Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

**REMODELAÇÃO DA TÁBUA ÓSSEA VESTIBULAR EM
IMPLANTES IMEDIATOS E EM ALVÉOLOS PÓS-
EXTRAÇÃO, UTILIZANDO CIRURGIAS SEM RETALHO,
COM OU SEM BIOMATERIAL
ESTUDO COMPARATIVO EM CÃES.**

Flávia Adelino Suaid

Ribeirão Preto

2012

FLÁVIA ADELINO SUAID

**REMODELAÇÃO DA TÁBUA ÓSSEA VESTIBULAR EM
IMPLANTES IMEDIATOS E EM ALVÉOLOS PÓS-
EXTRAÇÃO, UTILIZANDO CIRURGIAS SEM RETALHO,
COM OU SEM BIOMATERIAL
ESTUDO COMPARATIVO EM CÃES.**

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto-USP,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutora em
Periodontia.

Ribeirão Preto

2012

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Central do *Campus* USP- Ribeirão Preto

SUAID, Flávia Adelino

Remodelação da tábua óssea vestibular em implantes imediatos e em alvéolos pós-extração, utilizando cirurgias sem retalho, com ou sem biomaterial. Estudo comparativo em cães, 2012.

192.p.:il. ; 30cm.

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

Orientador: Moraes Grisi, Márcio Fernando

1. Implante Imediato. 2. Enxerto Ósseo. 3. Gap.
4. Cirurgia sem retalho. 5. Biomaterial.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Haylton e Marisa pelo incentivo, carinho, amor e dedicação nas horas mais difíceis, por lutarem ao meu lado, por me guiarem pelo caminho certo, por serem meus exemplos de vida. Devo a vocês todas as minhas conquistas e a mais esta vitória alcançada. Sem vocês ao meu lado não sou ninguém, sem seu amor não caminho. Já não me restam mais palavras, por isso só posso dizer muito obrigada e que para sempre amarei vocês.

Aos meus irmãos Carla e Ricardo, companheiros de todos os momentos, de todas as horas. Somos muito mais que irmãos, somos amigos e compartilhamos de uma amizade e de um amor sem dimensões. Sinto o carinho de vocês todas as horas, e tento retribuir a cada minuto. Só tenho a agradecer por tantas alegrias juntos. Amo vocês.

Ao meu marido Antônio, por estar sempre ao meu lado. A paciência, a dedicação, o carinho e o amor dedicados a mim são imensuráveis. Como um professor, me ensinou a lutar pelos meus objetivos. Serei eternamente grata por ter me tornado uma pessoa mais forte, decidida e feliz. Como já não tenho mais palavras, só resta dizer que meu amor por você é infinito.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi que me orienta desde o início do mestrado em 2006. Conviver com o senhor me ensinou a ter paciência, mostrando o que é ensinar, transmitindo novos conhecimentos, e principalmente passando o exemplo de um verdadeiro amor pela profissão. Ser professora é um dos maiores sonhos que tenho, e hoje posso dizer que o senhor é um dos grandes responsáveis por mais esta conquista. Muito obrigada professor por me tornar uma doutora, mas principalmente por tornar tudo mais fácil e ensinar a viver feliz durante todos estes anos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior pela sua intensa dedicação, paciência e persistência dedicados a mim e ao nosso trabalho desde o início do doutorado. Sua garra e firmeza me mostraram como é importante amar o que faz e jamais desistir de chegar ao final. Se me tornei mais forte e decidida, foi o senhor que me ensinou. Se hoje sei e gosto de pesquisar, é porque me ensinou a importância de sempre buscar algo novo. Professor, muito obrigada por me ajudar a enfrentar os obstáculos durante todo este tempo e finalmente produzir um trabalho como este.

AGRADECIMENTOS

À minha grande e querida amiga Adriana Corrêa Queiroz pela amizade, pelo carinho, disposição, dedicação e principalmente por ser uma pessoa maravilhosa. Sem você ao meu lado, me estendendo a mão nas horas mais precisas, eu não teria chegado ao final. Só me resta dizer o quanto você é importante para mim e o quanto gosto de você. Muito obrigada por tudo.

À técnica e amiga Adriana Luisa G. Almeida responsável pelas análises histomorfométricas e pelas belas imagens deste trabalho. O seu empenho foi fundamental para o excelente desenvolvimento deste trabalho, além das suas palavras de conforto. Muito obrigada pela amizade e por todo o auxílio.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Periodontia pelos ensinamentos, auxílios e apoio que de alguma forma me ajudaram no crescimento profissional e na busca pelo conhecimento.

Ao veterinário responsável Fábio Motta pelo empenho nos cuidados com os animais como se fossem nossos. O grande apoio e amizade nas horas mais tensas no biotério foram muito importantes para a continuidade dos experimentos.

Aos técnicos do biotério Aldo e Edson pela enorme ajuda e dedicação na fase experimental deste trabalho.

Às amigas do curso de doutorado que sempre estavam ao meu lado para oferecer um ombro amigo nos momentos mais difíceis e comemorar as vitórias. São amigas por toda a vida.

Às funcionárias do departamento Tatiana e Dulce por sempre estender o braço amigo me todo o tempo de convivência.

SUMÁRIO

PARTE 1	8
<i>Resumo</i>	<i>9</i>
<i>Introdução</i>	<i>12</i>
<i>Proposição</i>	<i>18</i>
<i>Material e Métodos.....</i>	<i>20</i>
<i>Resultados</i>	<i>32</i>
<i>Discussão.....</i>	<i>52</i>
<i>Conclusão</i>	<i>64</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>66</i>
 PARTE 2	 75
<i>Resumo</i>	<i>76</i>
<i>Introdução</i>	<i>78</i>
<i>Proposição</i>	<i>83</i>
<i>Material e Métodos.....</i>	<i>85</i>
<i>Resultados</i>	<i>91</i>
<i>Discussão.....</i>	<i>100</i>
<i>Conclusão</i>	<i>107</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>109</i>
 ARTIGOS EM INGLÊS	 115
<i>Artigo 1</i>	<i>116</i>
<i>Artigo 2</i>	<i>139</i>
<i>Artigo 3.....</i>	<i>172</i>

A presente tese de doutorado deu origem a três artigos científicos. O artigo radiográfico foi publicado no **Journal of Oral Implantology**, o histomorfométrico e de fluorescência foi submetido para o **Clinical of Oral Implants Research**, e o artigo referente a análise dos alvéolos será enviado para publicação no **Clinical of Oral Implants Research**.

PARTE 1

Resumo

Remodelação da tábua óssea vestibular após a instalação de implantes imediatos utilizando cirurgias sem retalho, com ou sem biomaterial. Análise radiográfica, histomorfométrica e de fluorescência em cães.

RESUMO

Recentes estudos em animais tem demonstrado pronunciada reabsorção da tábua óssea vestibular, após a colocação de implantes imediatos. A realização de cirurgias sem retalho para a colocação de implantes imediatos, e a utilização de enxertos ósseos nos gaps, representam alternativas viáveis para minimizar a reabsorção da tábua óssea vestibular e, dessa forma, otimizar a osseointegração. O presente trabalho se propôs a investigar a remodelação da tábua óssea vestibular, associada ou não ao enxerto ósseo sintético no gap entre a superfície do implante e a tábua vestibular, em cirurgias sem retalho. Neste contexto, implantes posicionados ao nível da tábua óssea vestibular, e 2.0 mm subcrestal foram comparados. Metodologicamente, os pré-molares mandibulares bilaterais de 8 cães foram extraídos sem retalho, 4 implantes foram instalados nos alvéolos de cada lado, e posicionados 2.0 mm da tábua óssea vestibular originando o gap. Os seguintes grupos foram testados: implantes equicrestal associado com o enxerto ósseo sintético (grupo teste equicrestal-GTEC), implantes equicrestal com coágulo sanguíneo (grupo controle-GCEC), implantes 2.0 mm subcrestal associado com o enxerto ósseo sintético (grupo teste subcrestal-GTSC) e implantes 2.0 mm subcrestal com coágulo sanguíneo (grupo controle-GCSC). Uma semana após as cirurgias, próteses metálicas foram instaladas. Marcadores ósseos foram administrados 1, 2, 4 e 12 semanas após as cirurgias para a análise da

fluorescência. Doze semanas após a colocação dos implantes os animais foram sacrificados. Para a análise radiográfica, cortes vestibulo-linguais foram realizados nos blocos com os implantes individualizados, e imagens digitais radiográficas foram obtidas. Para a análise histomorfométrica, lâminas foram preparadas através dos blocos seccionados. A análise radiográfica revelou que o grupo teste subcrestal apresentou maior perda da tábua óssea vestibular com diferença estatisticamente significativa quando comparado com os grupos equicrestais ($p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação à distância linear, e a presença ou ausência de neoformação tecidual no gap residual. A avaliação histomorfométrica demonstrou resultados significativos para o grupo teste equicrestal, sem perda da tábua óssea vestibular. Em relação aos outros parâmetros, o grupo controle subcrestal apresentou melhores resultados. A nova formação de tecido ósseo foi determinada pela quantificação da fluorescência dos marcadores em áreas adjacentes e distantes às superfícies dos implantes. As áreas adjacentes mostraram diferentes resultados entre os grupos, e pequeno um decréscimo na 12^a semana, exceto para o grupo controle subcrestal, que apresentou um aumento. As áreas distantes mostraram um aumento contínuo na formação óssea. Os implantes equicrestais apresentaram insignificativa perda da tábua óssea vestibular. No entanto, os implantes subcrestais mostraram maior perda da tábua óssea vestibular, mesmo com a presença do enxerto ósseo. No entanto, a tábua vestibular manteve-se sempre coronal ao ombro do implante. Ambos os grupos equicrestais e subcrestais testes e controles foram beneficiados nas fases iniciais do processo de formação óssea como evidenciado pela análise de fluorescência.

Palavras Chave: Biomaterial, enxerto ósseo sintético, implante imediato, cirurgias sem retalho.

Introdução

A instalação de implantes em alvéolos pós-extração atraiu grande interesse e muitos questionamentos (Schulte et al., 1978). Altas taxas de sucesso foram documentadas, após a instalação de implantes imediatos (Schwartz-Arad; Gulayev; Chaushu, 2000; Tolman; Keller, 1991; Mazor; Peleg; Redlich, 1999; Lazarra, 1989; Cornellini et al., 2000). Dentre as diversas vantagens da instalação de implantes imediatos, a mais importante é a preservação do processo alveolar referente ao alvéolo pós-extração (Schwartz-Arad; Gulayev; Chaushu, 2000; Tolman; Keller, 1991; Mazor; Peleg; Redlich, 1999). No entanto, a capacidade em prevenir a reabsorção da crista alveolar, consequência da extração dental e posterior instalação de implantes imediatos, é muito questionável (Denissen, et al., 1993; Watzek et al., 1995). Estudos recentes documentaram as variações das dimensões ósseas posteriores à instalação de implantes, e os fatores que potencialmente influenciam estas alterações (Ferrus et al. 2010, Tomasi et al. 2010).

Um dos principais requisitos para o sucesso dos implantes é a manutenção dos tecidos peri-implantares e, dessa forma, a osseointegração e os aspectos estéticos não são comprometidos. Clássicos estudos da década de sessenta mostraram a reabsorção do processo alveolar após a extração dental, sendo mais pronunciada na tábua vestibular (Ramfjord; Costich, 1968). Na presença do dente, o suprimento sanguíneo provém do ligamento periodontal, periósteo e do tecido ósseo. Após a extração de um dente, o ligamento periodontal é removido, e somente duas fontes de nutrição permanecem. Adicionalmente, o osso cortical é pouco vascularizado e, portanto, quando um retalho é levantado para a instalação de implantes, o suprimento sanguíneo suprapariosteal cessa. Isto leva a um osso pobremente vascularizado sem o componente medular, e consequente reabsorção óssea nos estágios iniciais (Pennel et al., 1967). A reabsorção óssea torna-se mais

crítica na tábua vestibular devido às características naturais inerentes a natureza e anatomia da região (Novaes et al., 2011). Isto talvez possa comprometer a osseointegração e os aspectos estéticos. Devido à importância dos fatos relatados, a realização de cirurgias sem retalho previamente a instalação de implantes imediatos, talvez represente uma alternativa para minimizar a reabsorção da tábua óssea vestibular, uma vez que o procedimento preservará a vascularização periosteal. Alguns estudos demonstraram que implantes imediatos instalados sem a realização de retalhos, obtiveram resultados mais previsíveis, contanto que uma técnica apropriada seja empregada (Campelo; Camara, 2002, Rocci; Martignoni; Gottlow, 2003; Becker et al., 2005).

Após a inserção dos implantes e início das cargas oclusais, o tecido ósseo sofre constantes processos de reabsorção e remodelação horizontal e vertical durante a cicatrização. Adell et al. (1981) em seu estudo de 15 anos utilizando implantes Branemark, mostrou uma perda óssea marginal de 1,2 mm em altura durante o primeiro ano. Dentre os fatores que contribuem para este processo estão o tipo de conexão protética, o desenho da região cervical do implante e tipo de tratamento de superfície, e a profundidade (altura) da inserção dos implantes (Oh et al., 2002). Os implantes com conexão do tipo cone Morse oferecem uma interface de selamento bacteriano com redução do microgap geralmente encontrado nos sistemas que não tenha a redução do diâmetro do abutment. A conexão implante abutment dos sistemas que permitem maiores microgaps, ocasionam repetidos micro movimentos entre as partes durante a função clínica e conseqüente acúmulo de biofilme bacteriano, o que pode levar à inflamação localizada e perda óssea da crista (Morris et al., 2004; Chou et al., 2004; Covani et al., 2006). Adicionalmente, as conexões do tipo cone Morse utilizam a plataforma switching, no qual o abutment é

mais estreito que o diâmetro do implante, portanto a transmissão das tensões é deslocada do bordo da plataforma para uma região mais central do implante, preservando assim a crista óssea (Morris et al., 2004 ; Cappiello et al., 2008). Além desses fatores, a formação do espaço biológico também é responsável pela perda da crista óssea, quando os implantes são inseridos abaixo do nível ósseo. Mais recentemente, estudos clínicos foram conduzidos para avaliar se a posição subcrestal dos implantes poderia alterar a reabsorção da crista óssea. No entanto, não houve nenhum consenso. Enquanto um estudo relatou que o nível de inserção do implante não coloca em risco a altura do rebordo peri-implantar (Todescan et al., 2002), outro estudo observou que implantes ao nível e abaixo da crista óssea tiveram a mesma perda óssea, e ainda um terceiro estudo encontrou maior reabsorção da crista óssea em implantes subcrestais (Hammerle et al., 1996).

Em relação ao posicionamento horizontal dos implantes (bucal-lingual ou mesio-distal), é comum observar a presença de um gap (espaço) entre a parede óssea do alvéolo e a superfície do implante. Normalmente, o gap é mais largo na porção coronal do sítio e, ao longo do comprimento do implante, há um estreitamento (Botticelli et al., 2003). Esta falta de adaptação é, em parte, explicada pelo fato de que os alvéolos pós-extração tem uma grande variação na configuração, tamanho e forma (Nociti Junior et al., 2000). Estudos realizados em diferentes modelos animais (Carlsson et al., 1988; Caudill; Meffert, 1991; Knox et al. 1991; Akimoto et al., 1999) sugerem que a extensão do gap entre a tábua óssea e a superfície do implante é um fator importante e crítico, pois os gaps podem ser preenchidos por tecido mole dificultando cicatrização do defeito. Estudos demonstram que um gap igual ou maior que 2 mm não tem um processo de cicatrização e formação óssea previsíveis (Wilson et al., 1998). O uso de

membranas e materiais de enxerto ósseo nos gaps críticos tem sido uma alternativa viável para contribuir com formação óssea peri-implantar (Kohal et al. 1998; Wilson et al., 2003; Park et al., 2011; Araujo; Linder; Lindhe, 2011).

Para o preenchimento desses *gaps* diversos substitutos ósseos têm sido apresentados. Esses materiais, que podem ser de origem xenógena, alógena ou sintética, em sua maioria, exercem propriedades osteocondutoras, atuando como um arcabouço para a adesão e proliferação celular e facilitando o preenchimento do defeito (Molly et al., 2008; Karring et al., 2005; Schopper et al., 2005). Estes substitutos ósseos têm sido utilizados em conjunto com a instalação de implantes imediatos, e resultados satisfatórios com altas taxas de sucesso foram obtidos (Gher et al., 1994; Hsu et al., 2010; Araujo; Linder; Lindhe, 2011).

Dentre os enxertos, pode-se citar o fosfato de cálcio bifásico (BCP), o qual é utilizado como um material de substituição óssea na ortopedia, aplicações orais e maxilo-faciais (Schopper et al., 2005; Schwartz et al., 1999). Quimicamente similar ao osso humano, o fosfato de cálcio bifásico é constituído de uma combinação de hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcio (TCP), ou seja, um material de duas fases. A dissolução do fosfato tricálcio fornece o material básico para íons de cálcio e fosfato, então desencadeando o processo de mineralização óssea. Ao mesmo tempo, a hidroxiapatita mantém um arcabouço para adesão de osteoblastos e início do processo de formação de novo osso, mantendo o volume contra uma reabsorção excessiva (Schopper et al. 2005; Gauthier et al., 1999). Avaliações histológicas demonstraram que o fosfato de cálcio bifásico (BCP) promove atividade osteoblástica induzindo a osteogênese nos defeitos. Dessa forma, o sistema de Harvers e um processo de remodelação óssea foram observados no período de 12 semanas (Manjubala et al., 2002). Comparativamente a diferentes enxertos ósseos,

o fosfato de cálcio bifásico revelou capacidade osteogênica substancialmente maior e, adicionalmente, parece ser tão seguro e eficiente quanto um enxerto ósseo autógeno (Fellah et al., 2008). Consequentemente, o fosfato de cálcio bifásico é citado como um biomaterial biocompatível, bioativo e osteocondutor quando implantado dentro dos defeitos ósseos (Nery et al. 1992; Boix et al. 2004; Daculsi; Goyenvallé; Aguado, 1999; Manjubala et al. 2002).

Desenvolvido como um novo substituto ósseo sintético, um específico fosfato de cálcio bifásico (Bone Ceramic, Straumann™, Basel-Switzerland), é a combinação de 60% de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e 40% de tricálcio fosfato $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$. Este material sintético é composto de poros interconectados variando entre 100 e 500 micron, com um alto índice de porosidade de 90%, o qual concede máximo espaço para a vascularização, migração osteoblástica e nova formação óssea. A hidroxiapatita promove rápida resposta, enquanto o fosfato tricálcio promove rápida remodelação (Daculsi et al., 1989; Frayssinet et al. 1993). Em termos de proporção de fase, foi provado que a porcentagem superior de hidroxiapatita está associada a uma formação óssea mais acelerada (Nery et al. 1992). Estudos em humanos demonstraram que esta nova combinação do fosfato de cálcio bifásico promoveu nova matriz óssea mineralizada e não mineralizada em contato com as partículas, e que foi reabsorvido em grandes proporções (74%) quando comparado com outro enxerto ósseo (62%), no período de 6 a 8 meses (Cordaro et al. 2008).

Proposição

O objetivo do presente estudo foi comparar através de análises radiográficas, histomorfométricas e de fluorescência a remodelação da tábua óssea vestibular entre implantes instalados abaixo da crista óssea (subcrestal) e ao nível da crista óssea (equicrestal), em cirurgias sem retalho, associados ou não com enxerto ósseo sintético no gap, em cães.

Material e Métodos

Procedimentos Cirúrgicos

Primeiramente o protocolo desta pesquisa foi submetido e aprovado pelo comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto (protocolo número 06.1.458.53.5).

Foram selecionados oito (8) cães machos, adultos jovens, sem raça definida, que pesavam aproximadamente 18 Kg. Estes animais apresentavam maxila e mandibular intactas, não apresentavam trauma oclusal generalizado, lesões virais ou fúngica (figura 1A). Apresentavam boa saúde geral e nenhum envolvimento sistêmico relevante de acordo com o médico-veterinário responsável pelo acompanhamento dos animais durante a pesquisa. Os cães foram imunizados com vacinas, receberam tratamento antiparasitário e foram submetidos a uma profilaxia dental para remoção de biofilme dental.

Os animais receberam 20.000 IU de penicilina e estreptomicina (1 Kg/10 kg) na noite anterior aos procedimentos cirúrgicos. Esta dose provê uma cobertura antibiótica de amplo espectro por quatro dias, sendo administrada uma nova dose após este período para prolongar o efeito por uma semana de pós-operatório. Esta associação antibiótica de amplo espectro é comumente usada para tratar infecções nos animais de pequeno porte e, portanto, foi escolhido antes das cirurgias de experimentais.

Durante o preparo para as cirurgias, os cães foram pré-anestesiados com zolazepan a 10% na concentração de 0,10ml/Kg e acepromazina na concentração 2%. A manutenção da anestesia foi obtida através de anestésico volátil, e os animais foram submetidos à intubação traqueal com uma sonda para adaptação de um dispositivo e 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 pré-molares foram feitos sem a realização de retalhos (figuras 1B e 1C). 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 1B). Após as exodontias, os seguintes alvéolos foram selecionados para instalação dos implantes (Bone Level TML SLActive, Straumann, Basel-Switzwerland): P2 mesial, P3 mesial e distal, e P4 mesial totalizando 4 implantes em cada lado da mandíbula (figuras 1C e 1D). Todos os implantes foram posicionados de forma que a região cervical obtivesse uma distância de 2,0mm da tábua óssea originando um gap (vestibulo-lingual) (figura 1E). Em um lado, 4 implantes de 3,3 X 8mm foram posicionados 2,0mm subcrestal em relação ao topo da crista óssea vestibular (ápico-coronal) e, do lado oposto, 4 implantes de 3,3 X 10mm foram posicionados equicrestal (ao nível da crista óssea).

Após a instalação dos implantes, os transferentes foram colocados para posterior moldagem com silicone de condensação e confecção de próteses metálicas provisórias (figura 1F). Dos quatro implantes inseridos em cada lado da mandibular, dois foram associados com o enxerto ósseo sintético 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 (figuras 2A e 2B). Dessa forma, os seguintes grupos foram formados: teste equicrestal (GTEC) com presença do enxerto ósseo sintético (Bone Ceramic, Straumann™, Basel-Switzerland), controle equicrestal (GCEC) com o coágulo, teste subcrestal (GTSC) com presença do enxerto ósseo sintético (Bone Ceramic, Straumann™, Basel-Switzerland) e controle subcrestal (GCSC) com o coágulo.

Uma vez que os implantes estavam posicionados, a relação entre a porção mais cervical do implante e a tábua óssea vestibular foi verificada, e a distância entre ombro do implante e topo da crista óssea vestibular foi registrada. A próxima etapa foi a adaptação dos cicatrizadores em todos os implantes (figura 2C).

Nos cuidados pós-operatórios, cloridato de tramadol (50mg/ml) foi usado na dosagem de 3mg/kg no intervalo 12 horas como terapia analgésica, e cetoprofeno 20mg na dosagem de 1comprimido/20 kg foi utilizado como anti-inflamatório. Os animais receberam Stomorgyl (Stomorgyl 10, Merial Saude Animal Ltda, Paulinia, SP, Brazil), na dosagem de 1comprimido/10 kg, por 10 dias como terapia antibiótica. Os animais foram mantidos com uma dieta leve por pelo menos 15 dias, e a cicatrização das regiões operadas foi acompanhada periodicamente e os dentes remanescentes receberam controle de placa, inclusive com a utilização de pontas ultrassônicas, mensalmente.

Uma semana após, as suturas foram removidas, as conexões protéticas adaptadas e as próteses metálicas instaladas no mesmo tempo, caracterizando a presença de carga precoce (figura 2D).

Durante o período de cicatrização de 3 meses, foram administrados 4 marcadores ósseos fluorescentes, de acordo com a técnica descrita por Cho et al, a fim de observar o grau e a extensão da mineralização óssea. Na primeira semana após a instalação dos implantes, 20mg/kg peso corpóreo de calceína verde intravenoso foi administrado (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); na segunda semana, 20mg/kg peso corpóreo de alizarina intravenoso foi administrado (Sigma); na quarta semana, 20mg/kg peso corpóreo de tetraciclina intravenoso foi administrado (Sigma); na décima segunda semana, 20mg/kg 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 com solução salina fisiológica. Após o preparo das soluções, o pH foi ajustado a 7,4 e as mesmas foram filtradas com os discos de 0,45 µm (Schleider & Schuell GmbH, Dassel, Germany). Cada animal recebeu doses de 3 ml de volume de cada corante.

Figura 1: **A** - aspecto inicial da mucosa e dos dentes; **B** - hemiseção radicular; **C** - alvéolos pós-extração; **D** – implantes imediatos; **E** – gap (2,0 mm) entre o implante e a tábua óssea vestibular; **F** – os transferentes na posição para moldagem para posterior confecção das próteses.

Figura 2: **A** – Enxerto ósseo no gap; **B** – todos os implantes posicionados; **C** - sutura ao redor dos cicatrizadores; **D** – próteses instaladas uma semana após as cirurgias.

Sacrifício e Processamento Histológico

Doze semanas após a instalação dos implantes, os animais foram sedados e sacrificados por uma indução de anestesia profunda e subsequente overdose de thiopental sódico e cloreto de potássio. As hemi-mandíbulas foram dissecadas removidas, reduzidas e fixadas em formalina a 4% em pH 7 por dez dias (figuras 3A, 3B e 3C). Os espécimes foram transferidos para uma solução de 70% álcool e, então, desidratados em concentrações ascendentes de álcool até atingir a concentração de 100%. Em seguida, foram infiltrados e incluídos em resina LR White (London Resin Company, Berkshire, England). Em seguida, os blocos foram seccionados no sentido vestibulo-lingual pela técnica de secção de tecidos duros descrita por Donath & Breuner (1982) e imagens radiográficas digitais padronizadas

foram feitas de cada corte (figuras 3D e 3E). Para tal procedimento, os implantes foram virados de lado e radiografias foram realizadas nas faces proximais que correspondiam a vestibular e a lingual (figura 3E), portanto revelando os detalhes de cada tábua óssea em cada implante.

Após a análise radiográfica, lâminas foram preparadas com uma espessura média de 50 µm para análise de fluorescência, e então para a histomorfometria após ser corada com *Azul de Toluidina* para análise microscópica.

Figura 3: **A** – Hemi-mandíbula removida após o sacrifício; **B** – o aspect radiográfico dos implantes unidos; **C** – a individualização dos implantes; **D** – o aspecto vestibulo-lingual dos implantes; **E**:- tomada radiográfica no sentido vestibulo-lingual dos blocos.

Análise Radiográfica

O parâmetro para cada avaliação foi a padronização do posicionamento do implante em relação à tábua óssea vestibular. A análise foi realizada utilizando o software Image Tool (Trophy-Radiologie, Vincennes, France) para verificar e determinar a distância resultante entre o ombro do implante e a crista óssea vestibular (**reabsorção vertical da crista óssea - RVCO**) (figura 4A), tão quanto à **distância linear do gap resultante entre a superfície do implante e crista óssea vestibular (L-GR)** (figura 4B), e a **medida da área radiolúcida do gap residual (A-GR)** (figura 4C).

Figura 4: **A** – a medida da reabsorção vertical da crista óssea (RVCO); **B** - distância linear do gap resultante entre a superfície do implante e a crista óssea vestibular (L-GR); **C** - a medida da área radiolúcida do gap residual (A-GR).

Análise Histomorfométrica

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

A **reabsorção vertical da crista óssea** (RVCO) da tábua vestibular dos implantes foi determinada como uma medida linear vertical a partir de uma linha imaginária do ombro do implante até o ponto mais alto da crista óssea (figura 5A).

O **nível ósseo vertical** (NOV) foi determinado na superfície vestibular do implante, a partir do ombro do implante em direção ao primeiro contato entre o osso mineralizado e a superfície do implante (figura 5B).

A densidade óssea histológica foi determinada dentro de um retângulo que abrange a região do defeito (gap), com 1,0 mm de largura e 3,0 mm de comprimento, partindo do ombro do implante (áreas adjacentes) e dentro de outro retângulo em imagem espelho às primeiras áreas (áreas distantes). As medidas da densidade óssea avaliaram as porcentagens de osso mineralizado em relação às porcentagens de espaços medulares para ambas as áreas adjacentes e distantes (figura 5C). O parâmetro de **osso novo** formado (ON) foi analisado nas áreas adjacentes e distantes, e **osso novo recentemente formado** (ORF) foi analisado somente nas áreas adjacentes. A porcentagem de **partículas residuais do enxerto ósseo** (PR) foi determinada nos grupos testes.

Finalmente, medidas horizontais lineares foram feitas dentro dos defeitos, a partir do ponto mais cervical do implante em direção a superfície interna da tábua

óssea, na função de avaliar a **reabsorção da crista óssea** (RCO) (figura 6). Adicionalmente, medidas foram feitas a partir da região central da superfície do implante em direção a superfície interna da tábua óssea (1) e, do ponto mais apical da superfície do implante em direção a superfície interna da tábua óssea (2) na função de avaliar o **gap residual** (GR, figura 6).

Figura 5: Medidas histomorfométricas. **A** - A densidade histológica determinada dentro de um retângulo que compreende a região do defeito. O comprimento de 3 mm é representada por uma linha do lado esquerdo do implante. A área adjacente representada pelo retângulo amarelo e a área distante em espelho à primeira; **B** - Nível ósseo vertical foi determinado na superfície vestibular do implante, a partir do ombro do implante em direção ao primeiro contato-implante; **C** - A reabsorção vertical da crista óssea (RVCO) da tábua vestibular dos foi determinada como uma medida linear vertical a partir de uma linha imaginária do ombro do implante até o ponto mais alto da crista óssea. (Aumento 2,5X). Coloração: Azul de Toluidina.

Figura 6: Reabsorção da crista óssea (RCO): medidas horizontais lineares a partir do ponto mais cervical do implante em direção a superfície interna da tábua óssea. Medidas foram feitas a partir da região central da superfície do implante em direção à superfície interna da tábua óssea (1) e, do ponto mais apical em direção à superfície interna da tábua óssea (2) para avaliar o gap residual (GR.). (Aumento 2,5X). Coloração: Azul de Toluidina.

Análise de Fluorescência

Imagens microscópicas de fluorescência foram capturadas no sentido longitudinal de cada implante através de uma câmara de vídeo Leica DC 300F (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) acoplada a um microscópio Leica MZFL III (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) utilizando combinações apropriadas de excitação e filtros. Assim, para a calceína verde foi utilizado filtros com comprimento de onda I3 e nível de excitação entre 450-490nm; 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 Leica Qwin (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) para determinar as porcentagens das marcações ósseas adjacentes e distantes à superfície do implante. Portanto, um retângulo que abrange a região do defeito (1,0 mm de largura e 3,0 mm de comprimento) foi utilizado para analisar áreas adjacentes aos implantes, enquanto outro retângulo foi colocado em imagem espelho às primeiras áreas para avaliar as áreas distantes aos implantes. As medidas das marcações ósseas quantificaram as porcentagens de osso marcado por cada fluorocromo em relação à área total. Apenas um examinador, que desconhecia a qual grupo pertencia cada uma das imagens, realizou todas as medidas.

Análise Estatística

Os resultados foram estatisticamente submetidos às análises, e médias e desvio-padrão foram calculados para todos os parâmetros avaliados. As diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste de Friedman. O teste de Wilcoxon foi utilizado com a correção de Bonferroni's para detectar as diferenças estatisticamente significantes que ocorreram entre os grupos. O nível de significância assumido foi de 5%.

Resultados

Observações Clínicas

Nenhuma intercorrência foi observada durante o período pós-operatório de 12 semanas, após a instalação dos implantes, em nenhum dos animais. Em especial, as regiões envolvidas na pesquisa não apresentaram sinais significativos de inflamação. Dos 64 implantes instalados, apenas quatro foram perdidos durante o experimento devido à interferências no processo de osseointegração. As próteses temporárias permaneceram estáveis durante todo o experimento e não foram observadas ocorrências ou complicações.

