness of keratinized tissue. In the test group, a significative increase in the lingual TKT was observed ($p=0.027$), corroborating previous studies, which demonstrated the capacity of ADM to increase the thickness of keratinized tissue (Aichelmann-Reidy 2001, Paolantonio, Dolci, Esposito, D'Archivio, Lisanti, Di Luccio & Perinetti 2002, Fowler, Breault & Rebitski 2000, Araujo, et al. 1998, Mellonig, et al. 1998, Felipe, et al. 2007) (Andrade, et al. 2008). (Novaes & Souza 2001). Regarding the width of keratinized tissue, both groups demonstrated a decrease of this parameter. In TG, a significative decrease in buccal and lingual WKT was noticed; in the CG, this difference was statistically significant only for the lingual WKT. In both groups, the flap was divided beyond the mucogingival junction and was extended until the partial-thickness flap could be passively positioned coronally, to provide complete coverage of the ADM or the absorbable membrane. Due to the coronal displacement of the flap, the mucogingival line was slightly positioned in a coronal direction, when compared to its original position; this fact that can explain a certain decrease in the width of keratinized tissue in both groups. It is well-known that the mucogingival line tends to return to its original position in the post-operative period (Ainamo, et al. 1992); however, 4 months does not seem to have been enough time for it occurs. Furthermore, the four month healing period might have been insufficient for the ADM to provide, by itself, an increase in WKT, which is in accordance with the study of Souza et al (2008) (de Souza, et al. 2008). These authors, in root coverage procedures, observed that 6 and 12 months had not yet

been a satisfactory time period for a significant increase in width of keratinized tissue to occur. Furthermore, it is important to mention that in the case study of Novaes Jr. and Souza (2001)(Novaes & Souza 2001), the ADM was intentionally left exposed to increase the width of keratinized mucosa, a procedure that was not performed in this study, in which the ADM was completely covered by the flap. The current literature demonstrates conflicting results related to width of keratinized tissue after the use of acellular dermal matrix (Novaes AB Jr 2001, Felipe, Andrade, Grisi, Souza, Taba, Palioto & Novaes 2007, Andrade, Felipe, Novaes, Souza, Taba, Palioto & Grisi 2008), since it is known that the increase of this tissue depends on the migration of cells with the capacity to stimulate the differentiation of the mucosa, a fact that variates among different species and even among members of the same species (Paolantonio, Dolci, Esposito, D'Archivio, Lisanti, Di Luccio & Perinetti 2002).

Although similarities were found between most of the evaluated parameters in this study, it could be observed that the post-operative healing of the group treated with ADM was the most satisfactory one. In Control group, there was exposure of the membrane in two animals, and in one of them this exposure was so large that it had to be excluded from the study. For the dog, which still remained in this study, membrane contamination was controlled with 0.12% chlorhexidine digluconate solution topically and systemic antibiotic therapy, as described by several authors in human studies (dos Anjos, et al. 1998, Simonpietri, et al. 2000, Villaca, et al. 2004). Clinically, it was observed in this case degradation of the exposed portion of the membrane and, histologically, a small migration of gingival tissues towards the interior of the bone defect, suggesting that in this site, the barrier function of the absorbable membrane was compromised. These findings corroborate several studies, which have demonstrated that absorbable membranes, when exposed to the

oral cavity, suffer premature degradation in the post-operative period (Simion 1997, Machtei 2001 , Lorenzoni, et al. 2002, Tal, et al. 2008). However this incident did not have a reflect in the final results of the control group – the results showed by this animal did not substantially differ from the others in the same group

The clinical, histomorphometric and radiographic results obtained in this study demonstrated that GBR technique was effective in both groups (Acellular Dermal Matrix and Absorbable Membrane), with no statistically significant differences between them. Thus, they indicate that the acellular dermal matrix has the capacity to act as a physical barrier in guided bone regeneration

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP; protocol number 06.1.420.53.8) for financial support of this study.

