UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCIANA PRADO MAIA

**INFLUÊNCIA DO “BIOTIPO PERIODONTAL” NA REMODELAÇÃO DOS
TECIDOS MOLES E DA TÁBUA ÓSSEA VESTIBULAR EM ALVÉOLOS PÓS-
EXODONTIA E IMPLANTES IMEDIATOS, COM E SEM ENXERTO XENÓGENO.**

PG.PERIO
FOP- USP

Ribeirão Preto

2014

LUCIANA PRADO MAIA

Influência do “biotipo periodontal” na remodelação dos tecidos moles e da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-exodontia e implantes imediatos, com e sem enxerto xenógeno.

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

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Bazan Palioto

Ribeirão Preto

2014

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

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Maia, Luciana Prado

Influência do “biotipo periodontal” na remodelação dos tecidos moles e da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-exodontia e implantes imediatos, com e sem enxerto xenógeno. Ribeirão Preto, 2014.

f. 138: il.; 30cm

Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2014.

Orientadora: Palioto, Daniela Bazan

1. Enxerto xenógeno. 2. Implante imediato. 3. Remodelação óssea alveolar.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Prado Maia

Influência do “biotipo periodontal” na remodelação dos tecidos moles e da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-exodontia e implantes imediatos, com e sem enxerto xenógeno.

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

Área de concentração: Periodontia.

Aprovado em: ____ / ____ / 2014

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Antonio** e **Maria Dalva**, que sempre me apoiaram e me incentivaram, não medindo esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Obrigada por me guiarem pelo caminho certo e por serem meus exemplos de vida.

Às minhas irmãs, **Cíntia** e **Larissa**, minhas melhores amigas e eternas companheiras, pelo estímulo e carinho de todos os momentos.

Ao meu namorado **Rodrigo**, meu apoio mais presente, por compartilhar comigo todas as etapas com paciência e companheirismo, sempre me dando forças para continuar.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por abençoar minhas escolhas e guiar meus passos para que pudesse chegar ao final de mais uma etapa.

À **minha família**, pais, irmãs, namorado, avós, tios e primos, pela torcida e apoio. Em especial à minha **avó Isaura**, exemplo de força e perseverança, à minha **madrinha Iraídes** e à **tia Ednalva**, que sempre me apoiaram em minha formação.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Daniela Bazan Palioto**, pelos conhecimentos adquiridos durante o desenvolvimento deste e de outros projetos e, principalmente, por acreditar e confiar em mim em todos os momentos.

Ao **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**, exemplo de pesquisador, pela sua intensa dedicação ao nosso trabalho e todos os ensinamentos a mim transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Antonio Nanci**, por me receber em seu laboratório no Doutorado Sanduíche, onde eu tive a oportunidade de aprender novas técnicas e crescer como pesquisadora, tornando possível a realização de um sonho.

Ao **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**, pela disposição e forma generosa com que sempre me atendeu, e por sua contribuição na realização deste trabalho.

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

Ao amigo do curso de doutorado, **Danilo Maeda**, que participou da fase experimental deste trabalho.

Ao veterinário responsável, **Fábio Motta**, e aos técnicos do biotério, **Aldo** e **Edson**, pelos empenho nos cuidados com os animais, pela enorme ajuda e dedicação na fase experimental deste trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios do Departamento de CTBMF e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, **Adriana Almeida**, do Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais, responsável pela análise de microtomografia computadorizada e auxílio nas análises histomorfométricas, e **Sebastião Bianco**, do Laboratório de Histologia, responsável pelo processamento das peças calcificadas.

À técnica do laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, **Vani Alves**, responsável pelo processamento das peças não-calcificadas.

À assistente de pesquisa do Laboratório para o Estudo de Tecidos Calcificados e Biomateriais da Faculdade de Odontologia da Universidade de Montreal, **Rima Wazen**, pelo treinamento para utilização do microscópio eletrônico de varredura, e a técnica de laboratório **Katia Ponce**, pelo auxílio na realização das análises de imunohistoquímica.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade De São Paulo**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio financeiro para a realização do estudo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior**, pelas bolsas concedidas de doutorado e do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

Aos demais professores do curso de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi**, **Prof. Dr. Mário Taba Jr.**, **Prof. Dr. Michel Reis**

Messora e Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza, pelo convívio e pelos conhecimentos e experiências compartilhados, que tanto contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Aos amigos da pós-graduação, em especial a **Patrícia Garani, Ingrid, Sanada, Karina Kimikó, Luciana Bastos, Adriana Queiroz, Flávia Suaid, Piscila Paganini, Carolina Delmondes, Carolina Mandetta e Umberto Ramos**, e todos os demais colegas de tantas turmas de mestrado e doutorado, pela companhia agradável, convivência harmoniosa e todo o apoio nesta trajetória.

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial às secretárias do departamento, **Tati, Dulce e Daniela**, à funcionárias da clínica de pós-graduação, **Sueli e Daniela**, e às funcionárias da pós-graduação, **Regiane e Isabel**, pela disposição com que me ajudaram durante a realização desta pesquisa, e, sobretudo, pelo carinho e amizade.

Aos amigos **Larissa de Castro, Lucas Novaes e Roger Fernandes**, pela amizade, companheirismo e por todo o apoio durante toda a pós-graduação.

Às amigas construídas em Ribeirão Preto, que me proporcionaram momentos alegres e motivação, em especial à **Ingrid Sanada, Karina Kimikó, Renata Filgueira e Juliana Cavalcante**, pelo carinho e força constantes.

A todos que estiveram presentes e contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento e finalização deste trabalho,

Muito Obrigada!

RESUMO

Maia LP. **Influência do “biotipo periodontal” na remodelação dos tecidos moles e da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-exodontia e implantes imediatos, com e sem enxerto xenógeno.** 138p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2014.

Após exodontia e instalação de implantes imediatos o sítio edêntulo sofre uma substancial remodelação óssea. O objetivo do presente estudo foi avaliar a remodelação dos tecidos moles e da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-exodontia e em implantes imediatos em cães com um “biotipo periodontal” fino, com a associação de um material de enxerto. Oito cães tiveram a espessura da gengiva de um lado da mandíbula reduzida, os pré-molares mandibulares extraídos em cirurgia sem retalho e 4 implantes foram instalados de cada lado à 1,5 mm da tábua óssea vestibular. Os demais alvéolos foram utilizados para o estudo da dinâmica de cicatrização alveolar. Os sítios foram aleatoriamente alocados em: GT (grupo teste) = gengiva fina; GT + ME (GT com material de enxerto); GC (grupo controle) = gengiva normal; e GC + ME (GC com material de enxerto). Espessura da tábua óssea vestibular (ETOV), espessura de gengiva queratinizada (EGQ), largura alveolar (LA), altura de retração gengival (RG) e profundidade de sondagem (PS) foram avaliados clinicamente. Após 12 semanas os cães foram sacrificados e as amostras processadas para as análises de micro-tomografia computadorizada, histologia, histomorfometria, fluorescência e imunohistoquímica. Uma ETOV fina foi observada em todos os cães. Os procedimentos pré-cirúrgicos reduziram a EGQ nos grupos teste, com alterações mínimas na LA. Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos para os parâmetros clínicos. Em todos os grupos o alvéolo ou o gap vestibular foram preenchidos por osso neoformado e uma leve reabsorção da tábua óssea vestibular foi observada, sem diferença estatística entre os grupos. Nos alvéolos pós-exodontia uma taxa de mineralização numericamente maior foi observada nos grupos que receberam material de enxerto em 12 semanas. A espessura do osso vestibular foi um fator fundamental na reabsorção da tábua óssea vestibular, mesmo com cirurgia sem retalho. Diminuir a gengiva para uma espessura crítica ou a adição de um biomaterial, em um biotipo fino pré-existente, não influenciou os resultados.

Palavras-chave: Enxerto xenógeno, implante imediato, remodelação óssea alveolar.

ABSTRACT

Maia LP. **Influence of “periodontal biotype” on soft tissues and buccal bone plate remodeling in fresh extraction sockets and after immediate implant placement, with and without xenografts.** 138p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2014.

After tooth extraction and immediate implant placement the edentulous site undergo marked bone remodeling. The aim of the present study was to evaluate soft tissues and buccal bone remodeling in fresh extraction sockets and immediate implants in dogs with a thin “periodontal biotype”, with the association of a graft material. The gingiva of 8 dogs was thinned at one side of the mandible, mandibular premolars were extracted without flaps, and 4 implants were installed on each side at 1.5 mm from the buccal bone. The remaining sockets were used for the study of the alveolar healing dynamic. The sites were randomly assigned into: TG (test group) = thin gingiva; TG + GM (TG with grafting material); CG (control group) = normal gingiva; and CG + GM (CG with grafting material). Buccal bone thickness (BBT), thickness of keratinized tissue (TKT), alveolar width (AW), gingival recession height (GR) and probing depth (PD) were clinically evaluated. After 12 weeks the dogs were sacrificed and the samples were processed for microtomographic, histological, histomorphometric, fluorescence and immunohistochemistic analysis. A thin BBT was observed in all the dogs. The pre-surgical procedures reduced gingival thickness in the test groups, with minimal changes of the AW. There were no statistically significant differences among the groups for the clinical parameters. In all the groups the socket or the buccal gap was filled with newly formed bone and a slight buccal bone loss was observed, with no statistical difference among the groups. In the extraction sockets a numerically higher mineralization rate was observed for the grafted groups at 12 weeks. The thickness of the buccal bone was a fundamental factor on buccal bone plate resorption, even with a flapless approach. To reduce the gingival thickness or the addition of a biomaterial, in a thin biotype, did not influence the results.

Key-words: Xenograft, immediate implant, alveolar bone remodeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental proposto no estudo.....	28
Figura 2. Peeling gengival: A) Aspecto inicial da mucosa; B) A gengiva vestibular dos dentes selecionados para cirurgia teve sua espessura reduzida com o auxílio de uma ponta diamantada de alta-rotação; C) Aspecto da gengiva no grupo teste após o peeling gengival.....	29
Figura 3. Aspecto gengival no momento da instalação do implante dos grupos teste (A), mostrando uma espessura gengival visivelmente menor quando comparada aos grupos controle (B).....	30
Figura 4. Placas dentárias utilizadas para padronização das medidas de espessura de gengiva queratinizada (EGQ) (A) e largura alveolar (LA) (B).....	31
Figura 5. A) Aspecto inicial da mucosa e dos dentes; B) Hemisseção dos pré-molares; C) Alvéolos pós-exodontia sem retalho; D) Implantes imediatos instalados; E) Gap de aproximadamente 1,5 mm entre a superfície do implante e a tábua óssea vestibular; F) Transferentes em posição para moldagem; G) Enxerto ósseo nos gaps e alvéolos selecionados aleatoriamente; H) Vista aproximada do gap preenchido com o material de enxerto; I) Cicatrizadores adaptados e sutura das feridas; J) Próteses instaladas uma semana após o procedimento cirúrgico (as cabeças de seta indicam as marcações utilizadas como referência para aferição da retração gengival).....	34
Figura 6. Imagens microtomográficas representando as medidas lineares: A) RVCO: reabsorção vertical da crista óssea - distância resultante entre o ombro do implante e o nível da crista óssea; B) L-GR: largura do gap residual - distância linear resultante do ponto mais alto entre a superfície do implante e a parede vestibular.....	38
Figura 7. Imagens microtomográficas representando as medidas tridimensionais. A) Vista corono-apical da amostra; B) Região de interesse (RI) determinada como um	

cilindro tomográfico medindo 3,5 e 5 mm nos eixos e 6 mm de profundidade, começando do ombro do implante; C) Área utilizada para determinar o volume da região de interesse (VRI) binarizado pelo histograma de tons de cinza; D) Área radiolúcida do gap utilizada para determinação do volume de gap residual (V-GR).....39

Figura 8. A. Imagem histológica marcada por calceína azul representando a área utilizada para quantificação das porcentagens de osso marcado por cada fluorocromo: um retângulo de 30 mm² (em branco), a partir do ponto mais coronal do alvéolo B. Imagem histológica marcada por calceína verde representando a área utilizada para quantificação das porcentagens de osso marcado por cada fluorocromo: um retângulo de 6 mm² (em branco), a partir do ombro do implante na tábua óssea vestibular. Magnificação 2,5X.....40

Figure 9. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando as medidas histomorfométricas aferidas na nos alvéolos. A) A reabsorção vertical da crista óssea vestibular (V) em relação ao osso lingual (L) foi determinada como uma medida linear vertical em duas regiões diferentes: de uma linha imaginária da crista óssea lingual ao ponto mais alto de osso neo-formado (RVCO-ON) (linha vermelha), e de uma linha imaginária da crista óssea lingual ao primeiro ponto de osso antigo (RVCO-OA) (linha branca); B) A largura do alvéolo (LA) foi analisada 1 mm abaixo do ponto ósseo mais alto no alvéolo (linha vermelha); C) A densidade óssea histológica foi determinada a partir de um retângulo de 30 mm² incluindo a região do defeito (em vermelho). A área de osso novo (ON), osso antigo (OA), tecido conjuntivo (TC) e partículas residuais do enxerto (PRE) foi quantificada. Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar OA e ON. Magnificação de 2.5X.....42

Figure 10. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando as medidas histomorfométricas aferidas na tábua óssea vestibular adjacente a implantes imediatos. A) Reabsorção vertical da crista óssea (RVCO), determinada como uma medida linear vertical a partir de uma linha imaginária do ombro do implante até o ponto mais alto da crista; B) Nível ósseo vertical (NOV), do ombro do implante ao primeiro contato osso-implante; C) Largura do gap residual (L-RG): medida linear horizontal, da superfície do implante ao ponto mais cervical da crista

óssea; D) Densidade óssea histológica, determinada a partir de um retângulo de 6 mm² (em vermelho) incluindo a região do defeito. Magnificação de 2.5X.....43

Figura 11. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando os alvéolos dos grupos sem enxerto. A entrada do alvéolo mostrou-se fechada por tecido ósseo mineralizado conectando as cristas ósseas vestibular (V) e lingual (L), enquanto que osso novo (ON) e tecido conjuntivo (TC) preencheram as áreas marginais e central do alvéolo (A) (Magnificação de 1,6X). Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar o osso antigo (OA) do ON (A, C e D). Observou-se a presença de osteoblastos (OB) e osteoclastos (OC) no ON (B) (Magnificação de 20X). Note a diferença entre ON, com áreas de osso imaturo (OI) e osso de fibras paralelas (OFP), e OA, em uma padrão lamelar (OL) (C) (Magnificação de 10X), mais evidente sob luz polarizada (D) (Magnificação de 10X).....51

Figura 12. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando os alvéolos dos grupos enxertados. Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocuparam grande parte da entrada e interior do alvéolo (A). Ocasionalmente, a presença de PRE foi notada fora do tecido ósseo (*) (A) (Magnificação de 1,6X). Uma linha amarela tracejada foi desenhada para separar o osso antigo (OA) do osso neoformado (ON) (A, C e D). Algumas PRE mostraram-se revestidas em ON, enquanto outras encontravam-se circunscritas por tecido conjuntivo fibroso (TC) (B) (Magnificação 20X). Note a diferença entre ON, com áreas de osso imaturo (OI) e osso de fibras paralelas (OFP), e OA, em uma padrão lamelar (OL) (C) (Magnificação de 20X), mais evidente sob luz polarizada (D) (Magnificação de 10X).....52

Figura 13. Imagens histológicas representando os resultados da fluorescência em alvéolos. O osso antigo mostrou-se sempre mais escuro e menos fluorescente. A) Calceína verde foi geralmente representada por linhas verdes evidentes; B) Vermelho de alizarina apresentou um padrão vermelho difuso; C) Tetraciclina mostrou finas linhas verde-amareladas; e D) Calceína azul foi caracterizada por um padrão azul difuso. Magnificação de 2,5X.....56

Figura 14. Porcentagem de osso neoformado nos alvéolos para todos os grupos experimentais ao longo dos períodos de avaliação.....57

Figura 15. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando os sítios de implante sem enxerto. Note o implante (I) integrado ao tecido ósseo adjacente e o nível ósseo vestibular apical ao ombro do implante (A) (Magnificação de 2,5X). O gap vestibular foi preenchido por osso neoformado (ON), o qual mostrou continuidade com o osso antigo (OA) da tábua óssea vestibular. Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar as estruturas de OA e ON (B,C) (Magnificação de 10X). A luz polarizada (C) evidencia as diferentes estruturas óssea: o ON formado por osso imaturo (OI) e osso de fibras paralelas (OFP), e o OA em padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10X). Em maior aumento observa-se aspectos imaturos do ON, com a presença de osteoblastos (OB) e uma matriz osteóide (MO) (Magnificação de 20X).....63

Figura 16. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando os sítios de implantes que receberam enxerto. Partículas residuais do enxerto (PRE – coloração castanho) foram observadas em algumas amostras na área do gap vestibular (A). Ocasionalmente, foi observada a presença de PRE fora do tecido ósseo (*) (A) (Magnificação de 2.5X). Imagens por microscopia de luz (B) e luz polarizada (C), mostrando que a superfície do implante (I) foi revestida por osso novo (ON), cuja estrutura estabeleceu contato direto com as PRE e o osso lamelar antigo (OL). Uma linha tracejada amarela foi desenhada separando as estruturas de ON e OA (B e C). As diferentes estruturas ósseas mostraram-se evidentes: o novo osso formado por osso imaturo (OI) e osso de fibras paralelas (OFP), e o OL. (Magnificação de 10X). As PRE encontravam-se revestidas por ON, e a presença de uma matriz osteóide (MO) pavimentada por osteoblastos (OB) foi observada (D) (Magnificação de 20X).....64

Figura 17. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura no modo de elétrons retroespalhados dos grupos sem enxerto. A) O osso novo (ON) estava presente principalmente na área do gap, em contato direto com a superfície do implante (I). A superfície entre ON e osso antigo (OA) é evidente (Magnificação de 37X). B) A imagem em maior aumento revela a presença de um maior número de osteócitos

(Oc) no ON. Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar as estruturas de ON e OA (Magnificação de 75X).....65

Figura 18. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura no modo de elétrons retroespalhados dos grupos que receberam enxerto. A) O osso neoformado (ON) estava em contato direto com a superfície do implante e circundando as partículas residuais do enxerto (PRE) na área do gap. Ocasionalmente, PRE foram observadas fora do tecido ósseo (*) (Magnificação de 37X). B) A imagem em maior aumento revela o maior número de osteócitos (Oc) no ON. Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar as estruturas de osso antigo (OA) e ON (Magnificação de 75X).....66

Figura 19. Resultados da análise de fluorescência ao redor de implantes. Neoformação óssea foi determinada histomorfométricamente pela quantificação de marcadores ósseos. O osso antigo mostrou-se sempre mais escuro e sem marcação. A) Calceína verde foi geralmente representada por linhas verdes evidentes; B) Vermelho de alizarina apresentou um padrão vermelho difuso; C) Tetraciclina mostrou finas linhas verde-amareladas; e D) Calceína azul foi caracterizada por um padrão azul difuso. Magnificação de 2,5X.....70

Figura 20. Porcentagem de osso neoformado adjacente à superfície dos implantes para todos os grupos experimentais ao longo do período de avaliação.....72

Figura 21. Detecção imunohistoquímica de BRIL ao redor de implantes imediatos após 12 semanas de cicatrização. Note que o implante (I) estava em contato com osso cortical. As áreas incluídas nos retângulos desta figura estão apresentados em maior aumento nas Figuras 2 a 5 correspondentes. Hematoxicilina foi usada como coloração de contraste. L: tábua óssea lingual; I: área do implante; V: tábua óssea vestibular.....73

Figura 22. Detecção imunohistoquímica para BRIL (A) e OPN (B) ao redor de implantes imediatos, em 12 semanas de cicatrização. Note em 2 a presença de osso neoformado na extremidade coronal da tábua óssea vestibular com imunomarcacão para BRIL e OPN na matriz; em 3, a interface osso-implante também marcada para

BRIL e OPN (mais evidente no detalhe em maior aumento); em 4, a porção externa da tábua óssea lingual com expressão de BRIL e OPN seguindo as linhas incrementais; e em 5, um área interna da tábua óssea vestibular com expressão de OPN no osso lamelar antigo. As setas em 3 e 5 indicam as linhas de cimentação, marcadas para OPN. Hematoxicilina foi utilizada como coloração de contraste.....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análises empregadas na avaliação de alvéolos e de implante imediatos.....	36
Tabela 2. Espessura da tábua óssea vestibular (ETOV) (mm) no momento da exodontia (T ₁); comparação intergrupos.....	46
Tabela 3. Espessura de gengiva queratinizado (EGQ) e largura alveolar (LA) antes do peeling gengival (T ₀), antes da exodontia (T ₁), e após 4 (T ₂) e 12 semanas (T ₃); comparações intra e intergrupos.....	48
Tabela 4. Variação (Δ) da espessura de gengiva queratinizada (EGQ) e largura alveolar (LA) entre os diferentes períodos experimentais; comparações intra e intergrupos.....	49
Tabela 5. Medidas histomorfométricas lineares em alvéolos; comparações intergrupos.	53
Tabela 6. Medidas histomorfométricas de área em alvéolos; comparações intergrupos.....	54
Tabela 7. Medidas de fluorescência em alvéolos: porcentagem de osso neoformado no alvéolo ao longo dos períodos experimentais; comparações intra e intergrupos.....	58
Tabela 8. Retração gengival (RG) (mm) imediatamente após a instalação dos implantes (T ₁), e após 4 (T ₂) e 12 semanas (T ₃), e variação (Δ) entre T ₂ e T ₃ ; comparações intra e intergrupos.....	59
Tabela 9. Frequência de ocorrência de retração gengival (RG) em implantes imediatos em 4 (T ₂) e 12 semanas (T ₃) após a instalação.....	60

Tabela 10. Medidas microtomográficas bidimensionais em implantes imediatos; comparação intergrupos.....61

Tabela 11. Medidas microtomográficas tridimensionais em implantes imediatos; comparações intergrupos.....61

Tabela 12. Medidas histomorfométricas lineares em implantes imediatos; comparações intergrupos.....68

Tabela 13. Medidas de fluorescência em implantes imediatos: porcentagem de osso neo-formado na tábua óssea vestibular próximo à superfície do implante ao longo dos tempos experimentais; comparações intra e intergrupos.....71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Δ	variação
μm	micrômetros
%V-GR	porcentagem que o volume do gap residual representa do volume da região de interesse
2D	bidimensional
3D	tridimensional
Al-Cu	alumínio – cobre
BEI	modo de elétrons retroespalhados
BRIL	“bone-restricted ifitm-like”
DO	densidade óssea
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGQ	espessura de gengiva queratinizada
ETOV	espessura da tábua óssea vestibular
GC	grupo controle – gengiva normal
GC + ME	grupo controle com material de enxerto
GT	grupo teste – gengiva fina
GT + ME	grupo teste com material de enxerto
h	horas
I	implante
kg	quilogramas
L	lingual
L-GR	largura do gap residual
LA	largura alveolar
M	molar
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MicroCT	microtomografia computadorizada
mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
mm ²	milímetros quadrados
MO	matrix osteóide

Nm	nanômetros
NOV	nível ósseo vertical
OA	osso antigo
OB	osteoblastos
OC	osteoclastos
Oc	osteócitos
OFP	osso lamelar de fibras paralelas
OI	osso imaturo
OL	osso lamelar maduro
ON	osso neoformado
OPN	osteopontina
OT	osso total
P1	primeiro pré-molar
P2	segundo pré-molar
P3	terceiro pré-molar
P4	quarto pré-molar
PBS	tampão fosfato-salino
PO	preenchimento ósseo
PRE	partículas residuais do enxerto
PS	profundidade de sondagem
RG	altura de retração gengival
RI	região de interesse
RVCO	reabsorção vertical da crista óssea
RVCO_ON	reabsorção vertical da crista óssea em relação ao osso novo
RVCO_OA	reabsorção vertical da crista óssea em relação ao osso antigo
T ₀	tempo experimental antes do primeiro peeling gengival
T ₁	tempo experimental imediatamente antes da exodontia
T ₂	tempo experimental 4 semanas após a instalação dos implantes
T ₃	tempo experimental 12 semanas após a instalação dos implantes
TC	tecido conjuntivo
V	vestibular
V-GR	volume do gap residual
VRI	volume da região de interesse

O presente estudo foi realizado no Biotério II (Canil) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP), no Laboratório de Histologia e Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais do Departamento de CTBMF e Periodontia da FORP/USP; no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; e no Laboratório para o Estudo de Tecidos Calcificados e Biomateriais da Faculdade de Odontologia da Universidade de Montreal.

Este estudo foi desenvolvido com auxílio financeiro da Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2011/00674-6 e deu origem a três artigos científicos. Os dados clínicos e microtomográficos de implantes foram aceitos para publicação na Clinical Oral Implants Research, e o artigo referente à análise dos alvéolos foi aceito para publicação na Clinical Implant Dentistry and Related Research. Os dados referentes à histomorfometria, fluorescência e imunohistoquímica de implantes serão submetidos para publicação na Journal of Clinical Periodontology.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	23
2.	PROPOSIÇÃO.....	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
	3.1. Desenho do Estudo e Randomização.....	28
	3.2. Procedimentos Pré-Cirúrgicos.....	29
	3.3. Parâmetros Clínicos.....	30
	3.4. Procedimentos Cirúrgicos.....	32
	3.5. Sacrifício e Processamento Histológico.....	35
	3.6. Microtomografia Computadorizada.....	37
	3.7. Fluorescência.....	39
	3.8. Histomorfometria.....	41
	3.9. Imunohistoquímica.....	43
	3.10. Análise Estatística.....	44
4.	RESULTADOS.....	45
	4.1. Observações Clínicas.....	45
	4.2. Medidas Clínicas de Espessura da Tábua Óssea Vestibular (ETOV), Espessura de Gengiva Queratinizada (EGQ) e Largura Alveolar (LA).....	45
	4.3. Remodelação da Tábua Óssea Vestibular em Alvéolos Pós- Exodontia.....	50
	4.3.1. Análise Histológica Qualitativa.....	50
	4.3.2. Histomorfometria.....	53
	4.3.3. Fluorescência.....	55
	4.4. Remodelação da Tábua Óssea Vestibular em Implantes Imediatos.....	59
	4.4.1. Medidas Clínicas de Retração Gengival (RG) e Profundidade de Sondagem (PS).....	59
	4.4.2. Microtomografia Computadorizada.....	60
	4.4.3. Análise Histológica Qualitativa.....	62
	4.4.4. Histomorfometria.....	67
	4.4.5. Fluorescência.....	69
	4.4.6. Imunohistoquímica.....	72
5.	DISCUSSÃO.....	75

6. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ARTIGO I EM INGLÊS.....	94
ARTIGO II EM INGLÊS.....	103
ARTIGO III EM INGLÊS.....	118
ANEXO.....	138

1. INTRODUÇÃO

A reabsorção óssea alveolar que ocorre após exodontia é uma condição inerente ao processo de cicatrização, e a área edêntula do processo alveolar irá sofrer alterações marcantes em altura e largura¹⁻⁵. O processo de cicatrização que se segue à exodontia resulta em reabsorção mais acentuada do aspecto vestibular do que do aspecto lingual ou palatino da crista óssea^{1,2}. A maior densidade óssea, representada pelo menor número de espaços medulares, em associação a um aspecto mais fino, tornam a tábua óssea vestibular mais suscetível à ocorrência de reabsorção após exodontia⁶. Adicionalmente, o processo que resulta na redução tecidual parece ser mais pronunciado durante a fase inicial de cicatrização da ferida do que durante períodos tardios após a remoção dentária^{1,5}.

Inúmeras investigações foram realizadas para estabelecer a real dimensão da reabsorção que ocorre após exodontia. Uma recente meta-análise sobre terapia de preservação do rebordo relatou reduções de rebordo de 2,6 a 4,5 mm em largura e 0,4 a 3,9 mm em altura em alvéolos cicatrizados naturalmente⁷. Essas reduções podem gerar complicações no posicionamento de implantes e na obtenção de resultados estéticos previsíveis, particularmente em áreas anteriores⁸.

No momento, o principal foco no tratamento de alvéolos pós-exodontia está na preservação do volume ósseo e melhora das condições de tecido mole para posterior reabilitação com próteses ou implantes. Para tanto, diferentes materiais de enxerto, incluindo enxerto ósseo autógeno, alógeno, xenógeno e sintéticos, associados ou não ao uso de membranas, vêm sendo utilizados em uma tentativa de preservar o rebordo alveolar após exodontia⁹⁻¹⁹.

Contudo, sabe-se que mesmo havendo a cicatrização do alvéolo após exodontia com técnicas de preservação do rebordo, a instalação e reabilitação protética de implantes está sujeita à ocorrência de perda óssea marginal precoce²⁰. Sendo assim, foi sugerido que a instalação de implantes imediatos poderia reduzir a contração do rebordo alveolar que se segue à remoção dentária²¹⁻²⁵, especialmente com a instalação de prótese provisória²⁶. Aprimoramentos no design e características de superfície de implantes resultaram no aumento da estabilidade inicial, diminuição da micro movimentação e maior aposição óssea ao longo da superfície do implante durante o processo de cicatrização²⁷⁻²⁹. Com esses avanços,

a aplicação de cargas funcionais controladas ao implante no momento da instalação cirúrgica pode ser utilizada de forma segura e eficaz na restauração protética de pacientes parcial ou totalmente edêntulos³⁰⁻³⁶. Esses passos preservariam a anatomia alveolar e auxiliariam na manutenção da estrutura óssea crestal²³. Em uma perspectiva estética, a restauração através de implantes imediatos e próteses provisórias beneficiaria o resultado do tratamento de duas formas, através da reposição imediata do dente perdido e preservação dos contornos teciduais na área do alvéolo, além de reduzir o número de procedimentos cirúrgicos e aumentar a aceitação de pacientes ao tratamento com implantes.

O que a literatura vem mostrando até o presente momento é que técnicas de preservação do alvéolo não previnem a reabsorção óssea mas podem reduzi-la, com resultados consequentemente superiores àqueles observados em casos de cicatrização natural⁷. Com relação aos implantes imediatos, a presença de perda óssea marginal ainda representa um desafio para o clínico³⁷⁻⁴⁰. Sendo assim, tanto na utilização de técnicas de preservação do rebordo, quanto na instalação de implantes imediatos, inúmeros aspectos devem ser observados, na tentativa de se obter melhor previsibilidade dos resultados. Esses aspectos incluem a espessura da tábua óssea vestibular e dos tecidos moles adjacentes ao sítio cirúrgico, a técnica cirúrgica utilizada, e a utilização ou não de biomateriais.

O termo “biotipo periodontal” foi introduzido por Seibert e Lindhe⁴¹ para descrever a espessura da gengiva no sentido buco-lingual, e essa espessura é um aspecto importante na manutenção da saúde gengival. Um biotipo periodontal fino está associado a uma estreita faixa de tecido queratinizado, gengiva fina e clara e osso alveolar relativamente fino^{42,43}. A avaliação do biotipo periodontal parece ser um fator significativo, considerando que ele está relacionado aos resultados de diferentes procedimentos dentários. Sendo a preservação do rebordo e a instalação de implantes imediatos procedimentos sensíveis, a avaliação detalhada dos componentes teciduais duros e moles se torna um passo importante na obtenção de resultados estéticos mais previsíveis e sucesso do tratamento.

A espessura da tábua óssea vestibular em sítios de extração parece exercer influência significativa na extensão da reabsorção óssea vertical e horizontal em alvéolos de humanos⁴⁴, bem como ao redor de implantes imediatos^{45,46}. Sítios com tábua óssea vestibular fina (≤ 1 mm) apresentam maior perda óssea horizontal e vertical após extração de dentes maxilares anteriores⁴⁴. A literatura mostrou que

alterações ósseas durante o processo de cicatrização são consistentemente dependentes das características iniciais. Portanto, o grau de reabsorção da crista óssea depende da espessura inicial das tábuas ósseas⁴⁵⁻⁴⁶. Spray et al.⁴⁷ avaliando a relação entre a perda óssea vertical e a espessura da tábua óssea vestibular em implantes instalados em rebordos cicatrizados, detectaram uma maior perda quando a tábua óssea vestibular apresenta uma espessura menor que 1,4 mm. Os autores concluíram que para evitar uma perda óssea vestibular e, com isso, uma possível retração gengival, deve-se manter um mínimo de 1,8 mm de cortical externa. Sendo assim, a espessura da tábua óssea vestibular é um aspecto importante que precisa ser considerado no processo de decisão com relação à realização de técnicas de preservação de rebordo e, principalmente, à instalação de implantes imediatos.