Análise das Imagens Radiográficas

Na análise das imagens radiográficas, foi possível observar os aspectos radiográficos da tábua óssea vestibular levemente acima do ombro do implante e presença do gap preenchido com o enxerto ósseo sintético no grupo equicrestal teste (figura 7A). No grupo equicrestal controle, a tábua óssea vestibular mostrou pequena perda e o gap estava parcialmente preenchido com novo tecido mostrando áreas radiolúcidas (figura 7B). O grupo subcrestal teste apresentou aspectos radiográficos da tábua óssea vestibular acima do ombro do implante tão quanto o gap estava preenchido por enxerto ósseo sintético (figura 7C). No entanto, o grupo subcrestal controle mostrou que a tábua óssea estava levemente acima do ombro do implante, mas menor que grupo subcrestal teste, e estava parcialmente preenchido com novo tecido (figura 7D).

Figura 7: **A** - Imagem radiográfica do grupo teste equicrestal demonstrando a presença do tecido neoformado no gap; **B** - Imagem radiográfica do grupo controle equicrestal demonstrando imagem radiolúcida no gap; **C** - Imagem radiográfica do grupo teste subcrestal demonstrando a de tecido neoformado no do gap; **D** - Imagem radiográfica do grupo controle subcrestal demonstrando a presença parcial do tecido neoformado no gap.

Análise Radiográfica

A reabsorção vertical da crista óssea (RVCO) entre os grupos teste e controle equicrestal não mostrou diferença estatisticamente ($p > 0.05$). Da mesma forma, não foi observada diferença significativa entre os grupos teste e controle subcrestal ($p > 0.05$). No entanto, foi observada diferença estatisticamente significante entre o grupo teste equicrestal em relação aos grupos teste e controle subcrestal ($p = 0.03$). O grupo teste

equicrestal não apresentou nenhuma perda da tábua óssea, com a tábua óssea praticamente ao nível do ombro do implante. O grupo controle equicrestal apresentou pequena perda (0,19 mm), no entanto os grupos subcrestais apresentaram níveis mais altos de reabsorção tanto no teste (1,20 mm) quanto no controle (1,60 mm) (Tabela 1).

A distância linear do gap resultante entre a superfície do implante e o ponto mais alto da crista óssea vestibular (L-GR) não estabeleceu diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle equicrestal e subcrestal ($p > 0.05$) (Tabela 2).

O mesmo resultado foi observado em relação à medida da área radiolúcida remanescente do gap residual (A-GR), no qual nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos teste e controle equicrestal e subcrestal ($p > 0.05$) (Tabela 3)

Tabela 1: Reabsorção vertical da crista óssea (RVCO) em mm.

	GTEC	GCEC	GTSC	GCSC	
RVCO (Média $\pm$ DP)	+0,09 $\pm$ 0,49*	0,19 $\pm$ 0,59	1,18 $\pm$ 0,63*	1,51 $\pm$ 0,89*	$P < 0,05$

GTEC: grupo teste equicrestal; GCEC: grupo controle equicrestal; GTSC: grupo teste subcrestal; GCSC: grupo controle subcrestal.

Teste de Friedman (*Bonferroni Post-HocTest*)

*Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P = 0,02$; $n=8$)

Tabela 2: Distância linear (mm) do gap residual entre a superfície do implante e a tábua vestibular (L-GR)

	GTEC	GCEC	GTSC	GCSC	
L-GR (Média $\pm$ DP)	0,06 $\pm$ 0,17	0,25 $\pm$ 0,39	0,06 $\pm$ 0,11	0,16 $\pm$ 0,31	$P > 0,05$

Teste de Friedman

Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$; $n=8$)

Tabela 3: Área radiolúcida (mm²) do gap residual entre a superfície do implante e a tábua vestibular (A-GR)

	<i>GTEC</i>	<i>GCEC</i>	<i>GTSC</i>	<i>GCSC</i>	
A-GR (Média ± DP)	0,03±0,10	0,14±0,22	0,11±0,26	0,18±0,37	$P > 0,05$

Teste de Friedman

Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$; n=8)

Análise Histológica

Em geral, todos os grupos mostraram a presença de osso lamelar maduro (OLM) representando o “osso antigo” (OA), osso novo (ON) formado nos períodos iniciais de cicatrização e osso novo recentemente formado (ORF) depositado no período final de cicatrização (próximo ao sacrifício) (figuras 5A e 5B). A Matriz osteóide (MO) foi observada em algumas áreas das superfícies externas do osso recentemente formado (figuras 5B, 5C e 6C), e estava pavimentada por osteoblastos (OB) representando um novo processo de formação óssea (figuras 5B, 5C e 6C). Adicionalmente, nos grupos testes, partículas residuais (PR) do enxerto ósseo estavam presentes no gap entre a superfície do implante e a tábua óssea vestibular (figuras 4B e 4D).

O osso novo estava presente na maior parte do alvéolo em ambos os grupos, e a superfície entre esta estrutura e o osso antigo é facilmente identificada (figuras 8B, 8C, 8D, 9A e 9B). Através de uma detalhada análise, foi possível observar que o osso novo foi caracterizado por fibras paralelas com um padrão mais lamelar, mas em algumas áreas, um osso com fibras entrelaçadas caracterizando osso imaturo estava presente (figuras 8C, 8D, 9A e 9B).

O osso novo recentemente formado (ORF) estava presente na interface com o tecido fibroso, e usualmente, estava acompanhado por uma camada de

osteoblastos representando um processo de remodelação óssea do osso novo depositado anteriormente (figuras 8B, 8C, 8D, 9A e 9B). Adicionalmente, osso novo recentemente formado estava em contato direto com a superfície do implante e com partículas do enxerto ósseo (figuras 10A, 10B, 10C, 10D). Em geral, esta mais nova formação óssea foi caracterizada por um osso de fibras paralelas (osso lamelar) com áreas residuais de fibras entrelaçadas (osso imaturo) (figuras 9B, 10C e 10D).

Nos grupos testes, ao longo do osso novo, foi possível observar a presença de partículas residuais do enxerto ósseo (PR) dispersas na região correspondente área do gap (figuras 10A, 10B, 10C e 10D). Em algumas áreas, as partículas estavam circunscritas por ambos os tipos de nova formação estabelecendo contato direto entre as estruturas (figuras 10B, 10C e 10D). A presença de osteoblastos, matriz osteóide e de osso novo recentemente formado indicou uma formação óssea ativa na superfície das partículas do enxerto (figura 10D).

Figura 8: **A** - Imagens histológicas do grupo controle. **B** - A presença do osso antigo (OA), do osso novo (ON) e do osso recentemente formado (ORF). Observe a nítida separação entre o osso antigo e o osso novo (Aumento10X); **C** - Área do osso novo demonstrando aspecto imaturo (fibras entrelaçadas) com algumas lamelas concêntricas e presença de osteoblastos (OB) e matriz osteóide (MO) indicando ativa formação óssea (Aumento20X). As setas azuis indicam osso recentemente formado em contato direto com o implante; **D** - As setas azuis indicam o osso recentemente formado e as vermelhas indicam osso novo. A matriz osteóide (MO) na superfície externa do ORF e a atividade osteoclástica (OC). (Aumento 40X). Coloração: Azul de Toluidina.

Figura 9: **A.** As diferentes estruturas. **B.** Luz Polarizada: as setas brancas indicam o aspect do osso novo com padrão lamelar e, algumas áreas, a estrutura com fibras entrelaçadas caracterizando osso imaturo. As setas azuis indicam o osso recentemente formado (ORF) caracterizado por um osso de fibras paralelas e algumas áreas residuais de fibras entrelaçadas (osso imaturo). (Aumento 10X). Coloração: Azul de Toluidina.

Figura 10: **A** - Imagens histológicas dos grupos testes (Aumento 1,6X). **B** - partículas residuais (PR) do enxerto ósseo circundadas por osso novo (ON) e osso recentemente formado (ORF) (Aumento 10X); **C** - A superfície do implante delineada por osso recentemente formado (ORF), assim como com a superfície da partícula do enxerto formando uma ponte entre as estruturas (Aumento 20X); **D** - Os osteoblastos (OB) e a matriz osteóide (MO) indicando formação óssea ativa em contato direto a superfície dos implantes e com as partículas residuais (PR). (Aumento 40X). Coloração: Azul de Toluidina.

Análise Histomorfométrica

A avaliação de cada grupo dos implantes foi realizada para investigar a capacidade de manutenção da tábua vestibular e formação óssea dentro do gap de acordo com a reabsorção da crista óssea vertical (RVCO), nível ósseo vertical (NOV), densidade óssea e gap residual (GR). De uma forma geral, foi observado que nos grupos subcrestais o parte do gap permaneceu acima do ombro do implante devido aos 2 mm abaixo da crista óssea, os valores para NOV e densidade óssea apresentaram melhores índices, enquanto aos valores da RVCO foram maiores (Tabela 4).

A avaliação da reabsorção vertical da crista óssea (RVCO) analisou a perda da crista em relação ao ombro do implante, e os grupos equicrestais obtiveram perda insignificante de 0,08 mm e 0,20 mm para o teste e controle respectivamente. Os grupos subcrestais obtiveram perda de 1.95 mm e 1.28 para o teste e controle respectivamente. Diferença estatisticamente significativa foi observada no grupo teste subcrestal em relação aos grupos teste e controle equicrestais, com um maior índice de perda no grupo subcrestal ($p < 0,05$) (Tabela 4).

O nível ósseo vertical (NOV) nos grupos teste e controle subcrestais mostraram valores superiores quando comparados aos grupos teste e controle equicrestal, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$). O GTEC mostrou 1,58 mm entre o ombro do implante e o primeiro contato osso implante, o GCEC apresentou 1,67 mm, enquanto nos grupos teste e controle subcrestais foi observado 1,31 mm e 0,75 mm respectivamente (Tabela 4).

Os grupos equicrestais e subcrestais apresentaram diferentes comportamentos em relação à densidade óssea histológica. Portanto, diferença estatisticamente significativa foi observada entre todos os grupos em favor do grupo controle subcrestal

em relação à densidade óssea adjacente para o parâmetro de novo osso ($p < 0,05$). O grupo teste equicrestal apresentou 35,76% de densidade óssea para o novo osso, o grupo controle equicrestal mostrou 51,40%, e os grupos testes e controles subcrestais apresentaram 45,15% e 80,01%, respectivamente. Para o novo osso recém-formado, todos os grupos apresentaram comportamentos similares e, portanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Para tal, os grupos teste e controle equicrestais apresentaram uma porcentagem média de 16,57% e 17,30% respectivamente, enquanto que os grupos teste e controle subcrestais mostraram densidade óssea aproximada de 13,71% e 18,11%, respectivamente. Em relação às áreas distantes, uma diferença numérica foi observada apontando maior densidade óssea no grupo controle subcrestal, no entanto diferença estatisticamente significativa não foi observada entre nenhum dos grupos ($p > 0,05$). Os grupos teste e controle equicrestais obtiveram valores percentuais médios de 26,03% e 17,46%, enquanto que os grupos teste e controle subcrestais apresentaram médias maiores em torno de 37,65% e 48,35%, respectivamente (Tabela 4).

Na análise intra-grupo, densidades ósseas entre as áreas adjacentes e distantes mostraram diferença estatisticamente significativa dentro dos grupos controle equicrestal e controle subcrestal, com maiores valores para a densidade óssea adjacente em ambos os grupos ($p < 0,05$) (Tabela 4).

A porcentagem residual das partículas do enxerto ósseo foi similar para ambos os grupos testes, indicando que parte deste biomaterial foi reabsorvida e parte estava envolvida por novo osso dentro do gap. No grupo subcrestal, a porcentagem foi menor com 8,40% de partículas residuais em relação ao grupo equicrestal que obteve 11,16%, provavelmente devido à posição subcrestal do implante acarretando a perda destas partículas (Tabela 4).

A reabsorção da crista óssea que aconteceu em alguns animais foi detectada não somente pela reabsorção vertical da crista óssea, mas também pelas medidas lineares horizontais (RCO). No presente estudo, a reabsorção foi observada somente no terço cervical dos defeitos, na primeira medida horizontal (Tabela 2). Devido à ocorrência deste tipo de reabsorção, não foi possível avaliar estatisticamente a reabsorção da crista óssea (primeira medida linear horizontal). Portanto, em uma análise descritiva, foi observado que o número de animais, nos quais não foi encontrado “osso” na primeira medida horizontal provinda do ombro do implante, foi maior nos grupos equicrestais do que nos grupos subcrestais provavelmente devido à posição do implante (Tabela 5). Para o grupo teste equicrestal, três animais mostraram a ausência de osso nesta primeira medida horizontal (reabsorção crista óssea). Para o grupo controle equicrestal, somente 2 animais obtiveram perda da crista óssea neste nível (Tabela 5). Para o grupo teste subcrestal, dois animais também apareceram sem osso nesta primeira medida horizontal, e nenhum animal mostrou reabsorção crista óssea na primeira medida horizontal no grupo controle subcrestal (Tabela 5).

Considerando as medidas horizontais que foram feitas na região central do defeito (1) para avaliar o gap residual (GR), foi observado que os valores médios diminuíram do grupo teste equicrestal para o grupo controle subcrestal, com o último grupo apresentando as médias mais baixas com diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos teste e controle equicrestais ($p < 0,05$). Portanto, o valor da média e do desvio-padrão encontrados foram 0,24 mm ($\pm 0,28$) no grupo teste equicrestal, 0,19 mm ($\pm 0,15$) no grupo controle equicrestal, 0,17 mm ($\pm 0,32$) no grupo teste subcrestal e 0,02 mm ($\pm 0,04$) no grupo controle subcrestal (Tabela 6).

A medida linear horizontal provinda da região mais apical do defeito (2) mostrou valores que decresceram do grupo teste equicrestal para o grupo controle subcrestal, mas sem diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$). Portanto, o valor da média e do desvio-padrão encontrados foram $0,17 \text{ mm} \pm (0,37)$ no grupo teste equicrestal, $0,04 \text{ mm} \pm (0,07)$ no grupo controle equicrestal, $0,10 \text{ mm} (\pm 0,16)$ no grupo teste subcrestal e $0,09 \text{ mm} \pm (0,12)$ no grupo controle subcrestal (Tabela 6). De uma forma geral, foi observado que o gap residual (GR) foi diminuindo à medida que o defeito foi afunilando em direção à superfície do implante, por isso a segunda medida linear foi menor.

Contando o número de zeros em cada grupo, que representa a ausência de espaço (Preenchimento Ósseo – PO) entre a superfície interna da tábua vestibular e a superfície do implante, foi possível observar que em todos os grupos o número de zeros foi inferior na primeira medida horizontal, onde foi observado maior índice de reabsorção crista óssea (Tabela 5). O número de zeros foi menor para as medidas “1” e “2” nos grupos equicrestais quando comparado aos grupos subcrestais, significando que os grupos subcrestais apresentaram maior preenchimento ósseo (Tabela 6).

Tabela 4: Comparações (média e desvio-padrão) entre os grupos testes e controles equicrestais e subcrestais para todos os parâmetros histomorfométricos: reabsorção da vertical crista óssea (RVCO), nível ósseo vertical (NOV), densidade óssea do osso novo (ON) (análise entre e intra-grupo das áreas adjacentes e distantes) e densidade óssea do osso novo recentemente formado (ORF), e a porcentagem das partículas residuais.

Grupos	RVCO (mm)	NOV (mm)	Densidade Óssea (%)			Partículas residuais (%)
			Adjacente (ON-100%)	Adjacente (ORF)	Distante (ON-100%)	
GTEC	0,08 ± 0,77 π	1,58 ± 0,95	35,76 ± 17 π	16,57 ± 8	26,03 ± 20	11,16
GCEC	0,20 ± 0,42π	1,67 ± 0,82	51,40 ± 17 π†	17,30 ± 9	17,46 ± 11†	—
GTSC	1,95 ± 0,52π	1,31 ± 0,41	45,15 ± 16π	13,71 ± 4	37,65 ± 37	8,40
GCSC	1,28 ± 0,60	0,75 ± 0,33	80,01 ± 10 π†	18,11 ± 12	48,35 ± 32†	—

GTEC: grupo teste equicrestal; GCEC: grupo controle equicrestal; GTSC: grupo teste subcrestal; GCSC: grupo controle subcrestal.

Teste de Friedman (*Bonferroni Post-HocTest*)

π: Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05,02$; $n=8$)

†: Diferença estatisticamente significativa intra- grupo ($p < 0,05,02$; $n=8$)

Tabela 5: Reabsorção da crista óssea (RCO) (mm) investigada em todos os grupos equicrestais e subcrestais através de medidas lineares horizontais do ombro do implante até a crista óssea cervical.

	Reabsorção crista óssea (RCO)								RCO	Preenchimento ósseo (PO)
GTEC			0,38	0,71	0,64	0		1,67	3	1
GCEC	0,54	0,65		0,41	0,29	0,56		0,46	2	0
GTSC	0,19	0,18	0,05	1,6	0,81	0			2	1
GCSC	0,17	0,52	0,29	0,17	0,22	0,28	0,26	0,45	0	0

Tabela 6: Gap residual (GR) (mm) investigada dentro dos gaps de todos os grupos equicrestais e subcrestais através das medidas lineares horizontais: (1) do implante até a região central do gap; (2) do implante até a região mais apical do gap dentro do retângulo.

	GTEC		GCEC		GTSC		GCSC	
	1	2	1	2	1	2	1	2
	0	0	0,50	0,20	0	0,29	0	0,25
	0	0	0,23	0,01	0,13	0,09	0	0,22
	0	0,03	0,06	0	0	0	0	0
	0,55	0,11	0,17	0	0	0	0	0
	0,37	0,06	0,08	0	0,93	0	0	0
	0,21	0,09	0,01	0	0,29	0,41	0	0,28
	0,06	0	0,15	0,08	0	0,01	0,05	0,03
	0,73	1,10	0,32	0,05	0	0	0,12	0
Média	0,24 π	0,17	0,19 π	0,04	0,16	0,10	0,02 π	0,08
Preenchimento ósseo (PO)	3	3	0	4	5	4	6	4

GTEC: grupo teste equicrestal; GCEC: grupo controle equicrestal; GTSC: grupo teste subcrestal; GCSC: grupo controle subcrestal.

Teste de Friedman (*Bonferroni Post-HocTest*)

π : Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05, 02$; $n=8$)

Análise da Fluorescência

A análise da microscopia de fluorescência mostrou intensa remodelação óssea para todos os grupos avaliados. O osso antigo mostrou-se sempre em tonalidades mais escuras e não fluorescentes, enquanto a calceína verde mostrou-se claramente através de faixas verdes, a alizarina vermelha com um padrão vermelho difuso, a tetraciclina através de linhas finas verdes e amarelas, finalmente a calceína azul foi caracterizada por uma coloração azul em um padrão difuso sempre sem bordas definidas (figura 11).

A nova mineralização óssea foi determinada histomorfometricamente por uma quantificação dos marcadores ósseos. Seqüencialmente, os marcadores ósseos representaram o padrão cicatricial de cada grupo avaliado. As porcentagens de novo osso formado nas áreas adjacentes e distantes à superfície do implante são descritas na tabela 7 e nos gráficos 1 e 2.

Para as áreas adjacentes, os valores variaram de 1,69% à 1,80% em relação ao índice de mineralização na primeira semana e, aumentaram gradualmente após 7 dias (de 2,65% à 5,36%), atingindo os valores mais altos na quarta semana de avaliação (6,80% à 8,00%). Na décima segunda semana, o nível de mineralização óssea permaneceu constante com pequenas oscilações (5,56% à 7,36%). Todos os grupos seguiram o padrão de mineralização descrito anteriormente, com aumentos progressivos até a quarta semana e manutenção do nível na décima segunda semana. No entanto, o grupo controle subcrestal foi a única exceção quee apresentou um aumento nesta última semana (de 6.80% para 7.36%) nas áreas adjacentes. Na análise entre-grupos foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle subcrestal na segunda semana ($p<0,05\%$).

Para a análise das áreas distantes, foi possível observar um aumento significativo entre a primeira e a décima segunda semana para todos os grupos. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle subcrestais na segunda semana ($p < 0,05\%$).

Considerando a análise intra-grupo entre as áreas adjacentes e distantes, foi possível observar diferença estatisticamente significativa no grupo controle equicrestal e, em ambos os grupos subcrestais com valores maiores nas áreas adjacentes na segunda semana de avaliação ($p < 0,05\%$). Adicionalmente, ao comparar as áreas na quarta semana de avaliação, diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre todos os grupos com a obtenção de maiores valores nas áreas adjacentes ($p < 0,05\%$). Com 12 semanas, somente o grupo controle equicrestal mostrou diferença significativa entre as áreas ($p < 0,05\%$).

Figura 11: Análise da Fluorescência. Nova formação óssea foi determinada histomorfometricamente pela quantificação dos marcadores ósseos. O osso antigo mostrou-se sempre em tonalidades mais escuras e não fluorescentes. **A** - calceína verde mostrou-se claramente através de faixas verdes. **B** - alizarina vermelha com um padrão vermelho difuso. **C** - tetraciclina com linhas finas verdes e amarelas. **D** - calceína azul caracterizada por uma coloração azul em um padrão difuso sempre sem bordas definidas. Magnification 2,5X.

Tabela 7: Análise de Fluorescência. As porcentagens do novo osso formado nas áreas adjacentes e distantes nos grupos equicrestais e subcrestais ao longo do período de avaliação.

Grupos	Índice de mineralização (%)							
	Adjacente				Distante			
	1 semana	2 semanas	4 semanas	12 semanas	1 semana	2 semanas	4 semanas	12 semanas
GTEC	1,69	4,20	6,96 π	6,30	1,18	2,02	3,12 π	5,50
GCEC	1,64	4,62†	8,00 π	7,56¥	0,47	1,44†	2,86 π	4,84¥
GTSC	1,80	5,36*†	7,89 π	5,56	1,42	2,97*†	4,42 π	5,80
GCSC	1,13	2,65*†	6,80 π	7,36	1,05	1,09*†	3,37 π	4,57

GTEC: grupo teste equicrestal; GCEC: grupo controle equicrestal; GTSC: grupo teste subcrestal; GCSC: grupo controle subcrestal.

Teste de Friedman (*Bonferroni Post-HocTest*)

*: Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05,02$; $n=8$)

π † ¥: Diferença estatisticamente significativa intra- grupo ($p < 0,05,02$; $n=8$)

Gráfico 1. Análise de Fluorescência: Medidas adjacentes aos implantes.

Gráfico 2. Análise de Fluorescência: Medidas distantes aos implantes

Discussão

O protocolo dos implantes imediatos implica na instalação de implantes dentais imediatamente após a extração dental. Estudos clínicos e séries de casos clínicos indicaram que implantes imediatos parecem ter o mesmo sucesso comparado com aqueles inseridos no protocolo convencional (Schwartz-Arad; Chaushu, 1997; Krump; Barnett, 1991; Tolman; Keller, 1991). No entanto, faltam análises histométricas para melhor entendimento da cicatrização óssea e qualidade de osseointegração quando diferentes variáveis que envolvem a terapia imediata estão associadas. A avaliação clínica da resolução de um defeito marginal crítico é muito limitada. Este estudo avaliou a remodelação da tábua óssea após implantes imediatos, em cirurgias sem retalho, comparando este processo entre sítios associados ou não com enxerto ósseo sintético no gap entre a superfície do implante e a tábua vestibular. Os resultados radiográficos demonstrados em relação ao gap residual e principalmente ao parâmetro referente à reabsorção vertical da crista óssea, foram confirmados pelos achados histomorfométricos, com algumas diferenças insignificantes que não alteram a interpretação dos dados. Portanto, toda a discussão será baseada nos resultados histológicos. A análise histomorfométrica demonstrou menor reabsorção da crista óssea vertical (RCOV) no grupo teste equicrestal, mas os outros parâmetros mostraram melhores resultados no grupo controle subcrestal. Portanto, em uma visão geral, conforme o implante foi posicionado 2,0 mm subcrestal, a reabsorção da crista vestibular e a densidade óssea aumentaram, porém o nível ósseo vertical diminuiu.

No presente estudo, a perda do osso vestibular (RVCO) nos grupos equicrestais foi menor quando comparado com os grupos subcrestais. A reabsorção foi insignificante no grupo teste equicrestal (0,08 mm) e apresentou apenas 0,20 mm de perda no grupo controle sequicrestal. Diferença significativa foi encontrada

comparando-se a perda do grupo teste subcrestal em relação aos grupos equicrestais. Nos grupos subcrestais, a crista óssea permaneceu acima do ombro do implante, mas o implante foi inserido 2,0 mm subcrestal, o que indicou que a perda óssea ocorreu, mas não expôs os implantes. Os resultados positivos obtidos nos grupos equicrestais, provavelmente ocorreram devido à realização de cirurgias sem retalho, ao gap de 2,0 mm que foi preenchido com enxerto ósseo sintético em associação com o design a posição do implante, e a superfície do SLActive ao longo de todo o comprimento do implante.

Alguns estudos em animais observaram pronunciada reabsorção da tábua vestibular, após a instalação de implantes imediatos resultando em uma acentuada redução da altura da tábua óssea bucal (Araujo et al., 2006b; Araújo; Wennstrom; Lindhe, 2006b). Foi sugerido (Araújo; Lindhe, 2005) que esta redução ocorreu devido à perda inicial de osso e espessura pré-cirúrgica do tecido ósseo vestibular fino (biótipo). Recentemente, alguns estudos (Barros et al., 2009b; Fickl et al., 2008) investigaram a efetividade de cirurgias sem retalho como uma alternativa para preservar a tábua vestibular em pelo menos alguma extensão. Este fato talvez tenha um impacto particular quando se trata de implantes imediatos, considerando que a extração dental elimina o suprimento sanguíneo provindo do ligamento periodontal, permanecendo somente a vascularização provinda do perióstio. Portanto, a utilização de retalhos nesta situação talvez comprometa fortemente o suprimento sanguíneo provindo do perióstio e consequente reabsorção da tábua óssea vestibular. Barros et al (2009a) observou uma perda óssea em altura duas vezes mais pronunciada no grupo onde implantes imediatos foram instalados após a elevação de retalhos, que no grupo sem retalho. No entanto, Caneva et al (2010) observaram que a reabsorção da crista óssea alveolar vestibular foi 1,7 mm no lado

com elevação de retalho e 1,5 mm no lado sem retalho. Entretanto, Fickl et al (2008) observaram um estreitamento bucal 0,7 mm maior no grupo com elevação de retalho quando comparado ao grupo com a ausência de retalho. Adicionalmente, Fickl et al (2008) realçou o ótimo impacto destes achados nos biotipos periodontais mais finos, onde atividades osteoclásticas internas ocorrem, além das externas convencionais na presença do retalho, podendo ambas as atividades se fundirem e causarem uma perda muito maior da tábua óssea vestibular. Portanto, a ausência de retalhos é um fator de extrema importância para a manutenção da crista óssea.

A associação da presença ou ausência de gaps e de retalhos leva à muitos questionamentos e diferentes resultados foram obtidos em diversos estudos. Blanco et al (2011) inseriu implantes imediatos ao nível da crista óssea em cirurgias com a elevação de retalhos e gaps menores que 1 mm. Foi observado que a crista óssea, no aspecto vestibular, estava 0,86 mm e 1,3 mm apical a borda do implante SLA. Comparando com nossos resultados, foi possível analisar que gaps amplos, como os presentes neste estudo, não interferem negativamente na manutenção da tábua óssea vestibular. Negri et al. (2011), investigou a reabsorção da tábua vestibular em implantes imediatos equicrestais e 2,0 mm subcrestais, mas sem a presença de gaps e com retalho. Os resultados não mostraram diferença significativa e os valores médios para o grupo equicrestal foram maiores (1,8 mm) quando comparado com o grupo subcrestal (1,26 mm). Comparativamente aos achados no presente trabalho, as perdas foram mais elevadas no estudo anterior, o que pode ter ocorrido muitas vezes em função da presença do retalho como discutido anteriormente.

A posição do implante é outro questionamento que precisa ser cuidadosamente analisado. Negri et al. (2011) mostrou maior perda óssea vestibular no grupo equicrestal (1,88 mm) em comparação o subcrestal (1,26 mm), e está de

acordo com o estudo realizado por Barros et al. (2009a, 2010), no qual a remodelação óssea foi avaliada ao redor de implantes Cone Morse inseridos em diferentes níveis (equicrestal e 1,5 mm subcrestal). O grupo subcrestal apresentou reabsorção óssea da crista óssea menor que no grupo equicrestal. Estes achados estão em desacordo com o estudo presente, no qual os grupos equicrestais apresentaram perdas insignificativas de 0,20 mm e 0,08 mm e os grupos subcrestais mostraram resultados menos favoráveis com 1,28 mm e 1,95 mm de reabsorção da crista óssea vestibular e diferenças estatisticamente significativas entre o grupo teste subcrestal e ambos os grupos equicrestais.

Na metodologia do presente estudo, o enxerto ósseo sintético (BoneCeramic) parece não ter contribuído para a obtenção de resultados superiores entre os grupos teste e controle em relação aos parâmetros avaliados. No entanto, os grupos equicrestais mostraram menor reabsorção da crista vestibular e, neste caso, a maior parte do gap estava localizada em contato com a superfície do implante, diferentemente do grupo subcrestal, o que manteve o enxerto ósseo contido entre a tábua óssea e a superfície do implante. Portanto, a degradação inicial do fosfato tricálcio (TCP) e consequente estímulos para o início da osteogênese (potencial osteocondutivo), assim como a lenta degradação da hidroxiapatita (arcabouço) no defeito, provavelmente contribuiu para a manutenção do osso vestibular.

A reabsorção da crista óssea (RC) que ocorreu em alguns animais foi detectada não somente pela linha medida linear vertical referente à reabsorção da crista (altura), mas também pela medida horizontal linear cervical. Discutindo os dados sem ignorar o pequeno número de animais que formou a amostra deste estudo, pode-se assumir que a perda da crista óssea cervical ocorreu em 37,5% dos implantes testes e 25% dos implantes controles no grupo equicrestal. Enquanto que

no grupo subcrestal, a reabsorção da crista foi encontrada em 25% dos implantes testes e, em nenhum implante do grupo controle. A presença do enxerto ósseo não promoveu melhores resultados nos grupos testes, mas levou ao preenchimento total do gap (formação óssea) em um caso de cada grupo.

O nível ósseo vertical (NOV) variou entre todos os grupos, mas diferença estatisticamente significativa não foi encontrada entre nenhum deles. A distância do ombro do implante até o primeiro contato osso-implante foi levemente maior nos grupos equicrestais que no grupos subcrestais, principalmente em relação ao grupo controle subcrestal. É importante enfatizar que a posição do gap e a anatomia do alvéolo em relação ao implante. Nos grupos subcrestais, parte do gap estava localizado acima do ombro do implante. Conseqüentemente, parece que esta distância foi menor nos grupos subcrestais, e o enxerto ósseo não interferiu nos resultados. Araujo et al (2010) , em uma metodologia similar, instalou implantes no nível ósseo ou levemente apical ao osso vestibular adjacente, mas com gaps que variaram entre 1-2 mm na tábua óssea vestibular. O nível ósseo vertical estava 0,1 mm apical no grupo teste (grupo com osso bovino) e 1,3 mm no grupo controle. Os resultados de Araujo et al (2010) estão em acordo com os achados de Blanco et al. (2008) em um estudo semelhante em cães, mas diferente dos resultados no presente estudo em relação ao grupos testes, mais propriamente devido ao tamanho do gap e tipo do enxerto ósseo. No entanto, Negri et al (2011) em um estudo no qual implantes imediatos foram inseridos com retalho e sem gap, observaram que a média do nível ósseo vertical estava localizado 3,39 mm apical no grupo equicrestal e 2,21 mm apical no grupo subcrestal, demonstrando valores muito superiores aos resultados dos grupos equicrestais e subcrestais no presente estudo. Este fato pode ser atribuído ao tempo de cicatrização, 8 semanas no estudo de Negri et al (2011),

comparado com 12 semanas neste estudo, assim como com a presença de retalhos. Blanco et al (2010) com o mesmo modelo de estudo, porém sem gap, mostrou que o contato osso implante mais coronal estava localizado 1,27 mm (implantes com carga), e 1,70 mm (implantes sem carga) apical a borda da superfície bucal do SLA. Comparando com os achados do presente estudo, é possível observar que a superfície SLActive provavelmente contribuiu para resultados superiores associados à carga precoce. Esta nova superfície de implante é quimicamente ativada, produzida em condições de controladas em uma atmosfera de nitrogênio e gás azoto, lacrada em tubos contendo soro fisiológico não haver contato com oxigênio e possível oxidação. Foi demonstrado que comparada à superfície SLA, o SLActive promoveu formação óssea mais rápida (Schwarz et al., 2007).