Table 1

Comparison between the Test (TG) and Control Groups (CG) for the mean values (mm) of the clinical parameters for Clinical Exams 1 and 2.

Parameters	TG	CG	$p^{\dagger}$	TG	CG	$p^{\dagger}$
	Exam 1	Exam 1		Exam 2	Exam 2	
B-TKT	1.27 ± 0.53	1.28 ± 0.53	0.916	1.75 ± 0.36	2.14 ± 0.72	0.173
O-TKT	1.60 ± 0.43	1.49 ± 0.56	0.917	1.88 ± 0.31	1.88 ± 0.64	0.686
L-TKT	0.97 ± 0.17	1.01 ± 0.28	0.752	1.44 ± 0.24	1.22 ± 0.66	0.60
B-WKT	3.90 ± 0.75	4.77 ± 0.98	0.173	3.21 ± 0.85	4.41 ± 1.05	0.028*
L-WKT	6.78 ± 1.63	6.98 ± 0.65	1.0	5.19 ± 1.55	4.19 ± 1.55	0.249

B-TKT: thickness of keratinized tissue in the buccal area; O-TKT: thickness of keratinized tissue in the occlusal area; L-TKT: thickness of keratinized tissue in the lingual area; B-WKT: width of keratinized tissue in the buccal area; L-WKT: width of keratinized tissue in the lingual area.

† Wilcoxon Test;

* Statistically significant difference ($p < 0.05$).

Table 2

Comparison between Clinical Exams 1 and 2 and the mean values (mm) of the clinical parameters of the Test and Control Groups (intra-group comparison).

Parameters	Test Group			Control Group		
	Exam 1	Exam 2	$p^{\dagger}$	Exam 1	Exam 2	$p^{\dagger}$
B-TKT	1.27 ± 0.53	1.75 ± 0.36	0.075	1.28 ± 0.53	2.14 ± 0.72	0.075
O-TKT	1.60 ± 0.43	1.88 ± 0.31	0.463	1.49 ± 0.56	1.88 ± 0.64	0.463
L-TKT	0.97 ± 0.17	1.44 ± 0.24	0.027*	1.01 ± 0.28	1.22 ± 0.66	0.345
B-WKT	3.90 ± 0.75	3.21 ± 0.85	0.028*	4.77 ± 0.98	4.41 ± 1.05	0.463
L-WKT	6.78 ± 1.63	5.19 ± 1.55	0.028*	6.98 ± 0.65	4.19 ± 1.55	0.028*

B-TKT: thickness of keratinized tissue in the buccal area; O-TKT: thickness of keratinized tissue in the occlusal area; L-TKT: thickness of keratinized tissue in the lingual area; B-WKT: width of keratinized tissue in the buccal area; L-WKT: width of keratinized tissue in the lingual area.

† Wilcoxon Test;

* Statistically significant difference ($p < 0.05$).

Figure 1

Comparison between the Test (TG) and Control Groups (CG) for the mean values of ANB-R, at 8 weeks (I-8), and at 16 weeks (I-16).

Table 3

Intra-group Comparison for ANB-R formed at 8 weeks and at 16 weeks.

ANB-R	8 weeks	16 weeks	Value of $p^{\dagger}$
TG	98.43 ± 24.33	103.54 ± 19.69	0.115
CG	102.30 ± 16.51	108.12 ± 21.96	0.115

ANB-R: Radiographic area of new bone; TG: Test Group; CG: Control Group.

$\dagger$ Wilcoxon Test.

Figure 2

Comparison between Test (TG) and Control Groups (CG) for the total mean values of BD-R at 8 weeks, and 16 weeks.