A influência da espessura de mucosa e formação do espaço biológico na manutenção da saúde tecidual e preservação da tábua óssea ao redor de implantes vem sendo discutida recentemente. A literatura mostra que a presença de tecido queratinizado é mais importante ao redor de restaurações e próteses com término subgengival do que em estruturas dentárias naturais, independente do status de higiene oral^{48,49}. Existe uma diferença fundamental entre os tecidos periodontais e perimplantares quanto à ancoragem dos tecidos moles marginais, o que deve influenciar a estabilidade desse tecido. Enquanto a mucosa periodontal encontra-se unida ao dente com fibras colágenas inseridas na porção supracrestal da raiz, a mucosa perimplantar não possui tal união⁵⁰, resultando na possibilidade de desinserção da mucosa marginal altamente móvel da superfície do implante. Desta forma, pode-se sugerir que uma inadequada faixa de tecido queratinizado, especialmente em má condição de higiene oral, influencia negativamente a manutenção dos tecidos marginais de dentes restaurados e/ou implantes dentários a longo prazo. Em implantes unitários anteriores, até 16% de retração gengival foi descrito na literatura⁵¹. Kan et al.⁵² demonstraram ainda melhores dimensões da mucosa perimplantar na presença de biotipo espesso. Outra desvantagem do periodonto fino é que é possível observar, em alguns casos, a coloração acinzentada do implante ou do pilar através da mucosa⁵³. Estudos em animais⁵⁴ e humanos⁵⁵⁻⁵⁷ demonstraram ainda que tecidos finos podem levar a maior perda óssea crestal durante a formação do selamento perimplantar.

A abordagem cirúrgica é outro aspecto importante que precisa ser considerado na preservação alveolar e implantação imediata. O trauma cirúrgico que

inclui a separação do perióstio da superfície óssea induz a remodelação da camada superficial do osso alveolar na área exposta^{39,58,59}. A cirurgia sem retalho vem sendo empregada recentemente como abordagem alternativa, fornecendo função, estética e conforto. A realização de cirurgias sem retalho diminui a taxa de reabsorção de alvéolos pós-exodontia⁶⁰. Além disso, a cirurgia de implante sem retalho acelera a cicatrização⁶¹⁻⁶⁴ e aumenta a vascularização da mucosa perimplantar após a instalação de implantes⁵⁴. Adicionalmente, foi demonstrado que retrações gengivais são menos frequentes em implantes imediatos instalados com cirurgia sem retalho⁶⁵.

Na instalação de implantes imediatos, a presença de um gap entre as paredes do alvéolo e a superfície do implante é comumente observado⁶⁶ e essa falta de adaptação é explicada em parte pelo fato de que o alvéolo pós-exodontia varia drasticamente em configuração, tamanho e formato⁶⁷. Como nas técnicas de preservação de rebordo, diferentes abordagens vêm sendo aplicadas para preencher esse gap, incluindo o uso de diferentes materiais de enxerto^{25,68-73}.

O osso mineral bovino desproteínizado é o material mais frequentemente relatado na literatura em procedimentos de preservação de rebordo^{3,9,13,14,74}. Esse biomaterial age como um arcabouço para a neoformação óssea^{75,76} e após cicatrização observa-se a incorporação do biomaterial, com mínima reabsorção^{9,14,74}. O mesmo osso mineral bovino desproteínizado combinado com colágeno (Bio-Oss Collage – Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), foi avaliado em estudos clínicos e experimentais, especialmente em procedimentos de preservação de rebordo^{9,77-81}, com resultados promissores. Em um estudo em animais foi demonstrado que o biomaterial parece modificar a remodelação e contração marginal do rebordo que ocorre após remoção dentária⁹. Observou-se ainda que a utilização desse enxerto xenógeno no gap entre o implante e as paredes ósseas vestibulo-proximal modifica o processo de cicatrização tecidual, melhorando o nível marginal do contato osso-implante.⁷³

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a remodelação dos tecidos moles e da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-exodontia e em implantes imediatos em cães com um “biotipo periodontal” fino. A possibilidade de reduzir o processo de reabsorção com a associação de um material de enxerto também foi estudada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho do Estudo e Randomização

Este estudo foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (número de protocolo 11.1.138.53.6). Foram selecionados 8 cães da raça Beagle, com cerca de 1 ano de idade e pesando em média 11,5 kg. Foram selecionados cães pequenos para garantir que todos apresentassem tábua óssea vestibular fina. Todos os animais selecionados apresentavam mandíbulas normais, sem trauma oclusal generalizado, sem lesões virais ou fúngicas na boca, boa saúde geral e sem comprometimento sistêmico atestado por exames veterinários. Os cães foram imunizados com vacinas, receberam tratamento antiparasitário e foram submetidos a profilaxia dental com o uso de pontas ultra-sônicas (Cavitron 3000, Dentsply Mfg. Co., USA) para remoção de cálculo e biofilme dental.

O estudo foi realizado utilizando o modelo de boca dividida, de acordo com o desenho experimental ilustrado na Figura 1. Cada lado da mandíbula foi aleatoriamente designado aos grupos teste (gengiva fina) ou controle (gengiva normal) por um examinador cego, através do lançamento de uma moeda. Foi então realizada a alocação por um bloco aleatoriamente permutado gerado por um programa de computador (Excel), para distribuir os sítios nos seguintes grupos experimentais: GT: grupo teste – gengiva fina; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle – gengiva normal; GC + ME: grupo controle com material de enxerto.

Figura 1. Desenho experimental proposto no estudo.

3.2. Procedimentos Pré-Cirúrgicos

A gengiva queratinizada vestibular do lado teste nos dentes que receberiam a cirurgia teve sua espessura reduzida com o auxílio de uma ponta diamantada de alta rotação (peeling gengival) enquanto o lado controle foi mantido intacto (Figura 2).

Figura 2. Peeling gengival: A) Aspecto inicial da mucosa; B) A gengiva vestibular dos dentes selecionados para cirurgia teve sua espessura reduzida com o auxílio de uma ponta diamantada de alta-rotação; C) Aspecto da gengiva no grupo teste após o peeling gengival.

Após quatro semanas, a gengiva do lado teste tornou-se similar à do lado controle da mandíbula, e outro peeling gengival foi realizado, seguido por escovação traumática semanal, na tentativa de manter um tecido queratinizado fino no lado teste. Oito semanas após o segundo peeling gengival foi observada diferença estatística significativa entre os lados teste e controle quanto a espessura de gengiva queratinizada (EGQ) (Figura 3), e os cães estavam prontos para o procedimento cirúrgico. Durante esses procedimentos, os animais foram anestesiados com zolazepan administrado por via intravenosa (0,1 mg/kg; Zoletil 50 – Verbac S.A., São Paulo, SP, Brasil) e acepromazina (2%; Acepran - Univet S. A., São Paulo, SP, Brasil).

Figura 3. Aspecto gengival no momento da instalação do implante do lado teste (A), mostrando uma espessura gengival visivelmente menor quando comparada ao lado controle (B).

3.3. Parâmetros Clínicos

Os parâmetros clínicos avaliados em todos os sítios envolvidos no experimento foram espessura de gengiva queratinizada (EGQ), largura alveolar (LA) e espessura da tábua óssea vestibular (ETOV). Nos sítios que receberam implantes foram avaliados ainda altura da retração gengival (RG) e profundidade de sondagem (PS).

A EGQ foi avaliada com o auxílio de um disco de silicone acoplado a uma agulha anestésica. A agulha foi posicionada 3 mm apicalmente à margem gengival, e inserida perpendicularmente à superfície da mucosa através do tecido mole, com leve pressão, até tocar o osso. O disco de silicone foi colocado em íntimo contato com a superfície externa do tecido gengival (Figura 4A). A LA foi avaliada usando um especímetro cirúrgico também 3 mm apicalmente à margem gengival (Figura 4B). A profundidade de penetração da agulha e a abertura do especímetro cirúrgico

foram transferidas para um paquímetro digital com resolução de 0,05 mm. EGQ e LA foram avaliados na porção central da face vestibular de cada raiz dos pré-molares inferiores (P1, P2, P3 e P4) antes do primeiro peeling gengival (T_0) e imediatamente antes da exodontia (T_1); e após a instalação dos implantes, na porção central da face vestibular de cada implante, após 4 (T_2) e 12 (T_3) semanas. As medidas em T_0 e T_1 foram realizadas com o auxílio de uma placa de acrílico com orifícios posicionados 3 mm apicalmente à margem gengival (Figura 3). Após a instalação dos implantes (T_2 e T_3) uma marcação nas próteses metálicas foi usada como ponto de referência, e as medidas foram realizadas 3 mm apicalmente a essa marcação. Nos alvéolos que não receberam implantes as medidas de EGQ e LA foram realizadas apenas em T_0 e T_1 .

Figura 4. Placas dentárias utilizadas para padronização das medidas de espessura de gengiva queratinizada (EGQ) (A) e largura alveolar (LA) (B).

A ETOV foi avaliada com o auxílio de um especímetro cirúrgico na porção central da face vestibular dos implantes durante a cirurgia, logo após a extração dos dentes, e a abertura obtida foi transferida para um paquímetro digital com resolução de 0,05 mm.

Nos sítios que receberam implantes, RG e PS foram avaliadas com o auxílio de uma sonda periodontal manual (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). A RG foi medida na porção central da face vestibular dos implantes em T_2 e T_3 , enquanto a PS foi avaliada em quarto sítios por implante (mesial, distal, vestibular e lingual), em T_3 . Foi utilizada para análise a média das PS obtidas nos quarto sítios avaliados.

3.4. Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram mantidos em jejum na noite anterior aos procedimentos cirúrgicos. Para a cirurgia, os animais foram pré-anestesiados com zolazepam 10% (0,1 ml/kg) e acepromazina (2%). A manutenção anestésica foi obtida através de anestésico volátil e os animais foram submetidos a intubação traqueal com uma sonda para adaptação do dispositivo anestésico e para administração do gás de isoflurano (oxigênio diluído volátil – 2V%). Adicionalmente, anestésias locais foram realizadas nas regiões dos pré-molares inferiores (P1, P2, P3 e P4).

Os procedimentos para extração dos 4 pré-molares inferiores foram executados sem a realização de retalhos. Os dentes foram seccionados ao meio, no sentido vestibulo-lingual a partir da região de bifurcação, possibilitando a extração individual das raízes mesial e distal, e, portanto, minimizando a possibilidade de trauma às paredes ósseas alveolares (Figura 5A-C). Após as exodontias, a espessura da tábua óssea vestibular (ETOV) foi avaliada com o auxílio de um especímetro cirúrgico. Os seguintes alvéolos em ambos os quadrantes da mandíbula foram selecionados para instalação dos implantes (Bone Level SLActive, Straumann Dental Implant System, Basel-Switzwerland, 3,3 mm de largura por 10 mm de comprimento): P2 distal, P3 mesial e distal, e P4 distal, totalizando 4 implantes em cada lado da mandíbula. Todos os implantes foram posicionados ao nível da crista óssea e com a porção cervical a aproximadamente 1,5 mm da tábua óssea vestibular (vestíbulo-lingual), originando um gap vestibular (Figura 5D, E). Os alvéolos mesiais do P2 e P4 foram utilizados para avaliação da preservação do rebordo e, portanto, não receberam implantes.

Após a instalação dos implantes, os transferentes foram posicionados (Figura 4F) para posterior moldagem com silicone de condensação e confecção de próteses metálicas provisórias. Após a moldagem, dos quatro implantes inseridos em cada lado da mandibular, aleatoriamente, dois foram associados ao enxerto xenógeno para o preenchimento do gap entre a superfície do implante e a tábua óssea vestibular, e os outros dois não receberam material de enxerto, cicatrizando apenas com a presença do coágulo (Figura 5G, H). Da mesma forma, um alvéolo de cada lado da mandíbula recebeu o xenoenxerto, enquanto o outro alvéolo cicatrizou somente com a presença do coágulo sanguíneo (Figura 5G).

Em seguida, cicatrizadores foram adaptados aos implantes e suturas foram realizadas para manter o coágulo em posição nos grupos sem enxerto, e o coágulo combinado ao material de enxerto nos grupos com enxerto (Figura 5I).

Nos cuidados pós-operatórios, cloridato de tramadol (50 mg/ml; Tramal - União Química Farmacêutica Nacional S. A., Pouso Alegre, MG, Brasil) foi utilizado na dosagem de 3 mg/kg no intervalo de 12 horas por 3 dias como terapia analgésica, e meloxicam (2 mg/20 kg; Maxicam - Ouro Fino Saúde Animal LTDS, Cravinhos, SP, Brasil) foi utilizado por 5 dias como anti-inflamatório. Os animais também receberam espiromicina (750.000 UI/10kg) e metronidazol (125 mg/10kg) (Stomorgyl10 - Merial Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP, Brasil) por 10 dias como terapia antibiótica. Após uma semana as suturas foram removidas, as conexões protéticas adaptadas e as próteses metálicas instaladas no mesmo tempo (Figura 4J), caracterizando a presença de carga precoce. Uma marcação foi realizada nas próteses para determinar o nível da margem gengival (Figura 5J, cabeças de seta). Os animais foram mantidos com uma dieta leve por pelo menos 15 dias e a cicatrização das regiões operadas foi acompanhada periodicamente com a aplicação tópica de clorexidina 0,12% para limitar a aderência de biofilme microbiano. Os dentes remanescentes receberam profilaxia mensal com o auxílio de pontas ultrassônicas.

Figura 5. A) Aspecto inicial da mucosa e dos dentes; B) Hemisseção dos pré-molares; C) Alvéolos pós-exodontia sem retalho; D) Implantes imediatos instalados; E) Gap de aproximadamente 1,5 mm entre a superfície do implante e a tábua óssea vestibular; F) Transferentes em posição para moldagem; G) Enxerto ósseo nos gaps e alvéolos selecionados aleatoriamente; H) Vista aproximada do gap preenchido com o material de enxerto; I) Cicatrizadores adaptados e sutura das feridas; J) Próteses instaladas uma semana após o procedimento cirúrgico (as cabeças de seta indicam as marcações utilizadas como referência para aferição da retração gengival).

Durante o período de cicatrização de 3 meses, foram administrados 4 marcadores ósseos fluorescentes a fim de observar o grau e a extensão da mineralização óssea. Na primeira semana após a cirurgia, 5 mg/kg de peso corpóreo de calceína verde intravenoso foi administrado (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); na segunda semana, 20 mg/kg de peso corpóreo de alizarina intravenoso foi administrado (Sigma); na quarta semana, 10 mg/kg de peso corpóreo de tetraciclina intravenoso foi administrado (Sigma); na décima segunda semana, 5 mg/kg de peso corpóreo de calceína azul intravenoso foi administrado (Sigma) em cada animal. Todos os corantes foram preparados imediatamente antes do uso, com bicarbonato de sódio a 2% ou solução salina fisiológica. Após o preparo das soluções, o pH foi ajustado para 7,4 e as mesmas foram filtradas com discos de 0,45 µm (Schleider & Schuell GmbH, Dassel, Germany). Cada animal recebeu doses de 3 ml de volume de cada corante.

3.5. Sacrifício e Processamento Histológico

Doze semanas após a cirurgia, os animais foram sacrificados através de indução de anestesia profunda com thiopental 25 mg/kg por via endovenosa, seguido por overdose com cloridrato de potássio a 19% na dose de 1 ml/kg. As hemi-mandíbulas foram removidas, dissecadas, reduzidas e fixadas em formalina a 4% em pH 7. Diferentes análises foram empregadas nas amostras utilizadas para avaliação da preservação da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-exodontia e em implantes imediatos (Tabela 1).

Tabela 1. Análises empregadas na avaliação de alvéolos e de implante imediatos.

	Alvéolos	Implantes Imediatos
MicroCT		☐
Fluorescência	☐	☐
Análise Histológica	☐	☐
Histomorfometria	☐	☐
MEV		☐
Imunohistoquímica		☐

MicroCT: microtomografia computadorizada; MEV: microscopia eletrônica de varredura.

Os espécimes contendo os implantes foram submetidos a análise microtomográfica computadorizada (MicroCT), realizada em um tomógrafo Micro-Sky Scan 1172 (SkyScan, Kontich, Belgium), com um filtro Al-Cu, em condições idênticas (100 kV, 100 uA, usando rotação de 360° graus).

Em seguida, tanto os espécimes dos alvéolos quanto metade dos espécimes dos implantes (um implante de cada grupo para cada cão) foram processados para as análise de fluorescência e histomorfometria. Os espécimes foram desidratados em concentrações ascendentes de álcool até atingir a concentração de 100%, infiltradas e incluídas em resina LR White (London Resin Company, Berkshire, England). Em seguida, os blocos foram seccionados no sentido vestibulo-lingual pela técnica de secção de tecidos duros descrita por Donath e Breunerth ⁸². Para cada amostra, um corte vestibulo-lingual representando a área central do sítio foi preparada. Os cortes foram reduzidos a uma espessura de cerca de 70 µm por micro-desgaste e polimento. As análises histológicas foram realizadas em um microscópio Leica DM LB2 equipado com uma câmera digital Leica DF 300F (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany). As imagens foram analisadas através do software LAS v4.1 (Leica) por um único examinador. Após a análise de fluorescência, os cortes longitudinais foram então corados com Alizarina para análise histomorfométrica.

Os blocos remanescentes dos sítios que receberam implantes foram examinados por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV), no modo de elétrons retroespalhados (BEI), em um microscópio JEOL JSM-6460LV de pressão variada, operado a 25 Pa e 20 kV (JEOL, Tóquio, Japão).

Os demais espécimes contendo implantes (um implante de cada grupo, para cada cão), foram descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 4% pH 7,4, trocado duas vezes por semana. Quando o tecido já se encontrava macio, os implantes foram gentilmente removidos mecanicamente por contra-torque. As amostras descalcificadas foram lavadas em água por 12 h, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, limpas em xilol, embebidas em parafina e seccionadas a uma espessura de 6 µm. Alguns cortes foram corados com hematoxilina e eosina e o restante foi processado para análise de imunohistoquímica.

3.6. Microtomografia Computadorizada

Os espécimes de implantes foram analisados por MicroCT, uma técnica precisa e validada que fornece medidas acuradas de volume e arquitetura óssea⁸³. Com essa metodologia, parâmetros morfométricos são calculados tanto diretamente em três dimensões, ou em duas dimensões, a partir de imagens binarizadas de cortes individuais.

Após escaneamento dos implantes, as análises bidimensionais (2D) foram realizadas usando o software DataViewer (Extron Electronics, Anaheim, Ca – USA), para determinar as seguintes medidas lineares na tábua óssea vestibular:

- Reabsorção vertical da crista óssea (RVCO): distância linear vertical entre o ombro do implante e a margem coronal da crista óssea (Figura 6A);
- Largura do gap residual (L-GR): distância linear horizontal entre a margem coronal da crista óssea e a superfície do implante (Figura 6B).

As análises tridimensionais (3D) foram realizadas utilizando o software CT-Analyser (SkyScan). Após a reconstrução das imagens, um cilindro tomográfico medindo 3,5 e 5 mm em seus eixos, iniciando a partir do ombro do implante, foi definido como a região de interesse (RI) (Figura 7B). A soma de todas as RIs ao longo de um conjunto contíguo de secções transversais da imagem, totalizando 6 mm em profundidade, foi utilizado para determinar o volume da região de interesse (VRI), representando o volume 3D selecionado (Figura 7C). Em seguida, o volume da área radiolúcida no interior do gap residual (V-GR) e a porcentagem que o V-GR

representava do VRI (%V-GR) foram determinados. Todas as imagens reconstruídas apresentavam 1000 x 668 pixels, com um pixel de 20 μm .

Figura 6. Imagens microtomográficas representando as medidas lineares: A) RVCO: reabsorção vertical da crista óssea - distância resultante entre o ombro do implante e o nível da crista óssea; B) L-GR: largura do gap residual - distância linear resultante do ponto mais alto entre a superfície do implante e a parede vestibular.

Figura 7. Imagens microtomográficas representando as medidas tridimensionais. A) Vista corono-apical da amostra; B) Região de interesse (RI) determinada como um cilindro tomográfico medindo 3,5 e 5 mm nos eixos e 6 mm de profundidade, começando do ombro do implante; C) Área utilizada para determinar o volume da região de interesse (VRI) binarizado pelo histograma de tons de cinza; D) Área radiolúcida do gap utilizada para determinação do volume de gap residual (V-GR).

3.7. Fluorescência

Para a análise microscópica de fluorescência as imagens foram obtidas usando combinações apropriadas de excitação e filtros. Assim, para a calceína verde foi utilizado filtro de comprimento de onda I3 (nível de excitação entre 450-490 nm), para a alizarina vermelha foi utilizado filtro N2-1 (excitação entre 515-560 nm), para a tetraciclina filtro D (nível de excitação entre 355-425 nm), e filtro A para

calceína azul (nível de excitação entre 340-380 nm). Todas as imagens foram ajustadas e analisadas através do software Leica QWin (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) para determinar as porcentagens das marcações ósseas no alvéolo ou na tábua óssea vestibular adjacente à superfície do implante. Para os alvéolos, foi utilizado um retângulo abrangendo a região do alvéolo (30 mm², a partir do ponto mais coronal do alvéolo) para avaliar a porcentagem de osso fluorescente. Nas amostras contendo implantes foi utilizado um retângulo de 6 mm², a partir do ombro do implante na tábua óssea vestibular (Figura 8). Foi realizada então a quantificação das porcentagens de osso marcado por cada fluorocromo em relação à área total.

Figura 8. A. Imagem histológica marcada por calceína azul representando a área utilizada para quantificação das porcentagens de osso marcado por cada fluorocromo: um retângulo de 30 mm² (em branco), a partir do ponto mais coronal do alvéolo B. Imagem histológica marcada por calceína verde representando a área utilizada para quantificação das porcentagens de osso marcado por cada fluorocromo: um retângulo de 6 mm² (em branco), a partir do ombro do implante na tábua óssea vestibular. Magnificação 2,5X.

3.8. Histomorfometria

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

- Reabsorção vertical da crista óssea (RVCO) vestibular: medida linear vertical entre a crista óssea lingual e a margem coronal do osso neoformado na tábua óssea vestibular (RVCO-ON), e entre a crista óssea lingual e a margem coronal do osso antigo na tábua óssea vestibular (RVCO-OA) (Figura 9A);
- Largura do alvéolo (LA): medida linear horizontal entre a tábua óssea vestibular e lingual, 1,0 mm abaixo do ponto mais coronal da formação óssea no interior do alvéolo (Figura 9B);

A densidade óssea histológica foi determinada a partir de um retângulo de 30 mm² abrangendo a região do alvéolo (área total obtida), partindo do ponto mais coronal do osso alveolar (Figura 9 C). A medida de densidade óssea avaliou a porcentagem de osso mineralizado em relação à porcentagem de espaços medulares. Foram avaliadas as áreas de tecido osso total (OT), osso novo (ON), osso antigo (OA), tecido conjuntivo (TC) e partículas residuais do enxerto (PRE).

Figure 9. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando as medidas hitomorfométricas aferidas na nos alvéolos. A) A reabsorção vertical da crista óssea vestibular (V) em relação ao osso lingual (L) foi determinada como uma medida linear vertical em duas regiões diferentes: de uma linha imaginária da crista óssea lingual ao ponto mais alto de osso neo-formado (RVCO-ON) (linha vermelha), e de uma linha imaginária da crista óssea lingual ao primeiro ponto de osso antigo (RVCO-OA) (linha branca); B) A largura do alvéolo (LA) foi analisada 1 mm abaixo do ponto ósseo mais alto no alvéolo (linha vermelha); C) A densidade óssea histológica foi determinada a partir de um retângulo de 30 mm² incluindo a região do defeito (em vermelho). A área de osso novo (ON), osso antigo (OA), tecido conjuntivo (TC) e partículas residuais do enxerto (PRE) foi quantificada. Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar OA e ON. Magnificação de 2.5X.

Já na análise histomorfométrica dos implantes, os seguintes parâmetros foram utilizados para as medidas lineares na tábua óssea vestibular (magnificação 2.5X):

- Reabsorção vertical da crista óssea (RVCO): distância linear vertical entre o ombro do implante e a margem coronal da crista óssea vestibular (Figura 10A);
- Nível ósseo vertical (NOV): distância linear vertical entre o ombro do implante e a margem coronal do contato osso-implante (Figura 10B);
- Largura do gap residual (L-GR): distância linear horizontal entre a crista óssea e a superfície do implante, no interior do defeito (calculado apenas nas amostras que apresentaram $RVCO \leq 1 \text{ mm}$) (Figura 10C). A ocorrência de L-GR = 0 foi considerado preenchimento ósseo completo (PO).

A densidade óssea (DO) histológica foi determinada à partir de um retângulo de 6 mm² abrangendo a região do defeito (área total obtida), partindo do ombro do implante (Figura 10D). A medida avaliou a porcentagem de osso mineralizado em relação à porcentagem de espaços medulares.

Figure 10. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando as medidas histomorfométricas aferidas na tábua óssea vestibular adjacente a implantes imediatos. A) Reabsorção vertical da crista óssea (RVCO), determinada como uma medida linear vertical a partir de uma linha imaginária do ombro do implante até o ponto mais alto da crista; B) Nível ósseo vertical (NOV), do ombro do implante ao primeiro contato osso-implante; C) Largura do gap residual (L-RG): medida linear horizontal, da superfície do implante ao ponto mais cervical da crista óssea; D) Densidade óssea histológica, determinada a partir de um retângulo de 6 mm² (em vermelho) incluindo a região do defeito. Magnificação de 2.5X.

3.9. Imunohistoquímica

A localização das proteínas osteopontina (OPN) e “bone-restricted ifitm-like” (BRIL) foi realizada por imunohistoquímica. OPN é uma proteína da matriz extracelular não-colágena que desempenha um importante papel na mineralização, adesão matriz-matriz e célula-célula / matriz, e na diferenciação celular⁸⁴⁻⁸⁸. Descoberta mais recentemente⁸⁹, BRIL é restrita a osteoblastos, e apesar de sua função ainda não ter sido bem esclarecida, estudos de superexpressão e supressão conduzidos em osteoblastos sugerem que seja um modulador positivo de mineralização⁹⁰.

Os cortes foram desparafinizados em xilol, re-hidratados em concentrações decrescentes de álcool e lavados em tampão fosfato-salino (PBS) contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canadá), pH 7,4 (0,01 M PBS-Tween 20). Para amplificar o sinal da reação, os cortes foram imergidos em tampão fosfato-citrato pH 6 por 20 min. Para evitar marcação inespecífica, os cortes foram bloqueados com PBS 0,01 M (pH 7,2) contendo leite desnatado a 5% por 20 min em

temperatura ambiente. As incubações foram realizadas em temperatura ambiente com anticorpos primários para BRIL (1:600, overnight, temperatura ambiente) e OPN (1:800, overnight, temperatura ambiente), seguidos por tratamento com o kit Dako Envision TM + System (Dako Corporation, Carpinteria, CA), como recomendado pelo fabricante. A visualização foi realizada com diaminobenzidina (DAB) (Dako) e hematoxilina de Harris foi utilizada como coloração de contraste. Como controle negativo, alguns cortes foram incubados com PBS no lugar do anticorpo primário. Os cortes foram examinados em um microscópio Carl Zeiss AxioImager M2 (Oberkochen, Alemanha).

3.10. Análise Estatística

Os dados quantitativos estão apresentados como média e desvio padrão. Para os dados paramétricos, o intervalo de confiança (95%) também foi apresentado, enquanto que para os dados não-paramétricos a mediana foi apresentada. A unidade experimental foi o cão (n=8). Como haviam 2 implantes e 1 alvéolo por grupo em cada animal para os parâmetros clínicos, a média dessas três medidas foi utilizada para análise estatística. Para verificar a normalidade dos dados o teste Shapiro-Wilk foi empregado. Para os dados paramétricos (ETOV, EGQ, LA, PS, dados histomorfométricos e microtomográficos), o Modelo Misto para Medidas Repetidas foi utilizado para as comparações intra e intergrupos, seguido pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Para os dados não-paramétricos (RG e dados de fluorescência em alvéolos pós-extração), o teste de Friedman (Análise de Variância de Dupla Classificação por Postos) foi aplicado para comparações intra e intergrupos. O Teste Q de Cochran para Amostras Relacionadas foi empregado para comparar a frequência de ocorrência de retração gengival entre os grupos. Um nível de significância de 0,05 foi empregado para todas as comparações estatísticas. O software estatístico usado para a análise foi o SPSS versão 21 (IBM Software, Armonk, NY, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Observações Clínicas

A cicatrização após exodontia e instalação dos implantes ocorreu sem nenhuma intercorrência durante o período pós-operatório de 12 semanas. As próteses temporárias permaneceram estáveis durante todo o experimento e não foram observadas ocorrências ou complicações. No momento do sacrifício, todos os implantes foram considerados integrados com sucesso e os alvéolos adequadamente cicatrizados.

4.2. Medidas Clínicas de Espessura da Tábua Óssea Vestibular (ETOV), Espessura de Gengiva Queratinizada (EGQ) e Largura Alveolar (LA)

Uma tábua óssea vestibular fina (ETOV) foi observada em todos os grupos experimentais, sem diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Espessura da tábua óssea vestibular (ETOV) (mm) no momento da exodontia (T₁); comparação intergrupos.

	GT	GT + ME	GC	GC + ME	p
ETOV	0,53 ± 0,10 (0,45 – 0,62)	0,50 ± 0,10 (0,42 – 0,58)	0,56 ± 0,12 (0,48 – 0,63)	0,55 ± 0,10 (0,47 – 0,63)	0,748

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto.

Modelo Misto para Medidas Repetidas, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão e intervalo de confiança de 95%.

Os dados relacionados a EGQ e LA estão sumarizados nas Tabelas 3 e 4. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em T_0 quanto a EGQ média. Nos grupos teste (GT e GT + ME – gengiva fina) a EGQ média diminuiu significativamente de T_0 para T_1 ($p < 0,0001$), e permaneceu fina até T_3 . Para os grupos controle (GC e GC + ME – gengiva normal), a EGQ média observada no começo do estudo (T_0) permaneceu estável até o final (T_3), sem alterações estatisticamente significantes. Essa redução na EGQ média nos grupos teste resultou em diferenças estatisticamente significantes entre esses grupos e os grupos controle em T_1 , T_2 e T_3 ($p < 0,0001$) (Tabela 3). A variação na EGQ ao longo dos períodos experimentais foi estatisticamente maior para os grupos teste entre T_0 e T_1 ($p < 0,0001$), enquanto que nos outros períodos e para os grupos controle as variações foram relativamente baixas e similares entre os grupos, sem diferença estatística significativa (Tabela 4).

Quanto a LA, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos períodos experimentais (Tabela 3). Em todos os grupos, foram observadas variações entre os períodos experimentais seguindo o mesmo padrão, com uma redução na LA de T_0 para T_1 , um aumento de T_1 para T_2 , seguido por nova redução de T_2 para T_3 . Todas essas variações resultaram em uma pequena diminuição na LA de T_1 para T_3 em todos os grupos experimentais, sem diferenças significantes entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 3. Espessura de gengiva queratinizado (EGQ) e largura alveolar (LA) antes do peeling gengival (T₀), antes da exodontia (T₁), e após 4 (T₂) e 12 semanas (T₃); comparações intra e intergrupos.