Na cicatrização óssea, a formação óssea depende da estabilização do coágulo sanguíneo ao redor da superfície dos implantes, e isto talvez seja afetado pela distância entre o implante e a tábua óssea e a qualidade óssea das paredes remanescentes. Blanco et al (2010), em um estudo com implantes imediatos e sem a presença de retalhos e gap, demonstrou que a área de formação óssea peri-implantar nos grupos com carga foi em torno de 94,81%. Este resultado está de acordo com as porcentagens de formação óssea no grupo controle subcrestal no presente estudo, mas superior quando comparado aos demais grupos. Em relação ao parâmetro discutido, o tamanho do gap e o enxerto ósseo parecem influenciar os processos de formação óssea. Os valores presentes neste estudo mostraram diferença estatisticamente entre todos os grupos, com a maior porcentagem de formação óssea (80%) presente no grupo controle subcrestal. Novamente, a anatomia dental do alvéolo e a posição do gap parecem favorecer o grupo controle subcrestal, mas não o grupo controle equicrestal. A porcentagem de formação óssea

nos grupos testes equicrestal e subcrestal foi menor, e não apresentou diferença estatisticamente significativa, em parte, devido à presença do enxerto ósseo que ocupou certa área do gap. Considerando a densidade óssea, parece que o enxerto ósseo foi capaz de conduzir formação óssea ao redor das partículas promovendo uma ligação (ponte) entre o enxerto e a superfície do implante. Portanto, todas as partículas estavam circundadas por novo osso, o qual se encontrava em contato direto com a superfície interna da tábua vestibular e do implante em 12 semanas de cicatrização. Então, a composição específica deste enxerto ósseo sintético (fosfato tricálcio) talvez tenha um efeito benéfico adicional levando à formação e maturação óssea ao redor das partículas do enxerto. Há relatos de que a associação entre implantes imediatos e enxertos com fosfato tricálcio levam à formação de um novo osso semelhante à um cortical (Nakadate et al., 2008).

Botticelli et al (2004) investigou os defeitos bucais ao redor dos implantes e discutiu que talvez não seja o tamanho do gap em si, mas a formação do coágulo, retenção e substituição por uma matriz provisória, que irão determinar se a resolução do defeito ocorrerá. O principal objetivo das medidas lineares horizontais foi avaliar o potencial de preenchimento ósseo em diferentes circunstâncias. Analisando os resultados obtidos pelas medidas horizontais do gap residual (1 e 2), as médias dos valores decresceram do grupos equicrestais para os grupos subcrestais, com diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle subcrestal em relação aos grupos equicrestais. Parece razoável sugerir que um amplo gap é um desafio para a formação óssea completa. Um desafio, mas não um impedimento, porque o preenchimento ósseo completo foi observado através do número de zeros, no qual nenhuma distância foi encontrada entre o novo osso e a superfície do implante.

Abrahamsson et al (2004) avaliando a formação óssea precoce em superfícies tipo SLA e lisa, observou que o novo osso formado estava presente na borda lateral do defeito, contínuo com o osso antigo, evidenciando uma formação óssea aposicional ou osteogênese por contato. Este tipo de formação óssea explica as dificuldades do processo em evoluir para regiões próximas do ombro do implante e, também para o interior do defeito em direção à superfície do implante em se tratando de amplos defeitos, em função da distância entre a superfície do implante e o osso antigo. Adicionalmente, Abrahamsson et al (2004) observou osso imaturo foi nas superfícies SLA a uma distância do osso antigo, demonstrando a presença de distante osteogênese. Esta ocorrência foi encontrada em algumas espécies do presente estudo, onde formação óssea distante das paredes alveolares pré-existentes foi observada originando uma conexão com a superfície do implante. Em relação a isto, Abrahamsson et al (2004) descreveu a superfície SLA como osteofílica, ou seja, que favorece a osseointegração precoce quando comparada com a superfície lisa (sem tratamento). O mesmo poderia ser atribuído para a superfície SLActive utilizada no presente estudo. Pesquisas em animais demonstraram formação e estruturação óssea mais rápida com excelente vascularização sanguínea e alta atividade da osteocalcina nos primeiros 14 dias após a instalação dos implantes SLActive (Schwarz et al., 2007). Esta acelerada cicatrização foi acompanhada por um contato osso-implante acima de 60% e um torque significativamente maior quando comparado com a superfície SLA após 2 e 4 semanas (Oates et al., 2007).

Devido à anatomia do alvéolo e ao gap que estava, em parte, localizado acima do ombro do implante, o gap residual foi menor no grupo controle subcrestal com diferença estatisticamente significativa entre este grupo e ambos os equicrestais

teste e controle. Portanto, o gap residual na primeira (1) e segunda (2) medidas lineares horizontais foi maior no grupo teste equicrestal e menor no grupo controle subcrestal. A análise intra-grupo não mostrou diferenças significativas entre os grupos teste e controle. Além disso, o gap residual vai diminuindo conforme a região apical se estreita em direção à superfície do implante. O preenchimento ósseo, em ambas as medidas lineares foi similar entre os grupos, com a exceção do grupo controle equicrestal que não promoveu este fechamento na região central. No presente estudo, o gap é considerado crítico e, portanto, a resolução dos defeitos torna-se mais difícil.

Além das análises histomorfométricas, o estudo também investigou a dinâmica da cicatrização óssea ao redor da superfície dos implantes e do gap através da análise de fluorescência. A aplicação de marcadores ósseos em diferentes períodos permitiu avaliar a formação e remodelação óssea nos diferentes estágios. Os fluorocromos calceína verde, alizarina, tetraciclina e calceína apresentam diferentes cores e representam uma informação sequencial quando intercalados. Os marcadores podem ser comparados, porque eles se vinculam à íons de cálcio (Sun et al., 1992), evidenciando as áreas de mineralização ativa (Nkenke et al., 2002).

A incorporação do fluorocromo mostrou um padrão dentre os diferentes grupos e ao longo do período de avaliação de 7 dias a 12 semanas. Como demonstrado pela análise histomorfométrica, a comparação entre os grupos teste e controle não mostrou diferença estatisticamente significativa na análise da fluorescência. Somente os grupos teste e controle subcrestais, na segunda semana de avaliação, apresentaram diferenças significativas com melhores resultados observados no grupo teste quando comparado com o grupo controle. De fato, os achados

evidenciaram resultados numericamente melhores para os grupos teste equicrestal e subcrestal em alguns períodos nas áreas adjacentes, mas em todas as avaliações para as comparações nas áreas distantes. É diferente dos achados histomorfométricos, onde os grupos controles equicrestal e subcrestal exibiram resultados superiores nas áreas adjacentes. Em uma visão do que é importante para entender a maior contribuição da análise da fluorescência, é a informação da dinâmica sobre as fases iniciais da formação óssea, diferentemente dos parâmetros histomorfométricos que são utilizados para avaliar a osseointegração ao redor dos implantes, mas baseado somente no momento final do experimento. Então, poderia ser assumido, que os grupos testes seriam capazes de favorecer os eventos precoces da formação óssea como sugerido previamente, sem influenciar o resultado final da formação óssea evidenciado pelos parâmetros histométricos. No geral, foi observado que em todos os grupos equicrestais e subcrestais a porcentagem de marcação óssea foi sutil na primeira semana com valores partindo de 1,13% até 1,80%, aumentou gradualmente após duas semanas com valores mínimos de 2,65% e máximo de 5,36% e alcançou os valores mais altos na quarta semana com mínimo de 6,80% e máximo de 8,00%, representando o pico da mineralização para todos os grupos. Finalmente, na décima segunda semana de avaliação, o nível de marcação óssea permaneceu constante com pequenas oscilações (entre 6,30% e 7,56%). A única exceção foi o grupo teste subcrestal que apresentou um decréscimo (7,89% para 5,56%) nas áreas adjacentes. Este padrão de incorporação dos fluorocromos é totalmente diferente daqueles observados em estudo prévio (Barros et al., 2010).

De acordo com Abrahamsson et al (2004), os primeiros passos para a remodelação óssea ao redor dos implantes envolve a presença de um coágulo que é

parcialmente penetrado por estruturas vasculares circundadas por células mesenquimais tipo fibroblastos em sua periferia. Dessa forma, na primeira semana, o processo para a formação do osso imaturo frequentemente foi iniciado e a formação dos ósteons primários reconhecida (Abrahamsson et al. 2004). Após duas semanas, a presença de trabéculas do novo osso em formação é observada e, neste tempo, o processo ativo de mineralização está presente (Abrahamsson et al. 2004). Estas observações dão suporte para os resultados encontrados no presente estudo, que demonstraram o pico da mineralização entre 2 e 4 semanas para todos os grupos com valores máximos na quarta semana. Na sequência, na décima segunda semana de avaliação um insignificante decréscimo foi observado somente no grupo teste subcrestal, mas nos outros grupos o padrão de mineralização foi constante. Geralmente, no último período o índice de mineralização decresce (Barros et al. 2010), o que pode ser explicado pelo fato de que um grande volume de osso imaturo tenha sido substituído por osso lamelar (Abrahamsson et al. 2004). Subsequentemente, a formação de ósteons secundários e consequente processo de remodelação poderiam ser esperados. Mas, no presente estudo, o padrão de mineralização foi diferente dos implantes inseridos em rebordos cicatrizados e em estudos onde defeitos foram cirurgicamente criados (Barros et al. 2010). Isto talvez seja atribuído à superfície SLActive do implante e à superfície interna da tábua vestibular em alvéolos frescos, alterando a formação óssea em sítios que ainda não cicatrizaram.

Conclusão

Os resultados radiográficos e histomorfométricos mostraram que os implantes inseridos ao nível da crista óssea (equicrestal), nesta metodologia, apresentou pequena (grupo controle) ou nenhuma perda (grupo teste) da tábua óssea vestibular em altura. No entanto, os implantes posicionados subcrestalmente demonstraram maior perda da tábua óssea vestibular, independentemente da presença do enxerto ósseo. Entretanto, o nível da tábua vestibular manteve-se sempre coronal ao ombro do implante. Ambos os grupos equicrestal e subcrestal foram beneficiados nas fases precoces de formação óssea como evidenciado pela análise de fluorescência.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi em parte financiado pelo Grupo Straumann® Dental Implant System, Basel, Switzerland.

Referências Bibliográficas

1. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research** 2004; 15: 381-392.
2. Adell R, Lekholm U, Branemark PI. A 15 year study fo osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **International Journal of Oral Surgery**. 1981; 10: 387-416.
3. Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **Journal of Clinical Periodontology** 2005; 32: 212–218.
4. Araújo MG, Sukekava F, Wennstrom JL, Lindhe J. Tissue modeling following implant placement in fresh extraction sockets. **Clinical Oral Implants Research** 2006a; 17: 615–624.
5. Araújo MG, Wennstrom JL, Lindhe J. Modeling of the buccal and lingual bone walls of fresh extraction sites following implant installation. **Clinical Oral Implants Research** 2006b; 17: 606–614.
6. Araújo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss Collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. **Clinical Oral Implants Research** 2011; 22: 1–8.
7. Akimoto K, Becker W, Persson R, Baker DA, Rohrer MD, O'Neal RB. Evaluation of titanium implants placed into simulated extraction sockets: A study in dogs. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants** 1999; 14: 351-360.
8. Barros RRM, Novaes AB Jr, Muglia VA, Iezzi G, Piattelli A. Influence of interimplant distances and placement depth on peri-implant boneremodeling of adjacent and immediately loaded Morse cone connection implants: a histomorphometric study in dogs. **Clinical Oral Implants Research** 2009a; 21: 371–378.
9. Barros RRM, Novaes AB, Papalexiou V. Buccal bone remodeling after immediate implantation with a flap or flapless approach: a pilot study in dogs. **Titanium** 2009b; 1:45-51.
10. Barros RR, Novaes AB Jr, Muglia VA, Iezzi G, Piattelli A. Influence of interimplant distances and placement depth on peri-implant bone remodeling of adjacent and immediately loaded Morse cone connection implants: a histomorphometric study in dogs. **Clinical Oral Implants Research** 2010; 4:371-8.

11. 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. ***International Journal of Oral Maxillofacial Implants*** 1994; 9:31–40.
12. Blanco J, Nunez V, Aracil L, Munoz F, Ramos I. Ridge alterations following immediate implant placement in the dog: flap versus flapless surgery. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2008; 35: 640–648.
13. Blanco J, Linares A, Villaverde G, Perez J, Munoz F: Flapless immediate implant placement with or without immediate loading. a histomorphometric study in beagle dog. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2010; 37: 937–942.
14. Blanco J, Linares A, Perez J, Munoz F. Ridge alterations following flapless immediate implant placement with or without immediate loading. Part II: a histometric study in the Beagle dog. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2011; 38: 762–770.
15. Botticelli D, Berglundh T, Buser D, Lindhe J. The jumping distance revisited: An experimental study in the dog. ***Clinical Oral Implants Research*** 2003; 14: 35-42.
16. 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. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2004; 31: 309-317.
17. Boix D, Gauthier O, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Grimandi G, Daculsi G. Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: an experimental study in dogs. ***Journal of Periodontology*** 2004; 75: 663– 671.
18. Caneva M, Botticelli D, Salata LA, Souza SLS, Bressan E, Lang NP. Flap vs. “flapless” surgical approach at immediate implants: a histomorphometric study in dogs. ***Clinical Oral Implants Research*** 2010; 21: 1314–1319.
19. Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T. Implant fixation improved by close fit. Cylindrical implant-bone interface studied in rabbits. ***Acta orthopaedica Scandinavica*** 1988; 9: 272-275.
20. Campelo LD, Camara JR. Flapless implant surgery: a 10-year clinical retrospective analysis. ***International Journal of Oral Maxillofacial Implants*** 2002; 17:271-6.

21. Cappiello M, Luongo R, Di Iorio D, Bugea C, Cocchetto R, Celletti R. Evaluation of peri-implant bone loss around platforms with implants. ***International Journal of Periodontics Restorative Dentistry***. 2008;28:347–355.
22. Caudill RF, Meffert RM. Histologic analysis of the osseointegration of endosseous implants in simulated extraction sockets with and without e-ptfe barriers. 1. Preliminary findings. ***The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*** 1991; 11: 207-215.
23. Chou CT, Morris HF, Ochi S, Walker L, DesRosiers D. AICRG, part II: crestal bone loss associated with the Ankylos implant: loading to 36 months. ***Journal of Oral Implantology*** 2004; 30:134–143.
24. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumanns Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. ***Clinical Oral Implants Research*** 2008; 19: 796–803.
25. Cornelini R, Scarano A, Covani U, Petrone G, Piattelli A. Immediate one-stage postextraction implant: a human clinical and histologic case report. ***International Journal of Oral Maxillofacial Implants*** 2000; 15: 432-7.
26. Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. ***Implant Dentistry***. 2006;15: 298–304.
27. Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. ***Journal of Biomedicine Materials Research*** 1989; 23(8):883e94.
28. Daculsi G, Goyenvalle E, Aguado E. Spongius and cortical bone substitution kinetics at the expense of macroporousbiphasic calcium phosphate: animal and human evidence. In: Ohgushi H, Yoshikawa T, Hastings GW, editors. *Bioceramics volume 12: Proceedings of the 12th International Symposium on Bioceramics in Medicine*. Singapore: World Scientific 1999; 287–290.
29. Denissen HW, Kalk W, Veldhuis HA, van Waas MA. Anatomic consideration for preventive implantation. ***The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*** 1993; 8: 191- 196.
30. Donath K, Breuner G. a method for the study of undecalcified bones nad teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. ***Journal of Oral Pathology*** 1982; 11:318-326.

31. Fellah B, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. **Biomaterials** 2008; 29:1177-1188.
32. Ferrus J, Cecchinato D, Pjetursson EB, Lang NP, Sanz M, Lindhe J. Factors influencing ridge alterations following immediate implant placement into extraction sockets. **Clinical Oral Implants Research** 2010; 21: 22-29.
33. 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. *Journal of Clinical Periodontology* 2008; 35:356-363.
34. Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, Azimus E, Autefage A. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. **Biomaterials**. 1993; 14(6):423-429.
35. Gauthier O, Bouler J-M, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic absorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. **Journal of Biomedical Materials Research** 1999; 47: 28-35.
36. Gher ME, Quintero G, Assad D, Monac E, Richardson AC. Bone grafting and guided bone regeneration for immediate dental implants in humans. **Journal of Periodontology** 1994; 65: 881-891.
37. Ha"mmerle CH, Bra"gger U, Bu" rgin W, Lang NP. The effect of subcrestal placement of the polished surface of ITI implants on marginal soft and hard tissues. **Clinical Oral Implants Research** 1996; 7:111-119.
38. Hsu KM, Choi BH, Ko CY, Kim HS, Xuan F, Jeong SM. Ridge Alterations following Immediate Implant Placement and the Treatment of Bone Defects with Bio-Oss in an Animal Model. *Clinical Implant Dentistry Related Research* 2010; 26 (epub ahead of print).
39. Karring T, Lindhe J, Cortellini P. Terapia periodontal regenerativa. In: Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang, eds. -**Tratado de Periodontia e Implantologia Oral**. 4ª. Ed. 2005: 641-646.
40. Knox R, Caudill R, Meffert R. Histologic evaluation of dental endosseous implants placed in surgically created extraction defects. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry** 1991; 11: 364-375.

41. Kohal RJ, Mellas P, Hurzele 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. ***Journal of Periodontology*** 1998; **69**: 927–937.
42. Krump JL, Barnett BG. The immediate implant: A treatment alternative. ***The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*** 1991; **6**: 19-23.
43. Lazzara RJ. Immediate implant placement into extraction sites: surgical and restorative advantages. ***The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*** 1989; **9**:332-43.
44. Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar R V, Sastry TP. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. John Wiley & Sons, Inc. ***Journal of Biomedical Materials Research (Appl Biomater)*** 2002; **63**: 200-208.
45. Mazor Z, Peleg M, Redlich M. Immediate placement of implants in extraction sites of maxillary impacted canines. ***The Journal of the American Dental Association*** 1999; **130**:1767-70.
46. Molly L, Vandromme H, Quirynen M, Schepers E, Adams JL, van Steenberghe D. Bone formation following implantation of bone biomaterials into extraction sites. ***Journal of Periodontology*** 2008; **79**:1108-15.
47. Morris HF, Ochi S, Crum P, Orenstein IH, Winkler S. AICRG, part I: a 6-year multicentered, multidisciplinary clinical study of a new and innovative implant design. ***J Oral Implantol.*** 2004;**30**:125– 133.
48. Nakadate M, Amizuka N, Li M, Freitas PH, Oda K, Nomura S, Uoshima K Maeda T. Histological evaluation on bone regeneration of dental implant placement sitesgrafted with a self-setting alpha-tricalcium phosphate cement. ***Microsc Res Tech*** 2008; **71**:93–104.
49. Negri B, Calvo-Guirado JL, Pardo-Zamora G, Ramý´rez- Fernandez MP. Delgado-Ruýz RA, Munoz-Guzon F. Peri-implant bone reactions to immediate implants placed at different levels in relation to crestal bone. Part I: a pilot study in dogs. ***Clinical Oral Implants Research*** 2011; **XX**: 000–000.
50. Nery EB, Legeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/ -TCP in periodontal osseous defects. ***Journal of Periodontology*** 1992; **63**: 729–735.

51. Nkenke E, Kloss F, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Loos K, Neukam FW. Histomorphometric and fluorescence microscopic analysis of bone remodelling after installation of implants using an osteotome technique. **Clinical Oral Implants Research** 2002; 13: 595-602.
52. Nociti Junior FH, Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Toledo S, Sallum AW. Histometric evaluation of bone regeneration around immediate implants partially in contact with bone: A pilot study in dogs. **Implant Dentistry** 2000; 9: 321-328.
53. Novaes AB Jr, Macedo GO, Suaid FA, Barros RR, Souza SL, Silveira Souza AM. Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. **Journal of Periodontology** 2011; 82:872-7.
54. Oates TW, Valderrama P, Bischof M, et al. Enhanced implant stability with a chemically modified SLA surface: A randomized pilot study. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants** 2007; 22:755-760.
55. Oh TJ, Yoon J, Misch CE, Wang HL. The causes of early implant bone loss: myth or science? **Journal of Periodontology** 2002; 73: 322-333.
56. Park S-Y, Kye S-B, Yang S-M, Shin S-Y. The effect of non-resorbable membrane on buccal bone healing at an immediate implant site: an experimental study in dogs. **Clinical. Oral Implants Research.**, 2011; 22: 289-294.
57. Pennel BM, King KO, Wilderman MN, Barron JM. Repair of the alveolar process following osseous surgery. **Journal of Periodontology** 1967; 38:426-431.
58. Ramfjord SF, Costich ER. Healing after exposure of periosteum on the alveolar process. **Journal of Periodontology** 1968; 39:199-207.
59. Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Brånemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. **Clinical Implant Dentistry and Related Research** 2003; 5 Suppl 1:57-63.
60. Schopper C, Ziya-Ghazvini F, Goriwoda W, Moser D, Wanschitz F, Spassova E, Lagogiannis G, Auterith A, Ewers R. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation--a long-term histological study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials** 2005; 74:458-67.

61. Schulte W, Kleineikenscheidt H, Lindner K, Schareyka R. The Tübingen immediate implant in clinical studies. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift** 1978; 33: 348-359.
62. Schwartz-Arad D, Chaushu G. The ways and wherefores of immediate placement of implants into fresh extraction sites: A literature review. **Journal of Periodontology** 1997; 68:915–923.
63. Schwartz C, Liss P, Jacquemaire B, Lecestre P, Frayssinet P. Biphasic synthetic bone substitute use in orthopaedic and trauma surgery: clinical, radiological and histological results. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** 1999; 10: 821–825.
64. Schwartz-Arad D, Gulayev N, Chaushu G. Immediate versus non-immediate implantation for full-arch fixed reconstruction following extraction of all residual teeth: a retrospective comparative study. **Journal of Periodontology** 2000; 71:923-8.
65. Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA titanium implants: Preliminary results of a pilot study in dogs. **Clinical Oral Implants Research** 2007;18:481–488.
66. 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.
67. Todescan FF, Pustiglioni FE, Imbronito AV, Albrektsson T, Gioso M. Influence of the microgap in the peri-implant hard and soft tissues: a histomorphometric study in dogs. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants** 2002; 17:467–472.
68. Tolman DE, Keller EE. Endosseous implant placement immediately following dental extraction and alveoloplasty: preliminary report with 6-year follow-up. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implant** 1991;6:24-8.
69. 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. **Clinical Oral Implants Research** 2010; 21: 30-36.
70. 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. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants** 1995; 10: 561-567.

71. Wilson TG Jr, Schenk R, Buser D, Cochran D. Implants placed in immediate extraction sites: A report of histologic and histometric analyses of human biopsies. Int ***Journal of Oral Maxillofacial Implants*** 1998;133:333–341.
72. Wilson TG Jr, Carnio J, Schenk R, Cochran D. Immediate implants covered with connective tissue membranes: Human biopsies. ***Journal of Periodontology*** 2003; 743:402–409.

PARTE 2

Resumo

Remodelação da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-extração, utilizando cirurgias sem retalho, com ou sem biomaterial.

Análise histomorfométrica em cães.

RESUMO

A reabsorção alveolar após extrações dentais é uma condição que pertence ao processo de cicatrização. Portanto, as paredes ósseas são reduzidas em altura e largura ocasionando alterações dimensionais principalmente na tábua vestibular. O presente trabalho se propôs a avaliar a remodelação da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-extração associados ou não com enxerto ósseo sintético, em cirurgias sem retalho. Metodologicamente, os pré-molares mandibulares bilaterais de 8 cães foram extraídos sem retalho, e 2 alvéolos de cada lado (totalizando 4) foram selecionados formando os seguintes grupos: um alvéolo de cada lado foi preenchido com enxerto ósseo (grupo teste-GT) e o outro permaneceu com coágulo sanguíneo (grupo controle-GC). Após 12 semanas, os animais foram sacrificados e a histomorfometria realizada. A área óssea total (AOT) mostrou diferença estatisticamente significante entre os grupos teste (38,60%) e controle (47,18%). A área do osso novo (AON) não foi estatisticamente significante entre os grupos teste (15,62%) e controle (22,24%). A espessura alveolar (EA) mostrou resultados similares, porém se diferenças significativas. Da mesma forma, a altura da crista óssea vestibular (ACV) nos parâmetros (1) e (2) em relação à crista lingual, não apresentou diferenças estatisticamente significantes. Pode-se concluir que não houve perda da crista vestibular em comparação à crista lingual, principalmente no grupo teste.

Palavras Chave: Biomaterial, enxerto ósseo sintético, alvéolo pós-extração, cirurgias sem retalho.

Introdução

A reabsorção óssea alveolar após extrações dentais é uma condição inerente ao processo de cicatrização, e o sítio edêntulo irá sofrer mudanças quantitativas e qualitativas (Pietrokovski; Massler, 1967; Cardaropoli; Araujo; Lindhe, 2003; Schropp et al., 2003; Araújo et al., 2005.) Os alvéolos geralmente irão cicatrizar, com nova formação óssea, após 1 a 2 meses seguidos por uma remodelação gradual que inclui alterações no tamanho e na forma, com redução aproximada de 40% na altura e 60% na espessura óssea alveolar (Amler, 1969; Atwood; Coi, 1971; Araújo; Lindhe, 2005). Consequentemente, as paredes do alvéolo terão uma redução significativa e mudanças dimensionais serão mais pronunciadas na tábua óssea vestibular do que na tábua lingual, devido à menor espessura (Pietrokovski; Massler, 1967; Pietrokovski et al., 2007). Portanto, mudanças progressivas e irreversíveis ocorrerão dificultando a futura instalação de implantes.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas na função de prevenir o efeito exacerbado da remodelação do alvéolo dental, incluindo a realização de cirurgias sem retalho. Na presença do dente, o suprimento sanguíneo provém do ligamento periodontal, periósteo e do tecido ósseo. Após a extração de um dente, o ligamento periodontal é removido, e somente duas fontes de nutrição permanecem. Adicionalmente, o osso cortical é pouco vascularizado e, portanto, quando um retalho é levantado para a instalação de implantes, o suprimento sanguíneo suprapariosteal cessa. Isto leva a um osso pobremente vascularizado sem o componente medular, e consequente reabsorção óssea nos estágios iniciais (Pennel et al., 1967). A reabsorção óssea torna-se mais crítica na tábua vestibular devido às características naturais inerentes a natureza e anatomia da região (Novaes et al., 2011). Isto talvez possa comprometer a osseointegração e os aspectos estéticos. Devido à importância dos fatos relatados, a realização de cirurgias sem retalho

previamente a instalação de implantes imediatos, talvez represente uma alternativa para minimizar a reabsorção da tábua óssea vestibular, uma vez que o procedimento preservará a vascularização periosteal (Campelo; Camara, 2002; Rocci et al., 2003).

Ainda assim, alterações nas dimensões verticais e horizontais ainda continuarão ocorrendo. A formação de defeitos como consequência do processo de remodelação óssea, geralmente dificultam a reabilitação ideal e, portanto, precisam ser corrigidos com enxertos de tecido mole e/ou duro (Park, 2010). Diversos biomateriais tem sido utilizados para prevenir ou minimizar o colapso alveolar após a extração dental e possibilitar a posterior instalação de implantes (Froum et al., 2004). O entendimento geral é de que a colocação do enxerto ósseo no alvéolo pós-extração poderia compensar os acontecimentos metabólicos ocorridos no interior do processo alveolar.

Portanto, muitas técnicas regenerativas utilizando desde o osso autógeno até um enxerto ósseo sinteticamente produzido, têm sido propostas para prevenir e corrigir a reabsorção do processo alveolar. Dessa forma, barreiras/membranas (Simion et al., 1994; Fernandes et al., 2011; Bashara et al., 2011) e diferentes enxertos ósseos foram testados em diversos modelos de estudos com variáveis tempos de cicatrização (Artzi; Tal; Dayan, 2000; Froum et al., 2002; Carmagnola; Adriaens; Berglundh, 2003; Nevins et al., 2006; Araújo; Lindhe, 2009; Fernandes et al., 2011; Bashara et al., 2011). Estes materiais exibem propriedades osteocondutoras e agem como um arcabouço para adesão e proliferação celular (Molly et al. 2008, Karring et al. 2005, Schopper et al. 2005), portanto facilitando o preenchimento do alvéolo. No entanto, resultados satisfatórios e altas taxas de

sucesso nem sempre foram obtidos dependendo da técnica utilizada e do tipo de enxerto ósseo utilizado (Araujo et al., 2008).

Dentre os enxertos com diferentes propostas, pode-se citar o fosfato de cálcio bifásico (BCP), o qual é sinteticamente produzido e utilizado como um material de substituição óssea na ortopedia, aplicações orais e maxilo-faciais (Schopper et al. 2005; Schwartz et al. 1999). Quimicamente similar ao osso humano, o fosfato de cálcio bifásico é constituído de uma combinação de hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcio (TCP), ou seja, um material de duas fases. A dissolução do fosfato tricálcio fornece o material básico para íons de cálcio e fosfato, então desencadeando o processo de mineralização e formação óssea. Ao mesmo tempo, a hidroxiapatita mantém um arcabouço para adesão de osteoblastos e formação de novo osso, mantendo o volume contra uma reabsorção excessiva (Schopper et al. 2005; Gauthier et al. 1999). Avaliações histológicas demonstraram que o fosfato de cálcio bifásico (BCP) promove atividade osteoblástica induzindo a osteogênese nos defeitos. Manjubala et al. (2002) observou a formação do sistema de Havers e um processo de remodelação óssea no período de 12 semanas. Comparativamente a diferentes enxertos ósseos, o fosfato de cálcio bifásico revelou capacidade osteogênica substancialmente maior e, adicionalmente, parece ser tão seguro e eficiente quanto um enxerto ósseo autógeno (Fellah et al., 2008). Consequentemente, o fosfato de cálcio bifásico é citado como um biomaterial biocompatível, bioativo e osteocondutor quando implantado dentro dos defeitos ósseos (Nery et al. 1992; Boix et al. 2004; Dalcusi et al. 1999; Manjubala et al. 2002).

Desenvolvido como um novo substituto ósseo sintético, um específico fosfato de cálcio bifásico (Bone Ceramic, Straumann™, Basel-Switzerland), é a combinação

de 60% de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e 40% de tricálcio fosfato $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$. Este material sintético é composto de poros interconectados variando entre 100 e 500 microns, com um alto índice de porosidade de 90%, o qual concede máximo espaço para a vascularização, migração osteoblástica e nova formação óssea. A hidroxiapatita promove rápida resposta, enquanto o fosfato tricálcio promove rápida remodelação (Daculsi et al. 1989; Frayssinet et al. 1993). Em termos de proporção de fase, foi provado que a porcentagem superior de hidroxiapatita está associada a uma formação óssea mais acelerada (Nery et al. 1992). Estudos em humanos demonstraram que esta nova proporção do fosfato de cálcio bifásico promoveu nova matriz óssea mineralizada e não mineralizada em contato com as partículas, e que foi reabsorvido em grandes proporções (74%) quando comparado com enxerto ósseo bovino (62%), no período de 6 a 8 meses (Cordaro et al. 2008). Adicionalmente, De Coster et al. (2011) observou que em vinte e duas semanas a reabsorção alveolar foi menor nos alvéolos com BoneCeramic do que nos alvéolos sem biomaterial.