References

- Seibert, J. & Nyman, S., (1990) Localized ridge augmentation in dogs: A pilot study using membranes and hydroxyapatite. *J Periodontol* 61: 157-165.
- Buser, D., Dula, K., Belser, U., Hirt, H.P. & Berthold, H., (1993) Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent* 13: 29-45.
- Mecall, R.A. & Rosenfeld, A.L., (1996) Influence of residual ridge resorption patterns on fixture placement and tooth position, part iii: Presurgical assessment of ridge augmentation requirements. *Int J Periodontics Restorative Dent* 16: 322-337.
- Fiorellini, J.P. & Nevins, M.L., (2003) Localized ridge augmentation/preservation. A systematic review. *Ann Periodontol* 8: 321-327.
- Chiapasco, M., Zaniboni, M. & Boisco, M., (2006) Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res* 17 Suppl 2: 136-159.
- Nevins, M.M., J.T. , (1992) Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: A combination of allograft and the gore-tex membrane. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 12: 97–111.
- Novaes, A.B., Jr. & Souza, S.L., (2001) Acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration: A case report. *Implant Dent* 10: 192-196.
- Novaes, A.B., Jr., Papalexiou, V., Luczyszyn, S.M., Muglia, V.A., Souza, S.L. & Taba Junior, M., (2002) Immediate implant in extraction socket with acellular dermal matrix graft and bioactive glass: A case report. *Implant Dent* 11: 343-348.

- Griffin, T.J., Cheung, W.S. & Hirayama, H., (2004) Hard and soft tissue augmentation in implant therapy using acellular dermal matrix. *Int J Periodontics Restorative Dent* 24: 352-361.
- Nowzari, H. & Slots, J., (1994) Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 21: 203-210.
- Rossa, M.L., Lima, L.A., Pustiglioni, F.E., Hespanhol, A.M., Kon, S., Grigolli Filho, J. & Novo, N.F., (2006) Sem analyses of bacterial contamination of e-ptfe membranes and gtr clinical results. *J Int Acad Periodontol* 8: 115-124.
- Machtei, E.E., (2001) The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: A meta-analysis. *J Periodontol* 72: 512-516.
- de Andrade, P.F., de Souza, S.L., de Oliveira Macedo, G., Novaes, A.B., Jr., de Moraes Grisi, M.F., Taba, M., Jr. & Palioto, D.B., (2007) Acellular dermal matrix as a membrane for guided tissue regeneration in the treatment of class II furcation lesions: A histometric and clinical study in dogs. *J Periodontol* 78: 1288-1299.
- Batista, E.L., Jr., Batista, F.C. & Novaes, A.B., Jr., (2001) Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *J Periodontol* 72: 265-273.
- 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.
- Novaes AB Jr, G.D., Molina GO, Souza SLS, Taba M Jr, Grisi MFM., (2001) Comparative 6- month clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix for the treatment of gingival recession. *J Periodontol* 72: 1477-1484.

Pontes, A.E., Pontes, C.C., Souza, S.L., Novaes, A.B., Jr., Grisi, M.F. & Taba, M., Jr., (2006) Evaluation of the efficacy of the acellular dermal matrix allograft with partial thickness flap in the elimination of gingival melanin pigmentation. A comparative clinical study with 12 months of follow-up. *J Esthet Restor Dent* 18: 135-143; discussion 143.

Novaes, A.B., Jr., Pontes, C.C., Souza, S.L., Grisi, M.F. & Taba, M., Jr., (2002) The use of acellular dermal matrix allograft for the elimination of gingival melanin pigmentation: Case presentation with 2 years of follow-up. *Pract Proced Aesthet Dent* 14: 619-623; quiz 624.

Fowler, E.B., Breault, L.G. & Rebitski, G., (2000) Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and demineralized freeze-dried bone allograft: Part ii. Immediate endosseous implant placement. *J Periodontol* 71: 1360-1364.

Buser, D., Bragger, U., Lang, N.P. & Nyman, S., (1990) Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 1: 22-32.

Caffesse RG, M.L., Quinones CR, Morrison EC. , (1997) Clinical comparison of resorbable and non-resorbable barriers for guided periodontal tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 24: 747-752.

Lindhe J, P.R., Berglundh T, Araujo M. , (1995) The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in gtr treatment of degree iii furcation defects. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 22: 276-283.

Novaes, A.B., Jr., Grisi, D.C., Molina, G.O., Souza, S.L., Taba, M., Jr. & Grisi, M.F., (2001) Comparative 6-month clinical study of a subepithelial connective tissue graft and acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recession. *J Periodontol* 72: 1477-1484.

Schenk RK, B.D., Hardwick WR, Dahlin C., (1994) Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: A histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 9: 13-29.

Bittar-Cortez, J.A., Passeri, L.A., Boscolo, F.N. & Haiter-Neto, F., (2006) Comparison of hard tissue density changes around implants assessed in digitized conventional radiographs and subtraction images. *Clin Oral Implants Res* 17: 560-564.

Hwang, Y.J., Fien, M.J., Lee, S.S., Kim, T.I., Seol, Y.J., Lee, Y.M., Ku, Y., Rhyu, I.C., Chung, C.P. & Han, S.B., (2008) Effect of scaling and root planing on alveolar bone as measured by subtraction radiography. *J Periodontol* 79: 1663-1669.

Hockers, T., Abensur, D., Valentini, P., Legrand, R. & Hammerle, C.H., (1999) The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 10: 487-498.

Polimeni, G., Koo, K.T., Pringle, G.A., Agelan, A., Safadi, F.F. & Wikesjo, U.M., (2008) Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res* 10: 99-105.

Trombelli, L., Farina, R., Marzola, A., Ito, A. & Calura, G., (2008) Gbr and autogenous cortical bone particulate by bone scraper for alveolar ridge augmentation: A 2-case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 23: 111-116.

Thomaidis, V., Kazakos, K., Lyras, D.N., Dimitrakopoulos, I., Lazaridis, N., Karakasis, D., Botaitis, S. & Agrogiannis, G., (2008) Comparative study of 5 different membranes for guided bone regeneration of rabbit mandibular defects beyond critical size. *Med Sci Monit* 14: BR67-73.

Schwarz, F., Rothamel, D., Herten, M., Wustefeld, M., Sager, M., Ferrari, D. & Becker, J., (2008) Immunohistochemical characterization of guided bone

regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 19: 402-415.

Paolantonio, M., Dolci, M., Esposito, P., D'Archivio, D., Lisanti, L., Di Luccio, A. & Perinetti, G., (2002) Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: A comparative 1-year clinical study. *J Periodontol* 73: 1299-1307.

Yan, J.J., Tsai, A.Y., Wong, M.Y. & Hou, L.T., (2006) Comparison of acellular dermal graft and palatal autograft in the reconstruction of keratinized gingiva around dental implants: A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 26: 287-292.

Cummings, L.C., Kaldahl, W.B. & Allen, E.P., (2005) Histologic evaluation of autogenous connective tissue and acellular dermal matrix grafts in humans. *J Periodontol* 76: 178-186.

Barros, R.R., Novaes, A.B., Jr., Grisi, M.F., Souza, S.L., Taba, M., Jr. & Palioto, D.B., (2005) New surgical approach for root coverage of localized gingival recession with acellular dermal matrix: A 12-month comparative clinical study. *J Esthet Restor Dent* 17: 156-164; discussion 164.

Fowler, E.B., Breault, L.G. & Rebitski, G., (2000) Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and demineralized freeze-dried bone allograft: Part i. A report of 2 cases. *J Periodontol* 71: 1353-1359.

Luczyszyn, S.M., Papalexiou, V., Novaes, A.B., Jr., Grisi, M.F., Souza, S.L. & Taba, M., Jr., (2005) Acellular dermal matrix and hydroxyapatite in prevention of ridge deformities after tooth extraction. *Implant Dent* 14: 176-184.

Bornstein, M.M., Bosshardt, D. & Buser, D., (2007) Effect of two different bioabsorbable collagen membranes on guided bone regeneration: A comparative histomorphometric study in the dog mandible. *J Periodontol* 78: 1943-1953.

Jovanovic, S.A., Hunt, D.R., Bernard, G.W., Spiekermann, H., Wozney, J.M. & Wikesjo, U.M., (2007) Bone reconstruction following implantation of rhbmp-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects. *Clin Oral Implants Res* 18: 224-230.

Kikuchi, M., Koyama, Y., Yamada, T., Imamura, Y., Okada, T., Shirahama, N., Akita, K., Takakuda, K. & Tanaka, J., (2004) Development of guided bone regeneration membrane composed of beta-tricalcium phosphate and poly (l-lactide-co-glycolide-co-epsilon-caprolactone) composites. *Biomaterials* 25: 5979-5986.

Araujo, M.G., Berglundh, T. & Lindhe, J., (1998) Gtr treatment of degree iii furcation defects with 2 different resorbable barriers. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 25: 253-259.

Mellonig, J.T., Nevins, M. & Sanchez, R., (1998) Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part ii. Material and a bone replacement graft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 18: 129-137.

Felipe, M.E., Andrade, P.F., Grisi, M.F., Souza, S.L., Taba, M., Palioto, D.B. & Novaes, A.B., (2007) Comparison of two surgical procedures for use of the acellular dermal matrix graft in the treatment of gingival recessions: A randomized controlled clinical study. *J Periodontol* 78: 1209-1217.

Andrade, P.F., Felipe, M.E., Novaes, A.B., Jr., Souza, S.L., Taba, M., Jr., Palioto, D.B. & Grisi, M.F., (2008) Comparison between two surgical techniques for root coverage with an acellular dermal matrix graft. *J Clin Periodontol* 35: 263-269.

Ainamo, A., Bergenholtz, A., Hugoson, A. & Ainamo, J., (1992) Location of the mucogingival junction 18 years after apically repositioned flap surgery. *J Clin Periodontol* 19: 49-52.

de Souza, S.L., Novaes, A.B., Jr., Grisi, D.C., Taba, M., Jr., Grisi, M.F. & de Andrade, P.F., (2008) Comparative clinical study of a subepithelial connective tissue graft and

acellular dermal matrix graft for the treatment of gingival recessions: Six- to 12-month changes. *J Int Acad Periodontol* 10: 87-94.

dos Anjos, B., Novaes, A.B., Jr., Meffert, R. & Barboza, E.P., (1998) Clinical comparison of cellulose and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of class ii furcations in mandibular molars with 6-month re-entry. *J Periodontol* 69: 454-459.

Simonpietri, C.J., Novaes, A.B., Jr., Batista, E.L., Jr. & Filho, E.J., (2000) Guided tissue regeneration associated with bovine-derived anorganic bone in mandibular class ii furcation defects. 6-month results at re-entry. *J Periodontol* 71: 904-911.

Villaca, J.H., Rodrigues, D.C., Novaes, A.B., Jr., Taba, M., Jr., Souza, S.L. & Grisi, M.F., (2004) Root trunk concavities as a risk factor for regenerative procedures of class ii furcation lesions in humans. *J Periodontol* 75: 1493-1499.

Simion, M., Misitano, U., Gionso, L. & Salvato, A. , (1997) Treatment of dehiscences and fenestrations around dental implants using resorbable and nonresorbable membranes associated with bone autografts: A comparative clinical study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 12: 159–167

Machtei, E.E., (2001) The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: A meta-analysis. . *J Periodontol* 72: 512–516

Lorenzoni, M., Pertl, C., Polansky, R.A., Jakse, N. & Wegscheider, W.A., (2002) Evaluation of implants placed with barrier membranes. A retrospective follow-up study up to five years. *Clin Oral Implants Res* 13: 274-280.

Tal, H., Kozlovsky, A., Artzi, Z., Nemcovsky, C.E. & Moses, O., (2008) Cross-linked and non-cross-linked collagen barrier membranes disintegrate following surgical exposure to the oral environment: A histological study in the cat. *Clin Oral Implants Res* 19: 760-766.