	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	p
EGQ (mm)					
GT	1,23 ± 0,16 (1,09 – 1,38) ^{aA}	0,74 ± 0,08 (0,64 – 0,84) ^{bA}	0,77 ± 0,12 (0,66 – 0,89) ^{bA}	0,61 ± 0,15 (0,43 – 0,80) ^{bA}	<0,0001*
GT + ME	1,23 ± 0,23 (1,08 – 1,37) ^{aA}	0,80 ± 0,06 (0,70 – 0,90) ^{bA}	0,80 ± 0,09 (0,69 – 0,92) ^{bA}	0,63 ± 0,09 (0,45 – 0,81) ^{bA}	<0,0001*
GC	1,24 ± 0,21 (1,09 – 1,38) ^{aA}	1,13 ± 0,14 (1,03 – 1,23) ^{aB}	1,23 ± 0,13 (1,11 – 1,34) ^{aB}	1,16 ± 0,35 (0,98 – 1,35) ^{aB}	0,555
GC + ME	1,18 ± 0,14 (1,04 – 1,33) ^{aA}	1,26 ± 0,21 (1,16 – 1,36) ^{aB}	1,31 ± 0,25 (1,19 – 1,42) ^{aB}	1,11 ± 0,30 (0,93 – 1,30) ^{aB}	0,295
valor de p	0,802	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	
LA (mm)					
TG	3,61 ± 0,81 (3,12 – 4,11) ^{aA}	3,26 ± 0,52 (2,88 – 3,65) ^{aA}	3,86 ± 0,54 (3,49 – 4,24) ^{aA}	3,65 ± 0,80 (3,19 – 4,11) ^{aA}	0,147
TG + GM	3,73 ± 0,56 (3,23 – 4,22) ^{aA}	3,38 ± 0,52 (2,99 – 3,76) ^{aA}	3,83 ± 0,48 (3,46 – 4,21) ^{aA}	3,49 ± 0,61 (3,03 – 3,95) ^{aA}	0,232
CG	3,77 ± 0,46 (3,27 – 4,26) ^{aA}	3,18 ± 0,45 (2,80 – 3,56) ^{aA}	3,61 ± 0,59 (3,24 – 3,99) ^{aA}	3,47 ± 0,43 (3,01 – 3,93) ^{aA}	0,059
CG + GM	3,40 ± 0,59 (2,90 – 3,89) ^{aA}	3,23 ± 0,52 (2,85 – 3,61) ^{aA}	3,63 ± 0,44 (3,26 – 4,01) ^{aA}	3,55 ± 0,65 (3,07 – 3,99) ^{aA}	0,399
p	0,498	0,663	0,629	0,937	

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto. Modelo Misto para Medidas Repetidas - Bonferroni, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. Comparações intragrupo (a, b) e intergrupo (A, B) – letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Tabela 4. Variação (Δ) da espessura de gengiva queratinizada (EGQ) e largura alveolar (LA) entre os diferentes períodos experimentais; comparações intra e intergrupos.

	ΔT_0-T_1	ΔT_1-T_2	ΔT_2-T_3	ΔT_1-T_3	p
EGQ (mm)					
GT	$-0,49 \pm 0,18 (-0,63 - -0,35)^{aA}$	$0,03 \pm 0,11 (-0,12 - 0,18)^{bA}$	$-0,16 \pm 0,16 (-0,30 - -0,02)^{bA}$	$-0,13 \pm 0,19 (-0,32 - 0,07)^{bA}$	$<0,0001^*$
GT + ME	$-0,43 \pm 0,21 (-0,57 - -0,29)^{aA}$	$0,00 \pm 0,13 (-0,15 - 0,15)^{bA}$	$-0,18 \pm 0,11 (-0,32 - -0,04)^{bA}$	$-0,18 \pm 0,10 (-0,37 - 0,02)^{bA}$	$<0,0001^*$
GC	$-0,11 \pm 0,17 (-0,24 - 0,03)^{aB}$	$0,14 \pm 0,37 (-0,05 - 0,25)^{aA}$	$-0,07 \pm 0,28 (-0,21 - 0,07)^{aA}$	$0,03 \pm 0,28 (-0,16 - 0,23)^{aA}$	0,132
GC + ME	$0,07 \pm 0,20 (-0,06 - 0,21)^{aB}$	$0,09 \pm 0,25 (-0,11 - 0,19)^{aA}$	$-0,20 \pm 0,13 (-0,34 - -0,06)^{aA}$	$-0,16 \pm 0,39 (-0,35 - 0,04)^{aA}$	0,133
p	$<0,0001^*$	0,767	0,172	0,157	
LA (mm)					
GT	$-0,35 \pm 0,73 (-0,87 - 0,17)^{acA}$	$0,60 \pm 0,66 (0,16 - 1,04)^{bcA}$	$-0,21 \pm 0,43 (-0,60 - 0,18)^{cA}$	$0,39 \pm 0,70 (-0,13 - 0,91)^{cA}$	0,016*
GT + ME	$-0,35 \pm 0,51 (-0,87 - 0,17)^{aA}$	$0,45 \pm 0,67 (0,01 - 0,89)^{aA}$	$-0,34 \pm 0,71 (-0,74 - 0,05)^{aA}$	$0,11 \pm 0,73 (-0,41 - 0,63)^{aA}$	0,057
GC	$-0,59 \pm 0,75 (-1,11 - 0,07)^{aA}$	$0,43 \pm 0,33 (-0,01 - 0,87)^{bA}$	$-0,14 \pm 0,33 (-0,53 - 0,25)^{abA}$	$0,30 \pm 0,22 (-0,22 - 0,81)^{bA}$	0,001*
GC + ME	$-0,16 \pm 0,73 (-0,68 - 0,36)^{aA}$	$0,40 \pm 0,67 (-0,04 - 0,84)^{aA}$	$-0,10 \pm 0,61 (-0,49 - 0,29)^{aA}$	$0,30 \pm 0,97 (-0,22 - 0,82)^{aA}$	0,391
p	0,365	0,849	0,835	0,839	

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto. Modelo Misto para Medidas Repetidas - Bonferroni, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. Comparações intragrupo (a, b) e intergrupo (A, B) – letras diferentes representam diferença estatística significativa.

4.3. Remodelação da Tábua Óssea Vestibular em Alvéolos Pós-Exodontia

4.3.1. Análise Histológica Qualitativa

Em geral, observou-se a presença das densas paredes do processo alveolar circundando uma ampla área central ocupada por medula óssea e osso neoformado (ON) (Figuras 11 e 12). Em todos os grupos houve a presença de uma área de osso lamelar maduro (OL), representando o “osso antigo” (OA), e uma área de osso neoformado (ON), caracterizada pela presença de osso lamelar de fibras paralelas (OFP) (Figuras 11C e D, e 12C e D). Adicionalmente, nos grupos enxertados, partículas residuais do enxerto (PRE) estavam presentes nos alvéolos (Figuras 12). A porção marginal do alvéolo estava ocupada por ON nos grupos sem enxerto, e ON associado a partículas de enxerto nos grupos enxertados. Todos os grupos apresentaram ON na porção coronal, fechando a entrada do alvéolo.

Em todos os grupos, a região apical dos alvéolos foi ocupada por novo osso, o qual se estendeu principalmente das paredes laterais do alvéolo, migrando em direção à região central. A superfície entre essa estrutura e o osso lamelar é evidente (Figuras 11C e D, e 12C e D). O ON apresentou padrão lamelar com fibras paralelas (OFP) mas, em algumas áreas, um osso imaturo (OI) de fibras interlaçadas estava presente (Figuras 11C e D, e 12C e D). Em algumas áreas, a superfície externa do novo osso encontrava-se revestida por uma matriz osteóide (MO) (Figuras 12C) pavimentada por osteoblastos (OB), representando o processo de remodelação óssea (Figura 11B). Em todas as áreas do alvéolo, células multinucleadas (osteoclastos - OC) foram ocasionalmente observadas na superfície do ON (Figura 11B).

Nos grupos enxertados, partículas residuais foram encontradas dispersas na região central do alvéolo (Figura 12). Em alguns casos as partículas estavam circunscritas por osso neoformado, estabelecendo contato direto entre as estruturas (Figura 12B e C). Em outros casos, as partículas estavam envolvidas por um tecido conjuntivo fibroso diferente da medula óssea nativa (Figura 12B). Material de enxerto foi observado também fora do tecido ósseo (Figura 12A – *).

Figura 11. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando os alvéolos dos grupos sem enxerto. A entrada do alvéolo mostrou-se fechada por tecido ósseo mineralizado conectando as cristas ósseas vestibular (V) e lingual (L), enquanto que osso novo (ON) e tecido conjuntivo (TC) preencheram as áreas marginais e central do alvéolo (A) (Magnificação de 1,6X). Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar o osso antigo (OA) do ON (A, C e D). Observou-se a presença de osteoblastos (OB) e osteoclastos (OC) no ON (B) (Magnificação de 20X). Note a diferença entre ON, com áreas de osso imaturo (OI) e osso de fibras paralelas (OFFP), e OA, em um padrão lamelar (OL) (C) (Magnificação de 10X), mais evidente sob luz polarizada (D) (Magnificação de 10X).

Figura 12. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando os alvéolos dos grupos enxertados. Partículas residuais do enxerto (PRE – em castanho) ocuparam grande parte da entrada e interior do alvéolo (A). Ocasionalmente, a presença de PRE foi notada fora do tecido ósseo (*) (A) (Magnificação de 1,6X). Uma linha amarela tracejada foi desenhada para separar o osso antigo (OA) do osso neoformado (ON) (A, C e D). Algumas PRE mostraram-se revestidas em ON, enquanto outras encontravam-se circunscritas por tecido conjuntivo fibroso (TC) (B) (Magnificação 20X). Note a diferença entre ON, com áreas de osso imaturo (OI) e osso de fibras paralelas (OFP), e OA, em uma padrão lamelar (OL) (C) (Magnificação de 20X), mais evidente sob luz polarizada (D) (Magnificação de 10X).

4.3.2. Histomorfometria

Em resumo, todos os grupos apresentaram resultados similares, sem diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros avaliados (Tabelas 5 e 6).

A RVCO relacionada ao osso novo (RVCO-ON) nos grupos controle (GC e GC + ME – gengiva normal) mostrou dados numericamente melhores quando comparados aos grupos teste (GT e GT + ME – gengiva fina), mas sem diferença estatística. Em geral, não foram observadas diferenças entre os grupos que receberam ou não o material de enxerto. A RVCO relativa ao osso antigo (RVCO-OA) e a largura alveolar (LA) foram muito semelhantes entre os grupos, sem diferença estatística significativa (Tabela 5).

A área total observada (100%) foi dividida em tecido conjuntivo e área óssea. Todos os grupos experimentais apresentaram em torno de 50% de área de tecido conjuntivo e 50% de área óssea, em média, sem diferença estatística significativa. A área de osso neoformado representou cerca de 35% da área total, também sem diferença estatística entre os grupos experimentais. Não houve diferença entre os grupos enxertados quanto a porcentagem de PRE (Tabela 6).

Tabela 5. Medidas histomorfométricas lineares em alvéolos; comparações intergrupos.

	RVCO-ON (mm)	RVCO-OA (mm)	LA (mm)
GT	0,73 ± 0,74 (0,34 – 1,10)	1,48 ± 0,97 (0,84 – 2,19)	3,61 ± 0,85 (3,09 – 4,12)
GT + ME	0,95 ± 0,48 (0,56 – 1,33)	1,76 ± 0,97 (1,13 – 2,40)	4,24 ± 0,65 (3,72 – 4,76)
GC	0,40 ± 0,40 (0,01 – 0,78)	1,16 ± 0,84 (0,52 – 1,80)	4,11 ± 0,71 (3,59 – 4,63)
GC + ME	0,64 ± 0,44 (0,26 – 1,03)	1,66 ± 0,72 (1,03 – 2,30)	4,01 ± 0,57 (3,49 – 4,53)
p	0,265	0,547	0,147

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto; RVCO-ON: reabsorção da crista óssea vestibular em relação ao osso novo; RVCO-OA: reabsorção da crista óssea vestibular em relação ao osso antigo; LA: largura alveolar.

Modelo Misto para Medidas Repetidas, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão e intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6. Medidas histomorfométricas de área em alvéolos; comparações intergrupos.

	TC (%)	OT (%)	ON (%)	PRE (%)
GT	51,85 ± 12,15 (44,25 – 59,45)	55,78 ± 12,29 (48,81 – 62,74)	37,46 ± 13,49 (30,23 – 44,69)	_____
GT + ME	54,50 ± 7,33 (46,90 – 62,10)	52,05 ± 6,00 (45,08 – 59,01)	35,33 ± 4,20 (28,10 – 42,55)	2,63 ± 3,44 (1,34)
GC	51,55 ± 10,02 (43,95 – 59,14)	53,55 ± 8,34 (46,58 – 60,51)	39,39 ± 9,82 (32,16 – 46,61)	_____
GC + ME	51,52 ± 11,76 (43,92 – 59,12)	51,64 ± 10,59 (44,68 – 8,61)	35,59 ± 10,07 (28,36 – 42,82)	1,98 ± 3,58 (0,27)
p	0,930	0,842	0,815	0,735

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto; TC: tecido conjuntivo; OT: osso total; ON: osso novo; PRE: partículas residuais de enxerto.

TC, OT e ON: Modelo Misto para Medidas Repetidas, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. PRE: Teste de Wilcoxon para Amostras Relacionadas, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como media ± desvio padrão e mediana.

4.3.3. Fluorescência

A análise de microscopia de fluorescência mostrou a presença de remodelação óssea para todos os grupos avaliados. O osso antigo mostrou-se sempre em tonalidades mais escuras e menos fluorescentes, enquanto a calceína verde mostrou-se através de linhas verdes, a alizarina vermelha com um padrão vermelho difuso, a tetraciclina através de linhas finas verdes-amareladas, e, finalmente, a calceína azul foi caracterizada por uma coloração azul, em um padrão difuso sem bordas definidas (Figura 13).

A nova mineralização óssea foi determinada histomorfometricamente pela quantificação dos marcadores ósseos. Sequencialmente, os marcadores ósseos representaram o padrão cicatricial de cada grupo avaliado. As porcentagens de área de osso neoformado são descritas na Tabela 7. Os valores médios para a taxa de mineralização aumentaram gradualmente ao longo dos períodos experimentais, com o aumento mais expressivo de 2 para 4 semanas. A taxa de mineralização alcançou valores mais altos na 12ª semana (Figura 14). Esses dados não resultaram em diferença estatística significativa entre os grupos, mas é importante salientar que em 2 semanas a taxa de mineralização foi numericamente maior para o GC + ME, e em 12 semanas esses dados foram maiores para os dois grupos enxertados (GT + ME e GC + ME), quando comparados ao grupos que não receberam material de enxerto (GT e GC).

Figura 13. Imagens histológicas representando os resultados da fluorescência em alvéolos. O osso antigo mostrou-se sempre mais escuro e menos fluorescente. A) Calceína verde foi geralmente representada por linhas verdes evidentes; B) Vermelho de alizarina apresentou um padrão vermelho difuso; C) Tetraciclina mostrou finas linhas verde-amareladas; e D) Calceína azul foi caracterizada por um padrão azul difuso. Magnificação de 2,5X.

Figura 14. Porcentagem de osso neoformado nos alvéolos para todos os grupos experimentais ao longo dos períodos de avaliação.

Tabela 7. Medidas de fluorescência em alvéolos: porcentagem de osso neoformado no alvéolo ao longo dos períodos experimentais; comparações intra e intergrupos.

	Taxa de Mineralização (%)				
	1 semana	2 semanas	4 semanas	12 semanas	p
GT	0,41 ± 0,25 (0,31) ^{aA}	0,87 ± 0,65 (0,71) ^{abA}	4,84 ± 5,56 (3,16) ^{bA}	6,01 ± 3,14 (6,10) ^{bA}	0,000*
GT + ME	0,62 ± 0,46 (0,42) ^{aA}	1,06 ± 1,06 (0,72) ^{abA}	4,06 ± 2,34 (3,24) ^{bA}	7,63 ± 5,50 (8,71) ^{bA}	0,001*
GC	0,81 ± 0,73 (0,67) ^{abA}	1,07 ± 1,98 (0,26) ^{aA}	5,72 ± 5,71 (3,10) ^{bcA}	5,52 ± 2,80 (5,99) ^{cA}	0,000*
GC + ME	0,98 ± 0,90 (0,98) ^{aA}	2,69 ± 3,79 (0,73) ^{abA}	4,13 ± 1,91 (4,12) ^{abA}	9,98 ± 4.41 (12,38) ^{bA}	0,005*
p	0,441	0,096	0,998	0,789	

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto.

Teste de Friedman - Análise de Variância de Dupla Classificação por Postos, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão e mediana. Comparações intragrupo (a, b) e intergrupo (A, B) – letras diferentes representam diferença estatística significativa.

4.4. Remodelação da Tábua Óssea Vestibular em Implantes Imediatos

4.4.1. Medidas Clínicas de Retração Gengival (RG) e Profundidade de Sondagem (PS)

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos na RG média em todos os períodos experimentais, com um aumento significativo de T₁ para T₃ para todos os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos na variação da RG entre T₂ e T₃ (Tabela 8). Analisando a frequência de ocorrência de RG, não foi observada diferença significativa entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 8. Retração gengival (RG) (mm) imediatamente após a instalação dos implantes (T₁), e após 4 (T₂) e 12 semanas (T₃), e variação (Δ) entre T₂ e T₃; comparações intra e intergrupos.

	T ₁	T ₂	T ₃	p	Δ T ₂ -T ₃
GT	0 ^{aA}	0,12 $\pm$ 0,22 (0,00) ^{abA}	0,84 $\pm$ 0,63 (1,00) ^{bA}	0,004*	0,72 $\pm$ 0,56 (0.75)
GT + ME	0 ^{aA}	0,50 $\pm$ 0,50 (0,50) ^{abA}	1,00 $\pm$ 0,62 (1,12) ^{bA}	0,007*	0,50 $\pm$ 0,83 (0.37)
GC	0 ^A	0,06 $\pm$ 0,12 (0,00) ^A	0,62 $\pm$ 0,70 (0,25) ^A	0,023*	0,63 $\pm$ 0,79 (0.25)
GC + ME	0 ^{aA}	0,12 $\pm$ 0,22 (0,00) ^{abA}	0,62 $\pm$ 0,62 (0,50) ^{bA}	0,002*	0,62 $\pm$ 0,64 (0.50)
p	1.000	0,105	0,711		0,986

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto.

Teste de Friedman - Análise de Variância de Dupla Classificação por Postos, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão e mediana. Comparações intragrupo (a, b) e intergrupo (A, B) – letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Tabela 9. Frequência de ocorrência de retração gengival (RG) em implantes imediatos em 4 (T₂) e 12 semanas (T₃) após a instalação.

	T ₂		T ₃	
	Sim	Não	Sim	Não
GT	2	14	8	6
GT + ME	8	8	11	5
GC	1	15	6	9
GC + ME	2	14	8	8
p	0,105		0,223	

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto.

Teste Q de Cochran para Amostras Relacionadas.

Em 12 semanas após a instalação dos implantes (T₃), não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação à PS (GT = 3,01 ± 0,78; GT + ME = 3,14 ± 0,63; GC = 3,44 ± 0,72; GC+ EM = 3,65 ± 0,77; p = 0,331).

4.4.2. Microtomografia Computadorizada

O dados obtidos através da análise de microtomografia computadorizada estão apresentados na Tabela 10. A análise tomográfica mostrou resultados lineares similares (RVCO e L-GR) entre todos os grupos experimentais, sem diferença estatística significativa (Tabela 10). Uma perda óssea vertical média (RVCO), variando de 1,07 ± 0,63 a 1,43 ± 0,81 mm, foi observada (Tabela 9). Adicionalmente, houve uma redução na extensão horizontal do gap entre a superfície do implante e a tábua óssea vestibular, similar em todos os grupos (Tabela 9).

O mesmo foi observado para as medidas tomográficas 3D (VRI, V-GR, %V-GR), as quais não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (Tabela 11). As medidas 3D demonstraram um gap residual representando cerca de 20% da região de interesse selecionada na metodologia.

Tabela 10. Medidas microtomográficas bidimensionais em implantes imediatos; comparação intergrupos.

	RVCO (mm)	L-GR (mm)
GT	0,96 ± 0,98 (0,19 – 1,73)	0,23 ± 0,28 (0,01 – 0,45)
GT + ME	1,38 ± 1,24 (0,62 – 2,15)	0,59 ± 0,38 (0,37 – 0,81)
GC	1,24 ± 0,91 (0,47 – 2,00)	0,44 ± 0,25 (0,22 – 0,66)
GC + ME	1,54 ± 1,04 (0,78 – 2,31)	0,26 ± 0,27 (0,05 – 0,48)
p	0,618	0,059

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto; RVCO: reabsorção vertical da crista óssea; L-GR: largura do gap residual.

Modelo Misto para Medidas Repetidas, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão e intervalo de confiança de 95%.

Tabela 11. Medidas microtomográficas tridimensionais em implantes imediatos; comparações intergrupos.

	VRI (mm³)	V-GR (mm³)	%V-GR (%)
GT	82,18 ± 0,61 (80,15 – 84,21)	14,07 ± 5,34 (08,82 – 19,32)	17,12 ± 6,45 (10,79 – 23,43)
GT + ME	80,46 ± 5,48 (78,43 – 82,50)	17,92 ± 8,41 (12,67 – 23,17)	22,10 ± 9,88 (15,79 – 28,42)
GC	81,94 ± 0,80 (79,90 – 83,97)	17,37 ± 5,99 (12,12 – 22,62)	21,23 ± 7,45 (14,91 – 27,55)
GC + ME	82,37 ± 0,63 (80,34 – 84,40)	16,92 ± 7,44 (11,67 – 22,17)	20,52 ± 8,96 (14,20 – 26,83)
p	0,535	0,320	0,625

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto; VRI: volume da região de interesse; V-GR: volume do gap residual; %-V-GR: porcentagem que o V-GR representa do VRI.

Modelo Misto para Medidas Repetidas, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão e intervalo de confiança de 95%.

4.4.3. Análise Histológica Qualitativa

A análise microscópica demonstrou que todos os implantes estavam bem integrados ao tecido ósseo circundante, e que o nível da tábua óssea vestibular encontrava-se ligeiramente apical ao ombro do implante em todos os espécimes (Figuras 15A, 16A). O gap vestibular foi preenchido por osso neoformado (ON), o qual apresentou-se contínuo ao osso antigo (OA) da tábua óssea vestibular (Figuras 15B, 16B, 17A e 18A). O osso novo era composto principalmente por osso imaturo (OI) e osso de fibras paralelas com padrão lamelar (OFP), enquanto o osso antigo apresentou um padrão lamelar (OL) (Figuras 15C, 16C). Uma matriz osteóide (MO) também foi identificada em algumas áreas de osso novo, a qual estava pavimentada por osteoblastos (OB) na superfície externa das lamelas (Figuras 15D, 16D). O alto número de osteócitos (Oc) no ON denota a rápida formação desse osso em remodelação (Figuras 17B e 18B).

Nos grupos com enxerto, partículas residuais do enxerto (PRE), quando observadas, estavam dispersas em uma matriz mineralizada e não-mineralizada na região correspondente à área do gap (Figuras 16 e 18). A superfície do implante apresentou-se coberta por ON, o qual se estendeu em direção ao osso ao redor das PRE (Figura 16A e 18A). Na maioria das amostras onde as partículas estavam presentes, elas estavam circundadas por ON (Figuras 16D e 18B). Ocasionalmente, material de enxerto foi observado também fora do tecido ósseo (Figuras 16A e 18A).

Figura 15. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando os sítios de implante sem enxerto. Note o implante (I) integrado ao tecido ósseo adjacente e o nível ósseo vestibular apical ao ombro do implante (A) (Magnificação de 2,5X). O gap vestibular foi preenchido por osso neoformado (ON), o qual mostrou continuidade com o osso antigo (OA) da tábua óssea vestibular. Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar as estruturas de OA e ON (B,C) (Magnificação de 10X). A luz polarizada (C) evidencia as diferentes estruturas óssea: o ON formado por osso imaturo (OI) e osso de fibras paralelas (OFP), e o OA em padrão lamelar (OL) (Magnificação de 10X). Em maior aumento observa-se aspectos imaturos do ON, com a presença de osteoblastos (OB) e uma matriz osteóide (MO) (Magnificação de 20X).

Figura 16. Imagens histológicas coradas em vermelho de alizarina representando os sítios de implantes que receberam enxerto. Partículas residuais do enxerto (PRE – coloração castanho) foram observadas em algumas amostras na área do gap vestibular (A). Ocasionalmente, foi observada a presença de PRE fora do tecido ósseo (*) (A) (Magnificação de 2.5X). Imagens por microscopia de luz (B) e luz polarizada (C), mostrando que a superfície do implante (I) foi revestida por osso novo (ON), cuja estrutura estabeleceu contato direto com as PRE e o osso lamelar antigo (OL). Uma linha tracejada amarela foi desenhada separando as estruturas de ON e OA (B e C). As diferentes estruturas ósseas mostraram-se evidentes: o novo osso formado por osso imaturo (OI) e osso de fibras paralelas (OFP), e o OL. (Magnificação de 10X). As PRE encontravam-se revestidas por ON, e a presença de uma matriz osteóide (MO) pavimentada por osteoblastos (OB) foi observada (D) (Magnificação de 20X).

Figura 17. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura no modo de elétrons retroespalhados dos grupos sem enxerto. A) O osso novo (ON) estava presente principalmente na área do gap, em contato direto com a superfície do implante (I). A superfície entre ON e osso antigo (OA) é evidente (Magnificação de 37X). B) A imagem em maior aumento revela a presença de um maior número de osteócitos (Oc) no ON. Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar as estruturas de ON e OA (Magnificação de 75X).

Figura 18. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura no modo de elétrons retroespalhados dos grupos que receberam enxerto. A) O osso neoformado (ON) estava em contato direto com a superfície do implante e circundando as partículas residuais do enxerto (PRE) na área do gap. Ocasionalmente, PRE foram observadas fora do tecido ósseo (*) (Magnificação de 37X). B) A imagem em maior aumento revela o maior número de osteócitos (Oc) no ON. Uma linha tracejada amarela foi desenhada para separar as estruturas de osso antigo (OA) e ON (Magnificação de 75X).

4.4.4. Histomorfometria

No geral, foi observada perda óssea vestibular em todos os grupos experimentais, sem diferença significativa (RVCO e NOV) (Tabela 12). Adicionalmente, todos os grupos apresentaram densidade óssea histológica e largura do gap residual (L-GR) similares (Tabela 12). Duas amostras do GR e uma amostra de cada grupo controle (GC e GC + ME) (Tabela 12) mostraram ausência de espaço entre o novo osso e a superfície do implante (preenchimento ósseo – PO).

Tabela 12. Medidas histomorfométricas lineares em implantes imediatos; comparações intergrupos.

	RVCO (mm)	NOV (mm)	DO (%)	L-GR (mm)	PO
GT	0,84 ± 0,76 (0,17 – 1,50)	1,20 ± 0,71 (-0,08 – 2,47)	75,48 ± 18,85 (56,46 – 94,50)	0,30 ± 0,36 (0,03 – 0,57)	2
GT + ME	1,63 ± 1,07 (0,96 – 2,29)	2,90 ± 1,82 (1,63 – 4,18)	61,49 ± 23,99 (42,48 – 80,51)	0,32 ± 0,08 (-0,4 – 0,71)	0
GC	1,13 ± 0,93 (0,47 – 1,80)	2,14 ± 1,81 (0,87 – 3,41)	74,02 ± 23,53 (55,00 – 93,03)	0,43 ± 0,24 (0,17 – 0,72)	1
GC + ME	1,31 ± 0,86 (0,64 – 1,97)	2,87 ± 2,28 (1,60 – 4,15)	66,33 ± 21,84 (47,31 – 85,35)	0,42 ± 0,47 (0,08 – 0,83)	1
p	0,328	0,152	0,583	0,841	

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto; RVCO: reabsorção vertical da crista óssea; NOV: nível ósseo vertical; DO: densidade óssea; L-GR: largura do gap residual; PO: preenchimento ósseo.

Modelo Misto para Medidas Repetidas, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão e intervalo de confiança de 95%.

4.4.5. Fluorescência

Como na avaliação dos alvéolos, a mineralização óssea na face vestibular de implantes imediatos foi determinada histomorfométricamente pela quantificação de marcadores ósseos. Sequencialmente, eles representam o padrão de cicatrização de cada grupo (Figura 19). As porcentagens de osso neoformado estão descritas na Tabela 13 e Figura 20. Para a primeira semana de avaliação foram observados valores entre 0,49% e 1,60%, havendo um aumento gradual até atingir os valores mais altos na avaliação de 12 semanas (6,63% a 10,69%). Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

Figura 19. Resultados da análise de fluorescência ao redor de implantes. Neoformação óssea foi determinada histomorfométricamente pela quantificação de marcadores ósseos. O osso antigo mostrou-se sempre mais escuro e sem marcação. A) Calceína verde foi geralmente representada por linhas verdes evidentes; B) Vermelho de alizarina apresentou um padrão vermelho difuso; C) Tetraciclina mostrou finas linhas verde-amareladas; e D) Calceína azul foi caracterizada por um padrão azul difuso. Magnificação de 2,5X.

Tabela 13. Medidas de fluorescência em implantes imediatos: porcentagem de osso neoformado na tábua óssea vestibular próximo à superfície do implante ao longo dos tempos experimentais; comparações intra e intergrupos.

	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	p
GT	1,11 ± 0,93 (0,33 – 1,88) ^{aA}	2,30 ± 0,83 (0,11 – 4,50) ^{abA}	4,58 ± 3,67 (1,98 – 7,17) ^{abA}	7,38 ± 5,87 (2,61 – 12,14) ^{bA}	0,002*
GT + ME	1,52 ± 1,44 (0,75 – 2,29) ^{aA}	4,53 ± 5,08 (2,33 – 6,72) ^{abA}	5,04 ± 2,45 (2,45 – 7,64) ^{abA}	10,69 ± 7,85 (5,92 – 15,45) ^{bA}	0,002*
GC	1,60 ± 1,15 (0,82 – 2,37) ^{aA}	2,83 ± 2,70 (0,63 – 5,02) ^{abA}	5,79 ± 2,45 (2,20 – 8,39) ^{abA}	8,45 ± 6,80 (3,68 – 13,21) ^{bA}	0,010*
GC + ME	0,49 ± 0,48 (-0,28 – 1,26) ^{aA}	1,86 ± 1,62 (-0,34 – 4,05) ^{abA}	5,26 ± 5,00 (2,66 – 7,85) ^{abA}	6,63 ± 5,56 (1,86 – 11,39) ^{bA}	0,005*
p	0,109	0,261	0,884	0,629	

GT: grupo teste; GT + ME: grupo teste com material de enxerto; GC: grupo controle; GC + ME: grupo controle com material de enxerto.

Modelo Misto para Medidas Repetidas - Bonferroni, *p < 0,05, todos os valores estão expressos como média ± desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. Comparações intragrupo (a, b) e intergrupo (A, B) – letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Figura 20. Porcentagem de osso neoformado adjacente à superfície dos implantes para todos os grupos experimentais ao longo do período de avaliação.

4.4.6. Imunohistoquímica

Após 12 semanas de cicatrização, a análise de imunohistoquímica revelou que os implantes estavam em contato com osso cortical (Figura 21), e osso neoformado (ON) foi observado principalmente na extremidade apical das cristas vestibular e lingual (Figura 22 - 2) e próximo ou na interface osso-implante (Figura 22 - 3). A interface osso-implante foi submetida a remodelação Harvesiana, com a formação de cavidades de reabsorção, seguida por deposição lamelar e de osso imaturo, com a formação de ósteons secundários (Figura 22 - 2). No ON, BRIL foi detectada de forma difusa na matriz óssea (Figura 22 - 2A). A porção externa de ambas as tábuas ósseas (vestibular e lingual) também apresentou marcação para BRIL, seguindo as linhas incrementais (Figura 22 - 4A). A marcação para OPN apresentou um padrão similar ao BRIL, com imunorreação na matriz no ON das cristas marginais (Figura 22 - 2B), na interface osso-implante (Figura 22 - 3B) e na porção externa das tábuas ósseas (Figura 22 - 4B). Imunomarcação para OPN também foi observada no osso lamelar antigo (OA) (Figura 22 - 5B), bem como nas linhas de cimentação na junção entre a superfície de OA e ON (Figuras 22 - 3B e 5B). Não foi observada marcação nas condições de controle negativo (Dados não apresentados).

Figura 21. Detecção imunohistoquímica de BRIL ao redor de implantes imediatos após 12 semanas de cicatrização. Note que o implante (I) estava em contato com osso cortical. As áreas incluídas nos retângulos desta figura estão apresentados em maior aumento nas Figuras 2 a 5 correspondentes. Hematoxilina foi usada como coloração de contraste. L: tábua óssea lingual; I: área do implante; V: tábua óssea vestibular.