Proposição

O objetivo do presente estudo foi comparar através de análises histomorfométricas a remodelação da tábua óssea vestibular em alvéolos pós-extração associados ou não com enxerto ósseo sintético, em cirurgias sem retalho, em cães.

Material e Métodos

Procedimentos Cirúrgicos

Primeiramente o protocolo desta pesquisa foi submetido e aprovado pelo comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto (protocolo número 06.1.458.53.5).

Foram selecionados oito (8) cães machos, adultos jovens, sem raça definida, que pesavam aproximadamente 18 Kg. Estes animais apresentavam maxila e mandibular intactas, não apresentavam trauma oclusal generalizado, lesões virais ou fúngica. Apresentavam boa saúde geral e nenhum envolvimento sistêmico relevante de acordo com o médico-veterinário responsável pelo acompanhamento dos animais durante a pesquisa. Os cães foram imunizados com vacinas, receberam tratamento anti-parasitário e foram submetidos a uma profilaxia dental para remoção de biofilme dental.

Os animais receberam 20.000 IU de penicilina e estreptomicina (1 Kg/10 kg) na noite anterior aos procedimentos cirúrgicos. Esta dose provê uma cobertura antibiótica de amplo espectro por quatro dias, sendo administrada uma nova dose após este período para prolongar o efeito por uma semana de pós-operatório. Esta associação antibiótica de amplo espectro é comumente usada para tratar infecções nos animais de pequeno porte e, portanto, foi escolhido antes das cirurgias de experimentais.

Durante o preparo para as cirurgias, os cães foram pré-anestesiados com zolazepan a 10% na concentração de 0,10ml/Kg e acepromazina na concentração 2%. A manutenção da anestesia foi obtida através de anestésico volátil, e os animais foram submetidos à intubação traqueal com uma sonda para adaptação de um dispositivo e 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 pré-molares foram feitos sem a realização de retalhos (figuras 1A e 1B). 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 1A). Após as exodontias, e instalação dos implantes nos alvéolos P2 mesial, P3 mesial e distal, e P4 mesial (conforme descrito e detalhado na parte 1), os alvéolos P2 distal e P4 distal remanescentes foram preparados para receber ou não o enxerto ósseo sintético, totalizando 2 alvéolos de cada lado da mandíbula (figura 1B). Aleatoriamente, em um lado, um alvéolo recebeu o enxerto ósseo sintético (Bone Ceramic, Straumann™, Basel-Switzerland), e outro alvéolo cicatrizou somente com a presença do coágulo sanguíneo (figura 1C). No lado oposto, o tipo de tratamento foi trocado entre os alvéolos, respeitando o método de aleatorização cruzada (Papalexiou et al., 2006). Em seguida, os alvéolos foram suturados com fio seda 4-0 (figura 1D). Uma semana após, os animais foram avaliados para assepsia e remoção das suturas.

Nos cuidados pós-operatórios, cloridato de tramadol (50mg/ml) foi usado na dosagem de 3mg/kg no intervalo 12 horas como terapia analgésica, e cetoprofeno 20mg na dosagem de 1comprimido/20kg foi utilizado como anti-inflamatório. Os animais receberam Stomorgyl (Stomorgyl 10, Merial Saude Animal Ltda, Paulinia, SP, Brazil), na dosagem de 1comprimido/10 kg, por 10 dias como terapia antibiótica. Os animais foram mantidos com uma dieta leve por pelo menos 15 dias, e a cicatrização das regiões operadas foi acompanhada periodicamente e os dentes remanescentes receberam controle de placa, inclusive com a utilização de pontas ultrassônicas, mensalmente.

Figura 1: **A** – hemiseção radicular; **B** – alvéolos pós-extração; **C** – As setas indicam a presença do enxerto ósseo no alvéolo P4 distal, e o coágulo sanguíneo no P2 distal; **D** – alvéolos suturados.

Sacrifício e Processamento Histológico

Doze semanas após a instalação dos implantes, os animais foram sedados e sacrificados por uma indução de anestesia profunda e subsequente overdose de thiopental sódico e cloreto de potássio. As hemi-mandíbulas foram dissecadas removidas, reduzidas e fixadas em formalina a 4% em pH 7 por dez dias. Os espécimes foram transferidos para uma solução de 70% álcool e, então, desidratados em concentrações ascendentes de álcool até atingir a concentração de 100%. Em seguida, foram infiltrados e incluídos em resina LR White (London Resin Company, Berkshire, England). Em seguida, os blocos foram seccionados no sentido vestibulo-lingual pela técnica de secção de tecidos duros descrita por Donath & Breuner (1982). Após, lâminas foram preparadas com uma espessura média de 50 μ m para análise histomorfométrica e coradas com *Stevenel's blue* e *Alizarin red S* para análise microscópica.

Análise Histomorfométrica

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

A **altura da crista óssea vestibular (ACV)** foi determinada como uma medida linear vertical em duas regiões diferentes: de uma linha imaginária provinda da crista óssea lingual até o osso novo no ponto mais alto da crista vestibular **(1)**, e de uma linha imaginária provinda da crista óssea lingual até o osso antigo no ponto mais alto da crista vestibular **(2)** (figura 2A).

A **espessura alveolar (EA)** foi determinada como uma medida linear horizontal entre a tábua óssea vestibular e lingual, a partir de uma linha imaginária 1,0 mm abaixo do ponto mais alto da formação óssea dentro do alvéolo (figura 2B).

A densidade óssea histológica foi determinada dentro de um retângulo que abrange a região do alvéolo com 5,5 mm de largura e 7,0 mm de comprimento, partindo do ponto mais alto do alvéolo. As medidas da densidade óssea avaliaram as porcentagens de osso mineralizado em relação às porcentagens de espaços medulares para a **área óssea total (AOT)**, **área de osso novo (AON)** e **área do osso antigo (AOA)**. Adicionalmente, as **áreas medulares (AM)** de cada grupo foram medidas (figura 2C). Finalmente, a porcentagem de partícula residual foi medida no grupo teste através da área ocupada nos alvéolos (figura 5A).

Figura 2: Imagens histológicas representando as medidas. **A.** A altura da crista vestibular em relação à crista lingual determinada em dois níveis: da linha imaginária da crista lingual até o osso novo (1) indicado pela linha vermelha, e da linha imaginária da crista lingual até o osso antigo (2) indicado pela linha azul **B.** A espessura alveolar (EA) determinada 1 mm abaixo do ponto mais alto no alvéolo. **C.** A densidade óssea histológica foi determinada dentro de um retângulo que abrange a região do alvéolo com 5,5 mm de largura e 7,0 mm de comprimento. A presença de osso antigo (OA) evidentemente diferente do osso novo (ON) e da área medular (AM). (Aumento 1,6X). Coloração: *Stevenel's blue* e *Alizarin red S*.

Análise Estatística

Os resultados foram estatisticamente submetidos às análises, e médias e desvio-padrão foram calculados para todos os parâmetros avaliados. As diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste de Wilcoxon. O nível de significância assumido foi de 5%.

Resultados

Observações Clínicas

Nenhuma intercorrência foi observada durante o período pós-operatório de 12 semanas, nos alvéolos em cicatrização, em nenhum dos animais. Em especial, as regiões envolvidas na pesquisa não apresentaram sinais significativos de inflamação. Todos os alvéolos, ao final do período de cicatrização, estavam “fechados” por tecido mole.

Análise Histológica

Em geral, todos os grupos mostraram a presença de osso lamelar maduro (OLM) representando o “osso antigo” (OA), osso novo (ON) composto por osso imaturo (OI) de fibras entrelaçadas e osso lamelar (OL) de fibras paralelas, e espaços medulares (figuras 3A e 5A). A matriz osteóide (MO) foi observada em algumas áreas das superfícies externas do osso novo, e estava pavimentada por osteoblastos (OB) representando um novo processo de formação óssea (figura 3C). Adicionalmente, nos grupos testes, partículas residuais (PR) do enxerto ósseo estavam presentes no interior dos alvéolos (figura 5A).

Em ambos os grupos, a região apical dos alvéolos foi ocupada por novo osso, o qual se estendeu do ápice e das paredes laterais migrando em direção a região central ocupando-a em toda sua extensão (figuras 3A e 5A). No grupo teste, as partículas estavam em meio ao osso novo, e circunscritas por ele estabelecendo um contato direto entre as estruturas (figuras 6A e 6B). A região mais coronal do alvéolo estava ocupada por osso novo no grupo controle, e osso novo associado às partículas no grupo teste (figuras 3A, 3B, 5A e 5B). Em ambos os grupos foi possível observar a presença de osso novo “fechando” a entrada do alvéolo (figuras 3A e 5A).

O osso novo estava presente na maior parte do alvéolo em ambos os grupos, e a superfície entre esta estrutura e o osso antigo é facilmente identificada (figuras 3A, 3B, 4A, 4B, 5A). Através de uma detalhada análise, foi possível observar que o osso novo foi caracterizado por fibras paralelas com um padrão mais lamelar e, em algumas áreas, um osso com fibras entrelaçadas caracterizando osso imaturo estava presente (figuras 4B, 5C e 6D). Em algumas regiões, a superfície do osso novo na interface com a área medular estava acompanhada por uma camada de osteoblastos representando um processo de remodelação óssea (figura 3C).

Nos grupos testes, ao longo do osso novo, foi possível observar a presença de partículas residuais do enxerto ósseo (PR) dispersas na região correspondente à área do alvéolo (figura 5A). Em algumas áreas, as partículas estavam circundadas por osso novo estabelecendo contato direto entre as estruturas (figuras 5B, 6A e 6B).

Figura 3: Imagens histológicas do grupo controle. **A:** A entrada do alvéolo é “fechada” por novo osso o qual conecta a tábua óssea vestibular e lingual. The marginal, middle and apical areas are filled by new bone and bone marrow (BM). Note a evidente diferença entre o osso novo e antigo (Aumento 1.6X); **B:** A tábua óssea vestibular exibe sinais de remodelação óssea (Magnification 2.5X); **C:** Esta área específica mostra os aspectos do osso novo com a presença de matriz osteóide (MO) pavimentada por osteoblastos (OB) indicando sinais de formação óssea ativa. L, tábua lingual; V, tábua vestibular. (Aumento 20X). Coloração: *Stevenel’s blue e Alizarin red S*.

Figura 4: **A.** A diferença entre o osso novo e o antigo. As estruturas são conectadas por uma remodelação tecidual. (Aumento 20X); **B.** Na luz polarizada foi possível observar a presença do osso novo com fibras entrelaçadas (osso imaturo-OI) e fibras paralelas (osso lamelar). (Aumento 20X). Coloração: *Stevenel's blue e Alizarin red S*.

Figura 5: Imagens histológicas do grupo teste. **A.** Observe o alvéolo preenchido por partículas residuais (PR) em meio ao osso novo (ON) e matriz conjuntiva. O biomaterial ocupa uma grande porção da entrada do alvéolo. Além disso, osso novo foi observado na região mais coronal do alvéolo quase “obliterando” a entrada e unindo ambas as tábuas. Fica evidente a diferença entre o osso antigo e o osso novo (Aumento 1,6X). **B.** A tábua vestibular exibe sinais de processo de remodelação óssea. (Aumento 2,5X); **C.** Na luz polarizada foi possível observar a presença de osso novo com fibras entrelaçadas (osso imaturo-OI) e fibras paralelas (osso lamellar-OL). O osso antigo é composto por osso lamellar maduro. O retângulo evidencia uma ponte (remodelação) entre o osso novo e antigo. L, tábua lingual; B, tábua vestibular. (Aumento 20X). Coloração: *Stevenel's blue* e *Alizarin red S*.

Figura 6: **A.** A presença do osso novo (ON) circundando as partículas residuais (PR) estabelecendo um contato direto entre as estruturas, e algumas áreas de matriz conjuntiva (MC) (Aumento 20X). **B.** O mesmo detalhe presente na luz polarizada: a superfície das partículas diretamente circundadas por osso novo o qual apresenta fibras paralelas (osso imaturo-OI) e fibras paralelas (osso lamelar-OL). Observe pontes de osso novo conectando as partículas. (Aumento 20X). Coloração: *Stevenel's blue e Alizarin red S.*

Análise Histomorfométrica

A avaliação de cada grupo foi realizada para investigar a capacidade de manutenção da tábua vestibular e formação óssea nos alvéolos de acordo com a altura da crista vestibular (ACV), espessura alveolar, área medular, área de osso novo e área de osso antigo. De uma forma geral, foi observado que ambos os grupos mostraram resultados similares, com diferenças estatisticamente significantes somente para área total óssea favorecendo o grupo controle (Tabela 2).

A altura da crista óssea vestibular (ACV) relativa ao osso novo (1), no grupo teste, demonstrou resultados numericamente superiores ou menor reabsorção comparativamente ao grupo controle, no entanto sem diferença estatisticamente significantes. No grupo teste o nível da crista vestibular estava somente 0,26 mm abaixo da crista lingual, enquanto que no grupo controle a crista vestibular estava

localizada 0,80 mm abaixo da lingual. Em relação ao osso antigo (2), os valores foram similares para ambos os grupos, sendo a crista vestibular localizada 0,94 mm abaixo da lingual no grupo teste, e 1,03 mm no grupo controle (Tabela 1).

A espessura alveolar foi analisada 1 mm abaixo do ponto mais alto da formação óssea dentro do alvéolo e, ambos grupos mostraram resultados similares sem diferenças significativas entre os grupos. Para o grupo teste a espessura foi de 5,20 mm e para o grupo controle de 5,00 mm (Tabela 1).

A área total do frame foi dividida em área medular e área óssea. Os grupos teste e controle demonstraram 51,27% e 52,86% de área medular, respectivamente. Ambos os grupos mostraram comportamentos diferentes apresentaram diferentes comportamentos em relação à densidade óssea histológica. Portanto, diferença estatisticamente significante foi observada entre o grupo teste com 38,60% de área óssea total e o grupo controle com 47,18%. A porcentagem de osso antigo foi 22,98% e 24,90% para os grupos teste e controle respectivamente. Para o osso novo, uma diferença numérica foi observada com maior formação óssea no grupo controle com 22, 24% quando comparado 15,62% no grupo teste (Tabela 2).

A porcentagem de partículas residuais no grupo teste foi de 10,13% indicando que parte do biomaterial foi reabsorvido e parte estava presente dentro dos alvéolos envolvido por osso novo (Tabela 2).

Tabela 1: Comparações (média e desvio-padrão) entre os grupos teste (GT) e controle (CG) para os parâmetros histomorfométricos lineares: altura da crista óssea vestibular (ACV) em relação ao osso novo (1) e antigo (2) e espessura alveolar (EA).

	ACV (1) (mm)	ACV (2) (mm)	EA(mm)
GT	0.26 ± 0.67	0.94 ± 0.81	5.20 ± 1.31
GC	0.86 ± 1.14	1.03 ± 0.75	5.00 ± 0.94
P	>0.05	>0.05	>0.05

Teste de Wilcoxon

Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$; n=8)

Tabela 2: Comparações (média e desvio-padrão) entre os grupos teste (GT) e controle (CG) em relação à porcentagem de área medular (AM), área óssea total (AOT), área osso novo (AON) e área osso antigo (AOA). A porcentagem de partículas residuais (PR) do enxerto ósseo foi analisada no grupo teste.

	Área medular (AM)	Área total óssea (ATO)	Área osso antigo (AOA)	Área osso novo (AON)	PR
GT	51.27%	38.60 ± 5.88†	22.98 ± 5.53	15.62 ± 7.20	11.13%
GC	52.86%	47.14 ± 8.02†	24.90 ± 7.14	22.24 ± 4.62	—
P	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	—

Teste de Wilcoxon

†: Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05,02$; n=8)

Discussão

Após as extrações dentais, o processo alveolar será submetido a alterações qualitativas e quantitativas, entretanto, algumas perdas ósseas serão eventualmente substituídas por novo osso trabecular e medular. No entanto, a perda em altura e largura dos alvéolos é consideravelmente maior do que o processo de reposição, principalmente na tábua óssea vestibular que apresenta um biotipo mais fino que a lingual.

Diferentes técnicas têm sido empregadas para preservar ou melhorar a dimensão e contorno do rebordo alveolar após a extração dental. Este estudo avaliou a remodelação da tábua óssea vestibular, em cirurgias sem retalho, comparando este processo entre alvéolos associados ou não com o enxerto ósseo sintético (BoneCeramic). Os resultados histomorfométricos demonstraram que a altura da crista vestibular em relação ao osso novo (1) foi numericamente superior no grupo teste, mas sem diferenças significativas. Para os outros parâmetros, os resultados foram similares para ambos os grupos. Em relação a área total óssea foi observado diferença estatisticamente significante com resultados superiores no grupo controle quando comparado com o grupo teste. A área de osso novo foi numericamente superior no grupo controle, mas sem apresentar diferenças significativas.

A altura da crista óssea vestibular (ACV), em todos os animais, estava ligeiramente apical à crista lingual correspondente. Nos alvéolos com enxerto ósseo sintético, as distâncias foram 0,26 mm e 0,94 mm em relação ao osso novo e antigo, respectivamente. Os alvéolos controles mostraram maior distância com 0,86 mm e 1,03 mm em relação ao osso novo e antigo, respectivamente. Ambos os grupos mostraram formação óssea acima do nível do osso antigo reduzindo as diferenças entre as cristas vestibulares e linguais durante a cicatrização. O grupo teste não

apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, mas a distância foi numericamente superior, principalmente em relação à posição do osso novo. Esta diferença observada em um modelo animal, com um “n” pequeno, talvez tenha implicações clínicas. A perda de 0,26 mm na altura pode não ser clinicamente significativa, mas a perda de 0,86 mm talvez tenha um grande impacto clínico, especialmente em relação aos resultados estéticos. Bashara et al. (2011) avaliou os efeitos de diferentes sistemas de substituição óssea na remodelação dos alvéolos pós-extração. Após o período de cicatrização de 6 meses, o nível vertical da tábua vestibular nos alvéolos com osso bovino e novo biomaterial (Natix) estava 0,65 mm apical e 0,45mm coronal à crista lingual, respectivamente. As cristas vestibulares dos alvéolos que cicatrizaram espontaneamente estavam 0,70 mm apical à crista lingual. No presente estudo, os alvéolos com enxerto ósseo exibiram valores entre os apresentados pelo osso bovino e grânulos de titânio no estudo anterior. No entanto, os alvéolos controles mostraram resultados similares. Ambos, o prévio e o presente estudo, mostraram resultados superiores em relação a aqueles encontrados por Rothamel et al. (2008), no qual a crista vestibular estava 0,85 mm e 1,07 mm apical à crista lingual nos alvéolos controles nos períodos de 3 e 6 meses, respectivamente. Adicionalmente, nos alvéolos com hidroxiapatita nanocristalina, a crista vestibular estava 0,54 mm (3 meses) e 1,14 mm (6 meses) apical a crista lingual. Os resultados do presente estudo foram muito superiores quando comparado com os de Araujo et al. (2008), no qual os alvéolos com coágulo e com enxerto ósseo bovino apresentaram 2,1 mm e 1,9 mm nas distâncias correspondentes, respectivamente. Além disso, Araujo; Lindhe (2011) observaram que o osso antigo da crista vestibular estava 1-2 mm localizado apicalmente a crista lingual nos alvéolos sem biomaterial, mostrando resultados inferiores

comparativamente aos do grupo controle no presente estudo. Vignolleti et al. (2012) em uma investigação realizada no período de 6 semanas, descreveu que a tábua vestibular estava 1,20 mm apical à crista lingual nos alvéolos que cicatrizaram espontaneamente quando comparados com alvéolos onde implantes imediatos foram inseridos. Este prévio estudo mostrou maior perda da tábua vestibular na metade do tempo quando comparado com o presente estudo, nos alvéolos controles, o que talvez possa ser atribuído à realização de cirurgias com retalho. A reabsorção da tábua óssea vestibular observada nos alvéolos que cicatrizaram espontaneamente (0,86 mm) foi menor que os 2,2 mm observado por Araujo et al. (2005) em um estudo experimental similar. Outro estudo do mesmo grupo de pesquisadores (Araujo; Lindhe, 2005) avaliou a dinâmica da cicatrização óssea em alvéolos pós-extração nos períodos de 1, 2, 4 e 8 semanas. A reabsorção vertical da crista vestibular manteve-a 1,9mm apical a crista lingual no final do estudo, novamente mais pronunciada que os resultados do presente estudo. Este fato pode ser atribuído a diferentes fatores tais como a idade dos animais, o período de cicatrização (3 meses), o enxerto ósseo sintético utilizado (BoneCeramic) e especialmente à realização de cirurgias sem retalho no presente estudo.

Na continuidade de avaliar as alterações ocorridas no processo pós-extração, a espessura alveolar também foi analisada 1 mm abaixo do ponto mais alto do alvéolo e verificou-se que para os grupos teste e controle a espessura média foi de 5,20mm e 5,0mm, respectivamente. Rothamel et al (2008), em uma metodologia similar, também mediu a espessura total do alvéolo 1 mm abaixo do topo da crista e, em 3 meses, observou que os alvéolos com a presença de hidroxiapatita nanocristalina (biomaterial) exibiu 3,55 mm de espessura enquanto que os alvéolos sem biomaterial apresentaram 2,89 mm respectivamente. Dessa forma, é possível

concluir que a diferença entre os grupos do estudo de Rothamel et al (2008) foi pequena, assim como os resultados da presente investigação para este parâmetro em particular. No entanto, podemos concluir que a realização de extrações sem retalhos permitiu a manutenção dos rebordos alveolares (5,0 mm ou 5,20 mm), o que é clinicamente significativo e suficiente para a instalação de implantes.

A comparação entre os dois tipos de tratamento dos alvéolos em relação à porcentagem dos tecidos neoformados indicou que o processo de remodelação tecidual obteve melhores resultados no grupo controle comparado ao grupo teste. Portanto, enquanto 57,51% do volume tecidual no grupo controle estavam preenchidos por osso novo, no grupo teste, a formação foi de 40,41%. Esta observação de uma cicatrização mais lenta ou tardia devido ao volume ocupado pelas partículas do enxerto ósseo sintético está de acordo com estudos anteriores (Artzi et al., 2004; Jensen et al., 2006) e com experimentos usando o modelo de alvéolos pós-extração (Araújo et al. 2008; Araújo et al., 2010; Araújo; Lindhe, 2009) que utilizaram diferentes enxertos ósseos e obtiveram porcentagem de formação óssea semelhantes. No presente estudo, parece que o uso enxerto ósseo sintético talvez tenha retardado a formação óssea no modelo experimental. A razão para este atraso claramente observado não é entendida, mas talvez esteja relacionada com a concentração de Ca^{2+} e PO_4^{3-} que possui um lento processo de degradação, e que quando inserido em defeitos ósseos, células gigantes multinucleadas incorporam-no anteriormente às atividades osteoblásticas (Yamada et al., 1997), o que pode interferir negativamente na ação dos osteoblastos conforme sugerido por Yuan et al. (2001). Mesmo assim, o presente estudo demonstrou que a utilização do enxerto ósseo sintético (BoneCeramic) em alvéolos pós-extração não inibiu o processo de modelação e remodelação que envolve as paredes ósseas do rebordo.

Aparentemente, o biomaterial promoveu a formação de osso novo, particularmente na região central e coronal dos alvéolos. Sugere-se, que durante a cicatrização, as partículas tornaram-se integradas ao osso novo e contribuíram para a manutenção da dimensão dos alvéolos. Então, é sugestivo que durante as fases mais tardias da cicatrização, alterações qualitativas e quantitativas talvez ocorram nos alvéolos com o biomaterial.

Em relação à porcentagem de osso novo, no presente estudo, o grupo controle apresentou maior formação (22,24%) comparativamente ao grupo teste (15,62%). Araujo; Lindhe (2011), em um estudo similar, porém com o deslocamento de retalhos e a presença de osso bovino no grupo teste observou uma porcentagem média de 18,1% de osso novo nos alvéolos com o biomaterial. Após o período de cicatrização de 6 meses e com a mesma metodologia do estudo anterior, Araujo; Lindhe (2009) observaram 15,4% e 15,7% de osso novo nos alvéolos com e sem enxerto, respectivamente. Em relação ao grupo sem enxerto, o presente estudo, obteve níveis mais altos de nova formação óssea provavelmente a associação do processo de reabsorção e tempo de cicatrização. No entanto, a porcentagem de osso novo no grupo teste foi semelhante ao encontrado por Araujo; Lindhe (2009), mas o tempo de cicatrização do presente estudo foi menor (3 meses). Então, neste específico caso, pode-se sugerir que o enxerto ósseo sintético (BoneCeramic) promoveu a mesma formação óssea na metade do tempo de cicatrização quando comparado com os 6 meses do estudo de Araujo; Lindhe (2009). Vignoletti et al. (2012) descreveu que, em 6 meses, 45% do processo alveolar em alvéolos que cicatrizam espontaneamente foi ocupado por osso novo variando entre 23% e 72% de acordo com a anatomia dos alvéolos.

As partículas residuais do enxerto ósseo, no presente estudo, ocuparam 11,13% do volume total da área analisada. Araujo et al. (2008) e Araujo; Lindhe (2011), utilizaram diferente material de enxerto (Osso bovino), e no mesmo tempo de avaliação observaram 12,2% e 8,6% de partícula do biomaterial, respectivamente. Em 6 meses, Araujo; Lindhe (2009) observaram 5% do biomaterial presente nos alvéolos, uma porcentagem menor que os 11,13% do presente estudo, mas com o tempo de cicatrização duas vezes maior. Talvez, a porcentagem do enxerto ósseo sintético (BoneCeramic) seria menor que os 5%, ou praticamente não existiria se analisado em um tempo maior, pois a diferença de porcentagem é pequena (6%) para um período duas vezes maior.

Conclusão

Baseado nos resultados foi possível concluir que, na específica metodologia, sem realização de retalhos, a crista óssea vestibular permaneceu no mesmo nível da crista óssea lingual, principalmente no grupo teste. Em outras palavras, não foi obtida perda significativa do nível vestibular, principalmente em relação aos alvéolos com a presença do biomaterial.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi em parte financiado pelo Grupo Straumann® Dental Implant System, Basel, Switzerland.

Referências Bibliográficas

1. Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. ***Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*** 1969; 27: 309–318.
2. Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2005; 32: 212–218.
3. Araujo MG, Sukekava F, Wennström JL, Lindhe J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2005; 32: 645–652.
4. Araújo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The Influence of Bio-Oss Collagen on Healing of an Extraction Socket: An Experimental Study in the Dogs. ***International Journal of Periodontics Restorative Dentistry*** 2008; 28:123–135.
5. Araujo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: a 6-month study in the dog. ***Clinical Oral Implants Research*** 2009; 20, 2009; 433–440.
6. Araujo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. ***Clinical Oral Implants Research*** 2010; 21: 55–64.
7. Araujo MG, Lindhe J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. ***Clinical Oral Implants Research*** 2011; 22, 2011; 9–13.
8. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. ***Journal of Periodontology*** 2000; 72: 1015–1023.
9. Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. ***The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*** 2004; 19: 357–368.
10. Atwood DA, Coy WA. Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges. ***Journal of Prosthetic Dentistry***. 1971; 26(3):280-95.
11. 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. ***Clinical Oral Implants Research***. 2011; 4: 000–000.

12. Boix D, Gauthier O, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Grimandi G, Daculsi G. Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: an experimental study in dogs. ***Journal of Periodontology*** 2004; 75: 663– 671.
13. Campelo LD, Camara JR. Flapless implant surgery: a 10-year clinical retrospective analysis. ***International Journal of Oral Maxillofacial Implants*** 2002; 17:271-6.
14. Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamic of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2003; 30: 809–818.
15. Carmagnola, D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. ***Clinical Oral Implants Research*** 2003; 14: 137–143.
16. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumanns Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. ***Clinical Oral Implants Research*** 2008; 19: 796–803.
17. Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. ***Journal of Biomedicine Materials Research*** 1989; 23(8):883-94.
18. Daculsi G, Goyenvallé E, Aguado E. Spongius and cortical bone substitution kinetics at the expense of macroporousbiphasic calcium phosphate: animal and human evidence. In: Ohgushi H, Yoshikawa T, Hastings GW, editors. *Bioceramics volume 12: Proceedings of the 12th International Symposium on Bioceramics in Medicine*. Singapore: World Scientific 1999; 287–290.
19. De Coster P, Browaeys H, De Bruyn H. Healing of Extraction Sockets Filled with BoneCeramic® Prior to Implant Placement: Preliminary Histological Findings. ***Clinical Implant Dentistry and Related Research***, v.13, 2011; 1: 34-45.
20. Donath K, Breuner G. a method for the study of undecalcified bones nad teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. ***Journal of Oral Pathology*** 1982; 11:318-326.
21. Fellah B, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. ***Biomaterials*** 2008; 29:1177-1188.

22. Fernandes PG, Novaes AB Jr., Queiroz AC, Souza SLS, Taba M Jr., Palioto DB, Grisi MFM. Ridge preservation with Acellular Dermal Matrix and anorganic bone matrix cell-binding peptide P-15 after tooth extraction in humans. ***Journal of Periodontology*** 2011;82:72-79.
23. Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, Azimus E, Autefage A. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. ***Biomaterials***. 1993; 14(6):423-429.
24. Froum S, Cho SC, Rosenber, F, Rohrer M, Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. ***Journal of Periodontology*** 2002; 73: 94–102
25. Froum S, Cho SC, Eliam N, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Extraction sockets and implantation of hydroxyapatites with membrane barriers. A histologic study. ***Implant Dentistry***. 2004; 13: 153-164.
26. Gauthier O, Bouler J-M, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic absorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. ***Journal of Biomedical Materials Research*** 1999; 47: 28–35.
27. Jensen SS, Broggini N, Hjrting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. ***Clinical Oral Implants Research*** 2006; 17: 237–243.
28. Karring T, Lindhe J, Cortellini P. Terapia periodontal regenerativa. In: Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang, eds. -***Tratado de Periodontia e Implantologia Oral***. 4ª. Ed. 2005: 641-646.
29. Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar R V, Sastry TP. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. John Wiley & Sons, Inc. ***Journal of Biomedical Materials Research (Appl Biomater)*** 2002; 63: 200-208.
30. Molly L, Vandromme H, Quirynen M, Schepers E, Adams JL, van Steenberghe D. Bone formation following implantation of bone biomaterials into extraction sites. ***Journal of Periodontology*** 2008; 79:1108-15.
31. Nery EB, Legeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/ -TCP in periodontal osseous defects. ***Journal of Periodontology*** 1992; 63: 729–735.

32. Nevins M, Camelo M, de Paoli S, Friedland B, Schenk RK, Parma-Benfenati S, Simion M, Tinti C, Wagenberg B. A study of the fate of the buccal wall of extraction sockets of teeth with prominent roots. ***The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*** 2006; 26: 19–29.
33. Novaes AB Jr, Macedo GO, Suaid FA, Barros RR, Souza SL, Silveira Souza AM. Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. ***Journal of Periodontology*** 2011; 82:872-7.
34. Park Jun-Beom. Healing of Extraction Socket Grafted With Deproteinized Bovine Bone and Acellular Dermal Matrix: Histomorphometric Evaluation. ***Implant Dentistry*** 2010;19:307–313.
35. Pennel BM, King KO, Wilderman MN, Barron JM. Repair of the alveolar process following osseous surgery. ***Journal of Periodontology*** 1967; 38:426-431.
36. Pietrokovski J, Massler M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. ***The Journal of Prosthetic Dentistry*** 1967; 17: 21–27.
37. Pietrokovski J, Starinsky R, Arensburg B, Kaffe I. Morphologic characteristics of bony edentulous jaws. ***Journal of Prosthodontics*** 2007; 15: 141–147.
38. Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Brånemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. ***Clinical Implant Dentistry and Related Research*** 2003; 5 Suppl 1:57-63.
39. Rothamel D, Schwarz F, Herten M, Engelhardt E, Donath K, Kuehn P, Becker J. Dimensional ridge alterations following socket preservation using a nanocrystalline hydroxyapatite paste: a histomorphometrical study in dogs. ***International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*** 2008;37(8):741-7.
40. Schopper C, Ziya-Ghazvini F, Goriwoda W, Moser D, Wanschitz F, Spassova E, Lagogiannis G, Auterith A, Ewers R. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation--a long-term histological study. ***Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*** 2005; 74:458-67.
41. 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. ***The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*** 2003; 23: 313–323.

42. Simion M, Fontana F, Rasperini G, Maiorana C. Vertical ridge augmentation by expanded- polytetrafluoroethylene membrane and a combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio Oss). **Clinical Oral Implants Research** 2007; 18: 620–629.
43. Schwartz C, Liss P, Jacquemaire B, Lecestre P, Frayssinet P. Biphasic synthetic bone substitute use in orthopaedic and trauma surgery: clinical, radiological and histological results. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** 1999; 10: 821–825.
44. Vignoletti F, Discepoli N, Muller A, de Sanctis M, Munoz F, Sanz M. Bone modelling at fresh extraction sockets: immediate implant placement versus spontaneous healing. An experimental study in the beagle dog. **Journal of Clinical Periodontology** 2012; 39: 91–97.
45. Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/tricalcium phosphate ratios. **Biomaterials** 1997; 18:1037–1041.
46. Yuan H, de Bruijn J, Li Y, Feng J, Yang Z, de Groot J, Zhang X. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissues of dogs: a comparative study between porous a -TCP and b TCP. **Journal of Material Science in Medicine** 2001; 12: 7–13.

ARTIGOS EM INGLÊS

Artigo 1

TITLE PAGE

Buccal bone plate remodeling after immediate implant placement with and without synthetic bone grafting and flapless surgery. Radiographic study in dogs.

Arthur B. Novaes Jr., DSc¹; Flávia Suaid, MScD²; Adriana C. Queiroz, MScD²; Valdir A. Muglia, DSc³; Sérgio L. S. Souza DSc⁴; Daniela B. Palioto⁴; Mário Taba Jr. DSc⁴; Márcio F. M. Grisi DSc⁴.

¹Chairman of Periodontology at the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

²Graduate students of Periodontology at the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

³ Professor of Prosthodontics at the Department of Dental Materials and Prothesis, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

⁴Professor of Periodontology at the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author: Arthur Belém Novaes Júnior

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

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

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

Running title: Radiographic aspects of buccal bone plates after immediate implant placement.

ABSTRACT

Background: Recent studies in animals have shown pronounced resorption of the buccal bone plate after immediate implantation. The use of flapless surgical procedures prior to the installation of immediate implants, as well as the use of synthetic bone graft in the gaps represent viable alternatives to minimize buccal bone resorption and to favor osseointegration. The aim of this study was to evaluate the healing of the buccal bone plate following immediate implantation using the flapless approach, and compare this process with sites in which a synthetic bone graft was or was not inserted into the gap between the implant and the buccal bone plate. Lower bicuspid from 8 dogs were bilaterally extracted without the use of flaps and 4 implants were installed in the alveoli in each side of the mandible and were positioned 2.0 mm from the buccal bone plate (gap). Four groups were devised: 2.0 mm subcrestal implants (3.3 x 8 mm) using bone grafts (SCTG), 2.0 mm subcrestal implants without bone grafts (SCCG), equicrestal implants (3.3 x 10 mm) with bone grafts (ECTG) and equicrestal implants without bone grafts (ECCG). One week following the surgical procedures, metallic prostheses were installed and within 12 weeks the dogs were sacrificed. The blocks containing the individual implants were turned sideways and radiographic imaging was obtained to analyze the remodeling of the buccal bone plate. In the analysis of the resulting distance between the implant shoulder and the bone crest (IS-BC), statistically significant differences were found in the SBTG when compared to the ECTG ($p=0.02$) and ECCG ($p=0.03$). For meanvalue comparison of the resulting linear distance between the implant surface and the buccal plate (GAP-L) no statistically significant difference was found between all the groups ($p>0.05$). The same result was observed in the parameter for presence or absence of tissue formation between the implant surface and buccal plate (GAP-A). Equicrestally placed implants, in this methodology, presented little or no loss of the buccal bone. The subcrestally positioned implants presented loss of buccal bone, even though synthetic bone graft was used. The buccal bone, however, was always coronal to the implant shoulder.

Keywords: Immediate implant, synthetic bone graft, tooth socket, tooth extraction, gap filling.

INTRODUCTION

Since the early dental implant installation techniques, innumerable modifications have been proposed in order to reach faster, less invasive and more aesthetical ways to restore missing teeth. One of these breakthrough innovations was the development of a technique which comprises the installation of implants immediately after tooth extraction, eliminating the necessity of having to wait for the alveoli to heal, which is the standard procedure under the traditional technique. Among the advantages of immediate implant installation are the reduction in the number of necessary surgical interventions and reduced treatment period¹⁻³, improved implant orientation during its installation^{1,4,5}, preservation of the tooth extraction area^{1,6-8} and improved aesthetics of the circumventing soft tissues³. High success rates have been documented following immediate implant installation in extraction sockets⁶⁻¹⁰.

One of the main requirements for success in implants is the maintenance of peri-implantar tissues so that osseointegration and aesthetic aspects are not jeopardized. Several classic studies from the 60's showed the resorption of the alveolar process following tooth extraction, which is significantly more pronounced in the buccal region¹¹. When teeth are present, blood flow is provided through three main sources: the periodontal ligament, the periosteum and the bone tissue. After a tooth is extracted, the periodontal ligament disappears, and only two nourishment sources remain. In addition, the cortical bone is poorly vascularized when compared to the medullary bone, therefore, when a flap is raised for implant installation, suprapariosteal blood supply ceases, leaving only the poorly vascularized bone without its medullary component, leading to bone resorption in the initial stages¹². Such bone remodeling in response to inadequate blood supply becomes more critical in the buccal region due to characteristics naturally inherent to this region's nature and anatomy, which may lead to serious compromises both for osseointegration and aesthetics. In the light of such facts, not raising a flap before implant installation may represent an alternative to minimize buccal bone plate resorption, since such procedure will preserve suprapariosteal vascularization. Moreover, flapless surgeries preserve soft tissue structure and further reduce gingival recession, important factors for aesthetics. Other advantages are reduced surgical time and minimized bleeding, and reduced post-operative discomfort for the patient¹³. Some studies show that implants installed under flapless surgeries yield more predictable outcomes, as long as the appropriate technique is employed and patients are well selected¹⁴⁻¹⁵.

The correct placing of immediate implants in relation to the alveoli bone walls is another paramount factor for satisfactory results. Since bone tissue suffers constant remodeling, both vertically and horizontally during the healing process, all dimensions must be carefully taken into consideration for adequate implant positioning. Innumerous studies showed that the bone crest is located 1.5 to 2 mm apically to the implant and the abutment junction, regardless of the implant position in relation to the bone crest at implant installation¹⁶. Such bone loss is justified by the formation of biological spaces in the peri-implantar tissues. However, when implants utilizing Morse-cone connections, bone crest lies at the same height of the cervical portion of the implant, and bone loss, which is observable with the utilization of internal connection systems, does not occur bellow the implant shoulder. Furthermore, the abutment is smaller than the implant diameter (platform shifting), which provides better lodging for the peri-implantar soft tissues, allowing them to act as a protective barrier for the bone-implant interface¹⁷. Due to the specific characteristics of the implant-abutment connection, a smaller emergence profile is obtained when the implant is installed more apically¹⁷⁻¹⁸.

Regarding the horizontal positioning of immediate implants (bucco-lingually or mesio-distally), it is common to observe a lack of adaptation to the socket walls in the cervical portion of the implant. This gap can be filled by soft tissues and thus may lead to osseointegration problems. The use of membranes and/or grafting materials to fill the peri-implantar residual defects has been proposed¹⁹⁻²⁴. Such procedures can impede epithelial invagination into these defects maintaining the necessary space for osteogenesis. Some authors associate these procedures with some complications, such as membrane exposure and delayed peri-implantar bone healing²¹. On the other hand, some studies showed increased bone-implant contact after membranes were utilized²⁴. There is no consensus in scientific literature for the need of associating regenerative techniques with immediate implant installation techniques^{25,26}. The use of membranes or grafting material can be an extra element, but they do not seem to be necessary in all cases. Another question that remains unanswered is whether osseointegration truly occurs in these regions, due to the several characteristics of the involved materials²⁷.

In an attempt to optimise osseointegration, many bone-replacing materials have been presented as an alternative to fill these gaps. These materials, which may be xenogenous, allogeneous or synthetic exhibit osseoconducting properties and act as

a scaffold for cell adhesion and proliferation, thus facilitating gap filing²⁸⁻³⁰. Among the employed biomaterials are allogeneous bone (Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft -DFDBA), anorganic bovine grafts, bovine hydroxyapatite and synthetic hydroxyapatite²⁷ which have been used in conjunction with immediate implantation with many of them showing successful results^{21,26,30}.

For the development of biomaterials aimed at improving bone healing, some researchers have focused their studies on synthetic grafts. Among such grafts, one can cite Biphasic Calcium Phosphate (BCP), which is being more and more utilized as a bone replacement material in orthopedic, oral and maxilo-facial applications^{30,31}. Chemically similar to human bone, biphasic calcium phosphate is constituted of a combination of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP), meaning it is a 2-phase material. The dissolution of TCP supplies the basic material for calcium and phosphate ions, thus triggering mineralization. At the same time, HA also maintains the scaffold for osteoblast adhesion and formation of new bone maintaining the volume against excessive resorption^{30,32}. Consequently, biphasic calcium phosphate (BCP) is cited as a biocompatible, bioactive and osteoconducting bone graft material when implanted into bone defects³³⁻³⁶.

Histological evaluations demonstrated that BCP promotes osteoblastic and osteoclastic activity characterizing a bone remodeling process 12 weeks later, and making evident the importance of alkaline phosphatase in the osteoblastic formation process³⁶. In a study by Farinã et al.³⁷, alkaline phosphatase's resorption and posterior bone migration were observed in the evaluated areas. Additionally, it was noted that the inherent properties of this material positively influence cellular bonding, migration, proliferation and differentiation reassuring its potential for mineralization and bone remodeling. Comparatively to different bone grafts, BCP revealed substantially higher osteogenic capacity, and it also seemed to be as safe and efficient as autogenous bone graft³⁸.

Developed as a new synthetic bone substitute, a specific BCP (Bone Ceramic, Straumann™, Basel-Switzerland) is a combination of 60% hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ and 40% tricalcium phosphate $[Ca_3(PO_4)_2]$, which is part of biphasic calcium phosphates. It is composed of interconnected pores ranging from 100 to 500 microns and a porosity index of 90%, which grants maximum space for vascularization, osteoblast migration and new bone formation.

Histologically, it was demonstrated that this specific proportion promoted formation of new non-mineralized and mineralized bone matrices in contact with the particles, which were resorbed at large (74%) when compared to another bone graft (62%), in the period of 6 to 8 months³⁹. Furthermore, in terms of phase proportion, it was proved that HA's superior ratio in BCP is associated to a more accelerated bone formation³³.

Therefore, the aim of this study was to evaluate radiographically buccal bone plate remodeling following immediate implantation using flapless procedures and comparing this process between sites that received or not synthetic bone grafts (BCP) in the gap between the implant and the buccal bone plate.

MATERIAL AND METHODS

This study protocol was approved by the Experimental Research Ethics Committee of the Campi of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (protocol number 06.1.458.53.5).

Eight young adult male dogs of undefined breed weighting approximately 20 kg each and raised at a private kennel were used. All selected animals had perfect mandibles, no generalized occlusal trauma, no viral or fungal mouth lesions (figure 1A), good overall health and no systemic compromises attested by veterinary exams. The dogs were immunized with vaccines, received anti-parasitic treatment and were submitted to dental prophylaxis using ultra-sound for removal of dental plaque and biofilm.

The night preceding the surgeries, the animals received 20.000 UI penicillin intramuscular and streptomycin at 1.0 g/10 kg of weight. Since such dosage allows antibiotic coverage for 4 days, a new dose was administered four days later, totaling 8 days of antibiotic protection. The fore-mentioned broad-spectrum antibiotic association is commonly used to treat infections in small animals and, thus, was chosen before the implant surgeries.

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 at 0.10 mL/kg and acepromazine at 2.0 %. Anesthetic maintenance was obtained using volatile anesthetics and, so, the animals were submitted to tracheal intubation with a Magill probe for adaptation of the anesthetic device and for administration of

isoflurane (2V%). Additionally, local anesthesia was used at the bicuspid (P1, P2, P3 and P4) regions.

The procedures for extraction of the 4 lower bicuspid were completed without flaps (figure 1B, C). The teeth were bucco-lingually sectioned so the roots could be removed with as little trauma as possible avoiding damage to the alveoli bone walls (figure 1B). The following sockets were selected for implant placement (Bone Level™ SLActive, Straumann, Basel-Switzerland): P2 mesial, P3 distal and mesial and P4 mesial, totalling 4 implants in each side of the mandible (figure 1C, D). All implants were positioned so that their cervical portion was placed 2.0 mm from the buccal bone plate (bucco-lingually) allowing a 2.0 mm gap (figure 1E). On one side, 4 implants measuring 3.3 x 8 mm were positioned 2.0 mm subcrestally (apico-coronally) and on the other side, 4 implants measuring 3,3 x 10 mm were equicrestally positioned.

Following implant installation, the transfers were placed for silicon impression and fabrication of the temporary restoration (figure 1F). The four implants were then placed in each hemi-mandible and two received synthetic bone grafts (BCP) for gap filling between the implant and buccal alveolar bone wall; and two others received no grafting material and, thus, healed solely with the aid of the coagulum (figure 2A, B). The following groups were devised: equicrestal with synthetic bone graft (BCP) (test ECTG), equicrestal with coagulum (control -ECCG), subcrestal synthetic bone with graft (BCP) (test -SCTG) and subcrestal with coagulum (control -SCCG).

Once the implants were in place, the relation between the installed implant and the buccal bone plate was verified and the distance between the cervical-most portion of the implant and the buccal bone plate was registered, as well as the distance between the implant and the lingual bone plate bucco-lingually, whenever applicable. The next step was the adaptation of the protective covering screws (figure 2C).

The remaining sockets (P2 distal and P4 distal) were used to study the dynamics of the healing process in flapless surgical sites, with or without the use of synthetic bone graft (BCP) (figure 2B). Randomly, in one hemi-mandible, one socket received the graft and the other did not; on the opposing side, this order was inverted. Posteriorly, the wounds were sutured with silk suture 4-0 (Shalon, S.L.M. Belos, GO, Brazil) in both sides of the mandible.

The animals received analgesic, non-steroidal anti-inflammatories, and multivitamin complex shots. Seven days later, sutures were removed, prosthetic connections were adapted and temporary metallic prostheses were installed at the same time, thus characterizing the presence of an early load (figure 2D).

The dogs were weekly anesthetized for mineralized biofilm removal with ultrasound and use of chlorhexidine digluconate sprays at 0.12%. After 12 weeks the animals were sacrificed. In order to reach euthanasia a 20% iv potassium chloride dose was used at 100 mg/kg.

The hemi-mandibles were removed, dissected, radiographed, cut and fixed using 4% formalin at pH 7 for 10 days and transferred to a 70% ethanol solution to wait for processing (figure 3A, B, C). The samples were dehydrated in increasing alcohol concentrations until 100% concentration was reached. They were embedded in LR White resin (London Resin Company Ltd, Berkshire, England) and then sectioned bucco-lingually (figure 3D) following Donath & Breuner's technique for hard tissues.

RADIOGRAPHIC ANALYSIS

Digital and standardized radiographic images were taken from all sectioned implants (bucco-lingually). Each implant, following embedment in acrylic resin, was turned sideways and the radiographs were taken from the proximal sides (figure 3D), therefore revealing in detail the buccal and lingual walls for each implant. The parameter for such evaluation was the standardized positioning of the implant in relation to the buccal bone plate. The analysis was performed using the Image Tool software (Trophy-Radiologie, Vincennes, France) to verify and determine the resulting distances between the implant shoulder and the bone crest level (IS-BC) (figure 4A), as well as the resulting linear distance from the highest point between the implant surface and the buccal bone wall (GAP-L) (figure 4B) and measurement of the radioluscent area within the gap (GAP-A) (figure 4C).

STATISTICAL ANALYSIS

Results were submitted to statistical analysis using Friedman's non-parametric tests, considering a significance level of $p < 0.05$. Wilcoxon test was also used with Bonferroni's correction to detect where significant statistical differences had occurred.

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.

Radiographic Analysis

When the test and control equicrestal groups were analyzed (ECTG and ECCG) for resulting distance between implant shoulder and bone crest level (IS-BC), no statistically significant differences were found ($p>0.05$). The results did not show statistically significant differences when comparing test and control equicrestal and subcrestal groups either ($p>0.05$). However, when comparing test and control equicrestal and subcrestal groups, there were statistically significant differences for the test subcrestal group (SBTG) when compared to test equicrestal ($p=0.02$) and control equicrestal groups (ECCG) ($p=0.03$).

For mean value comparison, the linear distance between implant surface and buccal socket wall (GAP-L) did not output any statistically significant differences between test and control equicrestal and subcrestal groups ($p>0.05$).

The same result was observed for radiolucency between implant surface and buccal socket wall (GAP-A) in which no statistically significant differences were detected between test and control equicrestal and subcrestal groups ($p>0.05$).

In the analysis of the radiographic image, it was possible to observe the radiographic aspects of the buccal bone wall lightly above the implant shoulder and the gap filled with synthetic bone graft in the ECTG group (figure 5A). In the ECCG group, the radiographic aspect of the buccal bone wall showed a little loss and the gap was partially filled with new tissue (figure 5B). The SCTG group showed radiographic aspects of the buccal bone wall above the implant shoulder as well as the gap was filled with synthetic bone graft (figure 5C). However, the radiographic aspects of the buccal bone wall in the SCCG group were slightly above the implant shoulder, but lower than in the SCTG group, and the gap was partially filled with new tissue (figure 5D).

DISCUSSION

Functional and esthetic implant successes are strongly correlated to the buccal bone resorption at the implant cervical region. This study evaluated radiographically, buccal bone plate remodeling following immediate implantation, using flapless procedures, and comparing this process between sites that received or not synthetic bone grafts (BCP) in the gap between the implant and the buccal bone plate.

In the present study, the resorption of the buccal bone wall (IS-BC) in the crestal groups (ECTG and ECCG) was smaller when compared to the subcrestal groups (SCTG and SCCG). In accordance with Hermann et al.⁴⁰ and Piattelli et al.⁴¹ who reported that when the implant-abutment junction was positioned deeper within the bone, a more pronounced loss of vertical crestal bone height was observed. The authors^{40,41} attributed this finding to the implant/abutment connection used. Some implant systems may also permit micromovements at the abutment-implant connection during clinical function that finally leads to localized inflammation and crestal bone loss⁴².

The subcrestal positioning of implants in the present study resulted in bone located above the implant shoulder, as demonstrated by the radiographic results of the distance between implant shoulder and bone crest level (IS-BC). It has been speculated⁴³⁻⁴⁵ that the Morse cone connections that allow abutments to emerge from a more central area of the implant (platform-shifting protocol) may help protect the peri-implant soft and mineralized tissues and reduce the rate of bone resorption⁴⁴ by positioning the implant-abutment junction away from the external, outer edge of the implant and neighboring bone, and, thereby, decreasing potential abutment inflammatory cell infiltrate on the surrounding tissues⁴³⁻⁴⁵. However, the resorption of the buccal bone wall was 1.18 mm in the group with bone graft (SCTG) and 1.59 mm in the group without bone graft (SCCG). On the other hand, the resorption didn't occur in the equicrestal group with bone graft (ECTG) (+0.09 mm) and was -0.19 mm in the equicrestal group without bone graft (ECCG). These findings showed statistically significant differences when comparing the ECTG group with the ECCG and SCTG groups. In the subcrestal groups, the bone remained above the implant shoulder, but implant placement was 2.0 mm subcrestal, which indicates that bone loss occurred, but did not expose the implant. The good results obtained in the equicrestal groups probably occurred due to the 2.0 mm gap that was filled with the synthetic bone graft in association with the design of the implant (Cone Morse) and

the SLActive surface on the entire length of the implant along with the used flapless approach, since a very small loss of bone (-0.19 mm) occurred without the bone graft.

Recently, some studies⁴⁶⁻⁴⁸ investigated the effectiveness of the flapless approach as an alternative to buccal bone preservation at least to some extension. This may have a particular impact when dealing with immediate implant therapy, considering that tooth extraction eliminates the periodontal ligament blood supply, leaving only the vascularization provided by the periosteum. Therefore, raising a mucoperiosteal flaps in this situation may strongly compromise the blood supply that comes from the periosteum and it can promote the buccal bone wall resorption. Barros et al.⁴⁶ 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. Furthermore, Fickl et al.⁴⁸ had similar results and highlighted the great impact of this finding in thin periodontal biotypes, where the osteoclastic activities of the internal and external sides could merge together and cause a more pronounced buccal bone plate loss. Then, the flapless surgery is a important factor for the maintenance of the crestal bone. It's important to emphasize that the buccal bone plate in humans is thin⁴⁹, thinner than in the dogs posterior mandible which can affect the results, however all the animal studies published in the subject used this same dog model^{46,47,50}.

Another factor that probably contributes to the maintenance of the buccal bone wall is the presence of the synthetic bone graft in the gap. It was observed that the crestal and sucrestal groups with bone graft showed smaller resorption of the buccal bone than in the groups with coagulum (table 1), when the intra-group comparison is analyzed.

Results from animal experiments revealed that the marginal horizontal gap remaining between the hard tissue and the implant, immediately following its installation, may be resolved with new bone formation and osseointegration^{24,51,52}. However, if the gap width exceeds 1.0 mm, the amount of direct bone-to-implant^{27,53} contact decreased. The jumping gap of 2.0 mm between the implant surface and the alveolar buccal wall is considered a defect with critical size that no implant system has been able to fill without the use of guided bone regeneration. In the present study, the gap of 2 mm remained with a coagulum or was filled with synthetic bone graft. As in the parameter presented in table 1, the equicrestal and subcrestal groups

with bone graft showed a better reduction of the linear distance between implant surface and buccal socket wall (Gap-L). The initial measure was 2.0 mm and after 12 weeks it was 0.06 mm for both groups. The gap with coagulum showed a higher distance between the surfaces for equicrestal and subcrestal groups (table 2). The differences however were not statistically significant, perhaps due to the small sample size.

It has been postulated that in TCP grafts, the soft tissue components present around the graft 6 months after surgery are filled with osteoblasts and few osteoclasts and that the resorption of residual particles is not due to osteoclast activity⁵⁴. This feature of TCP may represent a potential benefit for the grafted area because the osteogenic potential is maintained by the presence of osteoblasts and by the scarce osteoclast activity⁵⁴. Thus, the b-TCP component of the BCP may have a beneficial effect on bone healing and maturation around the graft particles⁵⁴. With BCP, the HA constituent therefore provides a rapid response, while the b-TCP constituent provides faster remodeling⁵⁵. In accordance to this, another study revealed that the BCP concept⁵⁶ is based on an optimum balance between the more stable phase (HA) and the more soluble phase (b-TCP). BCP bioceramics are soluble and gradually dissolve in vivo, providing new bone formation as they release calcium and phosphate ions into the biological medium. BCP combinations are osteoconductive, as they support bone apposition and growth, but are slowly degraded in the body⁵⁷⁻⁵⁸. The histomorphometric results of Cordaro et al³⁹ showed newly formed bone 180–240 days post-grafting. There was less residual graft material with “BoneCeramic” and, consequently, more tissue components. Comparatively to different bone grafts, BCP revealed substantially higher osteogenic capacity, and it also seemed to be as safe and efficient as autogenous bone grafts³³.

The analysis of the results in the equicrestal and subcrestal control groups (table 2) is in accordance with the study of Abushahba et al.⁵⁹ in which the amount of bone-to-implant found within the defects grafted with either bovine bone mineral or autogenous bone was greater than that found in the defects where no graft was used. They found remaining defects of 1.35 mm in width in the groups in which no bone grafts were used, but less bone area within threads as compared to grafted sites, and significant differences in the amount of osseointegration and bone regeneration were observed between the augmented sites as compared to defects without augmentation. This is in agreement with the results of Hall et al.⁶⁰ and

Akimoto et al.²⁷. In our study, the jumping gap is larger, so the resolution of the defects is complicated.

Polyzois et al.⁶¹, in a study, observed that all implants surrounded by 2.37mm defects (gap) filled with Bio-Oss integrated successfully. There also seemed to be more bone–implant contact and more bone inside the threads compared to the nongrafted sites with defects of the same diameter. In areas with no grafting, limited osseointegration was seen in the defect area. However, the grafted wider defects tended to demonstrate bone–implant contact more coronally than sites with gaps of the same magnitude that contained no grafts. They also demonstrated more linear bone–implant contact and a greater area of bone included within the threads. In a study by Hall et al.⁶⁰, large three-walled defects next to implants were grafted with canine demineralized freeze dried bone and bioactive glass. These sites were compared to a non-grafted control. They reported significantly more bone healing when grafting materials were used. These results are in agreement with those of our study that suggest better healing in the defects when grafting is used.

The same argumentation can be applied to the area of the gaps (table 3) in which it was possible to observe a correlation with the results presented in the linear distances between the implant surface and the buccal socket wall. The area without the presence of new tissue was smaller in the groups where synthetic bone grafting was used, mainly in the ECTG group. No statistically significant differences were observed between all the groups, but numerically the differences between the average intra and inter group comparisons is representative (table 3).

These observations indicate that large buccal gaps (critical size) following immediate implant installation will not be completely resolved without grafting. Hence, in such situations, the use of grafting materials may improve treatment outcomes.

CONCLUSIONS

Equicrestally-placed implants, in this methodology, presented little or no loss of the buccal bone wall. The subcrestally-positioned implants presented loss of buccal bone, regardless of the use of synthetic bone graft. However, the buccal bone was always coronal to the implant shoulder.

REFERENCES

1. Werbitt MJ, Goldberg PV. The immediate implant: Bone preservation and bone regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1992;12:207–217.
2. Schultz AJ. Guided tissue regeneration (GTR) of nonsubmerged implants in immediate extraction sites. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1993;52:59–65.
3. Shanaman RH. The use of guided tissue regeneration to facilitate ideal prosthetic placement of implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1992;124:256–265.
4. Denissen HW, Kalk W, Veldhuis HA, van Waas MA. Anatomic consideration for preventive implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;82:191–196.
5. 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;105: 561–567.
6. Schwartz-Arad D, Gulayev N, Chaushu G. Immediate versus non-immediate implantation for full-arch fixed reconstruction following extraction of all residual teeth: a retrospective comparative study. *J Periodontology*. 2000 Jun;71(6):923-8.
7. Tolman DE, Keller EE. Endosseous implant placement immediately following dental extraction and alveoloplasty: preliminary report with 6-year follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991 Spring;6(1):24-8.
8. Mazor Z, Peleg M, Redlich M. Immediate placement of implants in extraction sites of maxillary impacted canines. *J Am Dent Assoc*. 1999 Dec;130(12):1767-70.
9. Lazzara RJ. Immediate implant placement into extraction sites: surgical and restorative advantages. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1989;9(5):332-43.
10. Cornellini R, Scarano A, Covani U, Petrone G, Piattelli A. Immediate one-stage postextraction implant: a human clinical and histologic case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 May-Jun;15(3):432-7.

11. Ramfjord SF, Costich ER. Healing after exposure of periosteum on the alveolar process. *J Periodontol*. 1968 Jul;39(4):199-207.
12. Pennel BM, King KO, Wilderman MN, Barron JM. Repair of the alveolar process following osseous surgery. *J Periodontol*. 1967 Sep-Oct;38(5):426-31.
13. 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:S21-7.
14. Campelo LD, Camara JR. Flapless implant surgery: a 10-year clinical retrospective analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 Mar-Apr;17(2):271-6.
15. Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Brånemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003;5 Suppl 1:57-63.
16. Tarnow DP, Cho SC, Wallace SS. The effect of inter-implant distance on the height of inter-implant bone crest. *J Periodontol*. 2000 Apr;71(4):546-9.
17. Barros RR, Novaes AB Jr, Muglia VA, Iezzi G, Piattelli A. Influence of interimplant distances and placement depth on peri-implant bone remodeling of adjacent and immediately loaded Morse cone connection implants: a histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Apr 1;21(4):371-8. Epub 2010 Feb 1.
18. Döring K, Eisenmann E, Stiller M. Functional and esthetic considerations for single-tooth Ankylos implant-crowns: 8 years of clinical performance. *J Oral Implantol*. 2004;30(3):198-209.
19. 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.
20. Brägger 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.

21. 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.

22. Gelb DA. Immediate implant surgery: Three-year retrospective evaluation of 50 consecutive cases. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993;8: 388–399.

23. Scarano A, Iezzi G, Petrone G, Marinho VC, Corigliano M, Piattelli A.. Immediate postextraction implants: a histologic and histometric analysis in monkeys. *J Oral Implantol.* 2000;26(3):163-9.

24. Kohal RJ, Mellas P, Hürzeler 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(8):927-37.

25. Chen ST, Darby IB, Adams GG, Reynolds EC. A prospective clinical study of bone augmentation techniques at immediate implants. *Clin Oral Impl Res.* 16, 2005; 176–184.

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

27. Akimoto K, Persson R, Baker DA, Rohrer MD, O'Neal RB. Evaluation of titanium Implants Placed into Simulated Extraction Sockets: A Study in Dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:351–360.

28. Molly L, Vandromme H, Quirynen M, Schepers E, Adams JL, van Steenberghe D. -Bone formation following implantation of bone biomaterials into extraction sites. *J Periodontol.* 2008;79(6):1108-15.

29. Thorkild Karring, Jan Lindhe, Pierpaolo Cortellini. Terapia periodontal regenerativa. In: Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang, eds. -*Tratado de Periodontia e Implantologia Oral.* 4^a. Ed. 2005: 641-646.

30. Schopper C, Ziya-Ghazvini F, Goriwoda W, Moser D, Wanschitz F, Spassova E, Lagogiannis G, Auterith A, Ewers R. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation--a long-term histological study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;74(1):458-67.
31. Schwartz C, Liss P, Jacquemaire B, Lecestre P, Frayssinet P. Biphasic synthetic bone substitute use in orthopaedic and trauma surgery: clinical, radiological and histological results. *J Mater Sci Mater Med*. 1999; 10; 821–825.
32. Gauthier O, Bouler J-M, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic absorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res*. 1999; 47: 28–35.
33. Nery EB, Legeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/ -TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol*. 1992; 63: 729–735.
34. Boix D, Gauthier O, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Grimandi G, Daculsi G. Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: an experimental study in dogs. *J Periodontol*. 2004; 75: 663– 671.
35. Daculsi G, Goyenvallé E, Aguado E. Spongius and cortical bone substitution kinetics at the expense of macroporous biphasic calcium phosphate: animal and human evidence. In: Ohgushi H, Yoshikawa T, Hastings GW, editors. *Bioceramics volume 12: Proceedings of the 12th International Symposium on Bioceramics in Medicine*. Singapore: World Scientific; 1999; p. 287–290.
36. Manjubala I, Sivakumar M., Sureshkumar R. V., Sastry T. P. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. John Wiley & Sons, Inc. *J Biomed Mater Res. (Appl Biomater)* 2002;63: 200-208.
37. Farina MN, Guzon FM, Penã ML, Cantalapiedra AG. -In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *J Mater Sci: Mater Méd*. 2008; 19:1565–1573.