Figura 22. Detecção imunohistoquímica para BRIL (A) e OPN (B) ao redor de implantes imediatos, em 12 semanas de cicatrização. Note em 2 a presença de osso neoformado na extremidade coronal da tábua óssea vestibular com imunomarcagem para BRIL e OPN na matriz; em 3, a interface osso-implante também marcada para BRIL e OPN (mais evidente no detalhe em maior aumento); em 4, a porção externa da tábua óssea lingual com expressão de BRIL e OPN seguindo as linhas incrementais; e em 5, um área interna da tábua óssea vestibular com expressão de OPN no osso lamelar antigo. As setas em 3 e 5 indicam as linhas de cimentação, marcadas para OPN. Hematoxilina foi utilizada como coloração de contraste.

em

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a influência do “biotipo periodontal” na remodelação dos tecidos moles e duros em alvéolos pós-exodontia e implantes imediatos, com o emprego de cirurgia sem retalho. Esse processo também foi comparado entre sítios que receberam ou não um material de enxerto xenógeno, composto por osso mineral bovino desproteínizado combinado com colágeno, preenchendo o alvéolo ou o gap entre a superfície do implante e a tábua óssea vestibular. Para tanto, foram selecionados cães pequenos, os quais apresentavam um biotipo periodontal fino inerente. Todos os cães apresentaram uma tábua óssea vestibular inicial fina no momento das exodontias, medindo, em média, aproximadamente 0,5 mm. Os procedimentos pré-cirúrgicos reduziram a gengiva nos grupos teste para uma espessura crítica, de 1,2 mm para 0,8 mm, em média ($p < 0,0001$). Apesar da redução significativa na espessura de gengiva queratinizada (EGQ), não houve alterações estatisticamente significantes na espessura de tábua óssea vestibular (ETOV) nem na largura alveolar (LA).

Nos sítios que receberam a instalação de implantes imediatos foi observada a presença de retrações gengivais 12 semanas após cirurgia em todos os grupos experimentais avaliados, com o maior valor médio de $1,00 \pm 0,62$ mm. Apesar de terem sido observados maiores valores de RG em 12 semanas nos grupos com gengiva fina (GT e GT + ME), quando comparados aos grupos com gengiva normal (GC e GC + ME), não foram observadas diferenças estatísticas significantes. A PS média variou entre $3,02 \pm 0,57$ e $3,65 \pm 0,64$ mm, valores compatíveis com a normalidade, já que foi reportado na literatura implantes estáveis, rígidos e fixos com PS variando entre 2 e 6 mm⁹¹.

Na primeira tentativa de analisar a influência da espessura de gengiva na estabilidade da tábua óssea vestibular, Berglundh e Lindhe⁵⁵ mostraram que nos sítios onde a mucosa da crista óssea foi diminuída ($\leq 2,0$ mm) antes da conexão do intermediário do implante, a cicatrização incluiu reabsorção óssea consistentemente. Em estudos clínicos prospectivos em humanos que avaliaram a influência de uma fina mucosa da crista na estabilidade óssea em torno de implantes imediatos^{56,57}, os autores destacaram que se a altura tecidual for $\leq 2,0$ mm, perda óssea crestal de até 1,45 mm pode ocorrer. É importante enfatizar que esses estudos prévios

consideraram apenas a espessura da mucosa da crista alveolar em implantes instalados em alvéolos cicatrizados, analisando a influência desse aspecto na formação das distâncias biológicas. Kim et al.⁵⁴ reportaram ainda que, além de perda óssea crestal, em sítios com gengiva queratinizada insuficiente há risco de aumento na retração gengival. No presente estudo, não houve diferença estatística significativa entre os grupos quanto a altura e frequência de ocorrência de retração gengival, mas os dados foram numericamente maiores para os grupos com gengiva fina (GT e GT + ME). Essa diferença, apesar de pequena, sendo um estudo em modelo animal e consequentemente com um “n” pequeno, pode apresentar implicações clínicas. Apesar de uma possível influência na manutenção da saúde gengival, a similaridade entre os grupos em todos os parâmetros avaliados, tanto em alvéolos quanto em implantes imediatos, leva à conclusão de que a espessura gengival não influencia significativamente a preservação da tábua óssea vestibular quando a mesma é inicialmente fina.

No presente estudo, o nível da tábua óssea vestibular apresentou-se ligeiramente apical em todos os espécimes, não sendo observada diferença significativa entre os grupos que receberam (GT + ME e GC + ME) ou não (GT e GC) o material de enxerto, tanto em alvéolos quanto em implantes imediatos. Na análise dos resultados com relação ao emprego ou não do material de enxerto, a título de comparação com os demais estudos disponíveis na literatura, foram utilizados apenas os resultados dos grupos com gengiva normal (GC e GC+ME).

Na avaliação histomorfométrica de alvéolos pós-exodontia, observou-se uma diferença entre a altura das tábuas ósseas vestibular e lingual média de $0,64 \pm 0,44$ mm nos sítios tratados com o enxerto xenógeno, enquanto que nos sítios que não receberam o material de enxerto essa reabsorção foi em média $0,40 \pm 0,40$ mm (GC + ME). Resultados similares foram reportados na literatura^{19,92,93}. Bashara et al.⁹² estudaram o efeito de diferentes biomateriais na remodelação dos tecidos duros após sua utilização em alvéolos pós-exodontia em cães. Após 6 meses de cicatrização, os autores relataram perda vertical na tábua óssea vestibular similar entre os sítios tratados com osso bovino (Bio-Oss) ($0,65 \pm 0,40$) e sítios que cicatrizaram só com o coágulo ($0,70 \pm 0,35$ mm). Rothamel et al.⁹³, avaliando as alterações dimensionais do rebordo após aplicação de uma pasta de hidroxiapatita nano-cristalina em alvéolos pós-exodontia em cães, observaram uma diferença na altura óssea entre o osso vestibular e lingual de $0,54 \pm 0,62$ mm nos grupos

enxertados e $0,85 \pm 0,17$ mm nos sítios que não receberam o material de enxerto, após 3 meses de cicatrização. Suaid et al.¹⁹ também reportaram pequena perda óssea em alvéolos pós-exodontia enxertados com fosfato de cálcio bifásico, sem diferença entre os grupos. Os autores observaram um nível ósseo vestibular $0,26 \pm 0,67$ mm apical à crista óssea lingual nos sítios que receberam o material de enxerto, e $0,80 \pm 1,14$ mm nos grupos não-enxertados. Por outro lado, Araújo et al.⁷⁷, que avaliaram o preenchimento de alvéolos pós-exodontia com o mesmo enxerto xenógeno utilizado no presente estudo, mostraram uma distância vertical média entre as tábuas ósseas vestibular e lingual de $1,9 \pm 0,6$ mm nos grupos enxertados e $2,1 \pm 0,5$ mm nos grupos que não receberam material de enxerto. Esses valores mais altos, quando comparados ao observado no presente estudo, poderiam ser atribuídos à elevação do retalho realizada naquele estudo⁷⁷.

Em implantes imediatos, diferentes materiais têm sido utilizados para preencher o gap entre a superfície do implante e a tábua óssea vestibular após exodontia, na tentativa de minimizar a reabsorção da crista óssea vestibular, mas a literatura atual não é conclusiva quanto a efetividade desse procedimento. Na análise histomorfométrica do presente estudo, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos que receberam (GC + ME: $1,31 \pm 0,86$) ou não (GC: $1,13 \pm 0,93$) o material de enxerto com relação à reabsorção vertical da crista óssea vestibular (RVCO), bem como quando considerado o nível ósseo vertical (NOV), que variou entre $2,87 \pm 2,28$ (GC + ME) e $2,14 \pm 1,81$ (GC). A análise de microtomografia computadorizada mostrou resultados similares quanto a reabsorção da tábua óssea vestibular (RVCO = GC + ME: $1,54 \pm 1,04$; GC: $1,24 \pm 0,91$). Araújo et al.⁷³, utilizando o mesmo enxerto xenógeno empregado no presente estudo para preencher o gap vestibular, observaram uma tábua óssea vestibular mais espessa e menor reabsorção vertical nos sítios enxertados (NOV: $0,1 \pm 0,5$ vs $1,3 \pm 0,7$). Contrariamente, os resultados do presente estudo não mostraram diferença no uso de material de enxerto quando o gap é de aproximadamente 1,5 mm. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Botticelli et al.⁹⁴, que demonstraram não haver diferenças na perda óssea vestibular entre os sítios com um gap de 1,25 mm e sítios sem um gap (NOV: $0,96 \pm 0,71$ vs $0,99 \pm 0,53$). Adicionalmente, Suaid et al.²⁵ reportaram que o uso de fosfato beta-tricálcio para preenchimento do gap em implantes imediatos não parece contribuir para a manutenção da tábua óssea vestibular (RVCO: 0,08 vs 0,20; NOV: 1,58 vs 1,67).

A reabsorção da crista óssea vestibular que ocorreu em implantes imediatos no presente estudo foi detectada não só pelas medidas lineares verticais, mas também por medidas horizontais (L-GR), tanto por microtomografia quanto por histomorfometria, sem diferença entre os grupos. A análise microtomográfica revelou ainda um volume do gap residual similar entre os grupos com e sem enxerto. O principal objetivo das medidas lineares horizontais foi avaliar o potencial de preenchimento ósseo (PO) em diferentes circunstâncias, e todos os grupos mostraram baixa habilidade em promover esse fechamento na região central. Resultados similares foram relatados por Suaid et al.²⁵, que utilizaram material de enxerto para preencher um gap de 2 mm. O que pode ser inferido dos resultados do presente estudo é que a utilização desse enxerto xenógeno não previne a reabsorção da crista óssea vestibular tanto em alvéolos pós-exodontia quanto em implantes imediatos, além de não contribuir para o fechamento do gap ao redor de implantes imediatos, quando a tábua óssea vestibular é inicialmente fina.

É importante salientar que apesar de muitos estudos avaliando o uso de um material de enxerto em alvéolos pós-exodontia e em implantes imediatos não apresentarem diferenças estatísticas significantes entre os sítios com e sem enxerto, a maioria deles reportou melhores valores numéricos para os grupos enxertados^{73,77,92,93}, principalmente quando a técnica de cirurgia sem retalho foi aplicada^{19,25}, e isso provavelmente se deve à espessura da tábua óssea vestibular. No presente estudo, a cirurgia sem retalho não preveniu a ocorrência de perda óssea, mas provavelmente essa discrepância é um reflexo da tábua óssea vestibular fina em nosso modelo de estudo.

A largura alveolar (LA) histológica medida nos cortes de alvéolos no presente estudo, foi de aproximadamente 4 mm. Suaid et al.¹⁹, em uma metodologia similar, relataram valores médios de 5,2 mm e 5,0 mm para os sítios com e sem enxerto, respectivamente. Esses valores, maiores do que o observado neste estudo, deixam claro que nossos cães eram menores e, conseqüentemente, com tecidos orais mais finos. A similaridade entre os grupos em todos os parâmetros avaliados neste estudo sugere que alterações dimensionais na tábua óssea vestibular ocorrem após exodontia ou instalação de implantes imediatos em alvéolos com uma tábua óssea vestibular inicialmente fina, independentemente da espessura gengival ou a aplicação de material de enxerto. Esse aspecto, a espessura da tábua óssea

vestibular, parece ser um fator mais importante na cicatrização de alvéolos e implantes imediatos.

Spinato et al.⁴⁴ demonstraram que uma tábua óssea vestibular fina no momento da exodontia ($\leq 1,0$ mm) resulta em piores resultados na cicatrização óssea alveolar. Spray et al.⁴⁷, avaliando a relação entre perda óssea vertical e espessura da tábua óssea vestibular, reportaram maior perda óssea quando a tábua óssea vestibular apresenta menos que 1,4 mm de espessura. Em implantes instalados imediatamente em alvéolos pós-exodontia, Ferrus et al.⁴⁵ mostraram que a espessura da tábua óssea vestibular influenciou significativamente a quantidade de alteração em tecido duro que ocorreu durante um período de cicatrização de 4 meses, resultando em perda substancial da dimensão vertical. Qahash et al.⁹⁵, avaliando a dinâmica de cicatrização óssea em sítios vestibulares perimplantares em cães, observaram uma associação significativa entre a espessura da tábua óssea vestibular e a extensão de reabsorção óssea. A força dessa associação foi duas vezes maior em espécimes com espessura de tábua óssea vestibular < 2 mm. Vignoletti et al.⁹⁶ e Araújo et al.⁴⁰ instalaram implantes em alvéolos com diferentes espessuras de tábua óssea vestibular, sendo a espessura em pré-molares menor que a espessura em molares. A reabsorção vertical obtida em pré-molares foi maior em ambos os estudos. Os resultados do presente estudo reforçam os achados da literatura, mostrando que uma tábua óssea vestibular fina contribui para a perda óssea vertical.

A comparação dos sítios tratados diferentemente com relação à composição óssea nos alvéolos pós-exodontia e à densidade óssea na região vestibular dos implantes imediatos indicou que o processo de remodelação óssea progrediu de forma similar em todos os grupos experimentais. Essa observação está de acordo com o estudo de Araújo e Lindhe⁹, que avaliaram a cicatrização de alvéolos utilizando o mesmo biomaterial. A similaridade na quantidade de tecido mineralizado entre os grupos com e sem material de enxerto indica que aos 3 meses de cicatrização o enxerto xenógeno não melhora o processo de cicatrização e/ou estimula a formação de tecido ósseo em alvéolos pós-exodontia e implantes imediatos, mas serve como um arcabouço para a formação tecidual durante o processo de cicatrização.

Adicionalmente, neste estudo a análise histológica revelou a presença do biomaterial principalmente na porção coronal dos alvéolos pós-exodontia enquanto

que nos implantes imediatos observou-se a presença de uma pequena porção do biomaterial apenas em algumas amostras enxertadas. Nos alvéolos, as partículas residuais do enxerto (PRE) ocuparam $1,98 \pm 2,98 \%$ (GC + ME), o que é uma quantidade pequena quando comparado a estudos prévios. Araújo et al.⁷⁷ utilizaram o mesmo material de enxerto e o mesmo tempo de cicatrização, e encontraram 12,2% de PRE. Não é provável que a maioria dos grânulos tenha sido reabsorvida em um período tão curto de tempo. Bashara et al.⁹² reportaram a presença de osso neoformado ao redor das partículas do material de enxerto bovino inorgânico em alvéolos pós-exodontia aos 6 meses de cicatrização, com pouca evidência de o biomaterial ser substituído por osso. O mesmo foi demonstrado por Araújo e Lindhe⁹, que também observaram a presença do material de enxerto em áreas fora do tecido ósseo, como por exemplo na mucosa oral. Os autores sugeriram que durante o processo de remodelação da porção externa da crista, as partículas devem ter se deslocado do osso neoformado. Se é difícil manter o biomaterial em posição em um alvéolo, pequenos gaps entre a superfície do implante e a tábua óssea vestibular representam um desafio maior. Também é importante enfatizar que o uso de cirurgia sem retalho pode ter levado a uma exfoliação mais pronunciada do biomaterial, principalmente se os sítios não foram cobertos por membrana ou tecido conjuntivo, como no presente estudo, no qual parte do material de enxerto pode ter sido perdida durante o processo de cicatrização. Outro aspecto importante a ser discutido é que apesar de o biomaterial apresentar características de manuseio melhoradas, ele é composto apenas em 10% por colágeno suíno altamente purificado, os outros 90% são compostos por grânulos de osso bovino esponjoso, o que torna a sua compactação difícil de ser conseguida.

O estudo também teve como objetivo avaliar a dinâmica de cicatrização óssea através da análise de fluorescência. A aplicação de marcadores ósseos em diferentes períodos de tempo permite a avaliação da formação óssea e remodelação ao longo de diferentes estágios de cicatrização. Os fluorocromos alizarina, calceína verde, tetraciclina e calceína azul apresentam diferentes cores e fornecem informações sequenciais quando aplicados de forma intercalada. Os marcadores ósseos usados no presente estudo podem ser comparados porque eles se ligam aos íons de cálcio por quelação⁹⁷, evidenciando devidamente áreas de mineralização ativa⁹⁸. A incorporação do fluorocromo revelou o mesmo padrão para os diferentes grupos ao longo do período de avaliação, de 7 a 12 semanas tanto em alvéolos

quanto em implantes imediatos, sem diferença estatística significativa. Em geral, foi observado inicialmente para todos os grupos experimentais uma baixa porcentagem de osso marcado, que aumentou gradualmente após 2 e 4 semanas, alcançando os valores mais altos em 12 semanas de avaliação.

De acordo com Araújo et al.⁷⁴ os primeiros passos para a remodelação óssea em alvéolos pós-exodontia preenchidos com Bio-Oss Collagen envolve a presença de um coágulo contendo grandes números de células mesenquimais, leucócitos e estruturas vasculares, seguido pela formação de osso imaturo. No intervalo entre 2 e 4 semanas, a taxa de neoformação óssea é pronunciada. Essas observações suportam os resultados encontrados no presente estudo, que mostram um aumento de quase 4 vezes na taxa de mineralização de 2 a 4 semanas. Na sequência desse processo contínuo, em 4 semanas o osso imaturo está em processo de remodelação, indicando que a taxa de mineralização poderia continuar a aumentar nas semanas subsequentes. Essa dinâmica contínua também é observada em alvéolos cicatrizados naturalmente, onde há uma alteração pronunciada nos tecidos entre 4 e 8 semanas¹. Em 8 semanas é formada uma ponte cortical, selando a entrada do sítio de extração e o osso imaturo é substituído em larga escala por osso lamelar e medula¹. Os resultados do presente estudo corroboram com os achados da literatura, mostrando um aumento na taxa de mineralização entre 4 e 12 semanas. Apesar de não haver diferença estatística significativa entre os grupos com relação à taxa de mineralização, em 12 semanas os dados foram numericamente superiores para os grupos enxertados. Esses resultados corroboram com achados histomorfométricos de estudos prévios^{77,78}, que estabeleceram que a utilização desse biomaterial em um alvéolo modifica o processo de remodelação que ocorre após exodontia.

Já na remodelação óssea ao redor de implantes, segundo Abrahamsson et al.⁹⁹, os primeiros passos envolvem a presença de um coágulo, que se torna parcialmente penetrado por estruturas vasculares circundadas por células mesenquimais fibroblasto-like em sua periferia. Todavia, em 1 semana a formação de osso imaturo geralmente começa e os centros de formação óssea (ósteons primários) são usualmente reconhecidos. Após 2 semanas, a presença de um trabeculado de osso neoformado é previsível e ocupa todo o espaço arquitetural disponível. Nesse momento, um processo de mineralização ativo está presente. Em sequência à esse processo contínuo, no período de avaliação de 4 semanas, é

observada uma diminuição nos níveis de mineralização, o que é explicado pelo fato de que grande parte do osso imaturo já foi substituído por osso lamelar^{99,100}. No presente estudo o padrão de mineralização foi diferente ao observado em implantes instalados em rebordo cicatrizado^{99,100} e isso poderia ser atribuído à presença de uma borda interna em alvéolos frescos, alterando a formação óssea em sítios que ainda não foram cicatrizados. Ademais, no presente estudo existe ainda a influência da prótese instalada precocemente, pois apesar de a carga, neste caso, ser não funcional, não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de cargas laterais que poderiam promover um distúrbio e, conseqüentemente, um atraso no processo de cicatrização¹⁰¹. apesar de estudos mostrarem que a carga imediata ou precoce não acarreta nenhum prejuízo aos estágios iniciais de cicatrização e remodelamento ósseo^{102,103}.

Com o intuito de elucidar os eventos moleculares que se seguem à instalação de implantes imediatos e modulam a remodelação das tábuas ósseas, foi realizada também a imunolocalização das proteínas OPN e BRIL. Como era de se esperar, observou-se imunomarcagem para OPN em focos de mineralização no osso lamelar antigo, osso novo e nas linhas de cimentação. Inúmeros estudos de hibridização *in situ* comparando a expressão das proteínas da matriz no osso imaturo e osso lamelar sugerem que a expressão de OPN está amplamente distribuída em ambas as estruturas. A intensa expressão de OPN nas linhas de cimentação na junção entre a superfície do osso antigo e o osso novo, resultantes da criação de novas interfaces ósseas durante o processo de cicatrização que ocorre após a manipulação cirúrgica do osso, foi descrita anteriormente por McKee e Nanci⁸⁵. Já a imunomarcagem para BRIL foi observada apenas no osso neoformado, de forma difusa na matriz. Apesar de a função de BRIL ainda não estar totalmente esclarecida, sua localização embriogênica *in vivo* mostra que esta proteína está associada à formação óssea inicial. Sua expressão aumenta com a diferenciação de osteoblastos, atingindo o pico de expressão com a produção de matriz e mineralização, sugerindo um papel no processo de formação óssea inicial^{90,104}. Após o estágio de mineralização, a expressão de mRNA para BRIL declina expressivamente¹⁰⁴. A expressão de BRIL e OPN no osso neoformado da região do gap indica que o tecido ainda se encontra em processo de mineralização ativa mesmo após 12 semanas de cicatrização, como observado também na análise de fluorescência.

6. CONCLUSÃO

Até onde podemos acessar, este é o primeiro estudo que evidencia a influência de um biotipo periodontal fino na remodelação óssea em alvéolos pós-exodontia e após a instalação de implantes imediatos. No presente estudo, como exposto acima, a espessura do osso vestibular foi um fator fundamental na reabsorção da tábua óssea vestibular, mesmo com cirurgia sem retalho. Diminuir a gengiva para uma espessura crítica ou a adição de um biomaterial, em um biotipo fino pré-existente, não influenciou os resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- 1 ARAUJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 2, p. 212-8, Feb 2005.
- 2 CARDAROPOLI, G.; ARAUJO, M.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 9, p. 809-18, Sep 2003.
- 3 FICKL, S. et al. Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 10, p. 906-13, Oct 2008.
- 4 MECALL, R. A.; ROSENFELD, A. L. Influence of residual ridge resorption patterns on implant fixture placement and tooth position. 1. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 11, n. 1, p. 8-23, 1991.
- 5 SCHROPP, L. et al. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 23, n. 4, p. 313-23, Aug 2003.
- 6 NOVAES, A. B., JR. et al. Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. **J Periodontol**, v. 82, n. 6, p. 872-7, Jun 2011.
- 7 TEN HEGGELER, J. M.; SLOT, D. E.; VAN DER WEIJDEN, G. A. Effect of socket preservation therapies following tooth extraction in non-molar regions in humans: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 8, p. 779-88, Aug 2011.
- 8 BUSER, D. et al. Early implant placement with simultaneous guided bone regeneration following single-tooth extraction in the esthetic zone: a cross-sectional, retrospective study in 45 subjects with a 2- to 4-year follow-up. **J Periodontol**, v. 79, n. 9, p. 1773-81, Sep 2008.
- 9 ARAUJO, M. G.; LINDHE, J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 5, p. 433-40, May 2009.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- 10 Araújo, M. G.; Lindhe, J.. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 1, p. 9-13, Jan 2011.
- 11 ARTZI, Z.; TAL, H.; DAYAN, D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. **J Periodontol**, v. 71, n. 6, p. 1015-23, Jun 2000.
- 12 CAMARGO, P. M. et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 90, n. 5, p. 581-6, Nov 2000.
- 13 CARMAGNOLA, D. et al. Oral implants placed in bone defects treated with Bio-Oss, Ostim-Paste or PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 12, p. 1246-53, Dec 2008.
- 14 CARMAGNOLA, D.; ADRIAENS, P.; BERGLUNDH, T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, n. 2, p. 137-43, Apr 2003.
- 15 FERNANDES, P. G. et al. Ridge preservation with acellular dermal matrix and anorganic bone matrix cell-binding peptide P-15 after tooth extraction in humans. **J Periodontol**, v. 82, n. 1, p. 72-9, Jan 2011.
- 16 LAMBERT, F. et al. A methodological approach to assessing alveolar ridge preservation procedures in humans: hard tissue profile. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 9, p. 887-94, Sep 2012.
- 17 RORIZ, V. M. et al. Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 2, p. 148-55, Feb 2010.
- 18 SANTOS, F. A. et al. Comparison of biomaterial implants in the dental socket: histological analysis in dogs. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 12, n. 1, p. 18-25, Mar 2010.
- 19 SUAID, F. et al. Buccal bone remodeling after tooth extraction using the flapless approach with and without synthetic bone grafting. A histomorphometric study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 4, p. 407-13, Apr 2013.

- 20 ALBREKTSSON, T. et al. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 1, n. 1, p. 11-25, Summer 1986.
- 21 DENISSEN, H. W. et al. Anatomic consideration for preventive implantation. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 8, n. 2, p. 191-6, 1993.
- 22 WATZEK, G. et al. Immediate and delayed implantation for complete restoration of the jaw following extraction of all residual teeth: a retrospective study comparing different types of serial immediate implantation. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 10, n. 5, p. 561-7, Sep-Oct 1995.
- 23 PAOLANTONIO, M. et al. Immediate implantation in fresh extraction sockets. A controlled clinical and histological study in man. **J Periodontol**, v. 72, n. 11, p. 1560-71, Nov 2001.
- 24 NOVAES-JR, A. B. et al. Buccal bone plate remodeling after immediate implant with and without synthetic bone grafting and flapless surgery. Radiographic study in dogs. **J Oral Implantol**, Sep 9 2011.
- 25 SUAID, F. A. et al. Buccal bone plate remodeling after immediate implants with or without synthetic bone grafting and flapless surgery: a histomorphometric and fluorescence study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, Oct 8 2012.
- 26 KAN, J. Y.; RUNGCHARASSAENG, K.; LOZADA, J. Immediate placement and provisionalization of maxillary anterior single implants: 1-year prospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 18, n. 1, p. 31-9, Jan-Feb 2003.
- 27 ORENSTEIN, I. H. et al. Factors affecting implant mobility at placement and integration of mobile implants at uncovering. **J Periodontol**, v. 69, n. 12, p. 1404-12, Dec 1998.
- 28 CORSO, M. et al. Clinical and radiographic evaluation of early loaded free-standing dental implants with various coatings in beagle dogs. **J Prosthet Dent**, v. 82, n. 4, p. 428-35, Oct 1999.
- 29 PIERRISNARD, L. et al. Two dental implants designed for immediate loading: a finite element analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, n. 3, p. 353-62, May-Jun 2002.
- 30 WEINLAENDER, M. et al. Histomorphometry of bone apposition around three types of endosseous dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 7, n. 4, p. 491-6, Winter 1992.

- 31 GOTTLANDER, M.; ALBREKTSSON, T.; CARLSSON, L. V. A histomorphometric study of unthreaded hydroxyapatite-coated and titanium-coated implants in rabbit bone. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 7, n. 4, p. 485-90, Winter 1992.
- 32 BABBUS, C. A. Titanium plasma spray screw implant system for reconstruction of the edentulous mandible. **Dent Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 117-31, Jan 1986.
- 33 BABBUS, C. A.; KENT, J. N.; MISIEK, D. J. Titanium plasma-sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, n. 4, p. 274-82, Apr 1986.
- 34 LEFKOVE, M. D.; BEALS, R. P. Immediate loading of cylinder implants with overdentures in the mandibular symphysis: the titanium plasma-sprayed screw technique. **J Oral Implantol**, v. 16, n. 4, p. 265-71, 1990.
- 35 PIATTELLI, A. et al. Immediate loading of titanium plasma-sprayed screw-shaped implants in man: a clinical and histological report of two cases. **J Periodontol**, v. 68, n. 6, p. 591-7, Jun 1997.
- 36 SANZ, A. et al. Experimental study of bone response to a new surface treatment of endosseous titanium implants. **Implant Dent**, v. 10, n. 2, p. 126-31, 2001.
- 37 CANEVA, M. et al. Collagen membranes at immediate implants: a histomorphometric study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 9, p. 891-7, Sep 2010.
- 38 BOTTICELLI, D.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 10, p. 820-8, Oct 2004.
- 39 ARAUJO, M. G. et al. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 6, p. 645-52, Jun 2005.
- 40 ARAUJO, M. G. et al. Tissue modeling following implant placement in fresh extraction sockets. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 6, p. 615-24, Dec 2006.
- 41 SEIBERT, J.; LINDHE, J. Esthetics in periodontal therapy. In: (Ed.). **Textbook of Clinical Periodontology**. 3rd. Copenhagen, Munksgaard, 1997. p.647-681.

- 42 MULLER, H. P.; EGER, T. Gingival phenotypes in young male adults. **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 1, p. 65-71, Jan 1997.
- 43 DE ROUCK, T. et al. The gingival biotype revisited: transparency of the periodontal probe through the gingival margin as a method to discriminate thin from thick gingiva. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 5, p. 428-33, May 2009.
- 44 SPINATO, S. et al. Is socket healing conditioned by buccal plate thickness? A clinical and histologic study 4 months after mineralized human bone allografting. **Clin Oral Implants Res**, Nov 21 2012.
- 45 FERRUS, J. et al. Factors influencing ridge alterations following immediate implant placement into extraction sockets. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 1, p. 22-9, Jan 2010.
- 46 TOMASI, C. et al. Bone dimensional variations at implants placed in fresh extraction sockets: a multilevel multivariate analysis. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 1, p. 30-6, Jan 2010.
- 47 SPRAY, J. R. et al. The influence of bone thickness on facial marginal bone response: stage 1 placement through stage 2 uncovering. **Ann Periodontol**, v. 5, n. 1, p. 119-28, Dec 2000.
- 48 VALDERHAUG, J.; BIRKELAND, J. M. Periodontal conditions in patients 5 years following insertion of fixed prostheses. Pocket depth and loss of attachment. **J Oral Rehabil**, v. 3, n. 3, p. 237-43, Jul 1976.
- 49 STETLER, K. J.; BISSADA, N. F. Significance of the width of keratinized gingiva on the periodontal status of teeth with submarginal restorations. **J Periodontol**, v. 58, n. 10, p. 696-700, Oct 1987.
- 50 BERGLUNDH, T. et al. The soft tissue barrier at implants and teeth. **Clin Oral Implants Res**, v. 2, n. 2, p. 81-90, Apr-Jun 1991.
- 51 GOODACRE, C. J.; KAN, J. Y.; RUNGCHARASSAENG, K. Clinical complications of osseointegrated implants. **J Prosthet Dent**, v. 81, n. 5, p. 537-52, May 1999.
- 52 KAN, J. Y. et al. Dimensions of peri-implant mucosa: an evaluation of maxillary anterior single implants in humans. **J Periodontol**, v. 74, n. 4, p. 557-62, Apr 2003.

- 53 JUNG, R. E. et al. In vitro color changes of soft tissues caused by restorative materials. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 27, n. 3, p. 251-7, Jun 2007.
- 54 KIM, B. S. et al. Evaluation of peri-implant tissue response according to the presence of keratinized mucosa. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 3, p. e24-8, Mar 2009.
- 55 BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. **J Clin Periodontol**, v. 23, n. 10, p. 971-3, Oct 1996.
- 56 LINKEVICIUS, T. et al. Influence of thin mucosal tissues on crestal bone stability around implants with platform switching: a 1-year pilot study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 9, p. 2272-7, Sep 2010.
- 57 LINKEVICIUS, T. et al. The influence of soft tissue thickness on crestal bone changes around implants: a 1-year prospective controlled clinical trial. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 4, p. 712-9, Jul-Aug 2009.
- 58 WOOD, D. L. et al. Alveolar crest reduction following full and partial thickness flaps. **J Periodontol**, v. 43, n. 3, p. 141-4, Mar 1972.
- 59 BRAGGER, U.; PASQUALI, L.; KORNMAN, K. S. Remodelling of interdental alveolar bone after periodontal flap procedures assessed by means of computer-assisted densitometric image analysis (CADIA). **J Clin Periodontol**, v. 15, n. 9, p. 558-64, Oct 1988.
- 60 FICKL, S. et al. Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: a volumetric study in the beagle dog. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 4, p. 356-63, Apr 2008.
- 61 SCLAR, A. G. Guidelines for flapless surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 7 Suppl 1, p. 20-32, Jul 2007.
- 62 JEONG, S. M. et al. Comparison of flap and flapless procedures for the stability of chemically modified SLA titanium implants: an experimental study in a canine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 111, n. 2, p. 170-3, Feb 2011.
- 63 CAMPELO, L. D.; CAMARA, J. R. Flapless implant surgery: a 10-year clinical retrospective analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, n. 2, p. 271-6, Mar-Apr 2002.