38. Borhane H, Fellah a, Olivier Gauthier b, Pierre Weiss a, Daniel Chappard c, Pierre Layrolle. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model .*Biomaterials*. 2008;29: 1177-1188.
39. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumanns Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin. Oral Impl. Res.* 2008; 19: 796–803.
40. Hermann JS, Schoolfield JD, Schenk RK, Buser D, Cochran DL. Influence of the size of the microgap on crestal bone changes around titanium implants: a histometric evaluation of unloaded non-submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol*. 2001;72:1372–1383.
41. Piattelli A, Vrespa G, Petrone G, Iezzi G, Annibali S, Scarano A. Role of the microgap between implant and abutment: a retrospective histologic evaluation in monkeys. *J Periodontol*. 2003; 74:346–352.
42. Morris HF, Ochi S, Crum P, Orenstein IH, Winkler S. AICRG, part I: a 6-year multicentered, multidisciplinary clinical study of a new and innovative implant design. *J Oral Implantol*. 2004;30:125–130.
43. Lazzara RJ, Porter SS. Platform switching: a new concept in implant dentistry for controlling postrestorative crestal bone levels. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006;26:9–17.
44. Degidi M, Novaes AB Jr, Nardi D, Piattelli A. Outcome analysis of immediately placed, immediately restored implants in the aesthetic area: the clinical relevance of different inter-implant distances. *J Periodontol*. 2008;79: 1056– 1061.
45. Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue response to plaque formation at different implant systems: a comparative study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9:281-287
46. Barros RRM, Novaes AB, Papalexiou V. Buccal bone remodeling after immediate implantation with a flap or flapless approach: a pilot study in dogs. *Titanium* 2009;1:45-51.

47. Cardaropoli G, Monticelli F, Osorio R, et al. Healing following tooth extraction and immediate implant installation with flapless surgery. *Clin Oral Impl Res.* 2007;18. (abstract).
48. 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.
49. Katranji, A., Mish, K., Wang H-L. Cortical bone thickness in dentate and edentulous human cadavers. *Journal of Periodontology.* 2002; 28: 874-878.
50. Araújo, M.G., Wennström, J.L., Lindhe, J. Modeling of the buccal and lingual bone walls of fresh extraction sites following implant installation. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17:606-14.
51. Becker, W., Becker, B.E., Handelsman, M., Ochsenein, C. & Albrektsson, T. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets: a study in dogs. *Journal of Periodontology.* 1991; 62: 703–709.
52. Gotfredsen, K., Nimb, L. & Hjorting-Hansen, E. Immediate implant placement using a biodegradable barrier, polyhydroxybutyrate–hydroxyvalerate reinforced with polyglactin 910. An experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research.* 1994; 5: 83–91.
53. Knox, R., Lee, K. & Meffert, R. Placement of hydroxyapatite-coated endosseous implants in fresh extraction sites: a case report. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry.* 1993; 13: 245–253.
54. Zerbo, I.R., Bronckers, A.L., de Lange, G. & Burger, E.H. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials.* 2005; 26: 1445– 1451.
55. Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, Azimus E, Autefage A. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials.* 1993 May;14(6):423-9.

56. Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* .1998; 19(16):1473-8.
57. Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K. Osteoinduction by biomaterials e physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A*. 2006;77(4):747-62.
58. Habibovic P, van der Valk CM, van Blitterswijk CA, De Groot K, Meijer G. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15(4):373-80.
59. Abushahba F, Renvert S, Polyzois I, Claffey N. Effect of grafting materials on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Apr;19(4):32934. Epub 2008 Feb 20.
60. Hall, E.E., Meffert, R.M., Hermann, J.S., Mellonig, J.T., Cochran, D.L. Comparison of bioactive glass to demineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. *Journal of Periodontology*. 1999; 70: 526–535.
61. Polyzois I, Renvert S, Bosshardt DD, Lang NP, Claffey N. Effect of Bio-Oss on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects of different dimensions: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Jun;18(3):304-10.

FIGURES LEGEND

Figure 1: A – initial aspect of the mucosa and tooth ; B – root's section; C – socket after tooth extraction; D – Immediate implants; E – gap (2.0 mm) between the implant and the buccal bone plate; F – The transfers positioned.

Figure 2: A –The bone graft in the gap; B – The bone graft in the socket; C – sutured wound; D –prosthesis in place one week following surgical procedure.

Figure 3: A – The hemi-mandible sectioned; B – The radiographic aspects of the implants; C – The section between the implants; D – The bucco-lingual aspects of the implant sectioned (radiographs were taken from the proximal sides).

Figure 4: A – The measure of the distances between the implant shoulder and the bone crest level (IS-BC); B -The resulting linear distance from the highest point between the implant surface and the buccal bone wall (GAP-L); C -the measurement of the radioluscent area within the gap between the implant surface and the buccal wall (GAP-A).

Figure 5: A: The radiographic aspects of the buccal bone wall (lightly above the implant shoulder -IS) and the gap (G) filled with synthetic bone graft (SBG) in the ECTG group; B: The radiographic aspects of the buccal bone wall (with a little loss) and the gap (G) in the ECCG group; C: The radiographic aspects of the buccal bone wall (above the implant shoulder -IS) and the gap (G) filled with synthetic bone graft (SBG) in the SCTG group; D: The radiographic aspects of the buccal bone wall (lightly above the implant shoulder –IS) and the gap (G) in the SCCG group.

Table 1: Resulting distance (mm) between shoulder and bone crest level (IS-BC)

	<i>ECTG</i>	<i>ECCG</i>	<i>SCTG</i>	<i>SCCG</i>	
IS-BC (Mean±SD)	0,09±0,49*	-0,19±0,58*	0,82±0,62*	0,41±0,69	$P < 0,05$

Friedman Test (*Bonferroni Post-HocTest*)

* Statistically significant differences were observed between the groups ($P = 0,02$; $n=8$)

Table 2: Resulting linear distance (mm) between implant surface and buccal socket wall (GAP-L)

	<i>ECTG</i>	<i>ECCG</i>	<i>SCTG</i>	<i>SCCG</i>	
GAP-L (Mean±SD)	0,06±0,17	0,25±0,39	0,06±0,11	0,16±0,31	$P > 0,05$

No statistically significant differences were observed (Friedman Test $P > 0,05$; $n=8$)

Table 3: Resulting radiolucent area (mm²) between implant surface and buccal socket wall (GAP-A)

	<i>ECTG</i>	<i>ECCG</i>	<i>SCTG</i>	<i>SCCG</i>	
GAP-A (Mean±SD)	0,03±0,10	0,14±0,22	0,11±0,26	0,18±0,37	$P > 0,05$

No statistically significant differences were observed (Friedman Test $P > 0,05$; $n=8$)

Artigo 2

TITLE PAGE

Buccal bone plate remodeling after immediate implants with or without synthetic bone grafting and flapless surgery. A histomorphometric and fluorescence study in dogs.

Running title: Remodeling of buccal bone plate after immediate implant.

Keywords: Immediate implant, synthetic bone graft, tooth socket, tooth extraction, gap filling.

Authors: Flávia A. Suaid, MScD¹; Arthur B. Novaes Jr., DSc²; Adriana C. Queiroz, MScD¹; Valdir A. Muglia, DSc³; Adriana Luisa Gonçalves Almeida⁴; Márcio F. M. Grisi DSc⁵.

1. Doctoral student of Periodontology at the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.
2. Chairman of Periodontology at the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.
3. Professor of Prosthodontics at the Department of Dental Materials and Prothesis, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.
4. 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.
5. Professor of Periodontology at the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author: Arthur Belém Novaes Júnior

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

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

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

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the buccal bone plate remodeling after immediate implantation using the flapless approach with or without bone graft into the gap between the implant and the buccal bone.

Material and Methods: 8 dogs had the mandibular bicuspids extracted without flaps, and 4 implants were installed and positioned 2.0 mm from the buccal bone plate (gap). The following groups were devised: subcrestal test (SCTG) with bone graft and control (SCCG) without bone graft, and equicrestal test (ECTG) with bone graft and control (ECCG) without bone graft. One week following the surgeries, metallic prostheses were installed. Bone markers were administered 1, 2, 4 and 12 weeks after implant placement for fluorescence analysis. Ground sections were prepared from 12-week healing biopsies and histomorphometry was performed.

Results: The histomorphometric evaluation presents significant better results for the ECTG in the vertical crestal bone resorption, but the other parameters showed better results for the SCCG. The fluorescence evaluation in adjacent areas showed numerically different results between groups with a small decrease at 12 weeks, except for the SCCG, that was higher at this time. The distant area showed a continues increase in the marked bone.

Conclusion: The equicrestally placed implants presented little or no loss of the buccal bone wall. The subcrestally-positioned implants presented loss of buccal bone, regardless of the use of bone graft. However, the buccal bone was always coronal to the implant shoulder. Both the equicrestal and subcrestal groups were benefited in the early stages of bone healing as evidenced by the fluorescence analysis.

INTRODUCTION

The placement of a dental implant in a fresh extraction socket attracted great interest since its first report (Schulte et al. 1978). High success rates have been documented following immediate implant installation in extraction sockets (Schwartz-Arad et al. 2000, Tolman & Keller 1991, Mazor et al. 1999, Lazarra 1989, Cornelini et al. 2000). Among the many advantages of immediate implant the most important is the preservation of the tooth extraction area (Schwartz-Arad et al. 2000, Tolman & Keller 1991, Mazor, et al. 1999). But, the ability to counteract the alveolar ridge resorption, consequence of the teeth extractions, by installing a dental implant in the fresh extraction socket is also questioned (Denissen, et al. 1993, Watzek, et al. 1995). Recent studies reported on the bone dimensional variations that followed immediate implant placement and the factors that potentially influence them (Ferrus et al. 2010, Tomasi et al. 2010).

One of the main requirements for implants success is the maintenance of peri-implantar tissues so that osseointegration and aesthetic aspects are not jeopardized. Several classic studies from the 60's showed the resorption of the alveolar process following tooth extraction, which is significantly more pronounced in the buccal region (Ramfjord & Costich 1968). When teeth are present, blood flow is provided through the periodontal ligament, periosteum and the bone tissue. After a tooth is extracted, the periodontal ligament is removed, and only two nourishment sources remain. In addition, the cortical bone is poorly vascularized, therefore, when a flap is raised for implant installation, suprapariosteal blood supply ceases. This leaves only the poorly vascularized bone without its medullary component, leading to bone resorption in the initial stages (Pennel et al. 1967). Such bone remodeling in response to inadequate blood supply becomes more critical in the buccal region due to characteristics naturally inherent to this region's nature and anatomy (Novaes et al. 2011). This may lead to serious compromises both for osseointegration and aesthetics. In the light of such facts, not raising a flap before implant installation may represent an alternative to minimize buccal bone plate resorption, since such procedure will preserve periosteal vascularization. Some studies show that implants installed under flapless surgeries yield more predictable outcomes, as long as the appropriate technique is employed (Campelo & Camara 2002, Rocci et al. 2003).

The correct placement of immediate implants in relation to the alveoli bone walls is another paramount factor for satisfactory results. Since bone tissue

undergoes constant remodeling, both vertically and horizontally during the healing process, all dimensions must be carefully taken into consideration for adequate implant positioning. Innumerable studies showed that the bone crest is located 1.5 to 2 mm apically to the implant and the abutment junction, regardless of the implant position in relation to the bone crest at implant installation (Tarnow et al. 2000). Such bone loss is justified by the formation of biological spaces in the peri-implantar tissues. However, when an implant is performed utilizing Morse Cone connections, the bone crest lies at the same height as the cervical portion of the implant. The bone loss, which is observable with the utilization of internal connection systems, does not occur below the implant shoulder. Due to the specific characteristics of the implant-abutment connection, a smaller emergence profile is obtained when the implant is installed more apically (Barros et al. 2010, Döring 2004).

Regarding the horizontal positioning of the immediate implants (buccolingually or mesio-distally), it is common to observe the presence of a gap between the walls of the extraction socket and the implant. It is usually wider in the coronal portion of the recipient site (Botticelli et al. 2003). This lack of adaptation is explained in part by the fact that fresh extraction sockets vary drastically in configuration, size and shape (Nociti Junior et al. 2000). This gap can be filled by soft tissues and thus may lead to osseointegration problems.

Various bone regenerative techniques have been used to encourage bone growth within these defects, including barrier membranes (Bragger et al. 1996, Becker et al. 1994, Lang et al. 1994), autogenous bone grafts and different materials such as demineralized or mineralized freeze-dried bone allografts (Gher et al. 1994, Gelb 1993) and hydroxyapatite (Watzek et al. 1995). Different factors that may affect tissue alterations at the buccal and palatal aspects of the bone crests during the healing are being investigated. This studied in order to better understand why complete bone fill of the gaps is not always achieved. Data from experiments in different animal models (Carlsson et al. 1988, Caudill & Meffert 1991, Knox et al. 1991, Akimoto et al. 1999) suggest that the extent of the gap between the bone and the implant is of critical importance for proper osseointegration when guided bone regeneration techniques are not used.

In an attempt to optimize osseointegration in a critical size gap, many bone-replacing materials have been presented as an alternative. These materials exhibit osseoconducting properties, and act as a scaffold for cell adhesion and proliferation,

thus facilitating gap fill (Molly et al. 2008, Karring et al. 2005, Schopper et al. 2005). Several biomaterials have been used in conjunction with immediate implantation with many of them showing successful results (Gher et al. 1994, Schwartz-Arad & Chaushu 1997, Molly et al. 2008).

Among the grafts, one can cite Biphasic Calcium Phosphate (BCP), which is utilized as a bone replacement material in orthopedic, oral and maxilo-facial applications (Schopper et al. 2005, Schwartz et al. 1999). Chemically similar to human bone, biphasic calcium phosphate is constituted of a combination of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP), meaning it is a 2-phase material. The dissolution of TCP supplies the basic material for calcium and phosphate ions, thus triggering mineralization. At the same time, HA also maintains the scaffold for osteoblast adhesion and formation of new bone maintaining the volume against excessive resorption (Schopper et al. 2005, Gauthier et al. 1999). Histological evaluations demonstrated that BCP promotes osteoblastic and osteoclastic activity characterizing a bone remodeling process 12 weeks later (Manjubala et al. 2002). Comparatively to different bone grafts, BCP revealed substantially higher osteogenic capacity, and it also seemed to be as safe and efficient as autogenous bone graft (Borhane et al. 2008). Consequently, biphasic calcium phosphate (BCP) is cited as a biocompatible, bioactive and osteoconducting bone graft material when implanted into bone defects (Nery et al. 1992, Boix et al. 2004, Dalcusi et al. 1999, Manjubala et al. 2002).

Developed as a new synthetic bone substitute, a specific BCP (Bone Ceramic, Straumann™, Basel-Switzerland) is a combination of 60% hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ and 40% tricalcium phosphate $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, which is part of biphasic calcium phosphates. It is composed of interconnected pores ranging from 100 to 500 microns and a porosity index of 90%, which grants maximum space for vascularization, osteoblast migration and new bone formation. Histologically, it was demonstrated that this specific proportion promoted formation of new non-mineralized and mineralized bone matrices in contact with the particles, which were resorbed at large (74%) when compared to another bone graft (62%), in the period of 6 to 8 months (Cordaro et al. 2008). Furthermore, in terms of phase proportion, it was proved that HA's superior ratio in BCP is associated to a more accelerated bone formation (Nery et al. 1992).

Based on this, the aim of the present histomorphometric and fluorescence study is to compare the remodelling of the buccal bone plate, between immediate implants placed subcrestally and equicrestally in fresh extraction sockets, associated or not with synthetic bone grafts in the gaps, in dogs.

MATERIAL AND METHODS

This study protocol was approved by the Animal Experimental Ethics Committee of the Campi of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (protocol number 06.1.458.53.5).

Eight young adult male dogs of undefined breed weighting approximately 20 kg each and raised at a private kennel were used. All selected animals had perfect mandibles, no generalized occlusal trauma, no viral or fungal mouth lesions (figure 1A), good overall health and no systemic compromises attested by veterinary exams. The dogs were immunized with vaccines, received anti-parasitic treatment and were submitted to dental prophylaxis using ultra-sound for removal of dental plaque and biofilm.

The night preceding the surgeries, the animals received 20.000 UI penicillin intramuscular and streptomycin at 1.0 g/10 kg of weight. Since such dosage allows antibiotic coverage for 4 days, a new dose was administered four days later, totaling 8 days of antibiotic protection. The fore-mentioned broad-spectrum antibiotic association is commonly used to treat infections in small animals and, thus, was chosen before the implant surgeries.

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 at 0.10 mL/kg and acepromazine at 2.0 %. Anesthetic maintenance was obtained using volatile anesthetics and, 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 (2V%). Additionally, local anesthesia was used at the bicuspid (premolars-P1, P2, P3 and P4) regions.

The procedures for extraction of the 4 lower bicuspid (pre-molar) were completed without flaps (figure 1B, C). The teeth were bucco-lingually sectioned so the roots could be removed with as little trauma as possible avoiding damage to the alveoli bone walls (figure 1B). The following sockets were selected for implant placement (Bone Level TM SLActive, Straumann, Basel-Switzwerland): P2 mesial,

P3 distal and mesial and P4 mesial, totaling 4 implants in each side of the mandible (figure 1C, D). All implants were positioned so that their cervical portion was placed 2.0 mm from the buccal bone plate (bucco-lingually) allowing a 2.0 mm gap (figure 1E). On one side, 4 implants measuring 3.3 x 8 mm were positioned 2.0 mm subcrestally in relation to the buccal bone plate (apico-coronally) and on the other side, 4 implants measuring 3,3 x 10 mm were equicrestally positioned.

Following implant installation, the transfers were placed for silicon impression and fabrication of the temporary restoration (figure 1F). The four implants were then placed in each hemi-mandible and two received synthetic bone grafts (BCP) for gap filling between the implant and buccal alveolar bone wall; and two others received no grafting material and, thus, healed solely with the aid of the coagulum (figure 2 A, B). The following groups were devised: equicrestal with synthetic bone graft (BCP) (test-ECTG), equicrestal with coagulum (control -ECCG), subcrestal synthetic bone with graft (BCP) (test -SCTG) and subcrestal with coagulum (control -SCCG). Once the implants were in place, the relation between the installed implant and the buccal bone plate was verified and the distance between the cervical-most portion of the implant and the buccal bone plate was registered. The next step was the adaptation of the protective covering screws (figure 2C).

For the post-operative care, Tramadol chloridrate (50mg/ml) was used at 3mg/kg every 12h as analgesic therapy and ketoprofen 20mg at 1pill/20kg was used as anti-inflammatory therapy. The animals also received Stomorgyl (Stomorgyl 10, Merial Saude Animal Ltda, Paulinia, SP, Brazil), 1pill/10kg, for 10 days as antibiotic therapy. The animals were maintained on a soft ration diet for 15 days, and then the sutures were removed. Healing control was performed daily with a topical application of 0.12% chlorhexidine to limit microbial biofilm adherence. The remaining teeth were cleaned monthly with ultrasonic points.

Seven days later, sutures were removed, prosthetic connections were adapted and temporary metallic prostheses were installed at the same time, thus characterizing the presence of an early load (figure 2D).

During the healing period, 4 different fluorescent bone markers were administered in order to observe the degree and extension of bone mineralization. One week after implant placement, 20 mg calcein green/kg body weight was administered i.v. (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA); at two weeks, 20 mg alizarin/kg body weight was administered i.v. (Sigma); at four weeks, 20 mg

tetracycline/kg body weight was administered i.v. (Sigma); and at twelve weeks, 20 mg calcein blue/kg body weight was administered i.v. (Sigma) in each dog. 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 0.45µm filter (Schleider & Schuell GmbH, 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 hemi-mandibles were removed, dissected 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 (1982). The sections were prepared for fluorescence analysis and then for histomorphometry after being stained with Toluidine blue for optic microscopic analysis.

HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS

Longitudinal histological sections from each implant were captured through a video camera Leica DC 300F (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany) joined to a microscope Leica DM LB2 (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany). The images were analyzed through the Leica QWin (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany) by a single examiner with no knowledge of the experimental groups.

The **vertical crestal bone resorption** (VCBR) on the buccal bone of the implants was determined as a linear vertical measurement from an imaginary line from the implant shoulder to the highest point of the bone crest (figure 3)

The first **vertical bone level** (VBL) was calculated on the buccal implant surface from the implant shoulder to the first contact between the mineralized bone and the implant surface (figure 3).

The histological **“bone density”** was determined within a rectangle that comprised the region of the defect, 1.0 mm wide and 3 mm in length, from the implant shoulder (adjacent areas) and also within another in mirror image of the first areas (distant areas). The bone density measurements evaluated the percentages of mineralized bone in relation to the percentages of marrow spaces for both adjacent

and distant areas (figure 3). The percentage of the residual graft particles was measured in the test groups.

Finally, linear horizontal measurements were made inside the defects from the most cervical point of the implant to the bone in order to evaluate the crestal resorption (CR) (figure 4). In addition, measurements were made at the midpoint of the defect, from the implant surface to the bone (1) and from the most apical point of the defect, from the implant surface to the bone (2) in order to evaluate the **residual gap** (RG, figure 4).

FLUORESCENCE ANALYSIS

Fluorescence microscopic images were longitudinally captured from each implant through a video camera Leica DC 300F (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) using appropriate barrier filters. The filters of wavelengths used were: **I3** for calcein green that has an excitation level between 450-490nm; **N2-1** for alizarin red (excitation level between 515-560 nm); **D** for tetracyclin (excitation level between 355-425 nm) and **A** for calcein blue (excitation level between 340-380 nm). All the images were adjusted and analyzed through the Leica Qwin (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) to determine the percentages of bone marked adjacent and distant to the implant surface. Thus one rectangle comprising the region of the defect (1.0 mm wide and 3 mm in length from the implant shoulder) was used to evaluate the adjacent areas of the implants, while another rectangle was placed in a mirror image of the first one to evaluate the distant areas of the implants. The marked bone measurements evaluated the percentages of fluorescent bone in relation to the total area. A single examiner, with no knowledge of the experimental groups, made all the measurements

STATISTICAL ANALYSIS

Mean values and standard deviations were calculated for all the parameters evaluated. The mean differences between the groups were analyzed through the Friedman Test. Wilcoxon Matched Pairs Test was also used with Bonferroni's correction to detect where significant statistical differences had occurred. For all statistical analyses the significance level of 5% was adopted.

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.

Histologic Analysis

In general, all the groups showed the presence of the parent lamellar bone (PLB) representing the “old bone”, newly formed bone (NB) and the most recently formed bone (RFB) (figures 5A and 5B). An osteoid matrix (OM) was also identified in some areas on the external surfaces of the most recently formed bone (figures 5B, 5C and 6C), and it was paved with osteoblasts in the exterior of the lamellae representing the bone formation process (figures 5B, 5C and 6C). Besides, in the test groups, residual graft particles (RP) were present in the gap between the implant surface and the buccal bone plate (figures 4B and 4D).

The newly formed bone (NB) is present mostly in the gap area, and the surface between this structure and the parent lamellar bone is evident (figures 5A, 5B, 5C, 6A and 6B). The parallel-fibered bone characterized as lamellar pattern with lamellae circumscribed by concentric bone matrix is prevalent but, in some areas, a bone with interlaced fibers characterizing woven bone was present (figures 5A, 5B, 5C, 6A and 6B).

The most recently formed bone was present on the surface of the new bone in the fibrous tissue interface, and usually this was accompanied by a layer of osteoblasts representing the remodeling process of the new bone (figures 6B, 7A, 7B and 7C). Additionally, this recently formed bone was founded in direct contact with the implant surface and bone graft (figures 7A, 7B and 7C). In general, it was characterized by a parallel-fibered bone with a residual area of woven bone (figures 6B, 7B and 7C).

Amongst the newly formed bone, it was possible to observe the presence of residual graft particles (RGP), in the test group and these particles were dispersed in the region corresponding to the gap area (figures 7A, 7B and 7C). Sometimes, the particles were lined / circumscribed by the newly formed bone or by the most recently

formed bone with the direct contact between the structures (figures 7A, 7B and 7C). The presence of osteoblasts (OB), osteoid matrix (OM) and the RFB indicated evidence of active bone formation in direct contact with the residual particles of the bone graft (figure 7C)

Histomorphometric Results

The evaluation of each implant group was also done in order to investigate the jumping gap ability around the defect according to the VCBR, VBL and bone density results. It was observed that as the gap, in the subcrestal group, was positioned above the implant shoulder due to the 2mm subcrestal position, the values for VBL and density bone parameters presented better rates (smaller for the VBL and higher for the density), while the VCBR values increased (Table 1).

The evaluation of vertical crestal bone resorption (VCBR) analyzed the crestal loss in relation to the implant shoulder, and the equicrestal groups had a very small loss between 0.08 and 0.20mm in the test and control respectively. The subcrestal groups lost 1.95mm and 1.28mm in the test and control respectively. For this parameter, statistically significant relevance was found in the subcrestal test group in relation to the equicrestal test and control groups, with a higher resorption in the subcrestal group (Table 1).

The vertical bone level (VBL) in the subcrestal test and control groups showed numerically better data when compared to the equicrestal test and control groups, but without statistical relevance (Table 1).

The equicrestal test and control groups, and the subcrestal test and control groups had a different behavior in terms of bone healing taking into account the histological bone density in the different test groups. Therefore, statistically significant differences were observed between all groups in favor of the subcrestal control group for the adjacent bone density (NB) data. For the recently formed bone (RFB), a numerical difference was observed with higher bone density in the subcrestal control group, but without statistically significant differences between all the groups. A similar behavior was observed in all the groups in terms of distant bone density (NB) in comparison with the adjacent bone density, but with smaller values (Table 1).

The intra-group bone densities between the adjacent and distant areas showed a statistically significant difference in the equicrestal control group and in the

subcrestal control group with higher values for the adjacent bone density for both groups (Table 1).

The percentage of residual graft particles was similar to both test groups, indicating that part of this biomaterial was resorbed and part was in the jumping gap involved by newly formed bone. In the subcrestal group, the percentage was smaller, because part of the bone graft can be lost due the subcrestal positioning of the implant (Table 1).

The crestal bone resorption that happened in some these specimens was detected not only by the linear vertical crestal bone resorption measurements (VCBR parameter) but also by the linear horizontal measurements (crestal resorption parameter). In the present study, it was observed only in the cervical third of the defects, in the first horizontal measurement (Table 2). Because of this kind of resorption it was not possible to statistically evaluate the first horizontal measurements. When the bone was not detected it was determined as crestal bone resorption (CR). In a descriptive analysis it was observed that the number of specimens, in which no bone was detected horizontally from the shoulder of the implant, was higher in the equicrestal groups than in the subcrestal groups due to the position of the implant (Table 2). For the equicrestal test group, 3 specimens showed the absence of bone in the horizontal measurement named “crestal resorption”. For the equicrestal control group there were 2 specimens with the absence of the bone in the cervical region (Table 2). For the subcrestal test group, 2 specimens appeared without bone in the horizontal measurement named “crestal resorption”, and none of the specimens showed crestal bone resorption bone at the first horizontal measurement in the subcrestal control group (Table 2).

When considering the linear horizontal measurements that were made from the mid point of the defect to the bone (1) to evaluate the residual gap (RG), the mean values decreased from the equicrestal test group to the subcrestal control group, with the latter group presenting the lowest values with statistical significance ($P < 0.05$) in relation to the equicrestal test and control groups. The linear horizontal measurement from the most apical point of the defect to the bone (2) showed values that decreased from the equicrestal test group to the subcrestal control group, but without statistical relevance (Table 3).

Counting the number of zeros in each group that represent the absence of space (Bone Fill- BF) between the new bone and the implant surface, it was

observed that they appeared in an inferior number in the horizontal measurement of the crestal resorption for all the groups (Table 2). The number of zeros (bone fill) was lower for “1” and “2” measurements in the equicrestal groups when comparing with the subcrestal groups (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 had a red color in a smeared diffuse pattern; calcein green showed clearly evident green bands; 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 the quantification of the bone markers. Sequentially, they represented the healing pattern of each different group. The percentages of newly formed bone adjacent and distant to the implant interface are described in Table 4 and Graphs 1 and 2. The values were between 1.13% and 1.80% for the mineralization rate in the first week evaluation and, increased gradually after 7 days (2.65% to 5.36%), reaching the highest values at the 4-week evaluation (6.80% to 8.00%). At the 12-week evaluation the level of marked bone remained constant with small oscillations (5.56% to 7.56%). The subcrestal control group being the only exception since it increased 6.80 to 7.36%, for the adjacent areas with statistically significant differences between the subcrestal test and control groups in the second week. The analysis of the distant values showed a significant increase between the first week and the 12-week evaluation for all the groups with statistically significant differences between the subcrestal test and control groups in the second week.

Considering the intra-group analysis between the adjacent and distant areas, statistically significant differences were observed in the equicrestal control groups and, in both the subcrestal groups, with higher values in the adjacent parameter at the 2-week evaluation. Furthermore, when comparing the adjacent versus distant in the 4-week evaluation, a statistically significant difference was obtained in all the groups with the highest values in the adjacent areas. At 12-weeks, only the equicrestal control group presents a statistically significant difference.

DISCUSSION

Immediate implant placement protocols imply the installation of a dental implant in a fresh extraction socket. Findings from clinical studies and case report series indicate that immediate implants seem to have success comparable with those inserted in the delayed protocol (Schwartz-Arad & Chaushu 1997, Krump & Barnett 1991, Tolman & Keller 1991). However, there is a lack of histometric analysis to better understand the bone healing and quality of osseointegration when the different variables that involve the immediate implant therapy are associated. The clinical evaluation of the resolution of a marginal defect per se is very limited. This study evaluated buccal bone plate remodeling following immediate implantation, using flapless procedures, and comparing this process between sites that received or not synthetic bone grafts (BCP) in the gap between the implant and the buccal bone plate. The histomorphometric results demonstrated a significant better performance of the ECTG in the vertical crestal bone resorption, but the other parameters showed better results in the SCCG. Therefore, in a general view, as the implant was 2mm subcrestally positioned the vertical crestal bone resorption and bone density was higher, but the vertical bone level decreased.

In the present study, loss of buccal bone (VCBR) in the equicrestal groups was smaller when compared to the subcrestal groups. The resorption was insignificant in the equicrestal group with the bone graft (0.08 mm) and was 0.20 mm in the equicrestal group without the bone graft with statistically significant differences when comparing the subcrestal test group with the equicrestal test and control groups. In the subcrestal groups, the bone remained above the implant shoulder, but implant placement was 2.0 mm subcrestal, which indicates that bone loss occurred, but did not expose the implant. The positive results obtained in the equicrestal groups probably occurred due to the flapless approach, the 2.0 mm gap that was filled with the synthetic bone graft in association with the design of the implant and the implant position, and the SLActive surface on the entire length of the implant.

Some animal studies have found pronounced resorption of the buccal bone, after implant placement in fresh extraction sockets resulting in a marked reduction in height of the thin buccal hard tissue (Araujo et al. 2006a, 2006b). It was suggested (Araújo & Lindhe 2005) that the reduction of the buccal bone wall was in part related to the loss of bundle bone and the pre-surgical thickness of the buccal bone tissue (i.e. biotype). Recently, some studies (Barros et al. 2009, Fickl et al. 2008)

investigated the effectiveness of the flapless approach as an alternative to buccal bone preservation at least to some extent. This may have a particular impact when dealing with immediate implant therapy, considering that tooth extraction eliminates the periodontal ligament blood supply, leaving only the vascularization provided by the periosteum. Therefore, raising a mucoperiosteal flaps in this situation may strongly compromise the blood supply that comes from the periosteum and it can promote the buccal bone wall resorption. Barros et al (2009) 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. In agreement, Caneva et al (2010) observed that the resorption of the buccal alveolar bony crest was 1.7 mm and 1.5 at the control and test sites, respectively. Furthermore, Fickl et al (2008) had similar results and highlighted the great impact of this finding in thin periodontal biotypes, where the osteoclastic activities of the internal and external sides could merge together and cause a more pronounced buccal bone plate loss. Therefore, the flapless surgery is an important factor for the maintenance of the crestal bone.

Regarding the presence or absence of the gap associated with the flapless approach, Blanco et al (2011) placed immediate implants at the bone crest level in flapless surgery with a small gap ($< 1\text{mm}$). The bone crest at the buccal aspect was roughly 0.86mm and 1.3mm apical to the SLA border. Comparing with our results, it is possible to analyze that wider gaps did not interfere negatively with the maintenance of the buccal bone. Furthermore, Negri et al. (2011), investigated the vertical crestal bone resorption in immediate implants placed equicrestally and 2mm subcrestally, but without gaps and with flaps. The results did not show significant differences and the mean values for the crestal group were higher (1.88 mm) when compared with the subcrestal group (1.26 mm). Comparing with the results of present study, the loss was higher in the study of Negri et al. (2011) probably due to flap elevation previously discussed.

Implant position is another question that needs to be analyzed. The study mentioned above (Negri et al., 2011) showed a higher loss of buccal bone in the equicrestal group (1.88 mm) in comparison with the subcrestal (1.26 mm). This is in agreement with a study carried out by Barros et al. (2009a, 2009b) in which bone remodeling around contiguous Morse Cone connection implants at different placement depths (equicrestally and 1.5mm subcrestally) was evaluated. The

subcrestal group index for crestal bone resorption was significantly lower than that of the equicrestal group. It isn't in accordance with our study in which the equicrestal groups presented some loss (0.20 and 0.08) and the subcrestal groups showed less favorable results with 1.28 and 1.95 of crestal resorption with statistically significant differences between the subcrestal test group and the equicrestal groups.

In this specific methodology, the bone graft did not appear to contribute to the maintenance of the buccal bone due to similar results between the test and control groups. But, the equicrestal groups showed less crestal resorption and, in this case, the entire gap was located in contact with the implant surface, unlike the subcrestal group, therefore the bone graft was contained between the bone walls and the implant. Therefore, due to its osteoconductive potential and slow degradation in the body, the bone graft probably contributed to the maintenance of the buccal bone.

The crestal bone resorption (CR) that occurred in some specimens of this study was detected not only by the linear vertical crestal bone resorption measurements but also by the cervical linear horizontal measurements. Without ignoring the small number of animals that compose the study sample, one can assume that in the equicrestal groups, the loss of cervical bone crest occurred in 37.5% test implants and in 25% implants in the control group. While in the subcrestal groups, crestal resorption was found in 25% of test implants and none in the control groups. The bone graft did not improved better results in the test groups, but promoted the bone fill in one case of each group.

The vertical bone level (VBL) varied between all the groups, but without statistically significant differences. The mean distance from the shoulder of the implant to the highest point of bone contact was slightly higher in the equicrestal groups than in the subcrestal groups, mainly in relation to the subcrestal control group. It is important to emphasize the position of the gap and dental alveoli anatomy in relation to the implant. In the subcrestal groups, part of the gap was located above the implant shoulder. Consequently, it does appear that this distance was smaller in the subcrestal groups, and that the bone graft did not interfere in the results. Araujo et al (2010) used the same methodology with implants located at the level or slightly apical of the adjacent buccal bone, but with variable 1-2 mm gaps in the buccal bone wall. The vertical bone level was apical at 0.1 mm in the test (Bovine bone group) and 1.3 mm in the control groups. This is in agreement with the findings of Blanco et al. (2008) from a comparable study in the beagle dog, but different from our results in

the test group most likely due to the gap size and type of bone graft. However, Negri et al (2011) in a study with immediate implants without gaps and with flaps observed that the mean of vertical bone level was 3.39 mm in the equicrestal group and 2.21mm in the subcrestal group demonstrating higher values in comparison to our study for both groups. This can be due to the healing time, 8 weeks in their study, compared with 12 weeks in this study as well as the use of flaps. Blanco et al (2010) with the same dog model, but without a gap, showed that the most coronal bone-to-implant contact was located 1.27mm (immediate loading) and 1.70mm (without loading) apical to the SLA surface at the buccal bone. Comparing Blanco's with our study, it is possible to observe that the SLActive surface and the inner edge of the gap probably contribute to better results associated with early loading.

In bone healing, the bone density depends on the stabilization of the coagulum around the implant surfaces and this may be adversely affected by the distance from the bone to the implant and the quality of the remaining bone walls. Blanco et al (2010) showed that the inter-thread bone area did not differ for the loaded (mean 83.45%) and unloaded group (mean 80.65%). The peri-implant bone area showed no relevant differences between groups (loaded, 94.37%; unloaded, 94.81%). This result is in agreement with the present study regarding the subcrestal control group, but different in relation to the other groups. In relation to this parameter, the gap size and the bone graft seem to influence the bone formation. The values present in this study, showed a statistically significant difference between all the groups in favor of the subcrestal control group. Again, the dental alveoli anatomy and the gap position favors the subcrestal control group but not the equicrestal control group. The percentage of bone density in the test groups was smaller and without statistical differences in part due to the presence of the bone graft that occupied a part of the gap area. Considering the bone density, it appears that the bone grafts were capable of conducting the bone formation around the particles promoting a bridge between them and with implant surface. Therefore, all the particles were surrounded by newly formed bone that was in direct contact with both the inner edge of the gap and the implant surface at 12 healing weeks. Thus, the b-TCP component of the BCP may have a beneficial effect on bone healing and maturation around the graft particles⁵⁴.

Botticelli et al (2004) also investigated buccal defects around implants and discussed that it may not be the size of the marginal gap per se but rather the

formation of a coagulum in the defect, its retention and replacement with a provisional matrix that determine whether defect resolution will occur. The main objective of the linear horizontal measurements was to evaluate the potential of bone fill in the different circumstances. Analyzing the data obtained by the other two horizontal measurements (1 and 2), the mean values decreased from the equicrestal to the subcrestal groups, with statistically significant differences between the subcrestal control groups in relation to the equicrestal groups. It seems reasonable to suggest that the larger defect is a challenge also for complete bone fill. A challenge, but not an impediment, because complete bone fill was observed by the number of times in which no distance was found between the new bone and the implant surface. Abrahamsson et al (2004) evaluating the early bone formation at SLA and turned surfaces showed that the newly formed bone was presented at the lateral border of the cut bony bed, continuous with the parent bone, evidencing an appositional bone formation or contact osteogenesis. This kind of bone formation explains the difficulties in bone formation up to the shoulder of the implants and also to the interior of the implant threads when dealing with wider defects because of the distance between the implant surface and the parent bone. In addition, Abrahamsson et al (2004) showed that woven bone was observed on the SLA surfaces at a distance from the parent bone, demonstrating the presence of distant osteogenesis. This was also found in some specimens of the present study where bone formation was observed far away from the pre-existing bone walls, forming a connection to the implant surface. In that respect Abrahamsson et al (2004) described the SLA surface as an “osteophilic” surface that favors early osseointegration when compared to a turned surface, and the same could be ascribed for the SLActive surface evaluated in the present study. Animal studies showed a faster and more structured bone formation with greater blood vessel production and higher osteocalcin activity in the first 14 days following SLActive implantation²¹. This accelerated healing was accompanied by an up to 60% greater bone-to-implant contact and a significantly higher unscrewing torque compared with the SLA surface after 2 and 4 weeks.

Due to the anatomy of the alveoli and the gap that was in part located above to the shoulder of the implant, the residual gap was smaller in the subcrestal control group with statistically significant differences between this group and the equicrestal test and control groups. So, the residual gap at the first (1) and second (2) linear horizontal measurements was higher in the equicrestal test group and smaller in the

subcrestal control group. The intra-group analysis did not show different results between the test and control groups. Furthermore, the residual gap decreased as the gap narrowed towards the implant surface. The bone fill at both linear measurements was similar between the groups, with the exception of the equicrestal control group that did not promote this closure at the central region. In our study, the jumping gap is wider, so the resolution of the defects is more difficult.

Further, the study aimed to investigate the dynamics of early bone healing around the implant surfaces and the gap by a fluorescence analysis. The application of bone markers at different time periods permits evaluation of bone formation and remodeling throughout different stages of healing. Alizarin, calcein green, oxytetracycline 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 (Sun et al. 1992), properly evidencing the active mineralization areas (Nkenke et al. 2002).

The fluorochrome incorporation showed a pattern among the different groups of implant position and gap filling along the period of evaluation from 7 days to 12 weeks. As demonstrated by the histomorphometric analysis, the comparison between the control and test groups did not show statistically significant differences in the fluorescence analysis, only in the subcrestal test and control groups in the 2-weeks evaluation in which the test achieved statistically better results when compared to the control group. In fact the fluorescence findings evidenced numerically better results for the equicrestal and subcrestal test groups in some periods of the adjacent areas, but in all evaluations for the distant area comparisons. It is different from the histomorphometric findings where the equicrestal and subcrestal control exhibited numerical superiority in the adjacent areas and smaller values in the subcrestal test for the distant areas. In view of that it is important to understand that the major contribution of the fluorescence analysis is the dynamic information about the early phases of bone formation, differently from the histomorphometric parameters that are frequently used to evaluate the osseointegration around implants but based only in the final moment of the experiment. Thus it could be assumed that the test groups were able to favor the early events of the bone healing as suggested previously, but not influencing the final result of bone formation evidenced by the other histomorphometric parameters. Generally, it was observed for all the equicrestal and subcrestal groups that the

percentage of marked bone was slight in the first week (from 1.13 to 1.80), increased gradually after 2 weeks (2.65 to 5.36) and reached the highest values at the 4-week evaluation (6.80 to 8.00), representing the mineralization peak of all the groups. Finally, at the 12-weeks evaluation, the level of marked bone remained constant with small oscillations (6.30 to 7.56). The only exception was in the subcrestal test group that presented a decrease (7.89 to 5.56) in the adjacent area. This pattern of fluorochrome incorporation is totally different from those observed in a previous study (Barros et al. 2010).

According to Abrahamsson et al (2004), the first steps of bone remodeling around implants involved the presence of a clot that was partially penetrated by vascular structures surrounded by fibroblast-like mesenchymal cells at its periphery. Nevertheless, at 1-week, the woven bone formation frequently began and the bone formation centers (primary osteons) were usually recognized (Abrahamsson et al. 2004). After 2 weeks the presence of trabeculae of newly formed bone was predictable and at this time an active process of mineralization was present (Abrahamsson et al. 2004). These observations support the results found in the present study that showed the mineralization peak between 2 and 4-week period as for all groups with the highest values in this last phase. In sequence to this ongoing process, at the 12-week period of evaluation an insignificant decrease was observed just in the subcrestal test group, but in the other groups the mineralization pattern remained constant. Generally, in the last period the rate of mineralization decrease (Barros et al. 2010) which may be explained by the fact that a large volume of woven bone had already been replaced by lamellar bone (Abrahamsson et al. 2004). Subsequently, the formation of secondary osteons and an undergoing remodeling could be expected. But, in our study, the pattern of mineralization is different from the implants placed in healed ridge and in studies where surgically created defects were induced (Barros et al. 2010). This may be attributed to the SLActive surface implant and the inner edge of the gap in the fresh sockets altering the bone formation in sites that have not yet healed.

CONCLUSION

The histomorphometric results showed that the equicrestally-placed implants, in this methodology, presented little or no loss of the buccal bone height. On the other hand, the subcrestally-positioned implants presented loss of buccal bone,

regardless of the use a synthetic bone graft. However, the buccal bone was always coronal to the implant shoulder. Both the equicrestal and subcrestal groups were benefited in the early stages of bone healing as evidenced by the fluorescence analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was in part supported by Straumann Group, Basel, Switzerland.

REFERENCES

- Abrahamsson, I., Berglundh, T., Linder, E., Lang, N.P. & Lindhe, J., (2004) Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 381-392.
- 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.
- Araújo, M.G., Sukekava, F., Wennstrom, J.L. & Lindhe, J. (2006a) Tissue modeling following implant placement in fresh extraction sockets. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 615–624.
- Araújo, M.G., Wennstrom, J.L. & Lindhe, J. (2006b) Modeling of the buccal and lingual bone walls of fresh extraction sites following implant installation. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 606–614.
- Araújo MG, 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.
- Akimoto, K., Becker, W., Persson, R., Baker, D.A., Rohrer, M.D. & O'Neal, R.B., (1999) Evaluation of titanium implants placed into simulated extraction sockets: A study in dogs. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **14**: 351-360.
- Barros, R.R.M., Novaes, A.B. Jr, Muglia, V.A., Iezzi, G. & Piattelli, A. (2009a) Influence of interimplant distances and placement depth on peri-implant bone remodeling of adjacent and immediately loaded Morse cone connection implants: a histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 371–378.
- Barros, R.R.M., Novaes, A.B. & Papalexiou, V. (2009b) Buccal bone remodeling after immediate implantation with a flap or flapless approach: a pilot study in dogs. *Titanium* **1**:45-51.

Barros, R.R., Novaes, A.B. Jr, Muglia, V.A., Iezzi, G. & Piattelli, A. (2010) Influence of interimplant distances and placement depth on peri-implant bone remodeling of adjacent and immediately loaded Morse cone connection implants: a histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **4**:371-8.

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 Maxillofacial Implants* **9**:31–40.

Blanco, J., Nunez, V., Aracil, L., Munoz, F. & Ramos, I. (2008) Ridge alterations following immediate implant placement in the dog: flap versus flapless surgery. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 640–648.

Blanco, J., Linares, A., Villaverde, G., Perez, J. & Munoz, F. (2010) Flapless immediate implant placement with or without immediate loading. a histomorphometric study in beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology* **37**: 937–942.

Blanco, J., Linares, A., Perez, J. & Munoz, F. (2011) Ridge alterations following flapless immediate implant placement with or without immediate loading. Part II: a histometric study in the Beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology* **38**: 762–770.

Botticelli, D., Berglundh, T., Buser, D. & Lindhe, J., (2003) The jumping distance revisited: An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 35-42.

Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J., (2004) 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.

Boix, D., Gauthier, O., Guicheux, J., Pilet, P., Weiss, P., Grimandi, G. & Daculsi, G. (2004) Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: an experimental study in dogs. *Journal of Periodontology* **75**: 663– 671.

Borhane, H., Fellah, A., Olivier, G., Weiss, P., Chappard, D. & Layrolle, P. (2008) Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* **29**: 1177-1188.

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.

Caneva, M., Botticelli, D., Salata, L.A., Souza, S.L.S., Bressan, E. & Lang, N.P. (2010) Flap vs. “flapless” surgical approach at immediate implants: a histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 1314–1319.

Carlsson, L., Rostlund, T., Albrektsson, B. & Albrektsson, T. (1988) Implant fixation improved by close fit. Cylindrical implant-bone interface studied in rabbits. *Acta orthopaedica Scandinavica* **9**: 272-275.

Campelo, L.D. & Camara, J.R. (2002) Flapless implant surgery: a 10-year clinical retrospective analysis. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **17**:271-6.

Caudill, R.F. & Meffert, R.M., (1991) Histologic analysis of the osseointegration of endosseous implants in simulated extraction sockets with and without e-ptfe barriers. 1. Preliminary findings. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **11**: 207-215.

Cordaro, L., Bosshardt, D.D., Palattella, P., Rao, W., Serino, G. & Chiapasco, M. (2008) Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumanns Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 796–803.

Cornelini, R., Scarano, A., Covani, U., Petrone, G. & Piattelli, A. (2000) Immediate one-stage postextraction implant: a human clinical and histologic case report. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **15**:432-7.

Daculsi, G., Goyenvall, E. & Aguado, E. (1999): Spongy and cortical bone substitution kinetics at the expense of macroporousbiphasic calcium phosphate: animal and human evidence. In: Ohgushi, H., Yoshikawa, T., Hastings, G.W., eds. *Proceedings of the 12th International Symposium on Bioceramics in Medicine*, Bioceramics 12, p. 287. Singapore.

Denissen, H.W., Kalk, W., Veldhuis, H.A. & van Waas, M.A. (1993) Anatomic consideration for preventive implantation. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **8**: 191- 196.

Döring, K., Eisenmann, E. & Stiller, M. (2004) Functional and esthetic considerations for single-tooth Ankylos implant-crowns: 8 years of clinical performance. *Journal of Oral Implantology* **30**:198-209.

Farina, M.N., Guzon, F.M. & Penã, M.L. Cantalapiedra AG. (2008)-In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *Journal of Materials Science: Mater Méd.* **19**:1565–1573.

Ferrus, J., Cecchinato, D., Pjetursson, 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., Zuh, O., Wachtel, H., Bolz, W. & Huerzeler, 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.

- Gauthier, O., Bouler, J-M., Weiss, P., Bosco, J., Daculsi, G. & Aguado, E. (1999) Kinetic study of bone ingrowth and ceramic absorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research* **47**: 28–35.
- Gelb, D.A. (1993) Immediate implant surgery: Three-year retrospective evaluation of 50 consecutive cases. *The International Journal of Oral & 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.
- Karring, T., Lindhe, J. & Cortellini, P., (2005) Terapia periodontal regenerativa. In: Lindhe, J., Karring, T., Lang, N.P., eds. -*Tratado de Periodontia e Implantologia Oral*, 4ª. editon, p. 641. Rio de Janeiro: Guanabara.
- Knox, R., Caudill, R. & Meffert, R. (1991) Histologic evaluation of dental endosseous implants placed in surgically created extraction defects. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **11**: 364-375.
- Krump, J.L. & Barnett, B.G., (1991) The immediate implant: A treatment alternative. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **6**: 19-23.
- Lang, N.P., Bragger, U., Hammerle, C.H. & Sutter, F., (1994) Immediate transmucosal implants using the principle of guided tissue regeneration. I. Rationale, clinical procedures and 30-month results. *Clinical Oral Implants Research* **5**: 154-163.
- Lazzara R.J. (1989) Immediate implant placement into extraction sites: surgical and restorative advantages. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. **9**:332-43.
- Manjubala, I., Sivakumar, M., Sureshkumar, R. V. & Sastry, T. P., (2002) Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. John Wiley & Sons, Inc. *Journal of Biomedical Materials Research (Appl Biomater)* **63**: 200-208.
- Mazor, Z., Peleg, M. & Redlich, M. (1999) Immediate placement of implants in extraction sites of maxillary impacted canines. *The Journal of the American Dental Association* **130**:1767-70.
- Molly, L., Vandromme, H., Quirynen, M., Schepers, E., Adams, J.L. & van Steenberghe, D. (2008)-Bone formation following implantation of bone biomaterials into extraction sites. *Journal of Periodontology* **79**:1108-15.
- Negri, B., Calvo-Guirado, J.L., Pardo-Zamora, G., Ramý'rez- Fernandez, M.P., Delgado-Ruýz, R.A. & Munoz-Guzon, F. (2011) Peri-implant bone reactions to

immediate implants placed at different levels in relation to crestal bone. Part I: a pilot study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **24** (Epub ahead of print).

Nery, E.B., Legeros, R.Z., Lynch, K.L. & Lee, K. (1992) Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/ -TCP in periodontal osseous defects. *Journal of Periodontology* **63**: 729–735.

Nkenke, E., Kloss, F., Wiltfang, J., Schultze-Mosgau, S., Radespiel-Troger, M., Loos, K. & Neukam, F.W., (2002) Histomorphometric and fluorescence microscopic analysis of bone remodelling after installation of implants using an osteotome technique. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 595-602.

Nociti Junior, F.H., Stefani, C.M., Machado, M.A., Sallum, E.A., Toledo, S. & Sallum, A.W., (2000) Histometric evaluation of bone regeneration around immediate implants partially in contact with bone: A pilot study in dogs. *Implant Dentistry* **9**: 321-328.

Novaes, A.B. Jr., Macedo, G.O., Suaid, F.A., Barros, R.R., Souza, S.L., Silveira & Souza, A.M. (2011) Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. *Journal of Periodontology* **82**:872-7.

Pennel, B.M., King, K.O., Wilderman, M.N. & Barron, J.M. (1967) Repair of the alveolar process following osseous surgery. *Journal of Periodontology* **38**:426-431.

Ramfjord, S.F. & Costich, E.R. (1968) Healing after exposure of periosteum on the alveolar process. *Journal of Periodontology* **39**:199-207.

Rocci, A., Martignoni, M. & Gottlow, J. (2003) Immediate loading of Brånemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **5 Suppl 1**:57-63.

Schopper, C., Ziya-Ghazvini, F., Goriwoda, W., Moser, D., Wanschitz, F., Spassova, E., Lagogiannis, G., Auterith, A. & Ewers, R. (2005) HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation--a long-term histological study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **74**:458-67.

Schulte, W., Kleineikenscheidt, H., Lindner, K. & Schareyka, R., (1978) The Tübingen immediate implant in clinical studies. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* **33**: 348-359.

Schwartz-Arad D & Chaushu G. (1997) The ways and wherefores of immediate placement of implants into fresh extraction sites: A literature review. *Journal of Periodontology* **68**:915–923.

Schwartz, C., Liss, P., Jacquemaire, B., Lecestre, P. & Frayssinet, P. (1999) Biphasic synthetic bone substitute use in orthopaedic and trauma surgery: clinical, radiological

and histological results. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **10**: 821–825.

Schwartz-Arad, D., Gulayev, N. & Chaushu, G. (2000) Immediate versus non-immediate implantation for full-arch fixed reconstruction following extraction of all residual teeth: a retrospective comparative study. *Journal of Periodontology* **71**:923-8.

Sun, T.C., Mori, S., Roper, J., Brown, C., Hooser, T. & Burr, D.B., (1992) Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information? *Bone* **13**: 443-446.

Tarnow, D.P., Cho, S.C. & Wallace, S.S., (2000) The effect of inter-implant distance on the height of inter-implant bone crest. *Journal of Periodontology* **71**:546-9.

Tolman, D.E. & Keller, E.E. (1991)Endosseous implant placement immediately following dental extraction and alveoloplasty: preliminary report with 6-year follow-up. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **6**:24-8.

Tomasi, C., Sanz, M., Cecchinato, D., Pjetursson, 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. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **10**: 561-567.

FIGURES LEGEND

Figure 1: A – initial aspect of the mucosa and tooth; B – hemisection of the bicuspids; C – socket after tooth extraction; D – Immediate implants; E – gap (2.0 mm) between the implant and the buccal bone plate; F – The transfers are in position.

Figure 2: A –The bone graft in the gap; B – The bone graft in the socket; C – sutured wound; D –prosthesis in place one week following surgical procedure.

Figure 3: Histological images representing the morphometric measurements. **A.** Histological “bone density” determined within a rectangle that comprised the region of the defect. The length of 3 mm is always represented by a dotted line on the left of the implant. The adjacent area is the yellow rectangle and the distant area is the red rectangle placed in a mirror image of the first; **B.** Vertical bone level (VBL) were calculated on the buccal bone plate of the implants, from the implant shoulder to the first bone-to implant contact; **C.** Vertical crestal bone resorption (VCBR) determined as a linear vertical measurement from an imaginary line from the implant shoulder (second imaginary dotted line) to the highest point of the bone crest (dotted line). Toluidine blue stain. Magnification 2,5X.

Figure 4: Crestal resorption (CR): linear horizontal measurements were made from the most cervical point of the defect to the bone. Residual gap (RG): linear horizontal measurements were made from the midpoint of the defect to the bone (1) and from the most apical point of the defect to the bone (2) to evaluate the bone formation inside the defects. In some specimens crestal bone resorption was observed, involving the cervical third of the defects and compromising the first horizontal measurement. Toluidine blue stain. Magnification 2,5X.

Figure 5: Histological images of the control sites. **A.** The presence of the three types of bone tissue: parent lamellar bone (PLB), newly formed bone (NB) and the most recently formed bone (RFB). Note the red line separating the “old” and “new” structures (Magnification 10X); **B.** This specific area of the new bone shows immature aspects of bone with some concentric lamellae and the presence of osteoblasts (OB) and osteoid matrix (OM) indicating active bone formation (Magnification 20X). Blue arrows: the recently formed bone appeared in direct contact with the implant surface and, sometimes circumscribing the lamellae; **C.** The blue arrows indicates the details of the recently formed bone (RFB) and the red

arrows indicates new bone (NB) structures. The osteoid matrix on the external surface of the RFB and osteoclast (OC) activity. (Magnification 40X). Toluidine blue stain.

Figure 6: **A.** The different bone structures; **B.** The polarized light: the red arrows showed the new bone with the lamellar pattern and, in some areas, a structure with interlaced fibers characterizing the woven bone. The blue arrows showed the recently formed bone (RFB) characterized by a parallel-fibered bone with residual areas of woven bone. (Magnification 10X). Toluidine blue stain.

Figure 7: Histological images of the control sites. **A.** the residual particles of the bone graft (RP) surrounded by new bone (red arrows) and recently formed bone (blue arrows) (Magnification 10X); **B.** The implant surface was lined by RFB (blue arrows) and its structure established a direct contact with the particles and the new bone forming a bridge between the structures (Magnification 20X); **C.** The osteoblasts (OB), osteoid matrix (OM) and the RFB (blue arrows) indicating active bone formation in direct contact with the implant surface and residual particles of the bone graft. (Magnification 40X). Toluidine blue stain.

Figure 8: Fluorescence analysis in the control and test groups. New bone formation was determined histomorphometrically by quantification of the bone markers. The old bone always appeared darker and without labeling. (A) Alizarin red had a red color in a smeared diffuse pattern; (B) Calcein green was generally represented by clearly evident green bands; (C) Tetracycline showed thin yellow-green lines; and (D) Calcein blue was characterized by a blue color in a very diffuse pattern. Magnification 2,5X.

TABLES

Table 1: Comparisons between equicrestal and subcrestal control and test sites for all histomorphometric parameters: vertical crestal bone resorption (VCBR), vertical bone level (VBL), bone density of new bone total area (NB) (inter and intra-group analysis of adjacent and distant) and recently formed bone (RFB) (adjacent), and the percentage of residual particles.

Site	VCBR (mm)	VBL (mm)	Bone Density (%)			Residual particles (%)
			Adjacent (NB-100%)	Adjacent (RFB)	Distant (NB-100%)	
ECTG	0.08 π	1.58	35.76 π	16.57	26.03	11.16
ECCG	0.20 π	1.67	51.40 $\pi^\dagger$	17.30	17.46 †	_____
SCTG	1.95 π	1.31	45.15 π	13.71	37.65	8.40
SCCG	1.28	0.75	80.01 $\pi^\dagger$	18.11	48.35 †	_____

$\pi^\dagger$: Each symbol evidences a comparison that achieved statistical significance ($p < 0.05$).

Table 2: Crestal resorption (CR) (mm) investigated inside the defects of all the groups equicrestal and subcrestal through linear horizontal measurements from the most cervical point of the implant to the bone.

	Crestal Resorption (CR)								CR	Bone Fill (BF)
ECTG			0.38	0.71	0.64	0		1.67	3	1
ECCG	0.54	0.65		0.41	0.29	0.56		0.46	2	0
SCTG	0.19	0.18	0.05	1.6	0.81	0			2	1
SCCG	0.17	0.52	0.29	0.17	0.22	0.28	0.26	0.45	0	0

Table 3: Residual gap (RG) (mm) investigated inside the defects of all the groups equicrestal and subcrestal through linear horizontal measurements: (1) from the implant to the bone at the mid point of the defect; (2) from the implant to the bone at the most apical point of the defect.

	ECTG		ECCG		SCTG		SCCG	
	1	2	1	2	1	2	1	2
	0	0	0.50	0.20	0	0.29	0	0.25
	0	0	0.23	0.01	0.13	0.09	0	0.22
	0	0.03	0.06	0	0	0	0	0
	0.55	0.11	0.17	0	0	0	0	0
	0.37	0.06	0.08	0	0.93	0	0	0
	0.21	0.09	0.01	0	0.29	0.41	0	0.28
	0.06	0	0.15	0.08	0	0.01	0.05	0.03
	0.73	1.10	0.32	0.05	0	0	0.12	0
Mean	0.24 π	0.17	0.19 π	0.04	0.16	0.10	0.02π	0.08
Bone Fill (BF)	3	3	0	4	5	4	6	4

π: statistically significant ($p < 0.05$)

Table 4: Fluorescence Analysis. The percentages of newly formed bone adjacent and distant to the equicrestal groups and to the subcrestal groups along the period of evaluation.

Site	Rate of mineralization (%)							
	Adjacent				Distant			
	1 week	2 weeks	4 weeks	12 weeks	1 week	2 weeks	4 weeks	12 weeks
ECTG	1.69	4.20	6.96 π	6.30	1.18	2.02	3.12 π	5.50
ECCG	1.64	4.62 $\dagger$	8.00 π	7.56 $\yen$	0.47	1.44 $\dagger$	2.86 π	4.84 $\yen$
SCTG	1.80	5.36 $^{*}\dagger$	7.89 π	5.56	1.42	2.97 $^{*}\dagger$	4.42 π	5.80
SCCG	1.13	2.65 $^{*}\dagger$	6.80 π	7.36	1.05	1.09 $^{*}\dagger$	3.37 π	4.57

Each symbol evidences a comparison that achieved statistical relevance ($p < 0.05$).

Graph 1: Percentages of newly formed bone, adjacent to the implant interface, for equicrestal and subcrestal groups along the period of evaluation.

Graph 2: Percentages of newly formed bone, distant to the implant interface, for equicrestal and subcrestal groups along the period of evaluation.

Artigo 3

TITLE PAGE**Buccal bone remodeling after tooth extraction using the flapless approach with and without synthetic bone grafting. A histomorphometric study in dogs.**

Running title: Remodeling of buccal bone plate in fresh sockets

Keywords: bone formation, synthetic bone graft, extraction socket, grafting

Authors: Flávia Suaid, MScD¹; Márcio F. M. Grisi DSc²; Sérgio L. S. Souza DSc²; Daniela B. Palioto²; Mário Taba Jr. DSc²; Arthur B. Novaes Jr., DSc³

¹Graduate students of Periodontology at the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

²Professor of Periodontology at the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

³Chairman of Periodontology at the Department of Bucco-Maxillo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author: Arthur Belém Novaes Júnior

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

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

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

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate buccal bone remodeling of fresh sockets following tooth extraction using the flapless approach, with or without synthetic graft materials.

Material and Methods: 8 dogs had the mandibular bicuspids extracted without flaps, and 2 alveoli on each side (total of 4) were selected. The following groups were devised: one socket on each side received a grafting material (test group), and the other remained only with a blood clot (control group). Ground sections were prepared from 12-week healing biopsies and histomorphometry was performed.

Results: The buccal crest level (BCL) relative to the new bone (1), in the test group, showed numerically better data when compared to the control group, but without statistical relevance. The buccal crest level (BCL) relative to the old bone (2) was very similar for the groups without statistical relevance. The alveolar thickness (AT) showed similar results without statistical significance difference between the groups. The total bone area (TBA) showed statistically significant differences between the test (38.60%) and control (47.18%) groups. The new bone area (NBA) presents a numerical difference between the test (15.62%) and control (22.24%), but without statistically significant differences. The old bone and the medullar area was similar for both groups.

Conclusion: It was observed that there was no loss of the buccal bone crest in relation to the lingual bone crest level, mainly in the test group.

INTRODUCTION

Alveolar bone resorption after tooth extraction is an inherent condition of the healing process, and the edentulous site of the alveolar process will undergo both quantitative and qualitative changes (Pietrokovski; Massler, 1967; Cardaropoli; Araujo; Lindhe, 2003; Schropp et al., 2003; Araújo et al., 2005). Extraction sockets generally heal with bone tissue after 1 to 2 months which is followed by gradual remodeling that includes changes in size and shape, with reduction of approximately 40% in height and 60% in width of the alveolar bone (Amler, 1969; Atwood; Coi, 1971; Araújo; Lindhe, 2005). Furthermore, the walls of the socket will be markedly reduced and the dimensional changes will be more pronounced in the buccal than in the lingual bone plates (Pietrokovski; Massler, 1967; Pietrokovski et al., 2007). Progressive and irreversible changes will occur which can make implant placement difficult.