- 64 BECKER, W. et al. Minimally invasive flapless implant surgery: a prospective multicenter study. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 7 Suppl 1, p. S21-7, 2005.
- 65 BLANCO, J. et al. Biological width following immediate implant placement in the dog: flap vs. flapless surgery. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 6, p. 624-31, Jun 2010.
- 66 BOTTICELLI, D.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. The influence of a biomaterial on the closure of a marginal hard tissue defect adjacent to implants. An experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 3, p. 285-92, Jun 2004.
- 67 NOCITI JUNIOR, F. H. et al. Histometric evaluation of bone regeneration around immediate implants partially in contact with bone: a pilot study in dogs. **Implant Dent**, v. 9, n. 4, p. 321-8, 2000.
- 68 BECKER, W. et al. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 9, n. 1, p. 31-40, Jan-Feb 1994.
- 69 BRAGGER, U.; HAMMERLE, C. H.; LANG, N. P. Immediate transmucosal implants using the principle of guided tissue regeneration (II). A cross-sectional study comparing the clinical outcome 1 year after immediate to standard implant placement. **Clin Oral Implants Res**, v. 7, n. 3, p. 268-76, Sep 1996.
- 70 GELB, D. A. Immediate implant surgery: three-year retrospective evaluation of 50 consecutive cases. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 8, n. 4, p. 388-99, 1993.
- 71 GHER, M. E. et al. Bone grafting and guided bone regeneration for immediate dental implants in humans. **J Periodontol**, v. 65, n. 9, p. 881-91, Sep 1994.
- 72 KOHAL, R. J. et al. The effects of guided bone regeneration and grafting on implants placed into immediate extraction sockets. An experimental study in dogs. **J Periodontol**, v. 69, n. 8, p. 927-37, Aug 1998.
- 73 ARAUJO, M. G.; LINDER, E.; LINDHE, J. Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 1, p. 1-8, Jan 2011.
- 74 ARAUJO, M. G.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 1, p. 55-64, Jan 2010.

- 75 ARAUJO, M. G. et al. Orthodontic movement in bone defects augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 28, n. 1, p. 73-80, Jan 2001.
- 76 BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 8, n. 2, p. 117-24, Apr 1997.
- 77 ARAUJO, M. et al. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 28, n. 2, p. 123-35, Apr 2008.
- 78 ARAUJO, M.; LINDER, E.; LINDHE, J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 1, p. 1-6, Jan 2009.
- 79 FICKL, S. et al. Dimensional changes of the ridge contour after socket preservation and buccal overbuilding: an animal study. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 5, p. 442-8, May 2009.
- 80 FICKL, S. et al. Hard tissue alterations after socket preservation with additional buccal overbuilding: a study in the beagle dog. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 10, p. 898-904, Oct 2009.
- 81 HEBERER, S. et al. Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: a prospective study. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 12, p. 1219-25, Dec 2008.
- 82 DONATH, K.; BREUNER, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. **J Oral Pathol**, v. 11, n. 4, p. 318-26, Aug 1982.
- 83 MULLER, R. et al. In vivo reproducibility of three-dimensional structural properties of noninvasive bone biopsies using 3D-pQCT. **J Bone Miner Res**, v. 11, n. 11, p. 1745-50, Nov 1996.
- 84 MACNEIL, R. L. et al. Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. **Connect Tissue Res**, v. 33, n. 1-3, p. 1-7, 1995.
- 85 MCKEE, M. D.; NANJI, A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and

implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. **Microsc Res Tech**, v. 33, n. 2, p. 141-64, Feb 1 1996.

86 NANJI, A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. **J Struct Biol**, v. 126, n. 3, p. 256-69, Jun 30 1999.

87 SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. Osteopontin. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 11, n. 3, p. 279-303, 2000.

88 GANSS, B.; KIM, R. H.; SODEK, J. Bone sialoprotein. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 10, n. 1, p. 79-98, 1999.

89 MOFFATT, P. et al. Engineered viruses to select genes encoding secreted and membrane-bound proteins in mammalian cells. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 19, p. 4285-94, Oct 1 2002.

90 MOFFATT, P. et al. Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization. **J Bone Miner Res**, v. 23, n. 9, p. 1497-508, Sep 2008.

91 MISCH, C. E. et al. Implant success, survival, and failure: the International Congress of Oral Implantologists (ICOI) Pisa Consensus Conference. **Implant Dent**, v. 17, n. 1, p. 5-15, Mar 2008.

92 BASHARA, H. et al. The effect of permanent grafting materials on the preservation of the buccal bone plate after tooth extraction: an experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 8, p. 911-7, Aug 2012.

93 ROTHAMEL, D. et al. Dimensional ridge alterations following socket preservation using a nanocrystalline oxyapatite paste. A histomorphometrical study in dogs. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 37, n. 8, p. 741-747, Aug 2008.

94 BOTTICELLI, D.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Resolution of bone defects of varying dimension and configuration in the marginal portion of the peri-implant bone. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 4, p. 309-17, Apr 2004.

95 QAHASH, M. et al. Bone healing dynamics at buccal peri-implant sites. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 2, p. 166-72, Feb 2008.

- 96 VIGNOLETTI, F. et al. Early healing of implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in the beagle dog. III: soft tissue findings. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 12, p. 1059-66, Dec 2009.
- 97 ARAUJO, M.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. The periodontal tissues in healed degree III furcation defects. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 23, n. 6, p. 532-41, Jun 1996.
- 98 NKENKE, E. et al. Histomorphometric and fluorescence microscopic analysis of bone remodelling after installation of implants using an osteotome technique. **Clin Oral Implants Res**, v. 13, n. 6, p. 595-602, Dec 2002.
- 99 ABRAHAMSSON, I. et al. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 4, p. 381-92, Aug 2004.
- 103 GHANAVATI, F. et al. The effects of loading time on osseointegration and new bone formation around dental implants: a histologic and histomorphometric study in dogs. **J Periodontol**, v. 77, n. 10, p. 1701-7, Oct 2006.
- 104 HANAGATA, N. et al. Characterization of the osteoblast-specific transmembrane protein IFITM5 and analysis of IFITM5-deficient mice. **J Bone Miner Metab**, v. 29, n. 3, p. 279-90, May 2011.

ARTIGO I EM INGLÊS

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

Luciana P. Maia
 Danilo M. Reino
 Valdir A. Muglia
 Sérgio L. S. de Souza
 Daniela B. Palioto
 Arthur B. Novaes Jr

The influence of the periodontal biotype on peri-implant tissues around immediate implants with and without xenografts. Clinical and micro-computerized tomographic study in small Beagle dogs

Authors' affiliations:

Luciana P. Maia, Danilo M. Reino, Sérgio L. S. de Souza, Daniela B. Palioto, Arthur B. Novaes Jr Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil
 Valdir A. Muglia, Department of Dental Materials and Prosthetics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Corresponding author:

Arthur B. Novaes Jr
 Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto,
 Universidade de São Paulo
 Avenida do Café – s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brasil
 Tel.: +5516 3602 4135
 Fax: +5516 3602 4788
 e-mail: novaesjr@forp.usp.br

Key words: biomaterial, dogs, extraction socket, grafting, immediate implant

Abstract

Objective: Soft tissues and buccal bone plate remodeling after immediate implantation in sockets with thin buccal bone, using the flapless approach with or without bone graft into the buccal gap, was compared between sites with thin and normal gingiva.

Material and methods: Eight dogs had the gingiva of one side of the mandible thinned, the mandibular premolars were extracted without flaps, and 4 implants were installed in each side, positioned 1.5 mm from the buccal bone. The sites were randomly assigned into: TG (test group) = thin gingiva; TG + GM (TG with grafting material); CG (control group) = normal gingiva; and CG + GM (CG with grafting material). Buccal bone thickness (BBT), thickness of keratinized tissue (TKT), alveolar thickness (AT), gingival recession (GR), and probing depth (PD) were clinically evaluated. Within 12 weeks the dogs were sacrificed and the samples were analyzed by micro-computerized tomography.

Results: A thin BBT was observed in all the dogs. The presurgical procedures reduced TKT in the test group, with minimal changes of the AT. There were no statistically significant differences among the groups for the clinical parameters and the tomographic analysis showed similar linear and tri-dimensional bone reduction in all the groups.

Conclusion: The thickness of the buccal bone was a fundamental factor in buccal bone plate resorption, even with flapless implantation. The decrease in gingival thickness or the addition of a biomaterial in the gap did not influence the results.

The concept of early crestal bone loss after prosthetic reconstruction of an implant was suggested by Albrektsson et al. (1986) more than two decades ago. Additionally, it was observed that tissue alterations following tooth extraction are more pronounced in the buccal than in the lingual/palatal bone wall (Botticelli et al. 2004a; Araujo & Lindhe 2005; Araujo et al. 2005). Since then, methods of preservation of existing soft and hard tissues have been extensively discussed.

It has been suggested that the placement of an implant in the fresh extraction socket may counteract alveolar ridge contraction following tooth removal to some extension (Denissen et al. 1993; Watzek et al. 1995; Paolantonio et al. 2001), especially with the placement of a provisional restoration (Kan

et al. 2003). Those steps would preserve the alveolar anatomy and help to maintain the bone crest structure (Paolantonio et al. 2001). However, some authors stated that the immediate implantation does not prevent bone resorption (Araujo et al. 2005, 2006; Botticelli et al. 2004a; Caneva et al. 2010). Therefore, other aspects must be observed in an attempt to reduce the bone loss after immediate implant placement.

The thickness of the buccal bone plate in the extraction site seems to have a significant influence on the amount of horizontal and vertical crest resorption in human sockets (Spinato et al. 2012), as well as in implants placed immediately into extraction sockets (Ferrus et al. 2010; Tomasi et al. 2010). This is an important aspect that must

Date:

Accepted October 2013

To cite this article:

Maia LP, Reino DM, VA Muglia, de Souza SLS, Palioto DB, Novaes AB Jr. The influence of the periodontal biotype on peri-implant tissues around immediate implants with and without xenografts. Clinical and micro-computerized tomographic study in small Beagle dogs. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2013, 1–9
 doi: 10.1111/cir.12298

be considered in the decision-making process regarding the immediate positioning of implant into the socket.

The influence of mucosal thickness and biologic width formation on tissue health maintenance and bone wall preservation around implants has been discussed only recently and has received little attention. The term “periodontal biotype” was introduced by Seibert & Lindhe (1997) to describe the thickness of the gingiva in a bucco-lingual dimension, and this thickness is an important aspect in the maintenance of gingival health. Animal (Berglundh & Lindhe 1996) and clinical studies (Kim et al. 2009a; Linkevicius et al. 2009, 2010) have shown that thin tissues may lead to crestal bone loss during formation of the peri-implant seal. However, clinical research regarding the effects of gingival thickness on bone stability around implants is lacking.

The surgical approach is another important aspect that must be considered. Surgical trauma that includes the separation of the periosteum from the bone surface will induce remodeling of the alveolar bone surface layer in the exposed area (Wood et al. 1972; Bragger et al. 1988). Alternative methods, such as the flapless surgical approach, have been used in recent years to address this issue, providing function, esthetics, and comfort with minimally invasive surgery. Earlier studies have shown that flapless implant surgery accelerates recovery (Sclar 2007) and increases the vascularity of the peri-implant mucosa after implant placement (Kim et al. 2009b). It is conceivable that implants would stabilize more quickly without flap elevation (Campelo & Camara 2002; Becker et al. 2005; Jeong et al. 2011). Moreover, it was demonstrated that buccal soft tissue recession is lower in immediate implants placed with a flapless surgery (Blanco et al. 2010).

The presence of a gap between the walls of the extraction socket and the implant surface is commonly observed (Botticelli et al. 2004b), and different approaches have been advocated to fill this gap including the use of various graft or filler materials such as autografts, allografts, synthetic graft, etc. and/or barrier membranes (Gelb 1993; Becker et al. 1994; Gher et al. 1994; Watzek et al. 1995; Bragger et al. 1996; Kohal et al. 1998; Suaid et al. 2012). One particular graft material, comprising of deproteinized bovine bone mineral combined with collagen (BOC - Bio-Oss Collagen - Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), has been recently introduced in periodontal therapy. This material was evaluated in experimental and

clinical studies, especially in ridge preservation procedures (Heberer et al. 2008; Araujo & Lindhe 2009; Araujo et al. 2009; Fickl et al. 2009a,b), with promising results. In an animal study, it was also demonstrated that the placement of BOC in the gap between the implant and the buccal-approximal bone walls of fresh extraction sockets modified the process of hard tissue healing (Araujo et al. 2011). Favorable results of the use of BOC to fill the gap in immediate implants were also shown in a clinical prospective study (Degidi et al. 2013).

Based on this, the aim of the present clinical and micro-computerized tomographic study was to evaluate the remodeling of soft tissues and buccal bone plate in immediate implants, in small dogs with a thin biotype. In addition, the effect that a graft material filling the buccal gap could have on the remodeling process was also observed.

Material and methods

Study design and randomization procedure

According to the ARRIVE Guidelines (Berglundh & Stavropoulos 2012), brief details of the study design will be described. This study was conducted after approval of the Animal Experimental Ethics Committee (protocol number 11.1.138.53.6). Eight beagle dogs, around 1 year old and weighing on average 11.5 kg each, were used. Such small dogs were selected to ensure that all of them would present thin buccal bone plate. All selected animals had perfect mandibles, no generalized occlusal trauma, no viral or fungal mouth lesions (Fig. 1a), good overall health, and no systemic compromises attested by veterinary exams. The dogs were immunized with vaccines, received antiparasitic treatment, and were submitted to dental prophylaxis using ultrasonic points (Cavitron 3000, Dentsply Mfg. Co., USA) for the removal of dental calculus and biofilm. A computer-generated random permuted block was used to allocate the four experimental groups (TG: test group - thin gingiva; TG + GM: test group with grafting material; CG: control group - normal gingiva; and CG + GM: control group with grafting material) in each side of the mandible.

Presurgical procedures

In the first stage of this study, on the test side, the buccal mucosa of the teeth scheduled for surgery was thinned using a high-speed bur (gingival peeling) (Fig. 1a-d), whereas the control side was left without alteration in tissue thickness. Four weeks

after the gingival peeling the gingiva of the test side became similar to the control side of the mandible and another gingival peeling was carried out followed by weekly traumatic brushing, in an attempt to maintain a thin thickness of keratinized tissue (TKT) in the test side. Eight weeks after the second gingival peeling, a statistically significant difference between test and control sides on TKT was observed (Fig. 1e,f), and the dogs were ready for the surgery procedure. During these procedures, the animals were anesthetized with intravenously administered zolazepan (0.1 ml/kg; Zoletil 50 - Verbac S.A., São Paulo, SP, Brasil) and acepromazine (2.0%; Acepran - Univet S. A., São Paulo, SP, Brasil).

Clinical parameters

The clinical parameters evaluated were buccal bone thickness (BBT), probing depth (PD), gingival recession height (GR), thickness of keratinized tissue (TKT), and alveolar thickness (AT). All clinical assessments were recorded by the same calibrated experienced periodontist.

The TKT was assessed using an anesthetic needle attached to a silicone disk stop (Fig. 2a). The needle was placed 3 mm below the gingival margin, perpendicular to the mucosa surface through the soft tissue with light pressure, until a hard surface was felt. The AT was assessed using a surgical micrometer also 3 mm below the gingival margin (Fig. 2b). The penetration depth of both the needle and the micrometer was measured using a digital calliper with 0.05 mm resolution. TKT and AT were assessed at the mid-buccal point of each root of the premolars (P1, P2, P3 and P4) before the first gingival peeling (T₀) and immediately before implant placement (T₁); and at the mid-buccal point of each implant, 4 (T₂) and 12 (T₃) weeks after implants placement. The measurements at T₀ and T₁ were done using an acrylic stent with an orifice placed 3 mm below the gingival margin. After the implant placement (T₂ and T₃) a notch in the metallic prostheses was used as reference point, and the measurements were done 3 mm below this notch.

The BBT was assessed using a surgical micrometer during the surgery, after teeth extractions, and the penetration of the micrometer was measured using a digital calliper with 0.05 mm resolution.

The GR was assessed at the mid-buccal point of the implants using a manual periodontal probe (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) at T₂ and T₃. The PD was evaluated on four

Fig. 1. Gingival peeling: (a) initial aspect of the mucosa; (b) the buccal mucosa of the teeth scheduled for surgery was thinned using a high-speed bur; (c) aspect of the mucosa immediately after the gingival peeling; (d) aspect of the mucosa 7 days after the gingival peeling; (e) gingival aspect at the moment of implant placement of the test group, showing the visible lower gingival thickness in the test group; (f) gingival aspect at the moment of implant placement of the control group.

Fig. 2. (a) Thickness of keratinized tissue, assessed using an anesthetic needle attached to a silicone disc stop 3 mm below the gingival margin, using an acrylic stent; (b) Alveolar thickness assessed using a surgical micrometer 3 mm below the gingival margin, using an acrylic stent.

sides of the implants (mesial, distal, buccal and lingual), using a manual periodontal probe (Hu-Friedy) at T₃. The PDs at four points were averaged for the purpose of analysis.

Surgical procedures

The surgical procedures were performed by a single experienced operator. The animals were kept in fast since the night preceding the surgical procedures. For the surgery itself, the dogs were pre-anesthetized with 10% zolazepam (0.10 ml/kg) and acepromazine (2.0%). Anesthetic maintenance was obtained using volatile anesthetics and the animals were submitted to tracheal intubation with a

Magill probe for adaptation of the anesthetic device and for administration of oxygen-diluted volatile isoflurane (2V%; Isothane - Baxter Hospitalar LTDA, São Paulo, SP, Brasil). Additionally, local anesthesia was used at the premolar regions.

The procedures for extraction of the four lower bicuspid (premolars) were completed without flaps (Fig. 3a–c). The teeth were bucco-lingually sectioned and the roots were carefully removed, avoiding damage to the alveoli bone walls. After teeth extractions, the buccal bone thickness (BBT) was assessed using a surgical micrometer. The following sockets on both quadrants of the mandible were selected for implant placement (Straumann

Dental Implant System; Bone Level SLActive, 3.3 mm wide and 10 mm long; Straumann, Basel, Switzerland): P2 distal, P3 distal and mesial, and P4 distal, totaling four implants in each side of the mandible (Fig. 3d). All implants were positioned at the bone crest level and with their cervical portion placed 1.5 mm from the buccal bone plate (bucco-lingually), allowing a 1.5 mm gap (Fig. 3e).

Following implant installation, the transfers were placed for silicon impression and posterior fabrication of the restoration (Fig. 3f). After the impression, two implants in each hemi-mandible received xenografts (BOC) for gap filling between the implant surface and the buccal alveolar bone wall; and two others received no grafting material and, thus, healed solely with the aid of the coagulum (Fig. 3g,h).

Protective covering screws were adjusted to the implants and sutures were positioned to maintain the coagulum in position in the control groups, and the coagulum combined with the grafting material in the test groups (Fig. 3i). For gingival recession evaluation, a notch was made in the covering screws, determining the gingival margin level at the moment of implant placement.

For the postoperative care, Tramadol chlorhydrate (50mg/ml; Tramal - União Química Farmacêutica Nacional S. A., Pouso Alegre, MG, Brasil) was used with a dose of 3 mg/kg every 12 h for 3 days as analgesic therapy and Meloxicam (2 mg/20 kg; Maxicam - Ouro Fino Saúde Animal LTDS, Cravinhos, SP, Brasil) was used for 5 days as anti-inflammatory therapy. The animals also received Spiramycin (750.000 UI/10 kg) and Metronidazole (125 mg/10 kg) (Stomorgyl10 - Merial Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP, Brasil) for 10 days as antibiotic therapy. Seven days later, the sutures were removed, prosthetic connections were adapted and temporary metallic prostheses were installed at the same time (Fig. 2j), thus characterizing the presence of an early load. A notch was made also in the prostheses to determine the gingival margin level. The animals were maintained on a soft ration diet for 15 days and a healing control was performed daily with a topical application of 0.12% chlorhexidine to limit microbial biofilm adherence. The remaining teeth were cleaned monthly with ultrasonic points.

Twelve weeks after implant placement, the animals were sacrificed by induction of deep anesthesia with a subsequent intravenous sodium thiopental and potassium chloride overdose. The hemi-mandibles were removed,

dissected, cut, and fixed in 4% phosphate-buffered formalin pH 7 until the tomographic analysis.

Tomographic analysis

Micro-computerized tomography (Micro-CT) analysis was performed using a Micro-Sky Scan 1172 (SkyScan, Kontich, Belgium), with an Al-Cu filter, at identical settings (100 kV, 100 μ A, using a 360° rotation). Micro-CT scans and micro-tomographic reconstructions of the implants were performed. The two-dimensional (2D) analysis was performed using the DataViewer software to verify and determine the resulting distance between the implant shoulder and the bone crest level (IS-BC) (Fig. 4a), as well as the resulting linear distance from the highest point between the implant surface and the buccal bone wall (GAP-L) (Fig. 4b). The 3D analysis was performed using the CT-analyser software (Fig. 5). After image reconstruction, a tomographic cylinder measuring 3.5 and 5 mm in the axis, positioned in the implant shoulder (Fig. 5a), was defined as the region of interest (ROI) (Fig. 5b). The collective sum of all ROIs over a contiguous set of crosssectional image slices, totaling 6 mm in depth, was used to determine the volume of interest (VOI) (Fig. 5c), representing a selected 3D volume. Then, the volume of the radioluscent area within the gap (GAP-V) (Fig. 5d), and the percentage that the GAP-V represented of the VOI (%GAP-V) were determined. All the reconstructed images were 1000 $\times$ 668 pixels, with a pixel size of 20 μ m.

Statistical analysis

Quantitative data were presented as mean and standard deviations. For the parametric data, the confidence interval was also presented, whereas for the nonparametric data the median was presented. The experimental unit was the dog ($n = 8$). As there were two implants per group in each animal for the clinical parameters, the mean value was used for the statistical analysis. To verify the normality of the data, the Shapiro-Wilk Test was used. For the parametric data (BBT, TKT, AT, PD, and tomographic analysis), Mixed Model for repeated measurements was used for intragroup and intergroup comparisons. For the nonparametric data (GR), the Friedman's Two-Way ANOVA by Ranks was applied for intragroup and intergroup comparisons. The Related-Samples Cochran's Q Test was employed to compare the frequency of occurrence of gingival recession intergroups. Taking into account the presence of multiple variables in the study, $P < 0.008$

was considered statistically significant. SPSS version 20 (IBM Software, Armonk, NY, USA) was the statistical software used for the analysis.

Results

Clinical findings

After implant placement, healing was uneventful. There were no complications throughout the experimental period. The temporary prosthesis also remained stabilized throughout the entire experimentation and no occurrences or complications were observed.

Fig. 3. (a) Initial aspect of the mucosa and teeth; (b) hemisection of the premolars; (c) sockets after teeth extraction; (d) immediate implants; (e) gap (1.5 mm) between the implant and the buccal bone plate; (f) the transfers in position; (g) the graft material filling the gap; (h) the graft material in a greatest increase; (i) protective covering screws adjusted to the implants and sutured wound; (j) prosthesis in place one week following surgical procedure, with a notch (arrowhead) to determine the gingival margin level.

Clinical analysis

A thin BBT was observed in all the experimental groups, with no statistically significant differences among the groups (Table 1).

Data regarding the TKT and the AT are summarized in Table 2. There were no statistically significant differences among the groups at T_0 in the mean TKT. In TG and TG + GM, the mean TKT was significantly decreased from T_0 to T_1 ($P < 0.0001$), and it remained thinner until T_3 . For CG and CG + GM, the mean TKT observed at the beginning of the study (T_0) remained stable until the end of it (T_3), with no statistically

Fig. 4. Linear measurements: (a) resulting distance between the implant shoulder and the bone crest level (IS-BC); (b) resulting linear distance from the highest point between the implant surface and the buccal bone wall (GAP-L).

Fig. 5. Three-dimensional measurements: (a) corono-apical view of the sample; (b) region of interest (ROI) determined as a tomographic cylinder measuring 3.5 and 5 mm in the axis and 6 mm in depth, starting at the implant shoulder; (c) volume of interest (VOI) made binary from the histogram of gray levels; (d) radioluscent area within the gap.

significant changes. This reduction in the mean TKT in TG and TG + GM resulted in statistically significant differences between these groups and the control groups (CG and CG + GM) at T_1 , T_2 , and T_3 ($P < 0.0001$) (Table 2). The change in TKT

over the experimental periods was statistically higher for TG and TG + GM between T_0 and T_1 ($P < 0.0001$), whereas at the other periods and for CG and CG + GM, the changes were very low and similar among the groups, without statistically significance (Table 3).

For the AT, there were no statistically significant differences among the groups in all experimental periods (Table 2). In all the experimental groups changes in the same pattern were observed, with a reduction in the AT from T_0 to T_1 ; an increase from T_1 to T_2 followed again by a reduction from T_2 to T_1 . All these changes resulted in a small increase in the AT from T_1 to T_3 on all experimental groups, with no significant differences among the groups (Table 3).

There were no statistically significant differences among the groups in the mean GR in all the experimental periods. However, as higher values of GR were observed at T_3 , when compared with T_1 for TG ($P = 0.004$), TG + GM ($P = 0.007$), and CG + GM ($P = 0.002$), for CG there was no significant difference among the experimental periods. There were no significant difference among the groups in changes on GR between T_2 and T_3 (Table 4). Analyzing the frequency of occurrence of GR among the groups, no significant difference among the groups was observed (Table 5).

At 12 weeks after implant placement (T_3), no significant difference among the groups regarding the PD was observed (TG = 3.01 ± 0.78 ; TG + GM = 3.14 ± 0.63 ; CG = 3.44 ± 0.72 ; CG + GM = 3.65 ± 0.77 ; $P = 0.331$).

Tomographic analysis

Data regarding the tomographic analysis are summarized in Table 5. Tomographic analysis showed similar linear results (IS-BC and GAP-L) among all the experimental groups, with no statistically significant differences (Table 6). A mean vertical bone loss (IS-BC), ranging from 1.07 ± 0.63 to 1.43 ± 0.81 mm, was observed (Table 5). Also, there was a reduction in the horizontal extent of the gap between the implant surface and the buccal bone plate, similar for all the groups.

The same was observed for the tomographic 3D measurements (VOI, GAP-V and %GAP-V), which did not give an output with any statistically significant differences among the experimental groups (Table 7). The 3D measurements showed a residual gap representing around 20% of the region of interest selected in the methodology.

Discussion

In this study, the influence of the periodontal biotype on soft and hard peri-implant tissues remodeling following immediate implant placement using flapless procedures were clinically and tomographically evaluated. This process was also compared between sites that were or not grafted in the gap between the implant surface and the buccal bone plate. It is important to note that this study was conducted in small beagle dogs, which assembles a thin periodontal biotype. The presurgical procedures succeeded in reducing the gingiva of the test groups to a critical thickness, from 1.2 mm to 0.8 mm on average ($P < 0.0001$). Although the significant reduction in gingival thickness,

there were no statistically significant changes on buccal bone (BBT), observed at the implant placement, and alveolar thickness (AT). All the dogs used in the study presented a thin buccal bone plate at the moment of teeth extractions, measuring about 0.5 mm on average.

The presence of gingival recession after 12 weeks of implants placement was observed in all the experimental groups evaluated, with the highest mean value of 1.00 ± 0.62 mm. Although greater values of GR were observed in the groups with thin gingiva than in the groups with normal gingiva at 12 weeks, no statistically significant differences were observed. The mean PD ranged from 3.02 ± 0.57 to 3.65 ± 0.64 mm, which was compatible with normality, as

stable, rigid, and fixated implants have been reported with pocket depths ranging from 2 to 6 mm [Misch et al. 2008].

Samples were analyzed by MicroCT, which is a precise and validated technique that provided accurate measures of bone volume and architecture [Muller et al. 1996]. With this methodology, morphometric parameters are calculated either in direct 3D based on a surface-rendered volume model or in 2D from individual binarised cross-section images. In the 2D analysis, the linear parameters showed a vertical buccal bone loss, reaching a maximum mean value of 1.43 ± 0.81 mm, and a reduction of the horizontal gap in all the experimental groups, without a statistical difference among the groups. In the 3D analysis, a residual gap of approximately 20% of the region of interest was observed in all the experimental groups.

In the current experiment, the similarity among the groups regarding all the parameters evaluated leads to the hypothesis that a critical gingival thickness does not play a crucial role in maintaining the health of peri-implant tissue and in buccal bone preserva-

Table 1. Buccal bone thickness (BBT) (mm) at implant placement (T_1) intergroup comparison

	TG	TG + GM	CG	CG + GM	P value
BBT	0.54 ± 0.13 (0.43–0.65)	0.47 ± 0.08 (0.36–0.58)	0.55 ± 0.17 (0.44–0.66)	0.56 ± 0.16 (0.45–0.67)	0.597
Mixed Model for Repeated Measurements, $P < 0.008$, all values are expressed as mean $\pm$ standard deviation and confidence interval of 95%.					

Table 2. Thickness of keratinized tissue (TKT) and alveolar thickness (AT) before gingival peeling (T_0), at implant placement (T_1), after 4 (T_2) and 12 weeks (T_3), intragroup and intergroup comparisons

	T_0	T_1	T_2	T_3	P value
TKT (mm)					
TG	1.23 ± 0.20 (1.08–1.38) ^a	0.75 ± 0.10 (1.10–1.39) ^{ba}	0.77 ± 0.12 (1.06–1.36) ^{ba}	0.61 ± 0.15 (1.04–1.34) ^{ba}	<0.0001
TG + GM	1.25 ± 0.26 (0.62–0.82) ^a	0.81 ± 0.06 (0.74–0.89) ^{ba}	0.80 ± 0.09 (1.04–1.19) ^{ba}	0.63 ± 0.09 (1.14–1.28) ^{ca}	<0.0001
CG	1.21 ± 0.22 (0.66–0.89)	1.11 ± 0.14 (0.69–0.92) ^B	1.23 ± 0.13 (1.11–1.34) ^B	1.16 ± 0.35 (1.19–1.42) ^B	0.533
CG + GM	1.19 ± 0.07 (0.43–0.80)	1.21 ± 0.08 (0.44–0.81) ^B	1.31 ± 0.25 (0.98–1.34) ^B	1.11 ± 0.30 (0.93–1.30) ^B	0.187
P value	0.915	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
AT (mm)					
TG	3.73 ± 1.02 (3.15–4.30)	3.36 ± 0.54 (3.20–4.35)	3.86 ± 0.54 (3.20–4.34)	3.65 ± 0.80 (2.83–3.97)	0.300
TG + GM	3.77 ± 0.78 (2.94–3.78)	3.35 ± 0.52 (2.93–3.77)	3.83 ± 0.48 (2.77–3.61)	3.49 ± 0.61 (2.69–3.53)	0.293
CG	3.77 ± 0.65 (3.49–4.23)	3.19 ± 0.61 (3.46–4.20)	3.61 ± 0.59 (3.24–3.98)	3.47 ± 0.43 (3.26–4.01)	0.063
CG + GM	3.40 ± 0.59 (3.19–4.11)	3.11 ± 0.58 (3.03–3.95)	3.63 ± 0.44 (3.01–3.93)	3.55 ± 0.65 (3.09–4.01)	0.221
P value	0.571	0.535	0.627	0.936	
Mixed Model for Repeated Measurements, all values are expressed as mean $\pm$ standard deviation and confidence interval of 95%. Intragroup (a, b, c, d) and intergroups (A, B, C) comparisons – different letters represent statistically significant difference ($P < 0.008$).					