In order to counteract the effect of dental alveoli modelling, various techniques have been advocated including the use of the flapless approach. When teeth are present, blood flow is provided through the periodontal ligament, periosteum and the bone tissue. After a tooth is extracted, the periodontal ligament is removed, and only two nourishment sources remain. In addition, the cortical bone is poorly vascularized therefore, when a flap is raised for the extraction and implant installation, suprapariosteal blood supply ceases. This leaves only the poorly vascularized bone without its medullary component, leading to bone resorption in the initial stages (Pennel et al. 1967). Such bone remodeling in response to inadequate blood supply becomes more critical in the buccal region due to characteristics naturally inherent to this region's nature and anatomy (Novaes et al. 2011). This may lead to serious compromises both for osseointegration and aesthetics. In the light of such facts, not raising a flap before implant installation may represent an alternative to minimize buccal bone plate resorption, since such procedure will preserve periosteal vascularization (Campelo; Camara, 2002; Rocci et al., 2003).

Nevertheless, vertical and horizontal ridge dimension alterations were still evident. Ridge defects often hamper the placement of ideally shaped artificial crowns and are basically treated with soft or hard tissue grafts (Park, 2010). Various biomaterials have been used to prevent or minimize ridge collapse after tooth extraction in an attempt to improve implant placement (Froum et al., 2004). The general understanding is that bone graft placement in the extraction socket should

offset the catabolic processes observed within the crestal ridge. Therefore, several procedures, such as the use of bone autografts, bone replacement materials, and regenerative techniques, have been proposed to prevent and correct alveolar bone resorption.

Various bone regenerative techniques and different studies models have been used to encourage bone growth within the fresh sockets, including barrier membranes (Simion et al., 1994; Fernandes et al., 2011; Bashara et al., 2011), autogenous bone grafts and different biomaterials such as demineralized or mineralized freeze-dried bone allografts xenograft and synthetic bone grafts (Artzi; Tal; Dayan, 2000; Froum et al., 2002; Carmagnola; Adriaens; Berglundh, 2003; Nevins et al., 2006; Araújo; Lindhe, 2009; Fernandes et al., 2011; Bashara et al., 2011). These materials exhibit osseointegrating properties, and act as a scaffold for cell adhesion and proliferation, thus facilitating socket fill (Molly et al. 2008, Karring et al. 2005, Schopper et al. 2005). However, successful results were not always obtained according to the grafting material (Araujo et al., 2008).

Among the different grafting materials, one can cite Biphasic Calcium Phosphate (BCP), which is utilized as a bone replacement material in orthopedic, oral and maxillo-facial applications (Schopper et al. 2005; Schwartz et al. 1999). Chemically similar to human bone, biphasic calcium phosphate is constituted of a combination of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP), meaning it is a 2-phase material. The dissolution of TCP supplies the basic material for calcium and phosphate ions, thus triggering mineralization. At the same time, HA acts as the scaffold for osteoblast adhesion and formation of new bone maintaining the volume against excessive resorption (Schopper et al. 2005, Gauthier et al. 1999). Histological evaluations demonstrated that BCP promotes osteoblastic and osteoclastic activity characterizing a bone remodeling process 12 weeks later (Manjubala et al. 2002). Comparatively to different bone grafts, BCP revealed substantially higher osteogenic capacity, and it also seems to be as safe and efficient as autogenous bone graft (Fellah et al. 2008). Consequently, biphasic calcium phosphate (BCP) is cited as a biocompatible, bioactive and osteoconducting bone graft material when implanted into bone defects (Nery et al. 1992; Boix et al. 2004; Dalcusi et al. 1999; Manjubala et al. 2002).

Developed as a new synthetic bone substitute, a specific BCP (Bone Ceramic, Straumann™, Basel-Switzerland) is a combination of 60% hydroxyapatite

[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] and 40% tricalcium phosphate [Ca₃(PO₄)₂], which is part of biphasic calcium phosphates. It is composed of interconnected pores ranging from 100 to 500 microns and a porosity index of 90%, which grants maximum space for vascularization, osteoblast migration and new bone formation. Furthermore, in terms of phase proportion, it was proved that HA's superior ratio in BCP is associated to a more accelerated bone formation (Nery et al. 1992). Histologically, it was demonstrated that this specific proportion promoted formation of new non-mineralized and mineralized bone matrices in contact with the particles, which were resorbed at large 74% when compared to another bone graft 62%, in the period of 6 to 8 months (Cordaro et al. 2008). Additionally, De Coster et al. (2011) observed a smaller resorption in the sockets with BoneCeramic compared with that heal solely.

Based on this, the aim of the present histomorphometric study is to compare the remodeling of the buccal bone plate, between extraction sockets following a flapless approach, associated or not with synthetic bone grafts, in dogs.

MATERIAL AND METHODS

This study protocol was approved by the Animal Experimental Ethics Committee of the Campi of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (protocol number 06.1.458.53.5).

Eight young adult male dogs of undefined breed weighting approximately 20 kg each and raised at a private kennel were used. All selected animals had perfect mandibles, no generalized occlusal trauma, no viral or fungal mouth lesions (figure 1A), good overall health and no systemic compromises attested by veterinary exams. The dogs were immunized with vaccines, received anti-parasitic treatment and were submitted to dental prophylaxis using ultra-sound for removal of dental plaque and biofilm.

The night preceding the surgeries, the animals received 20.000 UI penicillin intramuscular and streptomycin at 1.0 g/10 kg of weight. Since such dosage allows antibiotic coverage for 4 days, a new dose was administered four days later, totaling 8 days of antibiotic protection. The fore-mentioned broad-spectrum antibiotic association is commonly used to treat infections in small animals and, thus, was chosen before the implant surgeries.

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 at 0.10 mL/kg and acepromazine at 2.0 %. Anesthetic maintenance was obtained using volatile anesthetics and, 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 (2V%). Additionally, local anesthesia was used at the bicuspid (P1, P2, P3 and P4) regions.

The procedures for the extraction of the 4 lower bicuspids (pre-molar) were completed without flaps (figure 1C). The teeth were bucco-lingually sectioned so the roots could be removed with as little trauma as possible avoiding damage to the alveoli bone walls (figure 1B, 1C). The following sockets were selected: P2 distal and P4 distal, totaling 2 sockets in each side of the mandible (figure 1C). The alveoli were used to study the dynamics of the healing process in flapless surgical sites, with or without the use of synthetic bone graft (BCP) (figure 1D). Randomly, in one hemi-mandible, one socket received the graft (test group), and the other did not, healing solely with the aid of a blood clot (control group) (figure 1D). On the opposing side, the sites were reversed according to the type of treatment, respecting the random cross-location method (Papalexiou et al. 2006). Following, the wounds were sutured with 4-0 silk suture on both sides of the mandible (figure 1E).

For the post-operative care, Tramadol chloridrate (50mg/ml) was used at 3mg/kg every 12h as analgesic therapy and ketoprofen 20mg at 1pill/20kg was used as anti-inflammatory therapy. The animals also received Stomorgyl (Stomorgyl 10, Merial Saude Animal Ltda, Paulinia, SP, Brazil), 1pill/10kg, for 10 days as antibiotic therapy. The animals were maintained on a soft ration diet for 15 days, and then the sutures were removed. Healing control was performed daily with a topical application of 0.12% chlorhexidine to limit microbial biofilm adherence. The remaining teeth were cleaned monthly with ultrasonic points.

Twelve weeks after the surgical procedure, the animals were sacrificed by induction of deep anesthesia with a subsequent intravenous sodium thiopental and potassium chloride overdose. The hemi-mandibles were removed, dissected and fixed in 4% phosphate-buffered formalin 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 (1982). The sections were prepared

for histomorphometry after being stained with *Alizarin Red* for optic microscopic analysis.

HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS

Buccal-lingual longitudinal histological sections from each socket were captured through a video camera Leica DC 300F (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany) joined to a microscope Leica DM LB2 (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany). The images were analyzed through the Leica QWin (Leica Microsystems Wetzlar, GmbH, Germany) by a single examiner with no knowledge of the experimental groups.

The **buccal crest level (BCL)** was determined as a linear vertical measurement in two different regions: from an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of the newly formed bone (1), and from an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of the “old bone” (2) (figure 3C).

The **alveolar thickness (AT)** comparing sockets with or without TCP was determined as a linear horizontal measurement, between both the buccal and lingual external walls, from an imaginary line 1mm below from the highest point of the bone in the socket (figure 2B).

The histological “**bone density**” was determined within a rectangle that comprised the region of the socket, 5.5 mm wide and 7 mm in length, from the highest point of the socket. The “bone density” measurements evaluated the percentages of mineralized bone in relation to the percentages of marrow spaces (figure 2A). The medullar area (MA), total bone area (TBA), parent lamellar bone area (PLBA) and the new bone area (NBA) were measured (figure 2A).

Finally, the percentage of the residual graft particles in the sockets were measured (figure 5A).

STATISTICAL ANALYSIS

Mean values and standard deviations were calculated for all the parameters evaluated. The mean differences between the groups and the significant statistical differences were analyzed through the Wilcoxon Matched Pairs Test. For all statistical analyses the significance level of 5% was adopted.

RESULTS

Clinical Findings

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

Histologic Analysis

In general, all the groups showed the presence of parent lamellar bone area (PLBA) representing the “old bone”, newly formed bone area (NBA) comprised of woven bone (WB) and parallel-fibered bone (PFB), and bone marrow (BM) (figures 3A and 5A). An osteoid matrix (OM) was also identified in some areas on the external surfaces of the newly formed bone, and it was paved with osteoblasts in the exterior of the lamellae representing the bone formation process (figure 3C). Besides, in the test groups, residual graft particles (RP) were present in the socket (figure 5A).

The apical portion of the extraction socket was occupied by newly formed bone in both the groups. This new bone extended from the apical and lateral walls of the extraction site, and migrated towards the middle portion, filling the entire region (figures 3A and 5A). In the test group, the TCP particles could be observed that were surrounded by newly formed bone with a direct contact between the structures (figures 6A and 6B). 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 group (figures 3A, 3B, 5A and 5B). Both the groups presented new bone in the coronal portion and “closed” the socket entrance (figures 3A and 5A).

The newly formed bone (NB) is present mostly in the center of the socket area of both groups, and the surface between this structure and the parent lamellar bone is evident (figures 3A, 3B, 4A, 4B and 5A). The parallel-fibered bone (PFB) is characterized as a lamellar pattern with some lamellae circumscribed by concentric bone matrix but, in some areas, a bone with interlaced fibers characterizing woven bone was present (figures 4B, 5C and 6B). In some areas, the surface of the bone marrow was accompanied by a layer of osteoblasts representing the remodeling process of the new bone (figure 3C). Additionally, in the test group, this newly formed bone was found in direct contact with the TCP graft particles (figures 6A, 6B).

Amongst the newly formed bone, it was possible to observe the presence of residual graft particles (RGP), in the test group, these particles were dispersed in the

central region of the socket (figure 5A). Sometimes, the particles were lined/circumscribed by the newly formed bone with the direct contact between the structures (figures 5B, 6A and 6B). The presence of osteoid matrix (OM) and the new bone indicated evidence of active bone formation in direct contact with the residual particles of the bone graft (figure 6A).

Histomorphometric Results

The evaluation of each group was also done in order to investigate the remodelling of the buccal bone plate, between extraction sockets following flapless extractions, associated or not with synthetic bone grafts, according to marrow spaces, bone density, alveolar thickness (AT) and the buccal crest level (BCL) measuring the highest point of the new and old bone. It was observed that, in summary, both groups presented similar results with statistical significance differences only for the total bone area (TBA) favoring the control group (Table 2).

The buccal crest level (BCL) relative to the new bone (1) in the test group showed numerically better data, or less resorption, when compared to the control group, but without statistical relevance. In the test group the buccal bone level only was 0.26mm below the lingual bone and, in the control group, it was 0.80mm below the lingual bone (Table 1). The buccal crest level (BCL) relative to the old bone (2) was very similar for the groups and without statistical relevance. In the test group the buccal bone was 0.94mm below the lingual bone and, in the control group, it was 1.03mm below the lingual bone (Table 1).

The evaluation of alveolar thickness (AT) was analyzed 1mm below the highest point of the bone in the socket, and the groups showed similar results without statistical significance differences. The thickness was 5.20mm and 5.00mm for test and control groups, respectively (Table 1).

The total area of the frame (100%) was divided into marrow spaces and bone area. The test and control groups showed 51.27% and 52.86% of marrow spaces, respectively. Both the groups had a different behavior in terms of bone healing taking into account the histological bone density. Therefore, statistically significant differences were observed between the groups in favor of the control group for the total bone area (TBA). The test group showed 38.60% of histologic bone density, and the control group presented 47.18% respectively. The percentage of the parent lamellar bone area was 22.98% and 24.90% for the test and control groups

respectively. For the new bone area (NBA), a numerical difference was observed with higher histologic bone density in the control group, but without statistically significant differences between the groups. The test and control groups showed 15.62% and 22.24% of new bone density, respectively (Table 2).

The percentage of residual graft particles (RGP), in the test group, was 10.13% indicating that part of this biomaterial was resorbed and part was present inside the socket involved by newly formed bone (Table 2).

DISCUSSION

Following tooth extraction, the edentulous alveolar process will undergo both quantitative and qualitative changes however, during healing, some of the lost bone will eventually be replaced with new trabecular bone and marrow. Furthermore, the walls of the socket will be reduced in both height and width. This change is often more pronounced in the buccal than in the lingual/palatal compartments of the extraction sites.

Different approaches have been advocated to preserve or improve the dimension and contour of the ridge following tooth extraction. Therefore, this study evaluated the buccal bone remodeling after tooth extraction, using the flapless approach, and comparing this process between sockets that received or not a synthetic bone grafts (TCP). The histomorphometric results demonstrated a significant better result for the control group when compared with the test group, in relation to the total area histologic bone density. Furthermore, the new bone area was numerically higher in the control group. The buccal crest level of the new bone (1) was higher in the test group, but without statistical difference. For the other parameters, the results were very similar for both groups.

The buccal crest level, in all specimens, was slightly apical to the corresponding lingual bone crest. In the grafted sites, the distances were 0.26mm and 0.94mm in relation to the new and old bone respectively. The nongrafted sites showed a higher distance, 0.86mm to the new bone and 1.03mm to the old bone. Both groups showed bone formation above the old bone crest level reducing the differences between the buccal and lingual crests during the healing period. The test group did not show statistical significant difference in relation to the control group, but the distance was numerically superior mainly in relation to the new bone. This difference although small, being an animal study, and therefore a small “n”, may have

clinical implications. A 0.26 mm loss in height, may not be very significant clinically, but a 0.86mm loss may, especially when concerned with the esthetic result. Bashara et al. (2011) evaluated the effects of a different bone substitute system on hard tissue remodelling in fresh extraction socket. After 6 months of healing, the vertical level of the buccal bone in the site with bovine bone and titanium granules were 0.65 mm apical and 0.45 mm coronal to the lingual bone crest, respectively. The socket that healed with blood clot was 0.70 mm apical to the lingual bone crest. In this study, the grafted sites exhibited mean values between the bovine bone and titanium granules. The nongrafted sites showed similar results. Both, the previous and this study, presented superior results in relation to those found by Rothamel et al. (2008), in which, the buccal crest lost 0.85 mm (3 months) and 1.07 mm (6 months) in relation to the lingual crest in the nongrafted sites. Besides, in the grafted sites (Nanocrystalline hydroxyapatite paste), the buccal crest was 0.54 mm (3 months) and 1.14 mm (6 months) apical to the lingual crest. The results of this investigation were much better when compared to Araujo et al. (2008), in which the nongrafted and grafted extraction sites presented 2.1mm and 1.9mm at the corresponding distances, respectively. Furthermore, Araujo & Lindhe (2011) found lower results when compared to this study, for the old buccal bone crest, in the nongrafted group that was located about 1–2mm apical to the lingual crest. Vignolleti et al. (2012) in a investigation that described the histological outcomes at 6 weeks, of fresh extraction sockets, left to heal spontaneously, and to compare with the healing where implants were immediately inserted, verified that the buccal bone level was located 1.20mm apical to the lingual crest. This previous study showed higher buccal bone loss in less time, half the time, when compared to this study, with the nongrafted sites, this fact can be attributed only to the flap elevation. The relative buccal bone resorption observed in the sites with spontaneous healing (0.86 mm) was lower than the 2.2 mm reported by Araujo et al. (2005) in a similar experimental study. Another study from the same research group evaluated the dynamics of bone healing at fresh extraction sockets 1, 2, 4 and 8 weeks after tooth extraction (Araujo & Lindhe 2005). The relative vertical bone resorption reported at the end of the study was 1.9mm, again more pronounced than the results reported in this investigation. The lesser buccal bone resorption observed in the present investigation may be attributed to different factors such as the age of the dogs, the different healing periods, the specific grafting material and the flapless approach.

The alveolar thickness (AT) measured 1mm below the highest point of the bone into the socket was 5.20mm and 5.0mm for the test and control groups respectively. Rothamel et al (2008), in a similar methodology, measured the total thickness of alveolar process 1mm below the top of the crest and, at 3 months, the grafted (Nanocrystalline hydroxyapatite paste) and nongrafted sites exhibited 3.55 mm and 2.89 mm, respectively in ridge thickness. It is possible to conclude that the difference between the groups were small, as were the results in this investigation, for this particular parameter. However we can conclude that flapless tooth extraction, either way, allowed the maintenance of a ridge (5.0 mm or 5.2 mm) that is clinically sufficient for the placement of implants.

A comparison of the two differently treated sockets with respect to tissue composition (Table 2) indicated that the process of tissue remodeling had progressed further in the nongrafted than in the grafted sites. Thus, while 57.51% of the tissue volume in the nongrafted sites was occupied by new bone, in the grafted sites, the new bone represented only about 40.41% of the tissue volume. This observation of a delayed healing in the grafted sites is in agreement with studies made previously (Artzi et al. 2004; Jensen et al. 2006) and from experiments using the extraction socket model (Araújo et al. 2008; Araújo et al., 2010; Araújo; Lindhe, 2009) that used different grafting materials. In this specific study, it appears that the use of the β -TCP graft may in fact have delayed the bone formation in this study model. The reason for this 'delayed' healing is presently not understood but may be related to a high local concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-} that may have been detrimental to osteoblast function as suggested by Yuan et al. (2001). However, the current animal study demonstrated that the placement of a synthetic bone graft (BoneCeramic) in fresh extraction sockets did not inhibit the processes of modelling and remodeling that took place in the bone walls of the ridge following tooth extraction. The biomaterial, however, apparently promoted new hard tissue formation, particularly at the central and marginal portions of the extraction sites. It is suggested that, during continued healing, the particles may become integrated with and further enhance the dimension of the bone crest. In other words, they may promote additional hard tissue formation and further enhance the dimension of the crest. Thus, it is proposed that during later phases of socket healing, qualitative as well as quantitative alterations may occur in the grafted sites.

Regarding the percentage of the new bone area, in our study, 15.62% of the total bone area was filled with new bone in the grafted sites and 22.24% in the nongrafted sites. Araujo & Lindhe (2011), utilized a different graft and flap elevation, and observed that 18.1% of the tissue volume in the grafted sites was occupied by new formed bone. Furthermore, Araujo et al. (2008) with the same methodology of their previous study observed that, the amount of mineralized bone present in the socket varied between 58.1% (grafted sites) and 50.5% (nongrafted sites), however this mineralized bone is a combination of lamellar and trabecular bone, therefore, a comparison with the results of this study is difficult. The previous studies analyzed the healing after 3 months post-operatively, but only the results of Araujo & Lindhe (2011) are comparable to this study. After 6 months of healing and with the same methodology of his previous studies, Araujo & Lindhe (2009), observed 15.4% and 15.7% of new bone in the grafted sites and nongrafted sites, respectively. In relation to the nongrafted sites, this study, higher levels of new bone formation were obtained probably due to association of the resorption and healing time. The percentage in the grafted sites is similar with the results of this study, but with a longer healing time. So, in this specific case, it could be that the TCP graft may promote faster remodelling. Vignoletti et al. (2012) described that, at 6 weeks, 45% of the alveolar process in the fresh extraction sockets that healed spontaneously was occupied by woven bone formation varying between 23% and 72% according to the socket anatomy.

The residual TCP particles, in this study, occupied 11.13% of the tissue volume, Araujo et al. (2008) and Araujo & Lindhe (2011), utilized a different grafting material, and at the same healing time, found 12.2% and 8.6% of residual graft particles, respectively. At 6 months, Araujo & Lindhe (2009) observed 5% of residual particles, it is less than the 11.13% observed in this study. It is probably due to their longer observation time, 6 months.

CONCLUSION

Based on the results, it is possible to conclude that, in this specific methodology, using the flapless approach, the buccal bone crest level remained at the same level as that the lingual crest, mainly in the test group. In other words, there was no significant loss of the buccal bone level, especially in the grafted sites.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was in part supported by Straumann Group, Basel, Switzerland.

REFERENCES

- Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. ***Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*** 1969; 27: 309–318.
- Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2005; 32: 212–218.
- Araujo MG, Sukekava F, Wennström JL, Lindhe J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2005; 32: 645–652.
- Araújo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The Influence of Bio-Oss Collagen on Healing of an Extraction Socket: An Experimental Study in the Dogs. ***International Journal of Periodontics Restorative Dentistry*** 2008; 28:123–135.
- Araujo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: a 6-month study in the dog. ***Clinical Oral Implants Research*** 2009; 20, 2009; 433–440.
- Araujo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. ***Clinical Oral Implants Research*** 2010; 21: 55–64.
- Araujo MG, Lindhe J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. ***Clinical Oral Implants Research*** 2011; 22, 2011; 9–13.
- Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. ***Journal of Periodontology*** 2000; 72: 1015–1023.
- Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. ***The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*** 2004; 19: 357–368.
- Atwood DA, Coy WA. Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges. ***Journal of Prosthetic Dentistry***. 1971; 26(3):280-95.
- 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. ***Clinical Oral Implants Research***. 2011; 4: 000–000.
- Boix D, Gauthier O, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Grimandi G, Daculsi G. Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone

substitute: an experimental study in dogs. **Journal of Periodontology** 2004; 75: 663– 671.

Campelo LD, Camara JR. Flapless implant surgery: a 10-year clinical retrospective analysis. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants** 2002; 17:271-6.

Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamic of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. **Journal of Clinical Periodontology** 2003; 30: 809–818.

Carmagnola, D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. **Clinical Oral Implants Research** 2003; 14: 137–143.

Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumanns Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. **Clinical Oral Implants Research** 2008; 19: 796–803.

Daculsi G, Goyenvallé E, Aguado E. Spongy and cortical bone substitution kinetics at the expense of macroporous biphasic calcium phosphate: animal and human evidence. In: Ohgushi H, Yoshikawa T, Hastings GW, editors. *Bioceramics volume 12: Proceedings of the 12th International Symposium on Bioceramics in Medicine*. Singapore: World Scientific 1999; 287–290.

De Coster P, Browaeys H, De Bruyn H. Healing of Extraction Sockets Filled with BoneCeramic® Prior to Implant Placement: Preliminary Histological Findings. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v.13, 2011; 1: 34-45.

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. **Journal of Oral Pathology** 1982; 11:318-326.

Fellah B, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. **Biomaterials** 2008; 29:1177-1188.

Fernandes PG, Novaes AB Jr., Queiroz AC, Souza SLS, Taba M Jr., Palioto DB, Grisi MFM. Ridge preservation with Acellular Dermal Matrix and anorganic bone matrix cell-binding peptide P-15 after tooth extraction in humans. **Journal of Periodontology** 2011;82:72-79.

Froum S, Cho SC, Rosenber, F, Rohrer M, Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. **Journal of Periodontology** 2002; 73: 94–102

Froum S, Cho SC, Eliam N, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Extraction sockets and implantation of hydroxyapatites with membrane barriers. A histologic study. **Implant Dentistry**. 2004; 13: 153-164.

Jensen SS, Broggini N, Hjrting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clinical Oral Implants Research** 2006; 17: 237–243.

Karring T, Lindhe J, Cortellini P. Terapia periodontal regenerativa. In: Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang, eds. -**Tratado de Periodontia e Implantologia Oral**. 4ª. Ed. 2005: 641-646.

Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar R V, Sastry TP. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. John Wiley & Sons, Inc. **Journal of Biomedical Materials Research (Appl Biomater)** 2002; 63: 200-208.

Molly L, Vandromme H, Quirynen M, Schepers E, Adams JL, van Steenberghe D. Bone formation following implantation of bone biomaterials into extraction sites. **Journal of Periodontology** 2008; 79:1108-15.

Nery EB, Legeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/ -TCP in periodontal osseous defects. **Journal of Periodontology** 1992; 63: 729–735.

Nevins M, Camelo M, de Paoli S, Friedland B, Schenk RK, Parma-Benfenati S, Simion M, Tinti C, Wagenberg B. A study of the fate of the buccal wall of extraction sockets of teeth with prominent roots. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry** 2006; 26: 19–29.

Novaes AB Jr, Macedo GO, Suaid FA, Barros RR, Souza SL, Silveira Souza AM. Histologic evaluation of the buccal and lingual bone plates in anterior dog teeth: possible influence on implant dentistry. **Journal of Periodontology** 2011; 82:872-7.

Park Jun-Beom. Healing of Extraction Socket Grafted With Deproteinized Bovine Bone and Acellular Dermal Matrix: Histomorphometric Evaluation. **Implant Dentistry** 2010;19:307–313.

Pennel BM, King KO, Wilderman MN, Barron JM. Repair of the alveolar process following osseous surgery. **Journal of Periodontology** 1967; 38:426-431.

Pietrokovski J, Massler M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. **The Journal of Prosthetic Dentistry** 1967; 17: 21–27.

Pietrokovski J, Starinsky R, Arensburg B, Kaffe I. Morphologic characteristics of bony edentulous jaws. **Journal of Prosthodontics** 2007; 15: 141–147.

Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Brånemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. **Clinical Implant Dentistry and Related Research** 2003; 5 Suppl 1:57-63.

Rothamel D, Schwarz F, Herten M, Engelhardt E, Donath K, Kuehn P, Becker J. Dimensional ridge alterations following socket preservation using a nanocrystalline hydroxyapatite paste: a histomorphometrical study in dogs. ***International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*** 2008;37(8):741-7.

Schopper C, Ziya-Ghazvini F, Goriwoda W, Moser D, Wanschitz F, Spassova E, Lagogiannis G, Auterith A, Ewers R. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation--a long-term histological study. ***Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*** 2005; 74:458-67.

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. ***The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*** 2003; 23: 313–323.

Simion M, Fontana F, Rasperini G, Maiorana C. Vertical ridge augmentation by expanded- polytetrafluoroethylene membrane and a combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio Oss). ***Clinical Oral Implants Research*** 2007; 18: 620–629.

Schwartz C, Liss P, Jacquemaire B, Lecestre P, Frayssinet P. Biphasic synthetic bone substitute use in orthopaedic and trauma surgery: clinical, radiological and histological results. ***Journal of Materials Science: Materials in Medicine*** 1999; 10: 821–825.

Vignoletti F, Discepoli N, Muller A, de Sanctis M, Munoz F, Sanz M. Bone modelling at fresh extraction sockets: immediate implant placement versus spontaneous healing. An experimental study in the beagle dog. ***Journal of Clinical Periodontology*** 2012; 39: 91–97.

Yuan H, de Bruijn J, Li Y, Feng J, Yang Z, de Groot J, Zhang X. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissues of dogs: a comparative study between porous a -TCP and b TCP. ***Journal of Material Science in Medicine*** 2001; 12: 7–13.

FIGURES LEGEND

Figure 1: **A** – initial aspect of the mucosa and tooth; **B** – hemisection of the bicuspid; **C** – socket after tooth extraction; **D** – The arrows indicate the bone graft in the P4 distal socket, and the blood clot in the P2 distal socket; **E** – sutured wound.

Figure 2: Histological images representing the morphometric measurements. **A**. Histological “bone density” determined within a rectangle that comprised the region of the defect. The length of 7 mm is always represented by a dotted line on the buccal and lingual walls. The presence of bone marrow (BM); **B**. Alveolar ridge thickness (ART) were calculated analyzed 1mm below the highest point of the bone in the socket; **C**. The level of the buccal bone crest in relation to the lingual bone crest was determined as a linear vertical measurement in two different regions: from an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of the newly formed bone (BBCL-new bone) (red line), and from an imaginary line from the lingual bone crest to the first point of the “old bone” (BBCL-old bone) (yellow line). Alizarin red stain. (Magnification 1,6X).

Figure 3: Histological images of the control sites. **A**. The presence of the fibrous tissue circumscribing the alveolar process. Note that the entrance of the socket was “closed” by a bridge of mineralized bone that connected the buccal and lingual crests. The marginal, middle and apical areas are filled by new bone and bone marrow (BM). The dotted lines separate the old bone (OB) from the newly formed hard tissue (NB) (Magnification 1.6X); **B**. The the buccal bone walls exhibited signs of modeling and remodelling process (Magnification 2.5X); **C**. This specific area of the new bone shows immature aspects of bone with some concentric lamellae and the presence of osteoblasts (OB) and osteoid matrix (OM) indicating active bone formation. L, lingual bone wall; B, buccal bone wall. Alizarin red stain. (Magnification 20X).

Figure 4: Histological images of the control sites. **A**. Note the difference between the new bone and old bone. The structures are connected by a tissue remodelling (Magnification 20X); **B**. In the polarized light, it was possible to observe the presence of woven bone (WB) with interlaced fibers (red arrows) and parallel-fibered bone (PFB) with lamellar pattern (white arrows) characterizing the newly formed bone. The old bone is comprised by a parent lamellar bone (PLB). Alizarin red stain. (Magnification 20X).

Figure 5: Histological images of the test sites. **A.** The fresh extraction socket was grafted with BoneCeramic. The residual particles (brown stain) are embedded in newly formed bone and some provisional connective tissue. Note that the biomaterial occupies a large portion of the socket entrance. Note that the entrance of the socket was “closed” by a bridge of mineralized bone. The dotted lines separate the old bone (OB) from the newly formed hard tissue (NB) (Magnification 1.6X). **B.** The the buccal bone walls exhibited signs of modelling and remodelling process (Magnification 2.5X); **C.** In the polarized light, it was possible to observe the presence of woven bone (WB) with interlaced fibers (red arrows) and parallel-fibered bone (PFB) with lamellar pattern (white arrows) characterizing the newly formed bone. The old bone is comprised by a parent lamellar bone (PLB). Note the bridge characterized by a remodelling process between the new and old bone L, lingual bone wall; B, buccal bone wall. Alizarin red stain. (Magnification 20X).

Figure 6: **A.** The newly formed bone surrounding BoneCeramic particles (P). The newly formed bone is laid down in the provisional connective tissue (CT) and on the surface of the grafting material (P). The presence of the osteoid matrix (OM) on the new bone surface (Magnification 20X). **B.** The same detail presented in polarized light. The hard tissue present on the surface of the biomaterial (P) is comprised of woven bone (WB) and parallel-fibered bone (PFB). Note a bridge of new bone between the residual particles. Alizarin red stain. (Magnification 20X).

Table 1: Comparisons between test and control groups for the linear histomorphometric parameters: alveolar ridge thickness (ART), new bone of the buccal bone crest level in relation to the lingual bone crest (BBCL-new bone), “old bone” of the buccal bone crest level in relation to the lingual bone crest (BBCL-old bone), and the percentage of the residual graft particle (RGP) in the test group.

	BCL New bone (1) (mm)	BCL Old bone (2) (mm)	ART(mm)
TG	0.26 ± 0.67	0.94 ± 0.81	5.20 ± 1.31
CG	0.86 ± 1.14	1.03 ± 0.75	5.00 ± 0.94
<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05

Table 2: Volumetric data describing the overall composition (%±SD) of the alveolar process in the grafted and non-grafted extraction sites.

	Marrow space	Bone density			RGP
		Total bone area (TBA)	Parent lamellar bone area (PLBA)	New bone area (NBA)	
TG	51.27%	38.50 ± 5.88†	22.98 ± 5.53	15.62 ± 7.20	11.13%
CG	52.86%	47.14 ± 8.02†	24.90 ± 7.14	22.24 ± 4.62	—
<i>P</i>	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	—

†: Statistically Significant (p <0.05)