Table 3. Changes in thickness of keratinized tissue (TKT) and alveolar thickness (AT) between the different periods of evaluation, intragroup and intergroup comparisons

	Change T_0 – T_1	Change T_1 – T_2	Change T_2 – T_3	Change T_1 – T_3	P value
TKT (mm)					
TG	-0.48 ± 0.26 (–0.63–0.34) ^{aA}	0.03 ± 0.09 (–0.09–0.14) ^b	-0.16 ± 0.16 (–0.30–0.02) ^b	-0.13 ± 0.15 (–0.30–0.03) ^b	<0.0001
TG + GM	-0.43 ± 0.24 (–0.58–0.28) ^{aA}	-0.01 ± 0.12 (–0.12–0.10) ^b	-0.18 ± 0.11 (–0.32–0.04) ^b	-0.19 ± 0.10 (–0.35–0.02) ^b	<0.0001
CG	-0.10 ± 0.15 (–0.25–0.04) ^B	0.12 ± 0.11 (0.00–0.23)	-0.07 ± 0.28 (–0.21–0.07)	0.05 ± 0.29 (–0.12–0.22)	0.109
CG + GM	0.02 ± 0.10 (–0.12–0.17) ^B	0.09 ± 0.25 (–0.18–0.21)	-0.19 ± 0.14 (–0.33–0.05)	-0.10 ± 0.29 (–0.26–0.07)	0.017
P value	<0.0001	0.275	0.200	0.059	
AT (mm)					
TG	-0.37 ± 0.83 (–0.97–0.23)	0.50 ± 0.65 (0.07–0.94)	-0.21 ± 0.43 (–0.60–0.18)	0.29 ± 0.72 (–0.25–0.84)	0.051
TG + GM	-0.42 ± 0.70 (–1.02–0.17)	0.48 ± 0.61 (0.05–0.92)	-0.34 ± 0.71 (–0.74–0.05)	0.14 ± 0.83 (–0.41–0.69)	0.024
CG	-0.58 ± 0.70 (–1.18–0.02)	0.42 ± 0.54 (–0.01–0.86)	-0.14 ± 0.33 (–0.53–0.25)	0.28 ± 0.40 (–0.27–0.83)	0.005
CG + GM	-0.29 ± 0.96 (–0.89–0.31)	0.53 ± 0.55 (0.09–0.96)	-0.09 ± 0.61 (–0.48–0.31)	0.44 ± 0.95 (–0.11–0.99)	0.177
P value	0.797	0.973	0.812	0.841	
Mixed Model for Repeated Measurements, all values are expressed as mean $\pm$ standard deviation and confidence interval of 95%. Intragroup (a, b, c, d) and intergroups (A, B, C) comparisons – different letters represent statistically significant difference ($P < 0.008$).					

Table 4. Gingival recession (GR) (mm) at implant placement (T₁), after 4 (T₂) and 12 weeks (T₃), intragroup and intergroup comparisons

	T ₁	T ₂	T ₃	P value	Change T ₂ -T ₃
TG	0 ^a	0.12 ± 0.22 (0.00) ^{ab}	0.84 ± 0.63 (1.00) ^b	0.004	0.72 ± 0.56 (0.75)
TG + GM	0 ^a	0.50 ± 0.50 (0.50) ^{ab}	1.00 ± 0.62 (1.12) ^b	0.007	0.50 ± 0.83 (0.37)
CG	0	0.06 ± 0.12 (0.00)	0.62 ± 0.70 (0.25)	0.023	0.63 ± 0.79 (0.25)
CG + GM	0 ^a	0.12 ± 0.22 (0.00) ^{ab}	0.62 ± 0.62 (0.50) ^b	0.002	0.62 ± 0.64 (0.50)
P value	1.000	0.105	0.711		0.986

Related Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks, all values are expressed as mean ± standard deviation (median). Intragroup (a, b) and Intergroups (A, B, C) comparisons - different letters represent statistically significant difference ($P < 0.008$).

Table 5. Frequency of occurrence of gingival recession at 4 (T₂) and 12 weeks (T₃)

	T ₂		T ₃	
	Yes	No	Yes	No
TG	2	14	8	6
TG+GM	8	8	11	5
CG	1	15	6	9
CG+GM	2	14	8	8
P value	0.105	0.223		

Related-samples Cochran's Q test.

tion when the buccal bone is thin. This aspect, the thickness of buccal bone, seems to be a more important factor in the healing of implants placed in fresh extraction socket.

In the first attempt to analyze the influence of mucosal thickness on bone stability regarding the biological width, Berglundh & Lindhe (1996) showed that at sites where the ridge mucosa prior to abutment connection was made thin (≤ 2 mm), wound healing consistently included bone resorption. In prospective clinical human studies that evaluated the influence of thin ridge mucosal tissues on crestal bone stability around dental implants (Linkevicius et al. 2009, 2010), the authors highlighted that if the tissue thickness is 2.0 mm or less, crestal bone loss up to 1.45 mm may occur (Linkevicius et al. 2009, 2010). Kim et al. (2009b) reported that, besides the crestal bone loss in cases with insufficient keratinized gingiva, there is the

risk of an increase of gingival recession. It is important to emphasize that these previous studies considered only the thickness of the mucosa of the crest of the ridge in implants placed in healed sockets, analyzing the influence of this aspect on biological width formation.

Spinato et al. (2012) demonstrated that a thin buccal plate at the moment of tooth extraction (≤ 1 mm) had a worse outcome on bone socket healing. Spray et al. (2000), evaluating the relationship between the vertical bone loss and the thickness of the buccal bone plate, reported a greater bone loss when the buccal bone has <1.4 mm of thickness. In implants placed immediately into extraction sockets, Ferrus et al. (2010) showed that the thickness of the buccal bone wall significantly influenced the amount of hard tissue alteration that occurred during a 4-month period of healing, resulting in a substantial loss of the vertical dimension. Our results reinforce the literature findings, showing that a thin buccal bone plate leads to vertical buccal bone loss, regardless of the gingival thickness.

It was suggested that the placement of implants in fresh extraction sockets would prevent buccal bone remodeling (Paolantonio et al. 2001). However, findings reported from a clinical study by Botticelli et al. (2004a) failed to support this hypothesis. The authors reported a marked resorption of the buccal

and lingual/palatal bone wall during the 4 months of healing after immediate implant placement. Additionally, Araujo et al. (2005), in an animal model, also stated that the placement of an implant in the fresh extraction site failed to prevent the remodeling that occurred in the walls of the socket. All these previous studies did not considered other factors that could impair bone maintenance around immediate implants, such as surgical approach and soft and hard tissues thickness - both used full-thickness flaps. Although using small dogs (12–13 kg), similar to ours, Araujo et al. (2005) observed a mean buccal bone loss of 2.6 ± 0.4 mm, whereas in our study it reached a maximum mean value of 1.43 ± 0.81 mm, which could be explained by the use of a flapless approach.

Regarding the surgical technique, Novaes et al. (2011a) observed a loss of bone height at least two times more pronounced in the group where immediate implants were installed after the elevation of mucoperiosteal flap than in the group without flap elevation. Fickl et al. (2008) demonstrated that leaving the periosteum in place decreases the resorption rate of the extraction sockets, as if a muco-periosteal flap is raised, an additional osteoclastic resorption will occur on the external aspect of the buccal bone plate. It is even more important in thin periodontal biotypes, where the osteoclastic activities occurring at the internal and external side will merge together and lead to a more pronounced loss of the buccal bone plate. Blanco et al. (2010) reported that a flapless approach also has a positive impact on soft tissue preservation, by observing that buccal soft tissue recession was lower after flapless surgery in immediate implants. Novaes-Jr et al. (2012) and Suaid et al. (2012) showed little or no loss of the buccal bone wall in immediate implants positioned equicrestally, using the

Table 6. Tomographic two-dimensional measurements, intergroup comparisons

	TG	TG + GM	CG	CG + GM	P value
IS-BC (mm)	0.96 ± 0.98 (0.19–1.73)	1.38 ± 1.24 (0.62–2.15)	1.24 ± 0.91 (0.47–2.00)	1.54 ± 1.04 (0.78–2.31)	0.618
GAP-L (mm)	0.23 ± 0.28 (0.01–0.45)	0.59 ± 0.38 (0.37–0.81)	0.44 ± 0.25 (0.22–0.66)	0.26 ± 0.27 (0.05–0.48)	0.059

IS-BC, distance between the implant shoulder and the buccal bone crest; GAP-L, linear distance between implant surface and buccal bone plate. Mixed Model for Repeated Measurements, $P < 0.008$, all values are expressed as mean ± standard deviation and confidence interval of 95%.

Table 7. Tomographic three-dimensional measurements, intergroup comparisons

	TG	TG + GM	CG	CG + GM	P value
VOI (mm ³)	82.18 ± 0.61 (80.15–84.21)	80.46 ± 5.48 (78.43–82.50)	81.94 ± 0.80 (79.90–83.97)	82.37 ± 0.63 (80.34–84.40)	0.535
GAP-V (mm ³)	14.07 ± 5.34 (08.82–19.32)	17.92 ± 8.41 (12.67–23.17)	17.37 ± 5.99 (12.12–22.62)	16.92 ± 7.44 (11.67–22.17)	0.320
%GAP-V (%)	17.12 ± 6.45 (10.79–23.43)	22.10 ± 9.88 (15.79–28.42)	21.23 ± 7.45 (14.91–27.55)	20.52 ± 8.96 (14.20–26.83)	0.625

VOI = whole volume of the region of interest, GAP-V = volume of the radioluscent area within the gap, % GAP-V = the percentage that the GAP-V represents of the VOI. Mixed Model for Repeated Measurements, $P < 0.008$, all values are expressed as mean ± standard deviation and confidence interval of 95%.

flapless approach. In our study, in which we used a similar methodology as the studies mentioned above (Novaes-Jr et al. 2012; Suaid et al. 2012), the flapless approach did not prevent the occurrence of bone loss and gingival recession, but probably it is due, again, to the thin buccal bone plate observed in our model. The dogs used in our study weighed on average 11.5 kg each, whereas in their study the dogs weighed approximately 20 kg each. Our dogs were clearly smaller, which, consequently, resulted in thinner oral tissues.

In this specific methodology, the graft material filling the gap between the implant surface and the bone wall did not appear to contribute to the maintenance of the buccal bone shown by the similar results between the grafted and nongrafted groups. This result is in accordance with Paolantonio et al. (2001) which reported that when a dental implant is placed without the use of barrier membranes or other regenerative materials into a fresh extraction socket with a bone-to-implant gap of 2 mm or less, the clinical outcome and degree of osseointegration does not differ from implants placed in healed, mature bone. Additionally, Ferrus

et al. (2010) demonstrated that the degree of bone fill is more pronounced in small gaps, which will predictably be completely resolved without graft material. Our microtomographic results showed no differences on the use of graft material when the gap is of 1.5 mm. On the other hand, Degidi et al. (2012) showed in a prospective study that implant placement into extraction sockets with the use of a xenogenic graft to fill the gap can result in favorable results even in the presence of evident alterations of the buccal bone wall. However, the authors emphasize that the subcrestal position of the implants generally determines the presence of bone in the buccal side and above the implant shoulder. In clinical terms the bone loss occurs, but the implant is not exposed.

To our knowledge, this is the first study that attempts to analyze the influence of a thin periodontal biotype in bone remodeling after immediate implantation. In the present study, the thickness of keratinized tissue influenced neither crestal bone loss nor the presence of gingival recession, but rather, as stated above, this can be explained by the presence of a thin buccal bone plate.

Conclusion

The thickness of the buccal bone was a fundamental factor in buccal bone plate resorption, even with flapless implantation. To thin the gingiva to a critical thickness or the addition of a biomaterial in the gap, in a pre-existing thin biotype, did not influence the results.

Acknowledgements: The authors thank the Coordination for the Improvement of Graduated Personnel (CAPES) for the scholarship that supported Ms. Maia, the State of São Paulo Research Foundation for the financial support of this study (process number 11/00674-6), Geistlich Pharma AG for the donation of the BOC used in this study. We also thank Adriana L.G. Almeida, Microscopic and Image Analysis Laboratory Technician at the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil, for the assistance with Micro-CT analysis, and Pierre Rompré, Research Assistant at the University of Montreal, Montreal, Canada, for the statistical analysis.

References

- Albrektsson, T., Zarb, G., Worthington, P. & Eriksson, A.R. (1986) The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **1**: 11–25.
- Araujo, M., Linder, E. & Lindhe, J. (2009) Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 1–6.
- Araujo, M.G., Linder, E. & Lindhe, J. (2011) Bio-oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 1–8.
- Araujo, M.G. & Lindhe, J. (2005) Dimensional ridge alterations following tooth extraction. an experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 212–218.
- Araujo, M.G. & Lindhe, J. (2009) Ridge preservation with the use of bio-oss collagen: a 6-month study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 433–440.
- Araujo, M.G., Sukekava, F., Wennstrom, J.L. & Lindhe, J. (2005) Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 645–652.
- Araujo, M.G., Sukekava, F., Wennstrom, J.L. & Lindhe, J. (2006) Tissue modeling following implant placement in fresh extraction sockets. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 615–624.
- Becker, W., Dahlin, C., Becker, B.E., Lekholm, U., van Steenberghe, D., Higuchi, K. & Kultje, C. (1994) The use of e-ptfe barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **9**: 31–40.
- Becker, W., Goldstein, M., Becker, B.E. & Sennerby, L. (2005) Minimally invasive flapless implant surgery: a prospective multicenter study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **7**(Suppl 1): S21–S27.
- Berglundh, T. & Lindhe, J. (1996) Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. *Journal of Clinical Periodontology* **23**: 971–973.
- Berglundh, T. & Stavropoulos, A. (2012) Preclinical in vivo research in implant dentistry. Consensus of the eighth european workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **39**(Suppl 12): 1–5.
- Blanco, J., Alves, C.C., Nunez, V., Aracil, L., Munoz, F. & Ramos, I. (2010) Biological width following immediate implant placement in the dog: Flap vs Flapless surgery. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 624–631.
- Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004a) Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology* **31**: 820–828.
- Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004b) Resolution of bone defects of varying dimension and configuration in the marginal portion of the peri-implant bone. an experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* **31**: 309–317.
- Bragger, U., Hammerle, C.H. & Lang, N.P. (1996) Immediate transmucosal implants using the principle of guided tissue regeneration (ii). A cross-sectional study comparing the clinical outcome 1 year after immediate to standard implant placement. *Clinical Oral Implants Research* **7**: 268–276.
- Bragger, U., Pasquali, L. & Kornman, K.S. (1988) Remodelling of interdental alveolar bone after periodontal flap procedures assessed by means of computer-assisted densitometric image analysis (cadia). *Journal of Clinical Periodontology* **15**: 558–564.
- Campelo, L.D. & Camara, J.R. (2002) Flapless implant surgery: a 10-year clinical retrospective analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **17**: 271–276.
- Caneva, M., Botticelli, D., Salata, L. A., Scombatti Souza, S. L., Carvalho Cardoso, L. & Lang, N. P. (2010) Collagen membranes at immediate implants: a histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 891–897.
- Degidi, M., Daprile, G., Nardi, D. & Piattelli, A. (2013) Buccal bone plate in immediately placed and restored implant with bio-oss(r) collagen graft: a 1-year follow-up study. *Clinical Oral Implants Research* **24**: 1201–1205.
- Denissen, H.W., Kalk, W., Veldhuis, H.A. & van Waas, M.A. (1993) Anatomic consideration for preventive implantation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **8**: 191–196.
- Ferrus, J., Cecchinato, D., Pietursson, E.B., Lang, N.P., Sanz, M. & Lindhe, J. (2010) Factors

- influencing ridge alterations following immediate implant placement into extraction sockets. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 22–29.
- Fickl, S., Schneider, D., Zuhr, O., Hinze, M., Ender, A., Jung, R.E. & Hürzeler, M.B. (2009a) Dimensional changes of the ridge contour after socket preservation and buccal overbuilding: an animal study. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 442–448.
- Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Bolz, W. & Hürzeler, M. (2008) Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: a volumetric study in the beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 356–363.
- Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Kerschull, M. & Hürzeler, M.B. (2009b) Hard tissue alterations after socket preservation with additional buccal overbuilding: a study in the beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 898–904.
- Gelb, D.A. (1993) Immediate implant surgery: three-year retrospective evaluation of 50 consecutive cases. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **8**: 388–399.
- Gher, M.E., Quintero, G., Assad, D., Monaco, E. & Richardson, A.C. (1994) Bone grafting and guided bone regeneration for immediate dental implants in humans. *Journal of Periodontology* **65**: 881–891.
- Heberer, S., Al-Chawaf, B., Hildebrand, D., Nelson, J.J. & Nelson, K. (2008) Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with bio-oss collagen after a 6-week healing period: a prospective study. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 1219–1225.
- Jeong, S.M., Choi, B.H., Kim, J., Lee, D.H., Xuan, F., Mo, D.Y. & Lee, C.U. (2011) Comparison of flap and flapless procedures for the stability of chemically modified sla titanium implants: an experimental study in a canine model. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **111**: 170–173.
- Kan, J.Y., Rungcharassaeng, K. & Lozada, J. (2003) Immediate placement and provisionalization of maxillary anterior single implants: 1-year prospective study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **18**: 31–39.
- Kim, J.I., Choi, B.H., Li, J., Xuan, F. & Jeong, S.M. (2009b) Blood vessels of the peri-implant mucosa: a comparison between flap and flapless procedures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **107**: 508–512.
- Kim, B.S., Kim, Y.K., Yun, P.Y., Yi, Y.J., Lee, H.J., Kim, S.G. & Son, J.S. (2009a) Evaluation of peri-implant tissue response according to the presence of keratinized mucosa. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **107**: e24–e28.
- Kohal, R.J., Mellas, P., Hürzeler, M.B., Trejo, P.M., Morrison, E. & Caffesse, R.G. (1998) The effects of guided bone regeneration and grafting on implants placed into immediate extraction sockets. an experimental study in dogs. *Journal of Periodontology* **69**: 927–937.
- Linkevicius, T., Apse, P., Grybauskas, S. & Puisys, A. (2009) The influence of soft tissue thickness on crestal bone changes around implants: a 1-year prospective controlled clinical trial. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **24**: 712–719.
- Linkevicius, T., Apse, P., Grybauskas, S. & Puisys, A. (2010) Influence of thin mucosal tissues on crestal bone stability around implants with platform switching: a 1-year pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **68**: 2272–2277.
- Misch, C.E., Perel, M.L., Wang, H.L., Sammartino, G., Galindo-Moreno, P., Trisi, P., Steigmann, M., Rebaudi, A., Palti, A., Pikos, M.A., Schwartz-Arad, D., Choukroun, J., Gutierrez-Perez, J.L., Marenzi, G. & Valavanis, D.K. (2008) Implant success, survival, and failure: the international congress of oral implantologists (icoi) pisa consensus conference. *Implant Dentistry* **17**: 5–15.
- Muller, R., Hildebrand, T., Hauselmann, H.J. & Rueggsegger, P. (1996) In vivo reproducibility of three-dimensional structural properties of noninvasive bone biopsies using 3d-pqct. *Journal of Bone and Mineral Research* **11**: 1745–1750.
- Novaes, A.B., Jr., Barros, R.R.M., Papalexou, V. & Almeida, A.L.G. (2011a) Buccal bone loss after immediate implantation can be reduced by the flapless approach. *Journal of Osseointegration* **3**: 45–55.
- Novaes-Jr, A.B., Suaid, F.A., Queiroz, A.C., Muglia, V.A., Souza, S.L., Palioto, D.B., Taba-Jr, M. & Grisi, M.F. (2012) Buccal bone plate remodeling after immediate implant with and without synthetic bone grafting and flapless surgery. Radiographic study in dogs. *Journal of Oral Implantology* **38**: 687–698.
- Paolantonio, M., Dolci, M., Scarano, A., d'Archivio, D., di Placido, G., Tumini, V. & Piattelli, A. (2001) Immediate implantation in fresh extraction sockets. A controlled clinical and histological study in man. *Journal of Periodontology* **72**: 1560–1571.
- Sclar, A.G. (2007) Guidelines for flapless surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **65**: 20–32.
- Seibert, J. & Lindhe, J. (1997) Esthetics in periodontal therapy. In: *Textbook of Clinical Periodontology*, 3rd edition, 647–681. Copenhagen, Munksgaard.
- Spinato, S., Galindo-Moreno, P., Zaffe, D., Bernardello, F. & Soardi, C. M. (2012) Is socket healing conditioned by buccal plate thickness? A clinical and histologic study 4 months after mineralized human bone allografting *Clinical Oral Implants Research* doi: 10.1111/clr.12073.
- Spray, J.R., Black, C.G., Morris, H.F. & Ochi, S. (2000) The influence of bone thickness on facial marginal bone response: stage 1 placement through stage 2 uncovering. *Annals of Periodontology* **5**: 119–128.
- Suaid, F. A., Novaes, A. B., Jr., Queiroz, A. C., Muglia, V. A., Almeida, A. L. & Grisi, M. F. (2012) Buccal bone plate remodeling after immediate implants with or without synthetic bone grafting and flapless surgery: a histomorphometric and fluorescence study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **0000**: 0000–0000.
- Tomasi, C., Sanz, M., Cecchinato, D., Pietrusson, B., Ferrus, J., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2010) Bone dimensional variations at implants placed in fresh extraction sockets: a multilevel multivariate analysis. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 30–36.
- Watzek, G., Haider, R., Mensdorff-Pouilly, N. & Haas, R. (1995) Immediate and delayed implantation for complete restoration of the jaw following extraction of all residual teeth: a retrospective study comparing different types of serial immediate implantation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **10**: 561–567.
- Wood, D.L., Hoag, P.M., Donnenfeld, O.W. & Rosenfeld, L.D. (1972) Alveolar crest reduction following full and partial thickness flaps. *Journal of Periodontology* **43**: 141–144.

ARTIGO II EM INGLÊS

Influence of Periodontal Biotype on Buccal Bone Remodeling after Tooth Extraction Using the Flapless Approach with a Xenograft: A Histomorphometric and Fluorescence Study in Small Dogs

Luciana Prado Maia, MScD;* Danilo Maeda Reino, MScD;* Arthur Belém Novaes Jr, DSc;†

Valdir Antonio Muglia, DSc;‡ Mário Taba Jr, DSc;§ Márcio Fernando de Moraes Grisi, DSc;§

Sérgio Luís Scombatti de Souza, DSc;§ Daniela Bazan Palioto, DSc§

ABSTRACT

Background: Several approaches have been used to counteract alveolar bone resorption after tooth extraction.

Purpose: The aim of the present study was to evaluate the influence of gingival thickness and bone grafting on buccal bone remodeling in extraction sockets with thin buccal bone, using a flapless approach.

Materials and Methods: The gingiva of 8 dogs was thinned at one side of the mandible and mandibular premolars were extracted without flaps. The sockets were randomly assigned to the test group (thin gingiva) (TG), the test group with grafting material TG + GM, the control group (normal gingiva) (CG), or the control group with grafting material CG + GM. Ground sections were prepared from 12-week healing biopsies, and histomorphometry and fluorescence analysis were performed.

Results: In the groups with thin gingiva, numerically greater buccal bone loss was observed, while there were no differences between grafted and nongrafted sites. A numerically higher rate of mineralization was observed for the grafted sites, as compared with the nongrafted sites, at 12 weeks.

Conclusions: A thin buccal bone plate leads to higher bone loss in extraction sockets, even with flapless surgery. The gingival thickness or the use of a graft material did not prevent buccal bone resorption in a naturally thin biotype, but modified the mineralization process.

KEY WORDS: alveolar bone remodeling, animal model, extraction socket, flapless implant surgery, xenograft

During the healing process of an extraction socket a series of events occurs, including the formation and maturation of a coagulum that will be subsequently

replaced by a provisional matrix and woven bone.¹⁻³ Further, the socket walls will be resorbed and gradually remodeled, and the distinct outline of the extraction socket will disappear.⁴ When, during healing, a cortical ridge is established in the entrance of the socket, the immature woven bone is remodeled and replaced by lamellar bone and marrow.⁵

*Doctoral student of periodontology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; †chairman of periodontology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ‡professor of prosthodontics, Department of Dental Materials and Prosthetics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; §associate professor of periodontology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Reprint requests: Ms. Luciana Prado Maia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida do Café – s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: lucianapmaia@gmail.com

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

DOI 10.1111/cid.12182

Alveolar bone resorption after tooth extraction is an inherent condition of the healing process, and the edentulous site of the alveolar process will undergo marked alterations of height and width.⁴⁻⁸ The healing process following tooth removal apparently results in more pronounced resorption of the buccal aspect of the ridge than of the lingual/palatal aspect.^{4,5} The higher bone density, represented by the lower number of marrow spaces, in association with the thinner aspect of the buccal bone plates, makes them more fragile to absorb compared with the lingual bone plates.⁹ Further, the processes resulting in tissue reduction seem to be more pronounced during the initial phase of wound healing than during later periods following tooth removal.^{4,8}

Several investigations have been performed to establish the real scale of the resorption. A recent meta-analysis on socket preservation therapies reports ridge reductions of 2.6 to 4.5 mm in width and 0.4 to 3.9 mm in height in naturally healed sockets.¹⁰ These reductions complicate ideal implant positioning and affect the predictability of esthetic outcomes, particularly in anterior areas.¹¹ At the moment, the main focus of treating the extraction socket must be to preserve the tissue volume to a certain extent and improve the soft tissue conditions for delayed implant placement.

Therefore, various graft materials, including autogenous bone, bioactive glass, coralline calcium carbonate, decalcified freeze-dried bone, deproteinized bovine bone, and hydroxyapatite, have been used in attempts to preserve the alveolar ridge following tooth extraction.¹²⁻²² One particular xenogenic graft composed of deproteinized bovine bone mineral is the material of which use in socket preservation procedures is most frequently reported in the literature.^{13,16,17,19} This biomaterial acts as a scaffold for new bone formation.^{23,24} Some authors have reported good osseointegration, resorption, and replacement of the graft particles with bone tissue,²⁴ while in some cases fibrous encapsulation of the biomaterial²⁵ and incorporation with minimal resorption^{12,17,25} have been observed. This same deproteinized bovine bone mineral combined with collagen (Bio-Oss Collagen [BOC], Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) has been recently introduced in dentistry. This biomaterial seems to modify modeling and counteract marginal ridge contraction that occurs following tooth removal.¹² Despite the promising results, conflicting data exist on the outcome of placing BOC in extraction sockets, and

some authors disagree with the potential of the biomaterial to limit the postoperative contour shrinkage.^{6,26-29}

Ten Heggeler and colleagues¹⁰ emphasized the scarcity of data on socket preservation therapies in humans. These authors concluded that socket preservation techniques do not prevent bone resorption but may reduce it, with consequent superior results to those recorded in cases of natural healing. Nevertheless, other aspects must be observed in an attempt to reduce the bone loss after tooth extraction, such as the initial thickness of the soft tissue and buccal bone plate and the surgical approach used.

The influence of mucosal thickness and biologic width formation on tissue health maintenance and bone wall preservation around implants has recently been discussed. The term *periodontal biotype* was introduced by Seibert and Lindhe³⁰ to describe the thickness of the gingiva in the buccolingual dimension, and this is an important aspect in the maintenance of gingival health. Although it seems to be an important factor for oral rehabilitation, research regarding the effects of gingival thickness on bone remodeling after tooth extraction is lacking.

The initial thickness of the buccal bone plate in the extraction socket seems to have a significant influence on the amount of horizontal and vertical crest resorption in human sockets.³¹⁻³³ Sites with thin buccal bone plate (≤ 1 mm) present more height and width of bone loss after extraction of maxillary anterior teeth.³² The literature showed that hard tissue changes during healing are consistently dependent on the baseline characteristics. Therefore, the degree of crestal resorption is dependent on the thickness of the buccal/palatal bone walls.^{31,33}

The surgical approach is another important aspect that must be considered. Surgical trauma that includes the separation of the periosteum and the rupture of the connective tissue attachment at the bone surface will induce remodeling of the alveolar bone surface layer in the exposed area.^{34,35} In a histological analysis of sites following tooth extraction with a full-thickness approach, osteoclasts were indeed present in the exposed area of the alveolar ridge, which exhibited signs of surface resorption.⁴ This may, in part, explain the marked dimensional alterations after tooth extraction demonstrated in the above-cited study. On the other hand, leaving the periosteum in place decreases the resorption rate of the extraction socket.³⁶

Based on this, the aim of the present histomorphometric and fluorescence study was to evaluate the influence of a thin periodontal biotype on buccal bone plate remodeling in extraction sockets following a flapless approach, associated or not associated with xenografts. Also, the dynamics of early bone healing were investigated.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Randomization Procedure

This study was conducted after the approval of the Animal Experimental Ethics Committee (protocol number 11.1.138.53.6). Eight beagle dogs, around 1 year old and weighing on average 11.5 kg, were used. Such small dogs were selected to ensure that all of them would present thin buccal bone plates. All selected animals had normal mandibles, no generalized occlusal trauma, no viral or fungal mouth lesions, good overall health, and no systemic compromises attested by veterinary exams.

The dogs were immunized with vaccines, received antiparasitic treatment, and were submitted to dental prophylaxis using ultrasonic points (Cavitron 3000, Dentsply York, PA, USA) for removal of dental calculus and biofilm.

A computer-generated random permuted block was used to allocate each side of each mandible to one of the four experimental groups – test group (TG; thin gingiva), test group with grafting material (TG + GM), control group (CG, normal gingiva), and control group with grafting material (CG + GM).

Presurgical Procedures

In the first stage of this study, on the test side, the buccal mucosa of the teeth scheduled for surgery was thinned using a high-speed bur (gingival peeling) (Figure 1), while the control side was left without alteration in tissue thickness. Four weeks after the gingival peeling, the gingiva of the test side had become

Figure 1 Gingival peeling: A, Initial aspect of the mucosa; B, The buccal mucosa of the teeth scheduled for surgery was thinned using a high-speed bur; C, Aspect of the mucosa immediately after the gingival peeling; D, Aspect of the mucosa 7 days after the gingival peeling; E, Gingival aspect at the moment of implant placement of the test group, showing the visible lower gingival thickness in the test group; F, Gingival aspect at the moment of implant placement of the control group.

similar to the control side of the mandible and another gingival peeling was carried out, followed by weekly traumatic brushing in an attempt to maintain the thinness of keratinized tissue on the test side. Eight weeks after the second gingival peeling, a statistically significant difference between test and control sides in keratinized tissue thickness was observed (see Figure 1, E and F), and the dogs were ready for the surgery procedure. During these procedures, the animals were anesthetized with intravenously administered zolazepam (0.1 mL/kg; Zoletil 50®, Verbac, São Paulo, São Paulo, Brazil) and acepromazine (2.0%; Acepran®, Univet, São Paulo, São Paulo, Brazil).

Clinical Parameters

The clinical parameters evaluated were thickness of keratinized tissue (TKT), alveolar thickness (AT), and buccal bone thickness (BBT). All clinical assessments were recorded by the same calibrated experienced periodontist (L.P.M.).

TKT and AT were assessed with the aid of an acrylic stent to determine the exact measurement sites before the first gingival peeling (T_0) and immediately before tooth extraction (T_1). The TKT was assessed using an anesthetic needle attached to a silicone disk stop. The needle was placed in an orifice in the acrylic stent, 3 mm below the gingival margin, and inserted perpendicular to the mucosa surface through the soft tissue with light pressure until a hard surface was felt. The AT was assessed using a surgical micrometer, also in the orifice of the acrylic stent. The penetration depth of both the needle and the micrometer was measured using a digital caliper with 0.05-mm resolution.

The BBT was assessed using a surgical micrometer during the surgery, after tooth extractions, and the penetration of the micrometer was measured using a digital caliper with 0.05-mm resolution.

Surgical Procedures

The surgical procedures were performed by a single experienced surgeon 12 weeks after the first gingival peeling (see "Presurgical Procedures").

The animals were kept on fast starting the night preceding the surgical procedures. For the surgery itself, the dogs were preanesthetized with 10% zolazepam (0.10 mL/kg) and acepromazine (2.0%). Anesthesia was maintained using volatile anesthetics, so the animals were submitted to tracheal intubation with a Magill probe for adaptation of the anesthetic device and for administration of oxygen-diluted volatile isoflurane (2% v/v; Isothane®, Baxter Hospitalar, São Paulo, São Paulo, Brazil). Additionally, local anesthesia was used on the premolar regions.

After local anesthesia, the four lower bicuspid (premolars) on both sides of the mandible were extracted without flap elevations (flapless). The teeth were buccolingually sectioned (Figure 2A), and the roots were carefully removed (see Figure 2B), avoiding damage to the alveolar bone walls. After tooth extractions, the BBT was assessed using a surgical micrometer. The mesial sockets of the second (P2) and the fourth (P4) premolars on both quadrants of the mandible were selected for the experiment. This procedure was also part of another study, and the remaining sockets were used for immediate implantation evaluation. As buccolingual sections of the middle portions of the experimental sites were evaluated in both studies, using the dogs for two experiments had no detrimental effects on the experimental model. Randomly, one socket in each hemimandible received xenografts (BOC) to fill the fresh extraction socket, while in the other socket a blood clot was allowed to form in the empty alveolus (see Figure 2C). Following this, the wounds were sutured with 5-0 nylon suture on both sides of the mandible.

For postoperative care, tramadol chlorhydrate (50 mg/mL; Tramal®, União Química Farmacêutica

Figure 2 A, Hemi-section of the bicuspid. B, Sockets after tooth extraction. C, Arrows indicate the blood clot in the P2 mesial socket and the bone graft in the P4 mesial socket.

Nacional, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brazil) was used at a dose of 3 mg/kg every 12 hours for 3 days as analgesic therapy, and meloxicam (2 mg/20 kg; Maxicam®, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, São Paulo, Brazil) was used for 5 days as anti-inflammatory therapy. The animals also received spiramycin (750,000 IU/10 kg) and metronidazole (125 mg/10 kg) (Stomorgyl® 10, Merial Saúde Animal, Paulínia, São Paulo, Brazil) for 10 days as antibiotic therapy. Seven days later the sutures were removed. The animals were maintained on a soft ration diet for 15 days, and healing control was performed daily with a topical application of 0.12% chlorhexidine to limit microbial biofilm adherence. The remaining teeth were cleaned monthly with ultrasonic points.

During the healing period, four different fluorescent bone markers were administered in order to observe the degree and extension of bone mineralization. One week after tooth extraction, 20 mg calcein green/kg body weight was administered i.v. in each dog; at 2 weeks, 20 mg alizarin red/kg body weight was administered i.v.; at 4 weeks, 20 mg tetracycline/kg body weight was administered i.v.; and at 12 weeks, 20 mg calcein blue/kg body weight was administered i.v. (all dyes from Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). All dyes were prepared immediately before use with 2% sodium bicarbonate or saline. After preparation, pH was adjusted to 7.4 and the solution was filtered through a 0.45- μ m filter (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Each dog received a total dose of 3 mL.

Twelve weeks after implant placement, the animals were sacrificed by induction of deep anesthesia with

a subsequent intravenous sodium thiopental and potassium chloride overdose. The hemimandibles were removed, dissected, cut, and fixed in 4% phosphate-buffered formalin (pH 7) until processing. The specimens were dehydrated in increasing concentrations of alcohol up to 100%, infiltrated, and embedded in LR White resin (London Resin Company, Berkshire, UK) and hard-sectioned using the technique described by Donath and Breuner 37. From each alveolus unit, one buccolingual section representing the central area of the site was prepared. The sections were reduced to a thickness of about 25 μ m by microgrinding and polishing. The sections were prepared for fluorescence analysis and then for histomorphometry after being stained with alizarin red for optic microscopic analysis.

Histomorphometric Analysis

Buccolingual longitudinal histological sections from each socket were analyzed on a Leica DM LB2 microscope outfitted with a Leica DC300F digital camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The images were analyzed through the Leica Application Suite v. 4.1 by a single examiner.

The buccal crest level (BCL) was determined as a linear vertical measurement in two different regions: as an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of the newly formed bone in the buccal crest (BCL-NB), and as an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of the “old bone” in the buccal crest (BCL-OB) (Figure 3A).

Figure 3 Histological images representing the morphometric measurements. A, The level of the buccal bone crest (B) in relation to the lingual bone crest (L) was determined as a linear vertical measurement in two different regions: as an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of the newly formed buccal bone (black line), and as an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of the “old bone” (white line). B, Alveolar ridge width was analyzed 1 mm below the highest point of the bone in the socket. C, Histological bone density was determined within a 30 mm² rectangle that comprised the region of the defect. The areas of connective tissue (CT), new bone (NB), and old bone (OB) were measured. (Magnification $\times 1.6$.) Alizarin red stain.

The alveolar ridge width (ARW) was determined as a linear horizontal measurement, between both the buccal and lingual external walls, as an imaginary line 1 mm below the highest point of the bone in the socket (see Figure 3B).

The bone area was determined within a rectangle that comprised the region of the socket (30 mm²), measured starting with the highest point of the socket. These measurements evaluated the percentage of the region occupied by mineralized bone in relation to the percentage occupied by marrow spaces. The connective tissue (CT), total bone area (TBA), and new bone area (NBA) were measured. Finally, the percentage of the sockets occupied by residual graft particles (RGP) was measured (see Figure 3C).

Fluorescence Analysis

Fluorescence microscopic images were longitudinally captured from each sample through a Leica DC300F video camera joined to a Leica DM LB2 microscope, using appropriate barrier filters. The wavelength filters used were I3 for calcein green (excitation level 450–490 nm), N2-1 for alizarin red (excitation level 515–560 nm), D for tetracycline (excitation level 355–425 nm), and A for calcein blue (excitation level 340–380 nm). All the images were adjusted and analyzed with Leica QWin software (Leica Microsystems) to determine the percentage of the alveoli occupied by marked bone. Thus, one rectangle comprising the region of the socket (30 mm², from the highest point of the socket) was used to evaluate the percentage of space occupied by fluorescent bone. The marked bone measurements evaluated the percentage of the total area occupied by fluorescent bone.

Statistical Analysis

Quantitative data were recorded as mean and standard deviations. The experimental unit was the dog ($n = 8$). To verify the normality of the data, the Kolmogorov-Smirnov test was used. For the parametric data (BBT, TKT, AT, and histomorphometric analysis), the one-way ANOVA was used for intragroup (T_0 vs. T_1) and intergroup (TG vs. TG + GM vs. CG vs. CG + GM) comparisons. For the nonparametric data (fluorescence analysis), the Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks was applied for intergroup comparisons. A confidence interval of 95% was adopted. SigmaStat (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) version 3.5 was the statistical software used for the analysis.

RESULTS

Clinical Findings

The healing was uneventful, and there were no complications during the experimental period.

Clinical Analysis

Data regarding the TKT, the AT, and the BBT are summarized in Table 1. There was no statistically significant difference in mean TKT among the groups at baseline. In TG and TG + GM the mean TKT was significantly decreased from T_0 to T_1 (TG: $p < .001$; TG + GM: $p = .004$). For CG and CG + GM, the mean TKT observed at T_0 remained stable until T_1 , with no statistically significant changes. This reduction in the mean TKT in TG and TG + GM resulted in statistically significant differences between these groups and the control groups (CG and CG + GM) at T_1 ($p < .001$) (see

TABLE 1 Thickness Measurements before Gingival Peeling (T_0) and at Tooth Extraction (T_1) (Mean $\pm$ SD): Intragroup and Intergroup Comparisons

	T_0	T_1	p Value
TKT (mm)			
TG	1.24 $\pm$ 0.13 ^A	0.73 $\pm$ 0.16 ^{Ba}	<0.001
TG + GM	1.19 $\pm$ 0.22 ^A	0.78 $\pm$ 0.14 ^{Ba}	0.004
CG	1.20 $\pm$ 0.19	1.16 $\pm$ 0.13 ^b	NS
CG + GM	1.18 $\pm$ 0.28	1.16 $\pm$ 0.14 ^b	NS
p Value	NS	<.001	
AT (mm)			
TG	3.39 $\pm$ 0.96	3.08 $\pm$ 0.46	NS
TG + GM	3.64 $\pm$ 0.86	3.44 $\pm$ 0.64	NS
CG	3.73 $\pm$ 1.00	3.15 $\pm$ 0.45	NS
CG + GM	3.39 $\pm$ 0.58	3.04 $\pm$ 0.61	NS
p Value	NS	NS	
BBT (mm)			
TG	—	0.53 $\pm$ 0.12	
TG + GM	—	0.55 $\pm$ 0.11	
CG	—	0.49 $\pm$ 0.19	
CG + GM	—	0.53 $\pm$ 0.06	
p Value		NS	

One-way ANOVA with Tukey's test. Different superscript letters represent statistically significant difference ($p < .05$).

^{A,B}Intragroup comparisons.

^{a,b}Intergroup comparisons.

TKT = thickness of keratinized tissue; AT = alveolar thickness; BBT = buccal bone thickness; TG = test group; CG = control group; GM = graft material; NS = not statistically significant.

Table 1). For the AT, there were no statistically significant differences among the groups at any point of the experiment (see Table 1). A low BBT was observed in all the experimental groups, with no statistically significant differences among the groups (see Table 1).

Histological Analysis

In general, the dense hard tissue walls of the alveolar process enclosed a large central area that was occupied by bone marrow and newly formed bone (Figures 4 and 5). All the groups showed the presence of parent lamellar bone, representing the “old bone”, and an area of newly formed bone, characterized as parallel-fibered bone (Figures 4–7). In addition, in the grafted groups, residual graft particles were present in the socket (see Figures 5 and 7).

The newly formed bone extended from the lateral walls of the extraction site and migrated towards the middle portion, being present mostly in the center of the socket areas of all the groups. The interface between this structure and the parent lamellar bone was evident (see Figures 6 and 7). The new bone presented a lamellar pattern with parallel fibers, but in some areas, bone with interlaced fibers (woven bone) was present (see Figure 6B). In some areas, the surface of the new bone was accompanied by a layer of osteoblasts and osteoid matrix representing the remodeling process (see

Figure 4B). In all areas of the socket, multinucleated cells (osteoclasts) could occasionally be observed on the surface of this new bone (see Figure 4B).

In the grafted groups, a small number of residual particles were dispersed in the middle region and surrounded by newly formed bone (see Figures 5 and 7). In some cases, the particles were lined/circumscribed by the newly formed bone, with direct contact between the structures (see Figure 5B). In other cases, the particles were surrounded by a fibrous connective tissue that differed from the native bone marrow (see Figure 5B). The marginal portion of the socket was occupied by newly formed bone in the control group and newly formed bone plus graft particles in the test groups. Both groups presented new bone in the coronal portion that “closed” the socket entrance.

Histomorphometric Results

It was observed that, in summary, all the groups presented similar results, with no statistically significant differences in any of the parameters evaluated (Tables 2 and 3).

BCL-NB in the control groups (normal gingiva) was numerically better as compared with the test groups (thin gingiva), but without statistical relevance. No differences between the groups that received the graft material and those that did not were observed. The

Figure 4 Histological images of the nongrafted sites. A, Note that the entrance of the socket was “closed” by a bridge of mineralized bone that connected the buccal (B) and lingual (L) crests. The coronal, middle, and apical areas were filled by new bone (NB) and connective tissue (CT). The red line separates the old bone (OB) from the newly formed hard tissue (NB) (magnification $\times 1.6$). B, At a higher magnification ($\times 20$), the specific area of new bone shows aspects of immaturity, with the presence of osteoblasts (OB) and osteoclasts (OC), indicating ongoing bone remodeling. Alizarin red stain.

Figure 5 Histological images of the grafted sites. *A*, The fresh extraction socket was grafted with a synthetic bone graft. The residual graft particles (RGPs, brown stain) were embedded in newly formed bone (NB) and fibrous connective tissue (CT). Note that the biomaterial occupied a large portion of the socket entrance, which was “closed” by a bridge of mineralized bone and graft material. The red line separates the old bone (OB) from the newly formed hard tissue (NB) (Magnification $\times 1.6$.) *B*, The circumscribed area in a higher magnification ($\times 20$), the presence of some RGPs lined/circumscribed by the newly formed bone (NB) was more evident, with direct contact between the structures, while other RGPs were surrounded by fibrous connective tissue (CT). Alizarin red stain.

BCL-OB and the ARW were very similar for the groups and without statistical relevance (see Table 2).

The total area of the frame (100%) was divided into connective tissue and bone area. All the experimental groups showed around 50% connective tissue and 50%

bone area, on average, without any statistically significant difference. The new bone area represented around 35% of the total frame, also without any statistically significant difference among the experimental groups (see Table 3).

Figure 6 Histological images of the nongrafted sites. *A*, Note the difference between the new bone (NB) and the old bone (OB). The structures are connected by remodeling tissue. *B*, Under polarized light, it was possible to observe the presence of the old bone (OB) with its lamellar pattern, and the newly formed bone (NB) with areas of interlaced fibers (woven bone, WB) and parallel fibers (PF). Alizarin red stain. (Magnification $\times 20$.)

Figure 7 Histological images of the grafted sites. *A*, Note the difference between the new bone (NB) and the old bone (OB). The structures are connected by remodeling tissue. *B*, Under polarized light, it was possible to observe the presence of the old bone (OB), with its lamellar pattern, and the newly formed bone (NB). Alizarin red stain. (Magnification $\times 20$.)

TABLE 2 Intergroup Comparisons for Linear Measurements (Mean $\pm$ SD)			
	BCL-NB (mm)	BCL-OB (mm)	ARW (mm)
TG	0.73 ± 0.53	1.48 ± 0.81	3.61 ± 0.59
TG + GM	0.95 ± 0.37	1.76 ± 0.86	4.24 ± 0.53
CG	0.40 ± 0.28	1.16 ± 0.60	4.11 ± 0.58
CG + GM	0.64 ± 0.33	1.66 ± 0.53	4.01 ± 0.44
<i>p</i> Value	NS	NS	NS

One-way ANOVA ($p < .05$).

BCL-NB = buccal crest level of new bone; BCL-OB = buccal crest level of old bone; ARW = alveolar ridge width; TG = test group; CG = control group; GM = graft material; NS = not statistically significant.

The percentage of residual graft particles in the groups that received graft material was $2.63 \pm 2.63\%$ for TG + GM and 1.98 ± 2.48 for CG + GM, indicating that part of this biomaterial was resorbed or lost and part was present inside the socket (see Table 3).

Fluorescence Results

The analysis under fluorescent microscopy showed intense bone remodeling for all the groups evaluated. The old bone was always darker and without labeling, while alizarin red showed a red color in a smeared, diffuse pattern; calcein green showed green bands;

TABLE 3 Intergroup Comparisons for Percentage-Area Measurements (Mean $\pm$ SD)				
	CT (%)	TBA (%)	NBA (%)	RGP (%)
TG	51.85 ± 9.29	55.78 ± 8.92	37.46 ± 9.28	—
TG + GM	54.50 ± 6.09	52.05 ± 4.50	35.33 ± 3.03	2.63 ± 2.63
CG	51.55 ± 7.74	53.55 ± 6.87	39.39 ± 7.24	—
CG + GM	51.52 ± 9.93	51.64 ± 8.60	35.59 ± 7.17	1.98 ± 2.48
<i>p</i> value	NS	NS	NS	

One way ANOVA ($p < .05$).

CT = connective tissue; TBA = total bone area; NBA = new bone area; RGP = residual graft particles; TG = test group; CG = control group; GM = graft material; NS = not statistically significant.

Figure 8 Histological images representing the fluorescence analysis. New bone formation was determined histomorphometrically by quantification of the bone markers. The old bone always appeared darker and without labeling. A, Calcein green was generally represented by clearly evident green bands; B, Alizarin red had a red color in a smeared diffuse pattern; C, Tetracycline showed thin yellow-green lines; D, Calcein blue was characterized by a blue color in a very diffuse pattern. (Magnification $\times 1.6$.)

tetracycline showed thin yellow-green lines; and, finally, calcein blue was characterized by a blue color in a very diffuse pattern (Figure 8).

New bone mineralization was determined histomorphometrically by quantification of the bone markers. Sequentially, they represented the healing pattern of each different group. The percentages of space occupied by newly formed bone are described in Table 4. The mean values for the mineralization rate gradually increased over the experimental periods, with the largest increase from 2 to 4 weeks. The mineralization rate reached the highest values at week 12, except for the CG, which showed a slight decrease from 4 to 12 weeks (Figure 9). These data did not reveal any statistically significant differences among the experimental groups, but at 12 weeks the mineralization rate was numerically higher for the grafted groups (TG + GM and CG + GM) as compared with the nongrafted groups (TG and CG).

DISCUSSION

Different approaches have been advocated to preserve or improve the dimension and contour of the ridge following tooth extraction. The present study evaluated the influence of the periodontal biotype on buccal bone remodeling in extraction sockets following a flapless approach. This process was also compared between sites that were or were not grafted with xenografts.

It is important to note that this study was conducted in small beagle dogs with a thin periodontal biotype. All the dogs used in the study presented a thin buccal bone plate at the moment of tooth extractions, measuring about 0.5 mm on average. The presurgical procedures succeeded in reducing the gingiva of the test groups to a critical thickness, from 1.2 mm to 0.8 mm on average ($p < .05$). Despite the significant reduction in gingival thickness, there were no statistically significant changes in AT.

TABLE 4 Fluorescence Analysis: Intergroup Comparisons of the Percentages of the Alveoli Occupied by Newly Formed Bone over the Period of Evaluation (Mean $\pm$ SD)

	Rate of Mineralization (%)			
	1 Week	2 Weeks	4 Weeks	12 Weeks
TG	0.41 $\pm$ 0.21	0.87 $\pm$ 0.46	4.65 $\pm$ 3.44	6.37 $\pm$ 2.43
TG + GM	0.62 $\pm$ 0.37	1.06 $\pm$ 0.69	4.06 $\pm$ 1.99	7.65 $\pm$ 4.34
CG	0.81 $\pm$ 0.47	1.07 $\pm$ 1.32	5.72 $\pm$ 4.07	5.52 $\pm$ 2.32
CG + GM	0.82 $\pm$ 0.56	3.6 $\pm$ 4.43	4.04 $\pm$ 1.42	8.39 $\pm$ 4.89
<i>p</i> Value	NS	NS	NS	NS

Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks ($p < .05$).

TG = test group; CG = control group; GM = graft material; NS = not statistically significant.

Figure 9 Percentages of the sockets occupied by newly formed bone for the experimental groups over the period of evaluation.

The buccal crest level in all specimens was slightly apical to the corresponding lingual bone crest. All the groups showed new bone formation above the old bone crest level, reducing the differences between the buccal and lingual crests during the healing period. No statistically significant difference was observed between the test groups (thin gingiva, TG and TG + GM) and the control groups (normal gingiva, CG and CG + GM), but the distance between buccal and lingual crests was numerically superior for the test groups, mainly in relation to the new bone. This difference, although it is small, and despite this being an animal study and therefore using a small sample size, may have clinical implications. Both animal³⁸ and human trials^{39–41} that evaluated the influence of thin ridge mucosal tissues on crestal bone stability around dental implants reported more pronounced crestal bone loss in cases with insufficient gingiva. The results of the current experiment suggest that the influence of gingival thickness on bone healing occurs after tooth extraction, independently of implant placement.

No difference between grafted (CG + GM: 0.40 ± 0.28 mm) and nongrafted (CG: 0.64 ± 0.33 mm) sites was observed in our study regarding the distance between the buccal and lingual crests. Similar results have been reported in the literature.^{22,42,43} Bashara and colleagues⁴² studied the effect of different biomaterials on hard tissue remodeling following their placement into fresh extraction sockets in dogs after 6 months of healing, and reported a similar amount of vertical buccal bone loss in sites treated with bovine bone (Bio-Oss) (0.65 ± 0.40 mm) and sites that healed with a blood

clot (0.70 ± 0.35 mm). Rothamel and colleagues,⁴³ evaluating the alterations in ridge dimensions following application of a nanocrystalline hydroxyapatite paste in fresh extraction sockets in dogs, observed a difference in bone height between buccal and lingual bone of 0.54 ± 0.62 mm in grafted sites and 0.85 ± 0.17 mm in nongrafted sites at 3 months of healing. Suaid and colleagues²² also reported low bone loss in extraction sockets grafted with biphasic calcium phosphate. The authors reported a buccal bone level of 0.26 ± 0.67 mm apical to the lingual bone in grafted sites and 0.80 ± 1.14 mm apical in the nongrafted sites. On the other hand, Araújo and colleagues,²⁶ who assessed the effect on bone remodeling following the placement of the same xenograft in fresh extraction sockets in dogs, found a mean vertical distance between the buccal and lingual bone crests of 2.1 ± 0.5 mm at nongrafted sites and 1.9 ± 0.6 mm at grafted sites. These values, higher compared with ours, could be attributed to the flap elevation performed in that study.

The advantageous effects of tooth extraction without the elevation of a mucoperiosteal flap on bone remodeling of extraction sockets were analyzed by Fickl and colleagues²⁸ in an animal model. The authors demonstrated significantly lower resorption rates in the flapless group. Also, Araújo and colleagues¹² compared hard tissue healing following tooth extraction with and without prior elevation of mucosal full-thickness flaps and found better results for the flapless approach regarding the distance between the cementum/enamel junction of the adjacent tooth and the bone crest (flap: 1 ± 0.1 mm; flapless: 0.7 ± 0.2 mm).

It is important to highlight that although many studies evaluating the effect of the use of a biomaterial graft after tooth extraction on bone remodeling did not show statistically significant differences between grafted and nongrafted sites, most of them reported better numerical values for the grafted groups.^{22,26,42,43} Also, recently published systematic reviews of the literature have concluded that socket preservation may aid in reducing the changes in bone dimensions following tooth extraction, although it does not prevent bone resorption, as a loss in width and height will probably occur.^{10,44} In the current study this was not observed, probably due to the thin aspect of the buccal bone.

The ARW, measured 1 mm below the highest point of the bone in the socket, was very similar among the groups, approximately 4 mm. Suaid and colleagues,²² with a similar methodology, reported 5.2 mm and 5.0 mm for grafted and nongrafted sites, respectively. These values, higher than those presented in this study, make it clear that our dogs were smaller and, consequently, with thinner oral tissues.

In a clinical study, Spinato and colleagues³² observed significant reductions in both crestal height and ridge width after extraction of maxillary anterior teeth with the use of a cancellous mineralized human bone allograft. However, in the group that did not receive the graft material, the sites with thin buccal bone plate (≤ 1 mm) presented more loss in height as well as in width. Additionally, in nongrafted sockets, the amount of bone in the "thick" group was statistically greater than that in the "thin" group, indicating that the thickness of the buccal bone plate markedly influenced new bone regeneration in human sockets 4 months after extraction. Tomasi and colleagues³³ also stated that the thickness of the buccal bone wall influences hard tissue changes during healing.

A comparison of the variously treated sockets with respect to tissue composition (see Table 3) indicated that the process of tissue remodeling progressed according to the same pattern in all the experimental groups. This observation is in agreement with studies made previously with the same biomaterial.^{12,13} The similarity in the quantity of mineralized tissue between the groups with and without graft material indicates that at 3 months of healing BOC did not enhance healing and/or stimulate hard tissue formation in the socket, but served as a scaffold for tissue formation during healing. Regarding the new bone area, in our study around 30%

of the total bone area consisted of new bone in all experimental sites. Using a similar methodology, Suaid and colleagues²² observed 15.62% new bone to be in the grafted sites and 22.24% in the nongrafted sites. In this study, higher levels of new bone formation were obtained, which may be due to the thickness of the lingual and buccal bone plates and perhaps to the biomaterial that was used.

Furthermore, in this study, the histological examination revealed the presence of biomaterial, mainly in the coronal portion of the extraction sockets. Araújo and colleagues,²⁵ evaluating the dynamics of BOC incorporation in fresh extraction wounds, stated that it involves a series of different processes that eventually result in *de novo* bone formation and hard tissue integration of the biomaterial. Bashara and colleagues⁴² reported the presence of newly formed bone around particles of an inorganic bovine graft material at 6 months of healing, with little evidence of the inorganic biomaterial being replaced by bone. The same was observed by Araújo and Lindhe,¹² who also observed the presence of graft material in locations outside the bone tissue, such as in the oral mucosa. The authors suggested that during the modeling process of the outer portion of the crestal region, the particles may be dislodged from the newly formed bone. In the current experiment the residual particles occupied $2.63 \pm 2.63\%$ (TG + GM) and 1.98 ± 2.48 (CG + GM) of the tissue volume, which is a small amount compared with previous studies. Araújo and colleagues²⁶ and Araújo and Lindhe¹³ utilized the same grafting material and the same healing time and found 12.2% and 8.6% residual graft particles, respectively. It is conceivable that these particles would not have been resorbed in such a short period of time, and the hypothesis of the dislodgment of the particles could be a good explanation for the data observed. Also, it is important to emphasize that the use of a flapless approach could lead to a more pronounced exfoliation of the biomaterial, especially if the sockets were not covered with membranes or connective tissue, as in the present study. The graft material was in contact with the oral environment, and part of it could be lost during the healing process. Another important point to be discussed is that although the biomaterial has enhanced handling characteristics, it is composed of only 10% highly purified porcine collagen; the other 90% consists of bovine cancellous bone granules, which makes its compaction at the bottom of the socket hard to achieve.

Further, the study aimed to use fluorescence analysis to investigate the dynamics of early bone healing in fresh extraction wounds in thin buccal bone filled with BOC. The application of bone markers at different time points permits evaluation of bone formation and remodeling throughout the different stages of healing. Alizarin, calcein green, tetracycline, and calcein blue fluorochromes present different colors and supply sequential information when applied intercalated. The bone markers used in the present study can be compared because they bind to calcium ions by chelation,⁴⁵ correctly indicating the areas of active mineralization. The fluorochrome incorporation followed a pattern among the different groups over the period of evaluation from 7 days to 12 weeks. Similarly to the histomorphometric findings, comparison among the groups did not show statistically significant differences in the fluorescence analysis results. Generally, it was observed for all the experimental groups that the area of marked bone was slight in the first week and gradually increased at 2 and 4 weeks, reaching the highest values at the 12-week evaluation. According to Araújo and colleagues,²⁵ the first steps of bone remodeling in extraction sockets filled with BOC involved the presence of a clot containing large numbers of mesenchymal cells, leukocytes, and vascular structures, followed by the formation of woven bone. In the interval between 2 and 4 weeks, the rate of new bone formation is pronounced. These observations support the results found in the present study that showed an increase of almost four times in the mineralization rate from 2 to 4 weeks, except for the CG + GM. In the sequence of this ongoing process, at 4 weeks the woven bone in such locations is in the process of remodeling, indicating that the mineralization rate could continue to increase in the subsequent weeks. This continuous dynamic is also observed in naturally healed tooth extraction sockets, where there is a pronounced alteration of the tissue within the extraction socket between 4 and 8 weeks.⁴ At 8 weeks a cortical ridge is formed, sealing the entrance of the extraction site, and the woven bone is to a large extent replaced by lamellar bone and marrow.⁴ The results of the present study corroborate the findings in the literature, showing an increase in the mineralization rate between 4 and 12 weeks.

Also, although no statistically significant difference was observed among the groups regarding the mineralization rate, at 12 weeks it was numerically superior for the grafted groups. The results support the histo-

morphometric findings of previous studies,^{26,46} which stated that the placement of this biomaterial in an extraction socket may modify the modeling process that occurs following tooth removal.

CONCLUSION

Based on these findings, it can be speculated that a naturally thin buccal bone plate leads to higher bone loss in extraction sockets, even with flapless surgery. Reduction in gingival thickness did not result in a significant contribution to bone loss. The use of graft material did not prevent buccal bone resorption in a thin biotype, but modified the mineralization process that occurs following tooth removal.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Coordination for the Improvement of Graduated Personnel (CAPES) for the scholarship that supported Ms. Maia, the State of São Paulo Research Foundation for the financial support of this study (process number 11/00674-6) and Geistlich Pharma AG (Wolhusen, Switzerland) for the donation of the graft material used in this study.

REFERENCES

1. Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969; 27:309–318.
2. Kuboki Y, Hashimoto F, Ishibashi K. Time-dependent changes of collagen crosslinks in the socket after tooth extraction in rabbits. *J Dent Res* 1988; 67:944–948.
3. Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec* 1994; 240:492–506.
4. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005; 32:212–218.
5. Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2003; 30:809–818.
6. Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Stappert CF, Stein JM, Hurzeler MB. Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. *J Clin Periodontol* 2008; 35:906–913.
7. Mccall RA, Rosenfeld AL. Influence of residual ridge resorption patterns on implant fixture placement and tooth position. 1. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1991; 11:8–23.
8. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth

- extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; 23:313–323.
9. Novaes AB Jr, Macedo GO, Suaid FA, Barros RR, Souza SL, Silveira ESAM. Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. *J Periodontol* 2011; 82:872–877.
 10. Ten Heggeler JM, Slot DE, Van der Weijden GA. Effect of socket preservation therapies following tooth extraction in non-molar regions in humans: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2011; 22:779–788.
 11. Buser D, Bornstein MM, Weber HP, Grutter L, Schmid B, Belser UC. Early implant placement with simultaneous guided bone regeneration following single-tooth extraction in the esthetic zone: a cross-sectional, retrospective study in 45 subjects with a 2- to 4-year follow-up. *J Periodontol* 2008; 79:1773–1781.
 12. Araujo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: a 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20:433–440.
 13. Araujo MG, Lindhe J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2011; 22:9–13.
 14. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol* 2000; 71:1015–1023.
 15. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90:581–586.
 16. Carmagnola D, Abati S, Celestino S, Chiapasco M, Bosshardt D, Lang NP. Oral implants placed in bone defects treated with Bio-Oss, Ostim-Paste or PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19:1246–1253.
 17. Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14:137–143.
 18. Fernandes PG, Novaes AB Jr, de Queiroz AC, et al. Ridge preservation with acellular dermal matrix and anorganic bone matrix cell-binding peptide P-15 after tooth extraction in humans. *J Periodontol* 2011; 82:72–79.
 19. Lambert F, Vincent K, Vanhoutte V, Seidel L, Lecloux G, Rompen E. A methodological approach to assessing alveolar ridge preservation procedures in humans: hard tissue profile. *J Clin Periodontol* 2012; 39:887–894.
 20. Roriz VM, Rosa AL, Peitl O, Zanotto ED, Panzeri H, de Oliveira PT. Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:148–155.
 21. Santos FA, Pochapski MT, Martins MC, Zenobio EG, Spolidoro LC, Marcantonio E Jr. Comparison of biomaterial implants in the dental socket: histological analysis in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010; 12:18–25.
 22. Suaid F, Grisi MF, Souza SL, Palioto DB, Taba M Jr, Novaes AB Jr. Buccal bone remodeling after tooth extraction using the flapless approach with and without synthetic bone grafting. A histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24:407–413.
 23. Araujo MG, Carmagnola D, Berglundh T, Thilander B, Lindhe J. Orthodontic movement in bone defects augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2001; 28:73–80.
 24. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8: 117–124.
 25. Araujo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:55–64.
 26. Araujo M, Linder E, Wennstrom J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008; 28:123–135.
 27. Cardaropoli G, Araujo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced – augmented and non-augmented – defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005; 32:435–440.
 28. Fickl S, Zuhre O, Wachtel H, Bolz W, Huerzeler MB. Hard tissue alterations after socket preservation: an experimental study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19: 1111–1118.
 29. Heberer S, Al-Chawaf B, Hildebrand D, Nelson JJ, Nelson K. Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19:1219–1225.
 30. Seibert J, Lindhe J. Esthetics and periodontal therapy. In: Lindhe J, ed. *Textbook of clinical periodontology*. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard, 1989:477–514.
 31. Ferrus J, Cecchinato D, Pjetursson EB, Lang NP, Sanz M, Lindhe J. Factors influencing ridge alterations following immediate implant placement into extraction sockets. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:22–29.
 32. Spinato S, Galindo-Moreno P, Zaffe D, Bernardello F, Soardi CM. Is socket healing conditioned by buccal plate thickness? A clinical and histologic study 4 months after mineralized human bone allografting. *Clin Oral Implants Res* 2012 [Epub ahead of print].
 33. Tomasi C, Sanz M, Cecchinato D, et al. Bone dimensional variations at implants placed in fresh extraction sockets: a multilevel multivariate analysis. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:30–36.

34. Bragger U, Pasquali L, Kornman KS. Remodelling of interdental alveolar bone after periodontal flap procedures assessed by means of computer-assisted densitometric image analysis (CADIA). *J Clin Periodontol* 1988; 15:558–564.
35. Wood DL, Hoag PM, Donnenfeld OW, Rosenfeld LD. Alveolar crest reduction following full and partial thickness flaps. *J Periodontol* 1972; 43:141–144.
36. Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Bolz W, Huerzeler M. Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: a volumetric study in the beagle dog. *J Clin Periodontol* 2008; 35:356–363.
37. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique 1982; 11:318–326.
38. Berglundh T, Lindhe J. Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. *J Clin Periodontol* 1996; 23:971–973.
39. Kim BS, Kim YK, Yun PY, et al. Evaluation of peri-implant tissue response according to the presence of keratinized mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107:e24–e28.
40. Linkevicius T, Apse P, Grybauskas S, Puisys A. The influence of soft tissue thickness on crestal bone changes around implants: a 1-year prospective controlled clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24:712–719.
41. Linkevicius T, Apse P, Grybauskas S, Puisys A. Influence of thin mucosal tissues on crestal bone stability around implants with platform switching: a 1-year pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68:2272–2277.
42. Bashara H, Wohlfahrt JC, Polyzois I, Lyngstadaas SP, Renvert S, Claffey N. The effect of permanent grafting materials on the preservation of the buccal bone plate after tooth extraction: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23:911–917.
43. Rothamel D, Schwarz F, Herten M, et al. Dimensional ridge alterations following socket preservation using a nanocrystalline oxyapatite paste. A histomorphometrical study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37:741–747.
44. Horvath A, Mardas N, Mezzomo LA, Needleman IG, Donos N. Alveolar ridge preservation. A systematic review. *Clin Oral Investig* 2013; 17:341–363.
45. Sun TC, Mori S, Roper J, Brown C, Hooser T, Burr DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information? *Bone* 1992; 13:443–446.
46. Araujo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20:1–6.

ARTIGO III EM INGLÊS

TITLE PAGE

Influence of periodontal biotype on buccal bone plate remodeling after immediate implant placement with and without xenografts.

Running title: The influence of periodontal biotype on peri-implant tissues.

Keywords: biomaterials, bone-implant interactions, bone substitutes, bone regeneration

Authors: Luciana P. Maia, MScD¹; Danilo M. Reino; DSc¹; Valdir A. Muglia, DSc²; Adriana L. G. Almeida³; Antonio Nanci⁴; Rima M. Wazen⁵; Paulo T. de Oliveira⁶; Daniela B. Palioto, DSc⁷; Arthur B. Novaes Jr, DSc⁸.

1. Doctoral student of Periodontology at the Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.
2. Professor of Prosthodontics at the Department of Dental Materials and Prosthetics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.
3. Graduated in Biology and Microscopic and Image Analysis Laboratory Technician of the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

4. Director of the Stomatology Department and the Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, QC, Canada.
5. Research Associate of the Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, QC, Canada.
6. Associate Professor of Histology at the Department of Morphology, Stomatology and Basic Pathology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.
7. Associate Professor of Periodontology at the Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.
8. Chairman of Periodontology at the Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author: Arthur Belém Novaes Junior

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Avenida do Café – s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brasil;

Faz: +5516 3602-4788; e-mail: novaesjr@forp.usp.br

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to evaluate the influence of gingival thickness and bone grafting on buccal bone plate remodeling after immediate implant placement in sockets with thin buccal bone, using a flapless approach.

Material and Methods: The gingiva of 8 dogs was thinned at one side of the mandible, mandibular premolars were extracted without flaps, and 4 implants were installed on each side at 1.5 mm from the buccal bone. The sites were randomly assigned into: TG (test group) = thin gingiva; TG + GM (TG with grafting material); CG (control group) = normal gingiva; and CG + GM (CG with grafting material). After 12 weeks the dogs were sacrificed and the samples were processed for histological analysis.

Results: All animals exhibited a thin buccal bone and the pre-surgical procedure reduced gingival thickness in the test group. In all the experimental groups the buccal gap was filled with newly formed bone and the buccal bone level was slightly apical to the implant shoulder. There were no statistically significant differences among the groups for the histomorphometric parameters.

Conclusion: The thickness of the buccal bone was a fundamental factor in buccal bone plate resorption, even with flapless implantation. The gingival thickness or the addition of a biomaterial in the gap did not influence the results.

INTRODUCTION

It is well known that the higher bone density and thinner aspect of buccal bone plates predispose this bone to increased resorption after tooth extraction ¹⁻⁴. It has been suggested that the immediate placement of an implant in the fresh extraction socket could reduce alveolar ridge resorption following tooth removal ⁵⁻⁹, however, localized osseous defects around immediate implants may present a challenge to the clinician ^{3, 4, 10, 11}. Therefore, other clinical parameters should be taken into consideration in an attempt to reduce the bone resorption after immediate implant placement.

A thin periodontal biotype is generally defined as a narrow zone of keratinized tissue, clear thin gingiva and a relatively thin alveolar bone ^{12, 13}. The assessment of the periodontal biotype seems to be a significant factor considering that it is related to the outcomes of different dental procedures. Since the immediate implant placement is a technique-sensitive procedure, detailed evaluation of hard and soft tissue components helps to achieve more predictable esthetics and treatment success. The influence of mucosal thickness on tissue health maintenance and bone wall preservation around implants has recently been discussed. Animal ¹⁴ and clinical studies ¹⁵⁻¹⁷ have shown that thin tissues may lead to crestal bone loss during formation of the peri-implant seal. In addition, the thickness of the buccal bone plate in the extraction site seems to have a significant influence on the amount of horizontal and vertical crest resorption ^{18,19, 20}. This is an important aspect that must be considered in the decision-making process regarding the immediate positioning of implant into the socket.

The surgical approach is another important aspect that must be considered for immediate implantation. Studies have shown that flapless implant surgery accelerates

recovery ²¹ and increases the vascularity of the peri-implant mucosa after implant placement ²². It is conceivable that implants would stabilize more quickly without flap elevation ²³⁻²⁵. Moreover, it was demonstrated that buccal soft tissue recession is lower in immediate implants placed with a flapless surgery ²⁶.

The presence of a gap between the walls of the extraction socket and the implant is commonly observed ²⁷. In an attempt to reduce buccal bone resorption, different approaches have been applied to fill this gap, including the use of various graft materials and/or barrier membranes ^{7-9, 28-32}. One particular graft material, comprised of deproteinized bovine bone mineral combined with collagen (Bio-Oss Collagen – Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), was evaluated in experimental and clinical studies, especially in ridge preservation procedures ^{33, 34 35-37}, with promising results. In an animal study, it was also demonstrated that the placement of this xenograft in the gap between the implant and the buccal-approximal bone walls of fresh extraction sockets modified the process of hard tissue healing ³⁸.

Based on this, the aim of this study was to evaluate histologically the remodeling of soft tissues and buccal bone plate in immediate implants, in small dogs with a thin periodontal biotype. The possibility of reducing the resorption process when associating a graft material filling the gap was also studied.

MATERIAL AND METHODS

Study design and randomization procedure

According to the ARRIVE Guidelines ³⁹, brief details of the study design will be described. This study was conducted after approval of the Animal Experimental Ethics

Committee (protocol number 11.1.138.53.6). Eight beagle dogs, around 1 year old and weighing on average 11.5 kg, were used. Such small dogs were selected to ensure that all of them would present a thin buccal bone plate. All selected animals had normal mandibles, no generalized occlusal trauma, no viral or fungal mouth lesions, good overall health and no systemic compromises attested by veterinary exams. The dogs were immunized with vaccines, received antiparasitic treatment and were submitted to dental prophylaxis using ultra-sonic points (Cavitron 3000, Dentisply Mfg. Co., USA) for the removal of dental calculus and biofilm.

A computer-generated random permuted block was used to allocate the four experimental groups (TG: test group - thin gingiva; TG+ GM: test group with grafting material; CG: control group - normal gingiva; and CG + GM: control group with grafting material) on each side of the mandible.

Pre-surgical procedures

The buccal mucosa on the test side of teeth scheduled for surgery was thinned using a high-speed bur (gingival peeling), while the control side was left intact. Four weeks later, a second peeling was carried out followed by weekly traumatic brushing to maintain a thin gingival thickness. Eight weeks after the second gingival peeling a statistically significant difference between test and control sides on gingival thickness was observed (Figure 1A and B) The details for the clinical results were described in Maia et al.⁴⁰.

Surgical procedures

The surgical procedures were performed 12 weeks after the first gingival peeling, by a single experienced operator, as described by Maia et al. ⁴⁰. Briefly, the extraction of the 4 lower bicuspid (premolars) were completed without flaps. After teeth extractions, the buccal bone thickness was assessed using a surgical micrometer. The following sockets on both quadrants of the mandible were selected for implant placement (Straumann Dental Implant System; Bone Level SLActive, 3.3 mm wide and 10 mm long; Straumann, Basel, Switzerland): P2 distal, P3 distal and mesial and P4 distal, totaling 4 implants in each side of the mandible (Figure 1C). All implants were placed at the bone crest level and with their cervical portion 1.5 mm from the buccal bone plate (bucco-lingually), allowing a 1.5 mm gap (Figure 1D).

Following implant placement, two implants in each hemi-mandible received xenografts to fill the gap between the implant and the buccal alveolar bone wall, while the two others received no grafting material (Figure 1E). Protective covering screws were placed on the implants, and sutures applied (figure 1F). Seven days later, the sutures were removed, prosthetic connections were adapted and temporary metallic prostheses were installed at the same time (Figure 1G), thus characterizing the presence of an early load.

Twelve weeks after implant placement, the animals were sacrificed by induction of deep anesthesia with a subsequent intravenous sodium thiopental and potassium chloride overdose. The hemi-mandibles were dissected out and fixed in 4% phosphate-buffered formalin pH 7, for 10 days, and transferred to a solution of 70% ethanol until processing. The specimens were dehydrated in increasing concentrations of alcohol up to 100%, infiltrated and embedded in LR White resin (London Resin Company, Berkshire, England),

and hard-sectioned using the technique described by Donath & Breuner ⁴¹. From each implant unit, one buccal–lingual section representing the central area of the site was prepared. The sections were reduced to a thickness of about 25 µm by micro-grinding and polishing. Longitudinal sections were then stained with Alizarin red for optic microscopic analysis. The histological examinations were performed on a Leica DM LB2 microscope outfitted with a Leica DF 300F digital camera (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany). The images were analyzed through the LAS v4.1 software (Leica) by a single examiner. The blocks were examined using backscattered electron imaging in a JEOL JSM-6460LV variable pressure SEM operated at 25 Pa and 20 kV (JEOL, Tokyo, Japan).

Histological examination

In the sections, linear measurements (magnification 2.5X) were made between the following landmarks (Figure 2):

- IS: implant shoulder;
- C: marginal level of the bone crest;
- B/I: marginal level of bone to implant contact.

All the measurements were calculated on the buccal bone area. The vertical crestal bone resorption (VCBR) was determined as a linear vertical measurement from the IS to the C landmarks (Figure 2). The first vertical bone level (VBL) was calculated from IS to B/I (Figure 2). Finally, for the samples that lost 1mm or less of VCBR, linear horizontal measurements were made inside the defects from C to the implant (I) surface, in order to evaluate the residual gap (RG) (Figure 2).

The histological “bone density” was determined within a 6 mm² rectangle that comprised the region of the defect (total area obtained), beginning from the IS (Figure 2). The bone density measurements evaluated the percentages of mineralized bone in relation to the percentages of marrow spaces inside the rectangle.

Statistical Analysis

The Shapiro-Wilk Test was used to verify the normality of the data,. Mixed Model for Repeated Measurements was used for intragroup and intergroup comparisons. For all statistical analyses a significance level of 5% was adopted. SPSS version 20 (IBM Software, Armonk, NY, USA) was the statistical software used for the analysis.

RESULTS

The microscopic examination revealed that all implants were well integrated with the surrounding bone tissue, and the buccal bone level in all specimens was slightly apical to the implant shoulder (Figures 3A, 4A, 5A and 6A). The buccal gap was filled with newly formed bone (NB), which was continuous with the old lamellar bone (LB) of the buccal bone wall (Figures 3B and C, 4B and C, 5A and B, 6A and B). The newly formed hard tissue was mainly comprised of woven bone (WB) and parallel-fibered bone with a lamellar pattern (PB) (Figures 3C, 4C). An osteoid matrix (OM) was also identified in some areas of the NB, and it was paved with osteoblasts (Ob) in the exterior of the lamellae (Figures 3D and 4D). The higher number of osteocytes in the NB denotes the rapid formation of this remodeling bone (Figures 5B and 6B).

In the grafted groups, residual graft particles (RGP), when observed, were dispersed in a non-mineralized and mineralized matrix in the region corresponding to the gap area (Figures 4A and B, and 6). In most of the samples where particles were present they were surrounded by newly formed bone (Figures 4B and D, and 6). The implant surface was also lined by NB which extended onto the bone around the particles (Figures 4A and 6A). Graft material was also observed outside the bone tissue (Figures 4A and 6A).

Histomorpometric Measurements

In general, buccal bone loss was observed in all the experimental groups, without significant difference (VCBR and VBL) (Table 1). Additionally, all groups presented similar histological bone density and residual gap (RG) (Table 1). Two samples of the TG and 1 sample of the control groups (CG and CG + GM) (Table 1) showed an absence of space (bone fill – BF) between the new bone and the implant surface.

DISCUSSION

In the present study, the influence of the periodontal biotype on buccal bone plate remodeling following immediate implant placement using a flapless procedure was evaluated. The influence of a xenograft comprised of deproteinized bovine bone mineral combined with collagen filling the gap between the implant surface and the buccal bone plate was also evaluated. It is important to note that this study was conducted in small beagle dogs, which were characterized by an inherently thin periodontal biotype. The findings from this study suggest that dimensional changes on buccal bone plate occur

following implant placement into fresh extraction sockets with an initially thin buccal bone plate, regardless of the gingival thickness or the application of bone filling.

Previous studies analyzing the influence of mucosal thickness on bone stability regarding the biological width showed that at sites where the ridge mucosa prior to abutment connection was thin (≤ 2 mm), wound healing consistently included bone resorption^{15-17, 42, 43}. It is important to emphasize that these studies considered only the thickness of the mucosa of the ridge crest. In the present study, the initial gingival thickness was around 1.2 mm, similar to what is usually observed in human maxillary anterior teeth⁴⁴. The similarity among the groups regarding all the parameters evaluated leads to the conclusion that gingival thickness does not play a significant role in buccal bone preservation when the buccal bone is initially thin.

Different materials have been used to fill the gap after tooth extraction and immediate implant placement trying to minimize the resorption of the buccal bone crest, but the current literature is not conclusive on its effectiveness. Araújo et al.³⁸, using the same xenograft to fill the buccal gap, as in our study, observed a thicker buccal bone crest and less vertical resorption in the grafted sites. However, our results showed no differences on the use of the graft material when the gap is of 1.5 mm. This result is in accordance with Botticelli et al.²⁷, who demonstrated no differences on buccal bone loss between sites with a gap of 1.25 mm and without a gap. Similarly, in a recent study, Suaid et al.⁹ reported that the use of hydroxyapatite and tricalcium phosphate did not appear to contribute to the maintenance of the buccal bone.

The crestal bone resorption that occurred in our study was detected not only by the linear vertical bone measurements but also by the horizontal measurements (RG). The

intragroup analysis did not show different results among the groups. The main objective of the linear horizontal measurements was to evaluate the potential of bone fill (BF) in the different circumstances, and all the groups showed a low ability to promote this closure at the central region.

Regarding the surgical technique applied, studies showed higher vertical bone resorption after flap elevation. Blanco et al. ⁴⁵, in a histomorphometric study in dogs, stated that flapless immediate implant surgery produces a minor reduction in buccal bone plate resorption. Farther, Novaes et al. ⁴⁶, observed a loss of bone height at least two times more pronounced when immediate implants are installed after the elevation of mucoperiosteal flap. In our study, the flapless approach did not prevent the occurrence of bone loss, but probably this discrepancy is a reflection of the thin buccal bone plate in our model.

It is important to notice that some studies showed much less buccal bone loss when dealing with immediate implants than the values observed in the present study ^{38, 47}, specially when a flapless approach was applied ⁹, and it is likely due to the thickness of buccal bone at the moment of implant placement. It has been observed that the narrower the buccal bone crest, the more it vertically resorbs after an extraction. Qahash et al. ⁴⁸, evaluating the bone healing dynamics at buccal peri-implant sites in dogs, observed a significant association between the width of the buccal alveolar ridge and the extent of bone resorption. The strength of this association was two times greater in specimens with a buccal ridge width < 2 mm. Vignoletti et al.⁴⁹ and Araújo et al. ¹⁰ placed implants in sockets of the same diameter with different buccal bone crest widths, being the P3 smaller width than the P4. Vertical resorption obtained in P3 was higher in both studies. Our

results provide additional support to literature reports showing that a thin buccal bone plate leads to vertical buccal bone loss.

A comparison of the differently treated sockets with respect to bone density indicated that the process of tissue remodeling progressed in the same pattern in all the experimental groups. This observation is in agreement with the study of Araújo & Lindhe³⁴, who evaluated the socket healing with the use of the same xenograft. The similarity in the quantity of mineralized tissue between the groups with and without graft material indicates that at 3 months of healing the xenograft did not enhance healing and/or stimulate hard tissue formation around implants immediately placed in fresh extraction sockets, but served as a scaffold for tissue formation during healing.

Histological examination revealed the presence of a small portion of biomaterial just in a few grafted samples. It is not likely that the majority of granules have been resorbed in such a short period of time. Bashara et al.⁵⁰ reported the presence of newly formed bone around the particles of the inorganic bovine graft material in extraction sockets at 6 months of healing, with little evidence of the inorganic biomaterial being replaced by bone. The same was demonstrated by Araújo and Lindhe³⁴, who also observed the presence of the graft material in locations outside the bone tissue, i.e. in the oral mucosa. The authors suggested that during the modeling process of the outer portion of the crestal region, the particles might be dislodged from the newly formed bone. If it is difficult to keep the biomaterial in place in an extraction socket, small gaps between the implant surface and the buccal bone plate represent a greater challenge. Also, it is important to emphasize that the use of a flapless approach could lead to a more pronounced exfoliation of the biomaterial, mainly if the gaps were not covered with membranes or connective tissue, as

in the present study, in which part of the graft material could be lost during the healing process. Another important point to be discussed is that although the biomaterial has enhanced handling characteristics, it is composed by only 10% of highly purified porcine collagen, the other 90% are composed by bovine cancellous bone granules, which makes its compaction hard to be achieved.

To our knowledge, this is the first study that attempts to analyze the influence of a thin periodontal biotype in bone remodeling after immediate implant placement. In the present study, as stated above, the thickness of the buccal bone was a fundamental factor in buccal bone plate resorption, even with flapless implantation. To thin the gingiva to a critical thickness or the addition of a biomaterial in the gap, in a pre-existing thin biotype, did not influence the results

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Coordination for the Improvement of Graduated Personnel (CAPES) for the scholarship that supported Ms. Maia, the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the financial support of this study (process number 11/00674-6) and Geistlich Pharma AG for the donation of the graft material used. We also thank Pierre Rompré, (Université de Montréal), for the assistance with the statistical analysis; and the Canadian Institutes of Healthy Research (CIHR), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canada Foundation for Innovation (CFI) for the support.

REFERENCES

1. Novaes AB, Jr., Macedo GO, Suaid FA, Barros RR, Souza SL, Silveira ESAM. Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. *J Periodontol* 2011; **82**: 872-877.
2. Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005; **32**: 212-218.
3. Araujo MG, Sukekava F, Wennstrom JL, Lindhe J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005; **32**: 645-652.
4. Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *J Clin Periodontol* 2004; **31**: 820-828.
5. Denissen HW, Kalk W, Veldhuis HA, van Waas MA. Anatomic consideration for preventive implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; **8**: 191-196.
6. Paolantonio M, Dolci M, Scarano A, d'Archivio D, di Placido G, Tumini V, Piattelli A. Immediate implantation in fresh extraction sockets. A controlled clinical and histological study in man. *J Periodontol* 2001; **72**: 1560-1571.
7. Watzek G, Haider R, Mensdorff-Pouilly N, Haas R. Immediate and delayed implantation for complete restoration of the jaw following extraction of all residual teeth: a retrospective study comparing different types of serial immediate implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995; **10**: 561-567.
8. Novaes-Jr AB, Suaid FA, Queiroz AC, Muglia VA, Souza SL, Palioto DB, Taba-Jr M, Grisi MF. Buccal bone plate remodeling after immediate implant with and without synthetic bone grafting and flapless surgery. Radiographic study in dogs. *J Oral Implantol* 2011.
9. Suaid FA, Novaes AB, Jr., Queiroz AC, Muglia VA, Almeida AL, Grisi MF. Buccal bone plate remodeling after immediate implants with or without synthetic bone grafting and flapless surgery: a histomorphometric and fluorescence study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2012.
10. Araujo MG, Sukekava F, Wennstrom JL, Lindhe J. Tissue modeling following implant placement in fresh extraction sockets. *Clin Oral Implants Res* 2006; **17**: 615-624.
11. Caneva M, Botticelli D, Salata LA, Scombatti Souza SL, Carvalho Cardoso L, Lang NP. Collagen membranes at immediate implants: a histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res*.
12. Muller HP, Eger T. Gingival phenotypes in young male adults. *J Clin Periodontol* 1997; **24**: 65-71.
13. De Rouck T, Eghbali R, Collys K, De Bruyn H, Cosyn J. The gingival biotype revisited: transparency of the periodontal probe through the gingival margin as a method to discriminate thin from thick gingiva. *J Clin Periodontol* 2009; **36**: 428-433.
14. Kim BS, Kim YK, Yun PY, Yi YJ, Lee HJ, Kim SG, Son JS. Evaluation of peri-implant tissue response according to the presence of keratinized mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; **107**: e24-28.
15. Berglundh T, Lindhe J. Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. *J Clin Periodontol* 1996; **23**: 971-973.
16. Linkevicius T, Apse P, Grybauskas S, Puisys A. Influence of thin mucosal tissues on crestal bone stability around implants with platform switching: a 1-year pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; **68**: 2272-2277.
17. Linkevicius T, Apse P, Grybauskas S, Puisys A. The influence of soft tissue thickness on crestal bone changes around implants: a 1-year prospective controlled clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; **24**: 712-719.
18. Spinato S, Galindo-Moreno P, Zaffe D, Bernardello F, Soardi CM. Is socket healing conditioned by buccal plate thickness? A clinical and histologic study 4 months after mineralized human bone allografting. *Clin Oral Implants Res* 2012.

19. Ferrus J, Cecchinato D, Pjetursson EB, Lang NP, Sanz M, Lindhe J. Factors influencing ridge alterations following immediate implant placement into extraction sockets. *Clin Oral Implants Res* 2010; **21**: 22-29.
20. Tomasi C, Sanz M, Cecchinato D, Pjetursson B, Ferrus J, Lang NP, Lindhe J. Bone dimensional variations at implants placed in fresh extraction sockets: a multilevel multivariate analysis. *Clin Oral Implants Res* 2010; **21**: 30-36.
21. Sclar AG. Guidelines for flapless surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; **65**: 20-32.
22. Kim JI, Choi BH, Li J, Xuan F, Jeong SM. Blood vessels of the peri-implant mucosa: a comparison between flap and flapless procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; **107**: 508-512.
23. Becker W, Goldstein M, Becker BE, Sennerby L. Minimally invasive flapless implant surgery: a prospective multicenter study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; **7 Suppl 1**: S21-27.
24. Campelo LD, Camara JR. Flapless implant surgery: a 10-year clinical retrospective analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; **17**: 271-276.
25. Jeong SM, Choi BH, Kim J, Lee DH, Xuan F, Mo DY, Lee CU. Comparison of flap and flapless procedures for the stability of chemically modified SLA titanium implants: an experimental study in a canine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; **111**: 170-173.
26. Blanco J, Alves CC, Nunez V, Aracil L, Munoz F, Ramos I. Biological width following immediate implant placement in the dog: flap vs. flapless surgery. *Clin Oral Implants Res* 2010; **21**: 624-631.
27. Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Resolution of bone defects of varying dimension and configuration in the marginal portion of the peri-implant bone. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2004; **31**: 309-317.
28. Becker W, Dahlin C, Becker BE, Lekholm U, van Steenberghe D, Higuchi K, Kultje C. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; **9**: 31-40.
29. Bragger U, Hammerle CH, Lang NP. Immediate transmucosal implants using the principle of guided tissue regeneration (II). A cross-sectional study comparing the clinical outcome 1 year after immediate to standard implant placement. *Clin Oral Implants Res* 1996; **7**: 268-276.
30. Gelb DA. Immediate implant surgery: three-year retrospective evaluation of 50 consecutive cases. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; **8**: 388-399.
31. Gher ME, Quintero G, Assad D, Monaco E, Richardson AC. Bone grafting and guided bone regeneration for immediate dental implants in humans. *J Periodontol* 1994; **65**: 881-891.
32. Kohal RJ, Mellas P, Hurzeler MB, Trejo PM, Morrison E, Caffesse RG. The effects of guided bone regeneration and grafting on implants placed into immediate extraction sockets. An experimental study in dogs. *J Periodontol* 1998; **69**: 927-937.
33. Araujo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res* 2009; **20**: 1-6.
34. Araujo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2009; **20**: 433-440.
35. Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Kebschull M, Hurzeler MB. Hard tissue alterations after socket preservation with additional buccal overbuilding: a study in the beagle dog. *J Clin Periodontol* 2009; **36**: 898-904.
36. Fickl S, Schneider D, Zuhr O, Hinze M, Ender A, Jung RE, Hurzeler MB. Dimensional changes of the ridge contour after socket preservation and buccal overbuilding: an animal study. *J Clin Periodontol* 2009; **36**: 442-448.
37. Heberer S, Al-Chawaf B, Hildebrand D, Nelson JJ, Nelson K. Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2008; **19**: 1219-1225.

38. Araujo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2011; **22**: 1-8.
39. Berglundh T, Stavropoulos A, Working Group 1 of the VEWoP. Preclinical in vivo research in implant dentistry. Consensus of the eighth European workshop on periodontology. *J Clin Periodontol* 2012; **39 Suppl 12**: 1-5.
40. Maia LP, Reino DM, Muglia VA, de Souza SLS, Palioto DB, Novaes ABJ. The influence of the periodontal biotype on peri-implant tissues around immediate implants with and without xenografts. Clinical and micro-computerized tomographic studies in small Beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 2013; **00**: 1-9.
41. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; **11**: 318-326.
42. Lee A, Fu JH, Wang HL. Soft tissue biotype affects implant success. *Implant Dent* 2011; **20**: e38-47.
43. Linkevicius T, Puisys A, Linkeviciene L, Peciuliene V, Schlee M. Crestal Bone Stability around Implants with Horizontally Matching Connection after Soft Tissue Thickening: A Prospective Clinical Trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013.
44. Rungcharassaeng K, Kan JY, Yoshino S, Morimoto T, Zimmerman G. Immediate implant placement and provisionalization with and without a connective tissue graft: an analysis of facial gingival tissue thickness. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012; **32**: 657-663.
45. Blanco J, Nunez V, Aracil L, Munoz F, Ramos I. Ridge alterations following immediate implant placement in the dog: flap versus flapless surgery. *J Clin Periodontol* 2008; **35**: 640-648.
46. Novaes ABJ, Barros RRM, Papalexiou V, Almeida ALG. Buccal bone loss after immediate implantation can be reduced by the flapless approach. *Journal of Osseointegration* 2011; **3**: 45-55.
47. Barone A, Ricci M, Calvo-Guirado JL, Covani U. Bone remodelling after regenerative procedures around implants placed in fresh extraction sockets: an experimental study in Beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 2011; **22**: 1131-1137.
48. Qahash M, Susin C, Polimeni G, Hall J, Wikesjo UM. Bone healing dynamics at buccal peri-implant sites. *Clin Oral Implants Res* 2008; **19**: 166-172.
49. Vignoletti F, de Sanctis M, Berglundh T, Abrahamsson I, Sanz M. Early healing of implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in the beagle dog. II: ridge alterations. *J Clin Periodontol* 2009; **36**: 688-697.
50. Bashara H, Wohlfahrt JC, Polyzois I, Lyngstadaas SP, Renvert S, Claffey N. The effect of permanent grafting materials on the preservation of the buccal bone plate after tooth extraction: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2012; **23**: 911-917.

Table 1. Histomorphometric parameters: vertical crestal bone resorption (VCBR), vertical bone level (VBL), bone density (BD), residual gap (RG) and bone fill, intragroup comparisons.

	TG	TG + GM	CG	CG + GM	p value
VCBR (mm)	0.84 ± 0.76 (0.17 – 1.50)	1.63 ± 1.07 (0.96 – 2.29)	1.13 ± 0.93 (0.47 – 1.80)	1.31 ± 0.86 (0.64 – 1.97)	0.328
VBL (mm)	1.20 ± 0.71 (-0.08 – 2.47)	2.90 ± 1.82 (1.63 – 4.18)	2.14 ± 1.81 (0.87 – 3.41)	2.87 ± 2.28 (1.60 – 4.15)	0.152
BD (%)	75.48 ± 18.85 (56.46 – 94.50)	61.49 ± 23.99 (42.48 – 80.51)	74.02 ± 23.53 (55.00 – 93.03)	66.33 ± 21.84 (47.31 – 85.35)	0.583
RG (mm)	0.30 ± 0.36 (0.03 – 0.57)	0.32 ± 0.08 (-0.4 – 0.71)	0.43 ± 0.24 (0.17 – 0.72)	0.42 ± 0.47 (0.08 – 0.83)	0.841
Bone fill	2	0	1	1	

Mixed Model for Repeated Measurements, all values are expressed as mean ± standard deviation and confidence interval of 95% (p<0.05).

FIGURES SUBTITLES

Figure 1. Gingival aspect at the moment of implant placement of the test group (A), showing the visible reduced gingival thickness; and of the control group (normal gingiva) (B). The implants were immediately placed in fresh extraction sockets (C) with a 1.5 mm gap (arrow) between the implant and the buccal bone plate (D); and two implants on each side received the graft material (arrow) filling the gap (E). Protective covering screws were placed on the implants and sutured applied (F), and after 7 days metallic prosthesis were installed (G).

Figure 2. Alizarin red stained histological section representing the histomorphometric measurements. All the measurements were calculated on the buccal bone area. The vertical crestal bone resorption (VCBR) was determined as a linear vertical measurement from an imaginary line from the implant shoulder (IS) to the marginal level of the bone crest (C). The vertical bone level (VBL) was calculated from IS to the first bone-to-implant contact (B/I). The residual gap (RG) was evaluated as a horizontal linear measurement from the implant (I) surface to C, and the histological “bone density” was determined within a 6 mm² rectangle (in red) that comprised the region of the defect. Magnification 2.5X.

Figure 3. Alizarin red stained bucco-lingual section representing the non-grafted sites. Note the implant (I) integrated with the surrounding bone tissue and the buccal bone level slightly apical to the implant shoulder (A) (Magnification 2.5X). The buccal gap was filled with newly formed bone (NB), which was continuous with the old lamellar bone (LB) of the buccal bone wall. A red line was drawn to separate the LB and NB structures (Magnification 10X) (B, C). The polarized light (C) evidencing the different bone structures: the new bone comprised of woven bone (WB) and parallel-fibered bone (PB), and the old LB. (Magnification 10X). D) This specific area of the new bone shows immature aspects of bone with the presence of osteoblasts (Ob) and osteoid matrix (OM) (Magnification 20X).

Figure 4. Bucco-lingual section representing the grafted sites. Residual graft particles (RGP) were observed in some samples in the buccal gap area (A). Occasionally, the

presence of RGP was noted outside of the bone tissue (*) (A) (Magnification 2.5X). Light microscopy imaging (B) and polarized light (C) showing that the implant (I) surface was lined by new bone (NB) and its structure established a direct contact with the RGP and the old lamellar bone (LB). A red line was drawn to separate the LB and NB structures (B and C). The different bone structures were evident: the new bone comprised of woven bone (WB) and parallel-fibered bone (PB), and the old LB (C). (Magnification 10X). The RGP were lined by the NB, and the presence of an osteoid matrix (OM) paved by osteoblasts (Ob) was observed (D) (Magnification 20X).

Figure 5. Backscattered Electron - SEM micrographs of the non-grafted groups: A) The new bone (NB) was present mostly in the gap area, in direct contact with the implant (I) surface. The surface between NB and the old lamellar bone (LB) was evident (Magnification 37X); B) High magnification image revealing the higher number of osteocytes (Oc) in the NB. A red line was drawn to separate the LB and NB structures (Magnification 75X).

Figure 6. Backscattered Electron - SEM micrographs of the grafted groups: A) The new bone (NB) was in direct contact with the implant surface and surrounding the residual graft particles (RGP) in the gap area. Occasionally, RGP were observed outside of the bone tissue (*). (Magnification 37X); B) High magnification image revealing the higher number of osteocytes (Oc) in the NB. A red line was drawn to separate the old lamellar bone (LB) and NB structures (Magnification 75X).

ANEXO – Carta de Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.138.53.6), intitulado "Importância da Espessura Gengival na Manutenção da Saúde dos Tecidos Peri-implantares e Preservação das Tábuas Ósseas Vestibular e Lingual ao Redor de Implantes Imediatos, Instalados em Cirurgia sem Retalho. Estudo clínico e histomorfométrico em cães", de autoria de **Luciana Prado Maia** e de **Daniela Bazan Palioto**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05/07/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.138.53.6), entitled: "Importância da Espessura Gengival na Manutenção da Saúde dos Tecidos Peri-implantares e Preservação das Tábuas Ósseas Vestibular e Lingual ao Redor de Implantes Imediatos, Instalados em Cirurgia sem Retalho. Estudo clínico e histomorfométrico em cães", by **Luciana Prado Maia** and **Daniela Bazan Palioto**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, July 05, 2011.

Ribeirão Preto, 7 de julho de 2011.

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

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro