

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

STYLIANOS NICOLAS PAPALEXIOU NETO

**O USO DA MATRIZ DÉRMICA ACELULAR COMO MEMBRANA ASSOCIADA OU
NÃO A UM NOVO BIOMATERIAL NA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA,
ESTUDO CLÍNICO E RADIOGRÁFICO EM MINI-PIGS**

CURITIBA

2011

STYLIANOS NICOLAS PAPALEXIOU NETO

**O USO DA MATRIZ DÉRMICA ACELULAR COMO MEMBRANA ASSOCIADA OU
NÃO A UM NOVO BIOMATERIAL NA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA,
ESTUDO CLÍNICO E RADIOGRÁFICO EM MINI-PIGS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – PPGO – PUCPR – da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sonia Mara Luczyszyn

CURITIBA

2011

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

P213u
2011 Papalexioi Neto, Stylianos Nicolas
O uso da matriz dérmica acelular como membrana associada ou não a um novo biomaterial na regeneração óssea guiada : estudo clínico e radiográfico em mini-pigs / Stylianos Nicolas Papalexioi Neto ; orientadora, Sonia Luczyszyn. – 2011.
80 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2011

Inclui bibliografias

Texto em português e inglês

1. Regeneração óssea guiada. 2. Matriz dérmica acelular. 3. Odontologia.
I. Luczyszyn, Sonia Mara. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

STYLIANOS NICOLAS PAPALEXIOU NETO

UTILIZAÇÃO DA MATRIZ DÉRMICA ACELULAR COMO MEMBRANA ASSOCIADA
OU NÃO A ENXERTO ÓSSEO ALÓGENO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA.
ESTUDO CLÍNICO E RADIOGRÁFICO EM MINIPIGS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em **Periodontia**.

Orientador(a):

Prof.ª Dr.ª Sônia Mara Luczyszyn
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Everdan Carneiro
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Junior
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, FORP-USP

Curitiba, 12 de maio de 2011.

RESUMO

Defeitos ósseos críticos em rebordos alveolares apresentam-se como um desafio importante, principalmente em casos de reabilitações orais que necessitem de implantes osseointegráveis e de volume de tecidos moles que favoreçam a estética. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a efetividade da matriz dérmica acelular (MDA) utilizada como membrana, associada ou não a um enxerto ósseo alógeno na regeneração óssea guiada (ROG). Foram realizadas extrações dos 4 pré-molares inferiores de 7 minipigs, bilateralmente. Após 8 semanas, foram confeccionados defeitos ósseos bilaterais e foi realizada a ROG. Cada lado foi aleatoriamente designado para o Grupo Controle (GC – MDA como membrana associada ao coágulo) ou para o Grupo Teste (GT – MDA como membrana associada a enxerto ósseo alógeno). Imediatamente após a ROG, foram realizadas tomadas radiográficas padronizadas, as quais foram repetidas com 8 e 16 semanas pós operatórias. Previamente à ROG foram realizadas mensurações clínicas da Largura do Tecido Queratinizado e Espessura do Tecido Queratinizado (LQT e EQT respectivamente). Estas medidas foram repetidas em 16 semanas. Clinicamente, ambos os grupos demonstraram aumento significativo de largura e espessura de tecido queratinizado, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Radiograficamente, ambos os grupos apresentaram imagens sugestivas de neoformação óssea em 8 e 16 semanas, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A MDA utilizada como membrana na ROG, favoreceu a neoformação óssea avaliada radiograficamente, além de ter promovido um ganho significativo em largura e em espessura do tecido queratinizado.

INTRODUÇÃO

Reabilitações protéticas associadas ou não a implantes osseointegráveis, apresentam como pré requisito a presença de dimensões adequadas de altura e espessura do rebordo alveolar. A reabsorção óssea alveolar pós exodontia, por exemplo, ocorre devido à migração do epitélio e à penetração do tecido conjuntivo gengival do retalho na área do alvéolo. Essa remodelação é gradual e leva a uma perda de aproximadamente 40% em altura e 60% em espessura do tecido ósseo (Amler 1969; Atwood & Coy 1971). Essa perda é irreversível e aumenta a dificuldade de reabilitações em áreas estéticas. A deposição do tecido ósseo ocorre de forma centrípeta e a maior velocidade de renovação celular do epitélio resulta em um defeito convexo no rebordo (Borges et al. 2009; Wainwright 1995).

Uma das técnicas mais previsíveis para prevenir essas alterações é a Regeneração Óssea Guiada (ROG). O princípio biológico da ROG é o da seletividade celular através do uso de uma barreira biológica para inibir a migração do epitélio e a penetração de tecido conjuntivo gengival do retalho, e assim, permitir a proliferação de células osteogênicas e a regeneração do osso alveolar (Dahlin 1988). Uma variedade de materiais biocompatíveis, tanto absorvíveis quanto não absorvíveis, tem sido utilizadas como membrana na ROG.

A literatura indica que clínica e histologicamente os resultados alcançados pelas membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis são similares (Novaes & Souza 2001; Novaes et al. 2002a, Novaes et al. 2002b; Griffin et al. 2004). No entanto, as membranas reabsorvíveis não requerem uma

segunda cirurgia para sua remoção, o que além de ser menos oneroso e mais confortável para o paciente, pode promover preservação do osso alveolar.

Muitos estudos mostram que membranas expostas podem ser severamente colonizadas por bactérias e que há uma relação desfavorável entre formação óssea e contaminação das membranas por placa bacteriana (Nowzari & Slots 1994; Machtei 2001; Rossa et al. 2006). A membrana ideal deveria ser confeccionada com material menos suscetível à exposição, ou não ser significativamente colonizada por bactérias periodontopatogênicas quando exposta à cavidade bucal. Além disso, uma membrana que pudesse levar a um aumento da espessura e da altura de tecido queratinizado poderia ser vantajosa.

Dentro deste contexto, alguns autores têm proposto o uso da matriz dérmica acelular (MDA) como membrana. A MDA é um material obtido da pele humana e tem sido usada para diversos fins: como substituto do tecido conjuntivo do palato, em enxertos para aumento da espessura de tecido queratinizado ao redor de dentes e implantes (Felipe et al. 2007) para tratamento de deformidades alveolares (Batista et al. 2001) para cirurgias de recobrimento radicular (Novaes & Souza 2001; Aichelmann-Reidy et al. 2001) e remoção de pigmentação melânica (Novaes et al. 2002b; Pontes et al. 2004). Recentemente, a MDA foi avaliada como membrana na regeneração tecidual guiada (RTG). No estudo, a MDA demonstrou resultados histomorfométricos semelhantes à membrana reabsorvível, além disso, a MDA leva a um aumento em espessura e em largura de tecido queratinizado (Andrade et al. 2008), como tem sido demonstrado em vários estudos (Seibert & Nyman 1990; Lindhe et al. 1995; Woodyard et al. 2004; de Queiroz Cortes et al. 2006). Alguns estudos

clínicos tem sugerido a utilização da MDA em rebordos edêntulos, associadas a implantes imediatos, sugerindo que esses materiais podem ser usados como membrana (Novaes et al. 2002a; Fowler et al. 2000).

Uma desvantagem das membranas, inclusive a MDA, quando utilizada como tal, é que em defeitos críticos há uma tendência delas invaginarem para o interior do defeito. Sendo assim, alguns autores indicam a utilização de enxerto ósseo autógeno e biomateriais de preenchimento para prevenir o colapso das mesmas (Hockers et al. 1999).

Existe uma grande variedade de materiais a serem utilizados como enxertos: autógenos, alógenos, xenógenos e substitutos ósseos sintéticos (Fowler et al. 2000; Simon et al. 2000; Kirkland et al. 2000; Fotek et al. 2009; Pinho et al. 2006).

Quanto à previsibilidade, os enxertos autógenos são considerados os mais indicados (McAllister & Haghghat 2007). Em contrapartida, a quantidade de osso necessária das áreas doadoras intra-orais e a morbidade associada ao procedimento cirúrgico são fatores que limitam a indicação e a aceitação por parte do paciente.

Os enxertos alógenos apresentam um baixo risco de transmissão de doenças e rejeição, por não conterem células viáveis. Além de constituírem fonte ilimitada de material, minimizam a morbidade do paciente uma vez que não é necessária a remoção de tecido ósseo de uma área doadora. Um novo material (Mineross®) constituído por uma mistura de partículas de osso alógeno cortical e medular tem sido utilizado como substituto ósseo na técnica da ROG (Gapski et al. 2008)

Este estudo teve por objetivo avaliar a efetividade da matriz dérmica

acelular utilizada como membrana, associada ou não a um enxerto ósseo alógeno na regeneração óssea guiada. Foram avaliadas clinicamente: largura e espessura do tecido queratinizado. E, radiograficamente, o preenchimento e a densidade óssea.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA-PUCPR) sob o n. 455 e após sua aprovação foram realizados os seguintes passos:

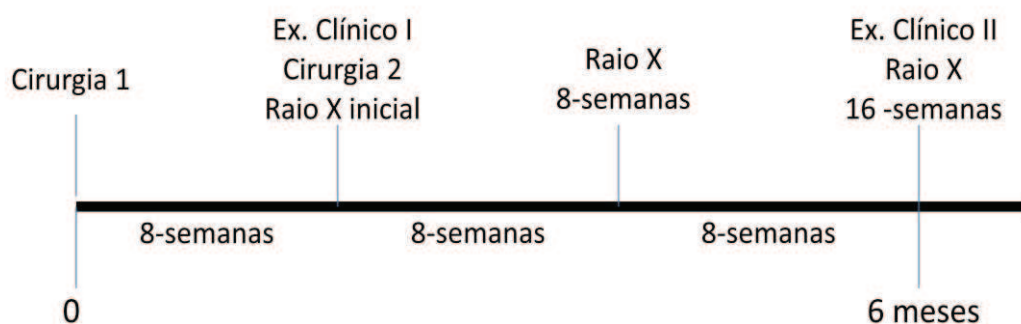
1. Seleção e preparo dos animais

Foram selecionados 7 *minipigs* (*Minipig* BR-1) de aproximadamente 18 meses de idade pesando entre 20 e 30 Kg. Os animais eram provenientes da empresa *Minipig* Comércio e Desenvolvimento (Campina do Monte Alegre-SP-Brasil) e foram transportados para a Fazenda Experimental Galha Azul da PUCPR, onde permaneceram até o final do experimento.

Os animais receberam tratamento antiparasitário, vitaminas, uma série completa de vacinas e tratamento profilático dental com uso de aparelho de ultrason (Cavitron 3000, Dentsply Mfg. Co. York, PA, USA).

Nos dias das cirurgias, os animais foram transportados para o Campus I da PUCPR, até o Laboratório de Técnica Operatória, onde os procedimentos foram realizados. Todo tratamento foi realizado com os animais anestesiados e monitorados por pessoal especializado.

O presente estudo seguiu o seguinte cronograma:



2. Cirurgia 1 – Exodontia bilateral dos quatro pré-molares inferiores.

Os animais permaneceram em jejum desde a noite anterior à cirurgia. Eles foram pré-anestesiados com anestésico específico para suínos Azaperone (Destress – Dês-Vet, São Paulo – SP – Brasil), ministrando-se 1mg/kg de peso. Após 20 minutos, aplicou-se a dose inicial de anestésico geral Quetamina (Dopalen – Vetbrands, Jacareí- SP- Brasil), com dosagem de 5 mg/kg de peso, ambos via intramuscular. Durante todo o período em que os animais permaneceram anestesiados, os batimentos cardíacos, a frequência respiratória, a temperatura e os reflexos palpebrais, interdigitais e intestinais foram monitorados por pessoal técnico especializado.

Após a anestesia, foram realizados retalhos totais bilateralmente na região dos quatro pré-molares inferiores (P1, P2, P3, P4). Os dentes foram seccionados na direção vestibulo-lingual na área de furca, as raízes foram cuidadosa e individualmente extraídas com a utilização de um periótomo para evitar a fratura das paredes ósseas. Os retalhos foram então reposicionados e suturados com fio reabsorvível Vicryl 5-0 (Ethicon - Johnson & Johnson - New Brunswick, NJ – EUA). Os animais receberam dieta pastosa (ração umedecida) por 14 dias para prevenir a ruptura das suturas.

Semanalmente, foi realizada aplicação tópica de clorexidina a 0,12%, bem como a observação clínica do processo de cicatrização das áreas operadas.

3. Exame Clínico I e Cirurgia 2 (Confecção do defeito e ROG)

Oito semanas após a cirurgia 1 foi repetida a técnica de sedação e anestesia e foram realizadas as medidas clínicas (Exame Clínico I) para avaliar a largura e a espessura do tecido queratinizado (LTQ e ETQ) respectivamente. Um guia (*stent*), sob medida, confeccionado na extensão entre os dentes, canino e molar foi utilizado para determinar e padronizar o sítio exato das medidas clínicas. Três marcas referenciais foram feitas no guia (*stent*) para determinar exatamente a área do defeito ósseo: uma vestibular, uma oclusal e uma lingual (Fig. 1A).

Todas as mensurações clínicas foram realizadas pelo mesmo operador. A largura do tecido queratinizado foi mensurada com a utilização de um compasso de ponta seca (Fig. 1B) e transferida para um paquímetro digital (Mitutoyo, Raffo - Suzano - SP – Brasil), o que determinou a largura do tecido queratinizado nas superfícies: vestibular (LTQ-V) e lingual (LTQ-L), ou seja, a distância entre a marca de referência da superfície oclusal e a junção mucogengival (JMG) vestibular ou lingual (Fig. 1C).

A espessura do tecido queratinizado foi mensurada nas superfícies: oclusal (ETQ-O), vestibular (ETQ-V) e lingual (ETQ-L), nas marcações correspondentes do guia. Essas mensurações foram realizadas com a utilização de uma sonda periodontal com um cursor de silicone (fig. D). A sonda foi posicionada perpendicularmente à superfície do tecido queratinizado e introduzida no tecido mole com leve pressão até que uma superfície dura fosse detectada (Fig. 1E). O cursor de silicone foi então posicionado em contato com a superfície externa de tecido mole. Após a retirada cuidadosa da sonda

periodontal, a profundidade de penetração foi medida por meio de um paquímetro digital (Fig. 1F). As mensurações da ETQ – V, ETQ – O e ETQ – L foram realizadas três vezes e o valor médio foi calculado para cada sítio.

Na seqüência, uma incisão horizontal foi feita na crista do rebordo, com lamina 15 c, da face distal do canino até a face mesial do primeiro molar (Fig. 2A). Um retalho total foi elevado e um defeito ósseo retangular foi cirurgicamente confeccionado bilateralmente na região dos rebordos edêntulos, utilizando-se brocas cirúrgicas de baixa-rotação 703 e 702 (KG Sorensen-Medical Burs Cotia, SP – Brasil) e Cinzéis de Ochsenbein N.1 e N. 2 (Hu-friedy - Chicago, IL – EUA) (Fig. 2B). Foi utilizada irrigação abundante de solução salina estéril durante a confecção dos defeitos. A dimensão dos defeitos era de 10mm no sentido vestibulo-lingual, 12mm no sentido mesio-distal e 8 mm no sentido ápico-coronal, sendo que a parede lingual foi mantida (Fig. 2C). As dimensões conferidas aos defeitos os fazem constituir defeitos críticos (Schenk et al. 1994).

Em um lado da mandíbula, aleatoriamente eleito por sorteio, o defeito foi preenchido com um enxerto de material alógeno, MINEROSS® (Biohorizons Inc. Birmingham – AL – EUA) (fig. 3A; 3B) (grupo teste - GT). O biomaterial foi então recoberto com a MDA (Alloderm; Biohorizons Inc. Birmingham – AL – EUA) a qual se estendeu além das margens do defeito por 2 a 3mm. A MDA foi mantida em posição por meio de 4 parafusos de fixação, sendo 2 nas bordas mesial e distal na face vestibular à 3 mm da base do defeito, os quais serviram como referência para as análises radiográficas, e 2 na face lingual (Fig. 3C). O retalho foi então reposicionado e suturado com fio de sutura reabsorvível vicryl 5-0, com o intuito de recobrir completamente a MDA (Fig. 3D).

Contralateralmente, o defeito cirurgicamente confeccionado foi apenas recoberto com a MDA (grupo controle - GC), a qual foi mantida em posição da mesma maneira descrita anteriormente. O retalho foi então reposicionado e suturado com fio de sutura reabsorvível vicryl 5-0, com o intuito de recobrir completamente a MDA (Fig. 4A; B; C; D)

Tomadas radiográficas dos defeitos ósseos bilaterais foram realizadas. Todas as radiografias foram obtidas por um único examinador, utilizando um aparelho de Raio X convencional (Spectro 70X, Dabi Atlante Ribeirão Preto-SP, Brasil). O tempo de exposição foi ajustado para 0,7s. Para padronizar a posição da tomada radiográfica, foi confeccionado um *bite-block* individual de silicone associado a um posicionador radiográfico para cada lado de cada animal.

Tratamento pós operatório:

Foi utilizado Tramadol (50 mg/ml) a 3 mg/kg como terapia analgésica, e Ketoprofeno 20 mg a 1pil/20kg, como anti-inflamatório. Os animais também receberam Stomorgyl (Stomorgyl 10, Merial saúde animal Ltda, Paulínia, SP – Brasil) a 1pil/10kg por 10 dias como terapia antibiótica.

Os animais foram mantidos sob dieta pastosa por 15 dias, quando foram removidas as sutura. Foi realizada diariamente aplicação tópica de clorexidina a 0,12%, para controle do biofilme. Os dentes remanescentes receberam instrumentação ultrasônica, mensalmente.

Durante todo o período experimental, os animais receberam água sem restrição e foram alimentados com ração própria para suínos (S4, Bravisco,

Bastos –SP-Brasil), numa quantidade diária equivalente a 2% do peso de cada animal, dividida em duas porções diárias.

Exame Clínico II

Dezesseis semanas após a cirurgia 2 (ROG) as medidas clínicas foram novamente realizadas seguindo os mesmos critérios de padronização utilizados no exame clínico I.

Análise Radiográfica

As radiografias iniciais (RI) no grupo teste (GT) e no grupo controle (GC) foram realizadas imediatamente após cirurgia 2 (ROG).

Após 8 semanas utilizando o *bite-block* individual de silicone (FIG. 5) foram realizadas novas radiografias padronizadas (R-8). Dezesseis semanas após a cirurgia 2 foram novamente realizadas radiografias padronizadas (R-16).

Para avaliar as mudanças ósseas, foi realizada subtração radiográfica das imagens utilizando o software Emago (Emagos/Advanced 3.43, Oral Diagnostic Systems, Louwesweg, Amsterdam, Holanda). As subtrações radiográficas foram calculadas em pares da seguinte forma: RI e R-8; RI e R-16; R-8 e R-16. Foi obtida assim uma nova imagem representando a diferença entre as radiografias originais (I-16 sub, I- 8sub e 8-16sub) (Fig. 6).

Dessas três novas imagens foi mensurada a área radiográfica de novo osso (ANO-R) em mm². A área radiográfica do defeito ósseo (ADO – R) foi

mensurada em mm² na radiografia inicial. O preenchimento ósseo radiográfico (PO-R) foi calculado em 8 semanas (PO-R 8) e 16 semanas (PO-R 16) (fig. 7), assim como a razão entre ADO-R e APO-R, e representada em valores percentuais.

A densidade óssea foi também avaliada (DO-R) em escala de cinza. Para realizar essa análise foram desenhadas duas linhas, uma horizontal e uma vertical, para determinar o ponto central do defeito (C). Deste ponto central, quatro novas regiões padronizadas de interesse foram definidas: uma coronal ao ponto central (Co), uma apical ao ponto central (A), uma no ponto central (Cc) e uma na base da mandíbula fora da área do defeito que serviu como controle (Cr). (Fig.8). Nessas regiões foi posicionado um quadrado (*grid*) de 16 pixels² e a DO-R foi então calculada nesses quadrados de área conhecida (Hwang et al. 2008) (Fig. 8) , compreendendo DO-R – Co, DO-R – A, DO-R – Cc e DO-R – Cr. A DO-R total foi calculada através da variação percentual da média aritmética entre DO-R – Co, DO-R – A, DO-R – Cc. A medida DO-R – Cr foi utilizada como controle e não era esperado que esta demonstrasse mudanças de densidade óssea durante o estudo. As medidas foram realizadas através do software Image J (National Institutes of Health (NIH) – Bethesda – MD – EUA).

Análise Estatística

Para análise das percentagens médias das variáveis avaliadas, testou-se inicialmente a normalidade dos dados para o grupo teste e para o grupo controle, utilizando-se o Teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a análise da homogeneidade de variância entre os grupos utilizou-se o Teste de Levene. O nível de significância adotado foi de 5 %. Quando ambos os grupos apresentaram normalidade e homogeneidade foi realizado o teste T de student, assumindo variáveis homogêneas. Quando os grupos não apresentaram homogeneidade, porém distribuição normal, foi realizado teste T de student, admitindo variância heterogênea. Quando pelo menos um dos grupos não apresentou distribuição normal, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney. O software utilizado para as análises estatísticas foi o SPSS 18.0.

RESULTADOS

Todos os procedimentos foram bem tolerados pelos animais e nenhum caso de infecção foi observado.

Resultados clínicos

Nas avaliações clínicas não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para LTQ-V, LTQ-L, ETQ-V, ETQ-O, ETQ-L no exame clínico I (Tabela 1), demonstrando similaridade pré-operatória entre GT e GC. Assim como no exame clínico I, o exame clínico II não apresentou diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os grupos.

Nas medições da variável LTQ-V a média no exame clínico I no GT foi de $3,66 \pm 0,69$ enquanto que no GC foi de $3,87 \pm 0,76$ ($p= 0,604$). No exame clínico II o GT apresentou média de $6,67 \pm 0,98$ e no GC $5,91 \pm 0,83$ ($p= 0,141$). Para a variável LTQ-L, no exame clínico I média no GT foi de $3,32 \pm 0,69$ enquanto que no GC foi de $3,63 \pm 0,76$ ($p= 0,435$). No exame clínico II o GT apresentou média de $6,69 \pm 0,76$ e no GC $5,92 \pm 0,68$ ($p= 0,068$). Para a variável ETQ-V no exame clínico I a média do GT foi de $1,96 \pm 0,35$ e de $1,88 \pm 0,51$ ($p=0,74$) no GC, no exame clínico II a média do GT foi de $3,07 \pm 0,21$ e de $2,95 \pm 0,42$ ($p= 0,522$) no GC. Na variável ETQ-O a média do GT encontrada no exame clínico I foi de $2,15 \pm 0,21$, enquanto que o GC apresentou média de $2,12 \pm 0,34$ ($p= 0,825$), no exame clínico II a média do GT foi de $2,85 \pm 0,46$ e a do GC foi de $3,01 \pm 0,45$ ($p=0,534$). Na variável ETQ-L a média do GT encontrada no exame clínico I foi de $1,73 \pm 0,18$, enquanto que o GC

apresentou média de $1,51 \pm 0,21$ ($p= 0,048$), no exame clínico II a média do GT foi de $2,28 \pm 0,33$ e a do GC foi de $2,28 \pm 0,42$ ($p=0,977$) (Tabela 1).

Nas análises intra-grupo, ambos (GT e GC) demonstraram aumento considerável da LTQ e da ETQ (Tabela 2). Diferenças estatisticamente significantes encontradas no GT foram: LTQ-V que variou de $3,66 \pm 0,69$ a $6,67 \pm 0,98$ ($p=0,000096$), LTQ-L que variou de $3,32 \pm 0,69$ a $6,69 \pm 0,76$ ($p=0,000007$), ETQ-V que variou de $1,96 \pm 0,35$ a $3,07 \pm 0,21$ ($p= 0,000175$), ETQ-O que variou de $2,15 \pm 0,21$ a $2,85 \pm 0,46$ ($p=0,010773$), ETQ-L que variou de $1,73 \pm 0,18$ a $2,28 \pm 0,33$ ($p= 0,001804$).

No GC foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para LTQ-V que variou de $3,87 \pm 0,76$ a $5,91 \pm 0,83$ ($p=0,000076$), LTQ-L que variou de $3,63 \pm 0,76$ a $5,92 \pm 0,68$ ($p=0,000001$), ETQ-V que variou de $1,88 \pm 0,51$ a $2,95 \pm 0,42$ ($p= 0,00257$), ETQ-O que variou de $2,12 \pm 0,34$ a $3,01 \pm 0,45$ ($p=0,00055$), ETQ-L que variou de $1,58 \pm 0,21$ a $2,28 \pm 0,42$ ($p=0,00417$).

Resultados Radiográficos

Na avaliação do preenchimento ósseo radiográfico (PO-R) a média do GT foi de $71,69 \pm 5,11$ mm² em 8 semanas e $73,64 \pm 5,97$ mm² em 16 semanas. No GC a média dos valores do PO-R foi de $72,67 \pm 3,97$ mm² em 8 semanas e $74,11 \pm 4,33$ mm² em 16 semanas (Tabela 3). Na comparação entre grupos as variáveis não apresentaram diferença estatisticamente significante, para 8 semanas ($p= 0,6963$) e 16 semanas ($p = 0,8703$) (Tabela 4).

Para a variável densidade óssea radiográfica (DO-R) as médias dos valores DOR-Cr não apresentaram diferença estatisticamente significante no

GT ($p=0,773$) e no GC ($p=0,562$), quando comparados: R-I, R-8 e R-16, demonstrando boa padronização das imagens.

No GT a média da variação percentual da densidade óssea radiográfica entre R-I e R-8 (8 semanas) foi de 91.17 ± 66.48 , entre R-I e R-16 (16 semanas) foi de 107.97 ± 63.35 e entre R-8 e R-16 foi de $10,86 \pm 6.92$. No GC a variação entre R-I e R-8 foi de 78.74 ± 51.93 , entre R-I e R-16 foi de 125.38 ± 84.37 e entre R-8 e R-16 foi de $21,96 \pm 10.53$. (Tabela 5)

Os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados. R-I – R-8 ($p= 0,392$), R-I – R-16 ($p= 0,754$) e R-8 – R-16 ($p= 0,474$). (Tabela 5).

DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados biomateriais com o intuito de promover a ROG em defeitos previamente confeccionados. A utilização da MDA associada ou não a um enxerto ósseo alógeno particulado que combina partículas de osso cortical e medular, resultou clinicamente em aumento de espessura e largura do tecido queratinizado, em ambos os grupos.

A técnica de ROG vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de diversos tipos de deformidades ósseas (Dhalin et al. 1988; Crespi et al. 2009; Gapski et al. 2005). Inúmeras são as vantagens estéticas e funcionais da preservação do rebordo alveolar. Contudo, alguns problemas podem estar associados com esta técnica quando se utilizam membranas de barreiras, sejam absorvíveis ou não absorvíveis, tais como a exposição prematura da membrana à cavidade bucal e sua subsequente contaminação (Nowzari & Slots 1994; Machtei 2001; Rossa et al. 2006). Além disso, só o uso de membranas pode não promover o aumento de largura e espessura de tecido queratinizado, que seria altamente desejável nas técnicas que visam o tratamento de defeitos de rebordo (Batista et al. 2001).

Assim, com o objetivo de minimizar tais desvantagens relacionadas ao uso das membranas, a MDA foi proposta como uma alternativa de uso nas técnicas de ROG. Um dos primeiros relatos clínicos da utilização da MDA como membrana na ROG foi apresentado por Novaes Jr e Souza (2001). A MDA foi utilizada como membrana para a prevenção do colapso alveolar pós-exodontia e a espessura óssea obtida após 6 meses permitiu a instalação adequada de um implante osseointegrável. Alguns estudos clínicos também utilizaram a MDA como membrana na ROG em rebordos edêntulos e em associação com

implantes imediatos (Novaes et al. 2002a; Fowler et al. 2000). Os resultados do presente estudo, assim como estudo prévio de Fotek et al. (2009) comprovaram que a MDA pode ser utilizada como membrana para prevenir o colapso alveolar em procedimentos de ROG.

Em estudo utilizando metodologia e análises clínicas semelhantes a este, Borges et al. (2009) testaram a habilidade da MDA em atuar como barreira em procedimento de ROG em defeitos ósseos cirurgicamente confeccionados em cães. Encontraram um ganho estatisticamente significativo em espessura do tecido queratinizado na face lingual, enquanto que no presente trabalho houve aumento desta espessura em todas as faces mensuradas (ETQ-V, $p=0,0001$; E.T.Q-O, $p=0,0107$ e E.T.Q-L, $p=0,0018$). Estes dados estão de acordo com estudos prévios, os quais demonstraram a capacidade da MDA em promover um aumento do tecido queratinizado (Fowler et al. 2000; Aichelmann-Reidy et al. 2001; Novaes et al. 2001). Com relação à largura do tecido queratinizado, os resultados são confrontantes. Enquanto no presente estudo também foi observado aumento significativo da largura do tecido queratinizado (L.T.Q-V, $p=0,0000$ e L.T.Q-L, $p=0,0000$), os achados de Borges et al. (2009) demonstraram uma redução da largura do tecido queratinizado, tanto na face vestibular, quanto lingual. Os autores relatam que este fato possa ter ocorrido pelo deslocamento coronário do retalho e, conseqüentemente, da junção mucogengival, então posicionada em direção coronária, em relação à sua posição original. Embora a junção mucogengival tenda a retornar à sua posição original em períodos posteriores (Ainamo et al. 1992), é provável que o período de 4 meses tenha sido insuficiente para a MDA promover este ganho de tecido em largura (de Souza et al. 2008). Além disso,

sabe-se que o aumento deste tecido depende da migração de células com a capacidade de estimular a diferenciação da mucosa, o que pode variar entre diferentes espécies ou mesmo entre membros da mesma espécie (Paolantonio et al. 2002). Isso poderia explicar a divergência de resultados em função das espécies envolvidas neste e no trabalho de Borges et al. (2009) respectivamente, *minipigs* e cães.

Luczyszyn et al. (2005) utilizaram a MDA associada ou não com enxerto de hidroxiapatita absorvível em preenchimento de alvéolos para preservação do rebordo alveolar. Foram 15 pares de dentes indicados para extração, nos quais de um lado foi utilizado apenas MDA e do outro, a MDA associada ao enxerto de hidroxiapatita. Após 6 meses, observou-se aumento de mucosa queratinizada com o uso da MDA, o que corrobora os achados clínicos do presente estudo, sem diferenças significativas para os grupos associados aos enxertos, em ambos os trabalhos.

Dahlin et al. (1988) demonstraram que quando células epiteliais e conjuntivas são isoladas dos defeitos ósseos, ocorre nova formação óssea. Contudo, é preciso que o espaço disponível para a regeneração óssea seja mantido sob as membranas. Em muitos casos, com o objetivo de manter esse espaço e servir como arcabouço para a migração celular favorável, sugere-se a associação entre enxertos ósseos e membranas, objetivando a ROG. No presente estudo, a MDA foi firmemente fixada com parafusos de titânio, o que pode ter impedido o colapso da MDA, mantendo o arcabouço e justificando assim a semelhança dos resultados clínicos encontrados nos dois grupos, com ou sem enxerto associado.

Radiograficamente, os resultados do presente estudo foram comparados com os achados de Borges et al. (2009) quanto aos parâmetros utilizados para avaliar as radiografias nas áreas dos defeitos ósseos cirurgicamente confeccionados e tratados com MDA, a qual foi usada como barreira na ROG. As porcentagens de preenchimento ósseo radiográfico, obtidas através da subtração radiográfica, serviram como indicador de uma possível nova formação óssea. Estas porcentagens, ora encontradas, (71,69% em 8 semanas e 73,64% em 16 semanas) são similares às encontradas por Borges et al. (2009) (78,41% em 8 semanas e 83,38% em 16 semanas), todas comparadas à radiografia inicial da área do defeito. Jovanovic et al. (2007) reportaram completo preenchimento radiográfico, porém não avaliaram pela técnica de subtração radiográfica, mas apenas por meio de imagens convencionais.

Enxertos ósseos autógenos são considerados o material ideal para procedimentos de enxertia óssea por apresentarem propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas. Além disso, não apresentam risco de transmissão de doenças nem causam rejeição. Por outro lado, este tipo de enxerto causa maior desconforto ao paciente além de morbidade provocada pela área doadora, uma vez que há a necessidade de um procedimento cirúrgico adicional para coleta do osso. Com o intuito de minimizar estas desvantagens, alguns autores sugerem a utilização de substitutos ósseos como alternativas aos enxertos autógenos (Crespi et al. 2009; De Coster et al. 2009; Matos et al. 2007; Roriz et al. 2006).

Em procedimentos visando a ROG, o enxerto ósseo alógeno mais utilizado é o enxerto alógeno desidratado por congelamento desmineralizado (DFDBA).

No presente trabalho, foi utilizado um novo enxerto alógeno particulado, o Mineross, que associa partículas de osso cortical à partículas de osso medular. A porção cortical do material tem a função de manter a integridade estrutural, enquanto a porção medular oferece arquitetura porosa o que promove revascularização e melhora seu potencial osteocondutor,. Até o momento existem poucos trabalhos na literatura utilizando este material.

Em um relato de caso, Gapski et al. (2008) demonstraram resultados positivos com a utilização de enxerto ósseo alógeno (Mineross), em cirurgias de levantamento de seio maxilar. A análise radiográfica realizada após 6 meses da enxertia demonstrou grande similaridade entre as imagens obtidas da área do enxerto e do osso nativo do paciente.

No presente estudo, ao final do período de 16 semanas, os resultados radiográficos obtidos através da técnica de subtração radiográfica e da técnica convencional, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, e sim, apresentaram similaridade tanto no preenchimento ósseo como na densidade óssea.

Com base na metodologia empregada e na análise dos resultados, pode-se concluir que a matriz dérmica acelular promoveu a regeneração óssea guiada e proporcionou ganho em espessura e largura do tecido queratinizado, associada ou não ao enxerto ósseo alógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aichelmann-Reidy, M.E., Yukna, R.A., Evans, G.H., Nasr, H.F. & Mayer, E.T. (2001) Clinical evaluation of acellular allograft dermis for the treatment of human gingival recession. *Journal of Periodontology* **72**: 998–1005.
- Ainamo, A., Bergenholtz, A., Hugoson, A. & Ainamo, J. (1992) Location of the mucogingival junction 18 years after apically repositioned flap surgery. *Journal of Clinical Periodontology* **19**:49–52.
- Amler, M.H. (1969) The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* **27**(3) : 309-318.
- Andrade, P.F., Felipe, M.E., Novaes, A.B. Jr, Souza, S.L., Taba, M. Jr, Palioto, D.B. & Grisi, M.F. (2008) Comparison between two surgical techniques for root coverage with an acellular dermal matrix graft. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 263–269.
- Atwood, D.A., Coy, W.A. (1971) Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges. *Journal of Prosthetic Dentistry* **26**: 280-295.
- Batista, E.L. Jr., Batista, F.C. & Novaes, A.B. Jr. (2001) Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *Journal of Periodontology* **72**: 265–273.
- Batista, E.L. Jr., Batista, F.C., Novaes, A.B. Jr. (2001) Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *Journal of Periodontology* **72**:265-273.
- Borges, G.J., Novaes, A.B. Jr., Grisi, M.F.M., Palioto, D.B., Taba, M. Jr., de Souza, S.L. (2009) Acellular dermal matrix as a barrier in guided bone

regeneration: A clinical, radiographic and histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 1105-1115.

Crespi, R., Cappare, P., Gherlone, E. (2009) Magnesium-enriched hydroxyapatite compared to calcium sulfate in the healing of human extraction sockets: Radiographic and histomorphometric evaluation at 3 months. *Journal of Periodontology* **80**:210-218.

Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J., Nyman, S. (1988) Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery* **81**: 672-676.

De Coster, P., Browaeys, De Bruyn, H., (2009) Healing of Extracion Socket Filled with Bone Ceramic® Prior to Implant Placement: Preliminary Hitological Findings. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **77**: 1280-1297.

de Queiroz Cortes, A., Sallum, A.W., Casati, M.Z., Nociti, F.H. Jr & Sallum, E.A. (2006) A two-year prospective study of coronally positioned flap with or without acellular dermal matrix graft. *Journal of Clinical Periodontology* **33**: 683–689.

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

Fotek, P.D., Neiva, R.F., Wang, H.L. (2009) Comparison of dermal matrix and polytetrafluoroethylene membrane for socket bone augmentation: A clinical and histologic study. *Journal of Periodontology* **80**:776-785.

Fowler, E.B., Breault, L.G., Rebitski, G. (2000) Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and demineralized freeze-dried bone allograft: Part

II. Immediate endosseous implant placement. *Journal of Periodontology* **71**: 1360-1364.

Gapski, R., Misch, C., Stapleton D, Mullins S, Cobb C, Vansanathan A, Reissner M. (2008) Histological, histomorphometric, and radiographic evaluation of a sinus augmentation with a new bone allograft: a clinical case report. *Implants Dentistry*. **17**(4): 430-438.

Gapski, R., Parks, C.A., Wang, H.L. (2005) Acellular dermal matrix for mucogingival surgery: A meta-analysis. *Journal of Periodontology* **76**: 1814-1822.

Griffin, T.J., Cheung, W.S. & Hirayama, H. (2004) Hard and soft tissue augmentation in implant therapy using acellular dermal matrix. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **24**: 352–361.

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

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

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

Kirkland, G., Greenwell, H., Drisko, C., Wittwer, J.W., Yancey, J., Rebitski, G. (2000) Hard tissue ridge augmentation using a resorbable membrane and a

particulate graft without complete flap closure. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **20**: 382-389.

Lindhe, J., Pontoriero, R., Berglundh, T. & Araujo, M. (1995) The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* **22**: 276–283.

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

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

Matos, S.M., Guerra, F.A., Krauser, J., Marques, F., Ermida, J.M., Sanz, M. (2007) Clinical evaluation of the combination of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cellbinding peptide (P-15) in particulate and hydrogel form as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month reentry controlled clinical study. *Journal of Periodontology* **78**:1855-1863.

McAllister, B.S., Haghghat, K. (2007) Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology* **78**:377-396.

Novaes, A.B. Jr., Papalexiou, V., Luczyszyn, S.M., Muglia, V.A., Souza, S.L.S., Taba, M. Jr. (2002a). Immediate implant in extraction socket with acellular dermal matrix graft and bioactive glass: A case report. *Implant Dentistry* **11**: 343-348.

Novaes, A.B. Jr., Pontes, C.C., Souza, S.L., Grisi, M.F. & Taba, M. Jr (2002b) The use of acellular dermal matrix allograft for the elimination of gingival

melanin pigmentation: case presentation with 2 years of follow-up. *Practical Procedure and Aesthetic Dentistry* **14**: 619–623; quiz 624.

Novaes, A.B. Jr., Souza, S.L.S. (2001) Acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration: *A case report. Implant Dentistry* **10**: 192-196.

Nowzari, H. & Slots, J. (1994) Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* **21**: 203–210.

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

Pinho, M.N., Roriz, V.L., Novaes, A.B. Jr. (2006) Titanium membranes in prevention of alveolar collapse after tooth extraction. *Implant Dentistry* **15**:53-61.

Pontes, A.E., Pontes, C.C., Souza, S.L., Novaes, A.B. Jr, Grisi, M.F. & Taba, M. Jr (2006) Evaluation of the efficacy of the acellular dermal matrix allograft with partial thickness flap in the elimination of gingival melanin pigmentation. A comparative clinical study with 12 months of followup. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* **18**: 135–143; discussion 143

Roriz, V.M., Souza, S.L.S., Taba, M. Jr., Palioto, D.B., Grisi, M.F.M. (2006) Treatment of Class III furcation defects with expanded polytetrafluoroethylene membrane associated or not with anorganic bone matrix/synthetic cell-binding peptide: A histologic and histomorphometric study in dogs. *Journal of Periodontology* **77**:490-497.

Rossa, M.L., Lima, L.A., Pustiglioni, F.E., Hespanhol, A.M., Kon, S., Grigolli Filho, J. & Novo, N.F. (2006) Sem analyses of bacterial contamination of e-

ptfe membranes and GTR clinical results. *Journal of the International Academy of Periodontology* **8**: 115–124.

Schenk, R.K., Buser, D., Hardwick, W.R. & Dahlin, C. (1994) Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **9**: 13–29.

Seibert, J. & Nyman, S. (1990) Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. *Journal of Periodontology* **61**: 157–165.

Simon, B.I., Von Hagen, S., Deasy, M.J., Faldu, M., Resnansky, D. (2000) Changes in alveolar bone height and width following ridge augmentation using bone graft and membranes. *Journal of Periodontology* **71**:1774-1791.

Wainwright, D.J. (1995) Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns* **21**: 243-248.

Woodyard, J.G., Greenwell, H., Hill, M., Drisko, C., Iasella, J.M. & Scheetz, J. (2004) The clinical effect of acellular dermal matrix on gingival thickness and root coverage compared to coronally positioned flap alone. *Journal of Periodontology* **75**: 44–56.

Zubillaga, G., Von Hagen, S., Simon, B.I., Deasy, M.J. (2003) Changes in alveolar bone height and width following post-extraction ridge augmentation using a fixed bioabsorbable membrane and demineralized freeze-dried bone osteoinductive graft. *Journal of Periodontology* **74**:965-975.

ANEXOS

FIG. 01

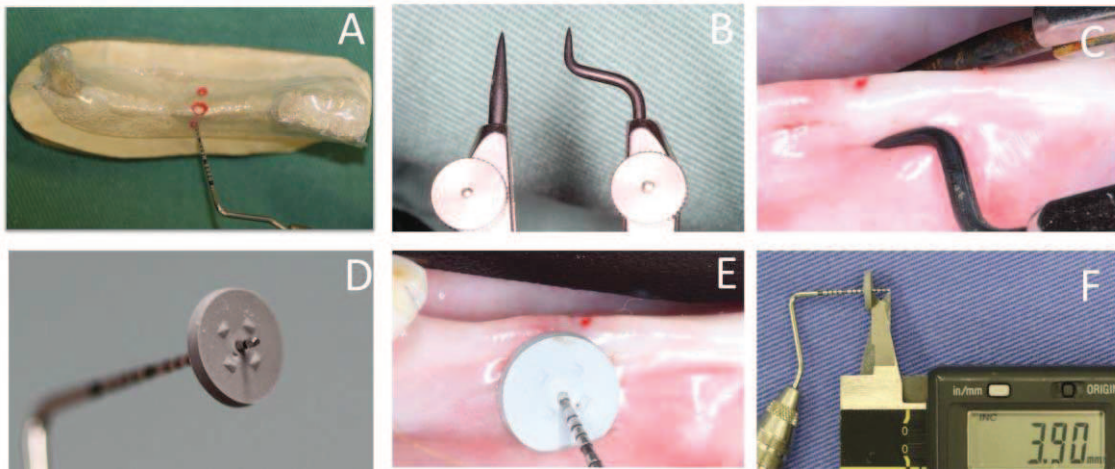


Fig. 1. A – Guia (stent) de acetato de canino a molar, com perfurações: vestibular, oclusal e lingual, na área do rebordo edêntulo correspondente à região do defeito ósseo a ser confeccionado. B – Compasso de ponta seca. C - mensuração da distancia entre a demarcação oclusal e a linha mucogendival vestibular e lingual, D – Sonda periodontal com cursor de silicone. E – Mensuração da espessura do tecido queratinizado. F – transferência das medidas de espessura to tecido queratinizado para o paquímetro digital.

FIG. 02

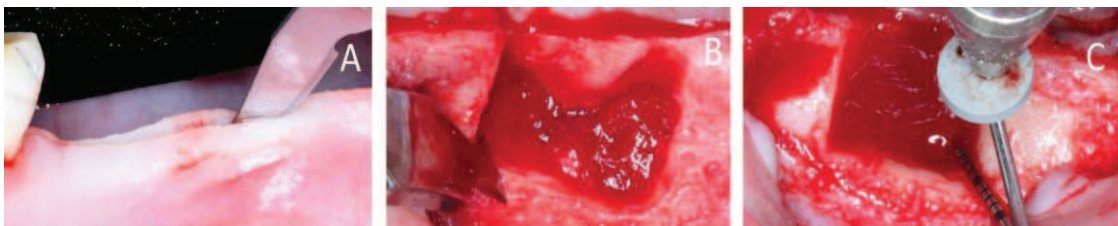


Fig. 2: A - Incisão com lamina 15c de molar a canino, B - confecção do defeito ósseo, C - Avaliação da profundidade do defeito, durante a confecção, com o uso de sonda milimetrada.

FIG. 3

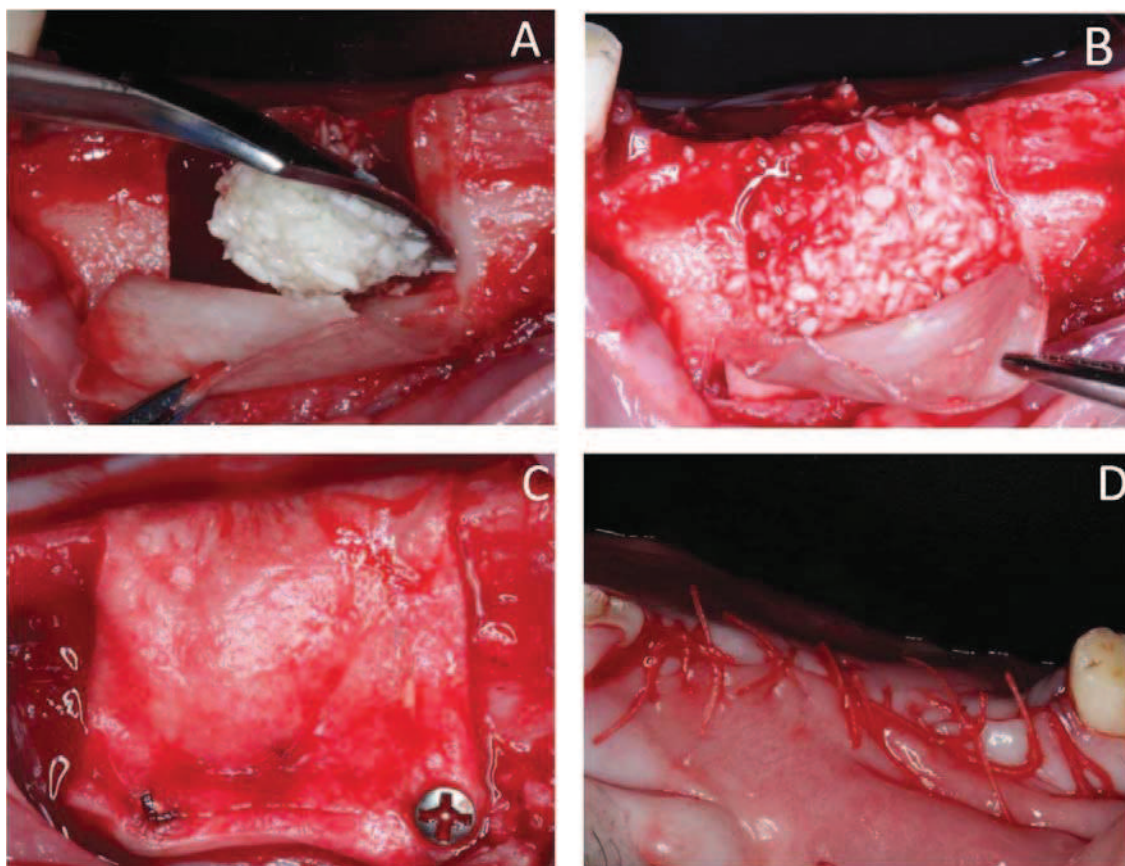


Fig. 3: A-B – inserção do enxerto alógeno MINEROSS ® no defeito. C – recobrimento da área com a MDA e fixação com parafusos de titânio. D – Sutura com vicryl 5-0 recobrindo totalmente a MDA.

FIG. 4

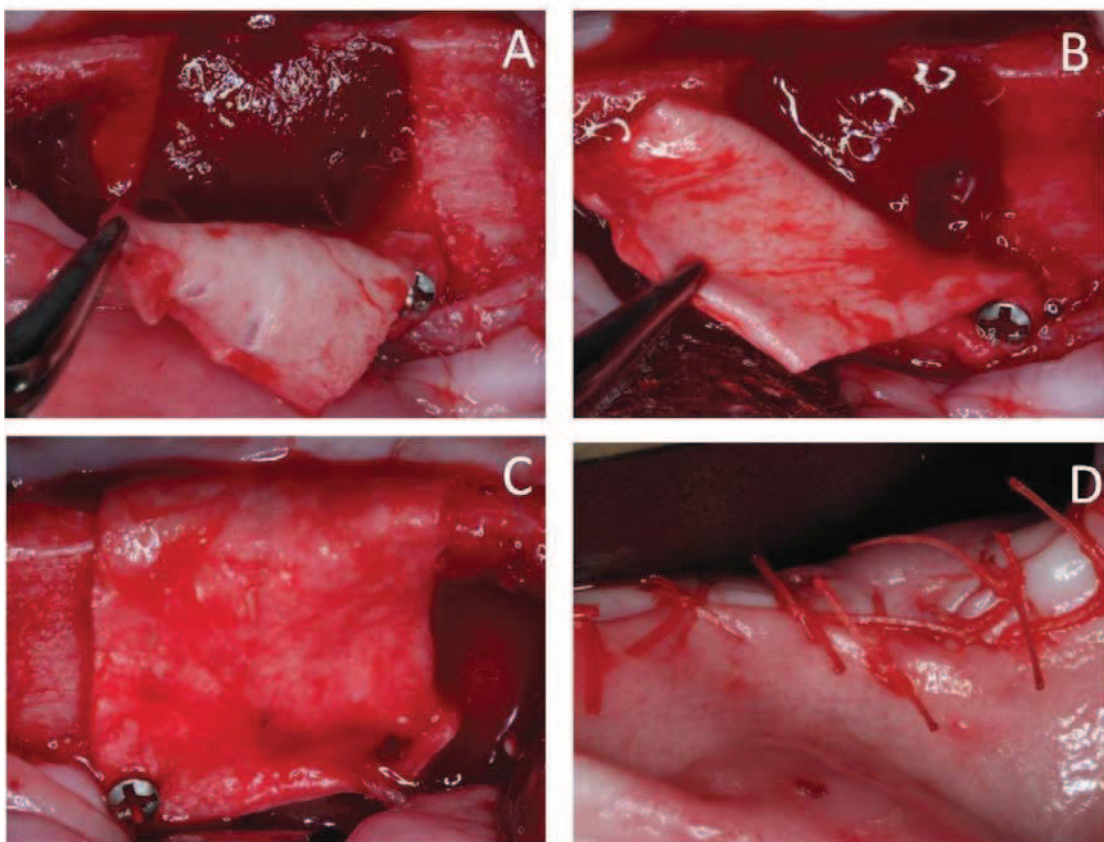


Fig. 4 – A-B – Defeito ósseo preenchido com o coágulo, C – posicionamento e fixação da MDA recobrindo o defeito. D- Sutura com vicryl 5-0 recobrindo totalmente a MDA.

FIG. 5



Posicionador radiográfico associado à um *bite-block* individual de silicone, para padronização das radiografias.

FIG. 6

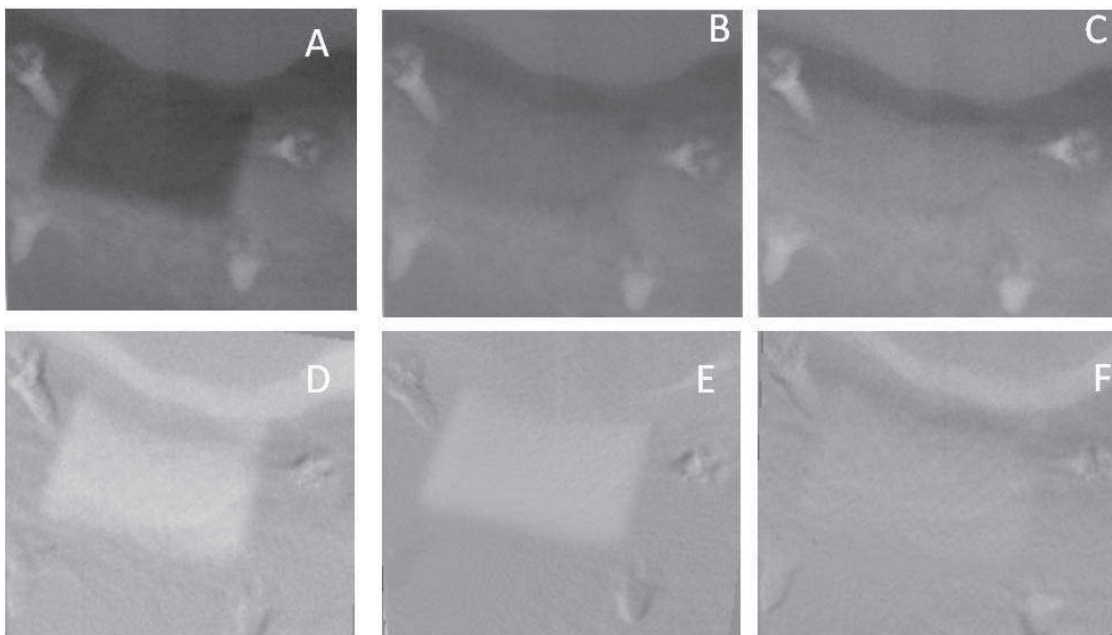
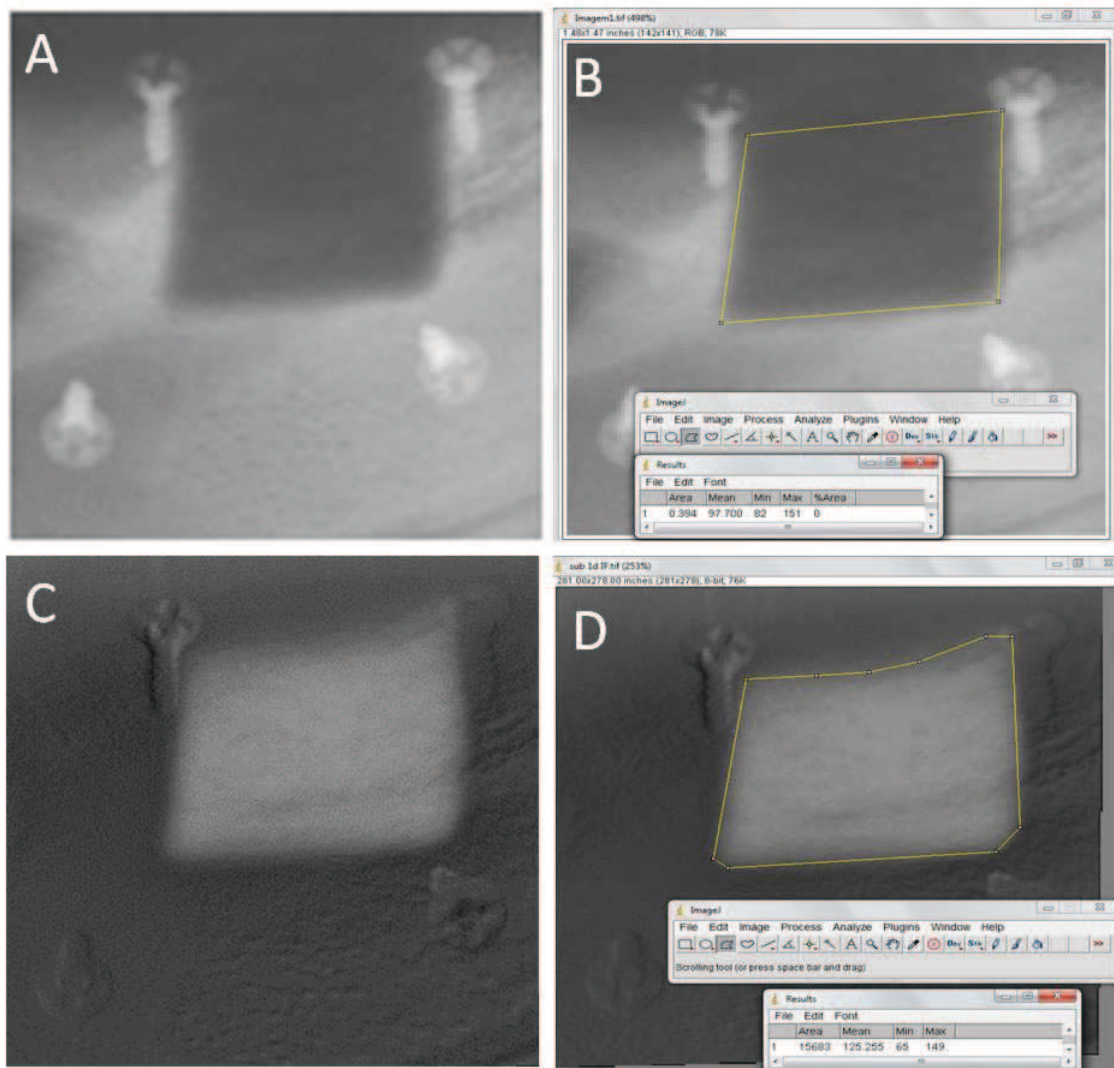


Fig. 6 – A- Raio x inicial (RI). B - 8-semanas (R-8). C – 16 semanas (R-16); D – I-16 imagem; E – I-8 imagem; F – 8-16 imagem.

FIG. 7



Fig, 7; A – R – I. B Mensuração da área do defeito utilizando o software image J. C – I-16sub. D - mensuração da área de preenchimento na imagem de subtração radiográfica I-16.

FIG. 8

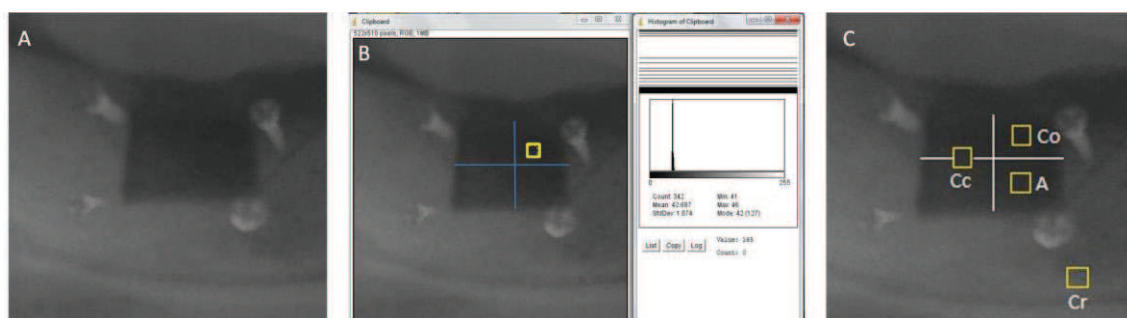


Fig. 8 - A – raio x Inicial (RI); B – mensuração da densidades óssea utilizando o software image J; C Desenho esquemático representando as áreas a serem avaliadas.

Tabela 1. Comparação entre o grupo teste (GT) e o grupo controle (GC) das médias (mm) para os sítios analisados nos exames clínicos I e II.

Sítio	Exame Clínico I		P	Exame Clínico II		P
	GT	GC		GT	GC	
L.T.Q.-V	3,66 ± 0,69	3,87 ± 0,76	0,604	6,67 ± 0,98	5,91 ± 0,83	0,141
L.T.Q.-L	3,32 ± 0,69	3,63 ± 0,76	0,435	6,69 ± 0,76	5,92 ± 0,68	0,068
E.T.Q.-V	1,96 ± 0,35	1,88 ± 0,51	0,74	3,07 ± 0,21	2,95 ± 0,42	0,522
E.T.Q.-O	2,15 ± 0,21	2,12 ± 0,34	0,825	2,85 ± 0,46	3,01 ± 0,45	0,534
E.T.Q.-L	1,73 ± 0,18	1,58 ± 0,21	0,048	2,28 ± 0,33	2,28 ± 0,42	0,977

L.T.Q.-V, Largura do tecido queratinizado na face vestibular; L.T.Q.-L, Largura do tecido queratinizado na face lingual;
E.T.Q.-V, Espessura do tecido queratinizado na face vestibular; E.T.Q.-O, Espessura do tecido queratinizado na região oclusal; E.T.Q.-L, Espessura do tecido queratinizado na face lingual.

Teste T de Student

Tabela 2. Comparação entre os exames clínicos I e II dos valores em mm para o grupo teste e o grupo controle (comparação intra-grupo)

Sítio	Grupo Teste			P	Grupo Controle			P
	Ex. Clínico	I	II		I	II		
L.T.Q.-V	3,66 ± 0,69	6,67 ± 0,98	0,000096*	3,87 ± 0,76	5,91 ± 0,83	0,000076*		
L.T.Q.-L	3,32 ± 0,69	6,69 ± 0,76	0,000007*	3,63 ± 0,76	5,92 ± 0,68	0,000001*		
E.T.Q.-V	1,96 ± 0,35	3,07 ± 0,21	0,000177*	1,88 ± 0,51	2,95 ± 0,42	0,00257*		
E.T.Q.-O	2,15 ± 0,21	2,85 ± 0,46	0,010773*	2,12 ± 0,34	3,01 ± 0,45	0,00055*		
E.T.Q.-L	1,73 ± 0,18	2,28 ± 0,33	0,001803*	1,58 ± 0,21	2,28 ± 0,42	0,00417*		

* - Diferença estatisticamente relevante ($p < 0.05$)

L.T.Q.-V, Largura do tecido queratinizado na face vestibular; L.T.Q.-L, Largura do tecido queratinizado na face lingual;
E.T.Q.-V, Espessura do tecido queratinizado na face vestibular; E.T.Q.-O, Espessura do tecido queratinizado na região oclusal; E.T.Q.-L, Espessura do tecido queratinizado na face lingual.

Teste T de Student

Tabela 3. Mensurações radiográficas do preenchimento ósseo radiográfico para cada animal em 8 e 16 semanas.

<i>Animal</i>	ADO-R	ANO - R - 8	ANO - R - 16	PO-R - 8	PO-R - 16
GT					
1	107.96	82.34	81.13	76,26	75.14
2	105.87	69.43	70.01	65,58	66.12
3	112.3	81.02	82.73	72.14	73.66
4	101.09	67.09	70.56	66.36	69,79
5	105.87	83.65	89.66	79,01	84.68
6	109.04	80.72	82.84	74.02	75.97
7	112.89	77.25	79.13	68.42	70.09
				71.69 ± 5.11	73,64 ± 5.97
GC					
1	106.76	74.97	75.09	70.22	70.33
2	100.4	77.04	77.93	76.73	77.89
3	103.1	70.26	72.41	68.14	70.23
4	104.23	79.12	82.98	75.90	79.61
5	109.43	76.14	76.85	69.57	70.22
6	103.4	72.70	74.45	70.3	72
7	102.00	79.33	80.30	77.77	78.72
				72,66 ± 3.97	74.11 ± 4.33
GT, Grupo teste; GC, Grupo Controle; ADO-R, Área do defeito ósseo Radiográfico; ANO-R, Área de osso novo radiográfico 8 e 16 semanas; PO-R Preenchimento ósseo radiográfico em 8 e 16 semanas. (%)					
Teste T de Student					

Tabela 4. Comparação entre os grupos das médias do PO-R em 8 e 16 semanas.

	<i>Média</i>	POR-8	POR-16
<u>GT</u>		71.69 ± 5.11	76.94 ± 5.97
<u>GC</u>		72.66 ± 3.97	74.11 ± 4.33
<u>P</u>		0.6963	0.8703

GT, Grupo teste. GC, Grupo Controle. PO-R, Preenchimento Ósseo Radiográfico em 8 semanas. PO-R – 16, Preenchimento Ósseo Radiográfico em 16 semanas.
Teste T de Student

Tabela 5. Variação percentual da variação da densidade óssea radiográfica entre os grupos GT e GC.

	<i>Período</i>	I – 8	I – 16	8-16
<u>GT</u>		91.17 ± 66.48	107.97 ± 63.35	10,86 ± 6.92
<u>GC</u>		78.74 ± 51.93	125.38 ± 84.37	21,96 ± 10.53
<u>p</u>		0.392	0.754	0.474

GT, Grupo teste; GC, Grupo Controle; I - 8, Percentagem de Variação da Densidade Óssea Radiográfica entre 0/8 semanas; I - 16 Percentagem de Variação da Densidade Óssea radiográfica entre 0/16 semanas; 8 -16, Percentagem da variação da densidade Óssea radiográfica entre 8/16semanas
Teste U de Mann-Whitney

Versão em inglês para submissão ao Periódico
Clínical Oral Implants Research

The use of the Acellular Dermal Matrix as a membrane associated or not to a new bone allograft in Guided Bone Regeneration: a clinical, radiographic study in minipigs.

Stylianos N. Papalexiou Neto[†]; Sônia M. Luczyszyn^{*}, DDS, PhD; Vula Papalexiou^{*}, DDS, PhD; Arthur B. Novaes Jr^{}, DDS, PhD**

^{*} Center for Health and Biological Sciences at Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brazil.

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

Running title: Acellular Dermal Matrix and allograft in GBR

Key words: Acellular Dermal Matrix; Membrane; Bone allograft; GBR

Corresponding author:

Sônia M. Luczyszyn, DDS, PhD
Center for Health and Biological Sciences (CCBS)
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)
Rua Imaculada Conceição, 1155
80215-901
Curitiba, PR, Brazil
Phone/Fax : +55 (41) 9975 - 5959
e-mail: sonia.luczyszyn@pucpr.br

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the Acellular Dermal Matrix (ADM) as a membrane in guided bone regeneration (GBR) associated or not to an allograft.

Material and methods: In Seven minipigs, the mandibular pre-molars were extracted. After 8 weeks, a bone defect was surgically created bilaterally and GBR was performed, each side was randomly assigned to the control group (CG – ADM as a membrane) or to the test group (TG – ADM associated to an allograft). Immediately after the GBR, standardized radiographs X-ray were taken, and were repeated at 8 and 16 weeks post-operatively. Clinical measurements of the width and thickness of the keratinized tissue (WKT and TKT, respectively) were performed before the GBR procedure and repeated 16 weeks after the GBR before the euthanasia. The minipigs were sacrificed 16 weeks after GBR and histomorphometric analysis was performed. Measurements of the Area of New Bone and Linear Bone Height were performed.

Results: The post-operative healing was uneventful in both groups. Both groups demonstrated a significant increase in width and thickness of the keratinized tissue, but there were no statistically significant difference between groups. Radiographic evaluation, showed images suggesting new bone formation in both groups, at 8 and 16 weeks following GBR. There were no statistically difference between Groups in the histomorphometric evaluations.

Conclusion: ADM when used as a membrane, allowed new bone formation and promoted a significant gain in width and thickness of the keratinized tissue.

INTRODUCTION

Prosthetic rehabilitation, associated or not to dental implants, have as a prerequisite the presence of an appropriate size in width and thickness of the alveolar ridge. The alveolar bone resorption after tooth extraction, for example, occurs due to migration of the epithelium, and penetration of the gingival tissue flap in the area of the alveoli. The remodeling is progressive and leads to a loss of approximately 40% in width and 60% in thickness of bone tissue (Amler 1969, Atwood & Coy 1971). This loss is irreversible and increases the difficulty of prosthetic rehabilitations. The deposition of bone tissue occurs in a centripetal way, and faster cell renewal of the epithelium, results in a convex defect in the alveolar ridge (Borges et al. 2009; Wainwright 1995). One of the most predictable ways to prevent these changes, is the Guided Bone Regeneration (GBR). The biological principle of GBR is the cell selectivity through the use of a biological barrier to inhibit epithelial migration and penetration of the gingival tissue flap, and thereby, allow the proliferation of osteogenic cells and alveolar bone regeneration (Dahlin 1988). A variety of biocompatible materials, both absorbable and non absorbable membranes, has been used in the GBR technique. The literature indicates that clinically and histologically, the results achieved by non-absorbable and absorbable membranes are similar (Novaes & Souza 2001, Novaes et al. 2002a, 2002b, Griffin et al. 2004). However, absorbable membranes do not require a second surgery for its removal, which besides being less costly and more comfortable for the patient, may promote alveolar bone preservation. Many studies showed that exposed membranes may be severely colonized by bacteria and there is an

unfavorable relationship between bone formation and contamination of membranes by bacterial plaque (Nowzari & Slots 1994; Macht 2001; Rossa et al. 2006). The ideal membrane should be made of a material less susceptible to exposure, or may not be significantly colonized by periodontal pathogens when exposed to the oral cavity. Furthermore a membrane that could lead to an increase in the thickness and width of keratinized tissue, could be advantageous. Within this context some authors have proposed the use of acellular dermal matrix (ADM) as a membrane. The ADM is a material obtained from human skin and has been used for various purposes: as a substitute of the palate tissue in grafts to increase the thickness of keratinized tissue around teeth and implants (Felipe et al. 2007) for the treatment of alveolar deformities (Batista et al. 2001) for surgical root coverage (Novaes & Souza 2001; Aichelmann-Reidy et al. 2001) and removal of melanin pigmentation (Novaes et al. 2002a; Novaes et al. 2002b; Pontes et al. 2006). Recently, the ADM was evaluated as a membrane in guided tissue regeneration (GTR). In the study, the ADM showed similar histomorphometric results when compared to a resorbable membrane, in addition, the MDA led to an increase in thickness and width of keratinized tissue (Andrade et al. 2008), as has been shown in several studies (Seibert & Nyman 1990 , Lindhe et al. 1995; Woodyard et al. 2004; de Queiroz Cortes et al. 2006). Some clinical studies have used the ADM in edentulous ridges, associated with immediate implants, suggesting that these materials can be used as membrane (Novaes et al. 2002a; Fowler et al. 2000). One of the main disadvantages of the membranes, including the MDA when used such as, is that in critical defects there is a tendency of them to invaginate into the

defect. Thus, some authors suggest the use of autogenous bone graft and biomaterials to prevent the collapse of the ADM. (Hockers et al. 1999).

There are a variety of materials to be used as grafts: autogenous, allografts, synthetic bone substitutes and xenogenous (Fowler et al. 2000; Simon et al. 2000; Kirkland et al. 2000; fotek et al. 2009; Pinho et al. 2006) As for predictability, autografts are considered the most suitable (McAllister & Haghghat 2007) In contrast, the amount of bone needed of intraoral donor sites and morbidity associated with surgical procedure, limits the indication and acceptance by the patient . The allograft have a low risk of disease transmission and rejection, as they do not contain viable cells. In addition it is presented as an unlimited source of material, minimizing the morbidity of the patient since it is not necessary to remove bone tissue from a donor area. A new material Mineross ® consisting of a mixture of allogenic particulate bone which blends cortical and cancellous bone particles, was selected to be used in this work, associated with the ADM in the GBR procedure. This study aimed to evaluate the effectiveness of acellular dermal matrix used as a membrane, with or without a bone allograft in guided bone regeneration. In the clinical evaluation the width and thickness of keratinized tissue, was measured, and the radiographic evaluation of bone density and bone fill.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Pontifical Catholic University of Parana (CEUA-PUCPR) under the n. 561 and after its adoption were performed the following steps:

1. Selection and preparation of animals.

Seven minipigs were selected (Minipig BR-1) approximately 18 months of age weighing between 20 and 30 kg. The animals were from the company Minipig Trade and Development (Campina do Monte Alegre-SP-Brazil) and were transported to the Experimental Farm Gralha Azul - PUCPR, where they remained until the end of the experiment. The animals received antiparasitic treatment, vitamins, a full series of vaccines and dental prophylactic treatment with a ultrasonic cleaner (Cavitron 3000, Dentsply Mfg. Co., York, PA, USA). In the days after surgery, the animals were transported to PUC-PR camp I, to the Laboratory of Surgical Technique, where the procedures were performed. Every treatment was performed with the animals anesthetized and monitored by qualified personnel.

2. Surgery 1 – Extraction of the four lower premolars bilaterally

The animals were fasted from the night before surgery. They were pre-anesthetized with specific anesthetic for pigs azaperone (Destress - Des-Vet, São Paulo - SP - Brazil), ministering to 1mg/kg of body weight. After 20 minutes, we applied the initial dose of general anesthetic ketamine (Dopalen -

Vetbrands, Jacareí-SP-Brazil) with a dosage of 5 mg / kg, both intramuscularly. Throughout the period in which the animals were anesthetized, heart rate, respiratory rate, temperature and palpebral reflexes palpebral and were monitored by specialized personnel. Under anesthesia, mucoperiosteal flaps were performed bilaterally in the region of four premolars (P1, P2, P3, P4). The teeth were sectioned in buccolingual direction in the area of the root furcation, roots were carefully and individually extracted to avoid fracture of the bone walls. The flaps were then repositioned and sutured with absorbable Vicryl 5-0 (Ethicon - Johnson & Johnson - New Brunswick, NJ - USA). The animals were fed with a paste (wet food) for 14 days to prevent rupture of the sutures. A topical use chlorhexidine 0.12% was performed weekly, and the clinical observation of the healing process of the operated areas.

3. Surgery 2 – Surgical creation of the defect and ROG.

Eight weeks after surgery 1, the technique of sedation and anesthesia was repeated and clinical measures were performed (Clinical Examination I) to evaluate the width and thickness of keratinized tissue (WKT and TKT) respectively. An individual guide (stent), in extending between the canine and molar, was used to determine the exact site and standardize clinical measurements. Three marks were made in the guide (stent) to determine the exact area of the bone defect: a buccal, occlusal and lingual one (FIG.01-A).

All clinical measurements were performed by one operator. The width of keratinized tissue was measured with the use of a compass needle point (FIG. 01-B) and transferred to a digital caliper (Mitutoyo, Raffo - Suzano - SP - Brazil), which determined the width of keratinized tissue in the surfaces: buccal (WTK-B) and lingual (WKT-L), the distance between the reference mark on the occlusal surface and the mucogingival junction, buccal or lingual (FIG.01-C).

The thickness of keratinized tissue was measured on surfaces: occlusal (TKT-O), vestibular (TKT-B) and lingual (TKT-L), corresponding to the markings of the guide. These measurements were made using a periodontal probe with a silicone cursor (FIG.01-D). The probe was positioned perpendicularly to the surface of keratinized tissue and inserted into the soft tissue with light pressure until a hard surface was detected (FIG. 01-E). The cursor was then positioned silicon in contact with the outer surface of soft tissue. After careful removal of the periodontal probe, the depth of penetration was measured using a digital caliper (FIG. 01-F). The average value of the three measurements: TKT - B,

TKT – O, TKT - L was calculated for each site. Further, a horizontal incision was made on the crest of the ridge, with a 15 c blade, the distal face of the canine to the mesial surface of first molar (FIG.02 -A). A mucoperiosteal flap was raised and a rectangular bone defect was surgically made bilaterally in the region of the edentulous ridges, using surgical low-speed burs 703 and 702 (KG-Sorensen Medical Burs Cotia, SP - Brazil) and chisels of Ochsenbein N.1 and N. 2 (Hu-Friedy - Chicago, IL - USA) (FIG. 02-B). We used copious irrigation with sterile saline solution during the manufacturing defects. The defect size was 10 mm in the bucco-lingual, 12mm mesio-distal and 8 mm in apico-coronal direction, and the lingual wall was maintained (FIG. 02-C). The dimension given to the defects constitute a critical defect (Schenk et al. 1994). On one side, was randomly assigned to be filled with a new graft material, MINEROSS® (Biohorizons inc. Birmingham - AL - USA) (FIG.03 A, B) (test group - GT). The biomaterial was then coated with ADM (Alloderm; Biohorizons inc. Birmingham - AL - USA), which extended beyond the defect margins by 2 to 3mm. The ADM was held in position by 4 titanium screws, 2 mesial and distal edges on the buccal surface to 3 mm from the base of the defect, which served as reference for the X-ray analysis, and two on the lingual (FIG. 03-C). The flap was then repositioned and sutured with absorbable suture vicryl 5-0, in order to completely cover of the ADM (FIG.03-D). Contralaterally, the defect was surgically made only coated with ADM (control group - CG), which was held in position in the manner described above. The flap was then repositioned and sutured with absorbable suture vicryl 5-0, in order to completely cover the ADM (FIG. 04 A, B, C, D) bilateral radiographs of bone defects were then taken. All radiographs were obtained by a single examiner using a conventional X-ray

machine (Spectro 70X, Dabi Atlante, Ribeirao Preto SP, Brazil) The exposure time was adjusted to 0.7 s. To standardize the position of the radiographic procedure, an individual silicone bite-block associated with a radiographic positioned was made for each side of each animal (FIG. 05).

Postoperative treatment

Tramadol was used (50 mg/ml) to 3 mg/kg as analgesic therapy, and ketoprofen 20 mg 1pil/20kg as anti-inflammatory. The animals also received Stomorgyl (10 Stomorgyl, Merial Animal Health Ltda, in Southeastern Brazil - Brazil) 1pil/10kg for 10 days as antibiotic therapy. The animals were kept under gruel for 15 days when the sutures were removed. Topical application of chlorhexidine 0.12% was daily performed for plaque control.

Sixteen weeks after surgery 2 (GBR) clinical measurements were repeated, clinical examination II, following the same criteria used in clinical examination I. During the experimental period, animals received water without restriction and were fed with pig chow (S4, Bravisco, Bastos-SP-Brazil), a daily amount equivalent to 2% by weight of each animal, divided into two portions, daily.

Radiographic Analysis

The initial radiographs (IR) in the test group (TG) and control group (CG) were performed immediately after surgery 2 (GBR). After 8 weeks using the individual silicon bite-block (Pic. 5) further standardized radiographs were taken

(R-8). Sixteen weeks after surgery 2, the radiographs were taken one more time (R-16).

To evaluate bone changes, radiographic subtraction of the images were performed, using the software EMAGO (Emago / Advanced 3.43, Oral Diagnostic Systems, Louwesweg, Amsterdam, Netherlands). The subtractions from radiographic were calculated in pairs as follows: RI and R-8, RI and R-16, R-8 and R-16. Was thus obtained a new image representing the difference between the original radiographs. (I-16 sub, and I-8-8sub 16sub) (FIG. 6). On these three new images the radiographic area of new bone was measured (ANB-R) in mm^2 . The radiographic area of the bone defect (ABD - R) was measured in mm^2 on the initial radiograph. The radiographic bone fill (BF-R) was calculated at 8 weeks (BF-R 8) and 16 weeks (BF-R 16) (FIG. 7) as the ratio of ABD and ANB-R, and represented in percentages. Bone density was also evaluated (BD-R) in grayscale. For this analysis two lines were drawn, one horizontal and one vertical, to determine the center point of the defect (C). From this central point, four new patterned regions of interest were defined: an occlusal to the central point (Co), an apical to the central point (A), a center point (Cc) and a bottom point in the base of the jaw outside the area of defect which served as control (Cr). (FIG. 8) in these regions a square (grid) of 16 pixels^2 was placed and BD-R was then calculated in these squares of known area (Hwang et al. 2008) (FIG. 8), comprising BD-R - Co, BD-R - A, BD-R - CC and BD-R - Cr. The total BD-R was calculated using the arithmetic average of the percentage change between BD-R - Co, BD-R - A, BD-R - Cc.

As BD-R - Cr was used as control no changes in bone density during the study was expected, to demonstrate good standardization of the radiographs.

Measurements were performed using the software Image J (National Institutes of Health NIH - Bethesda - MD - USA)

Statistical Analysis

For analysis of the average percentages of variables, was initially tested the normality of the data for the test group and the control group and the homogeneity of variance between groups using the Kolmogorov-Smirnov test for normality, and test of homogeneity of variance Levene, the level of significance was 5%. When both groups had the normality and homogeneity was performed by Student t test, assuming homogeneous variables, when the groups were not homogeneous, but normal distribution was performed by Student t test, assuming heterogeneous variance. When at least one of the groups were not normally distributed, we used the U test of Mann-Whitney. The software used was SPSS 18.0

RESULTS

All procedures were well tolerated by the animals and no infection was observed.

Clinical results

In the clinical evaluations no statistically significant differences for WKT-B, WKT-L, TKT-B, TKT-O TKT-L clinical examination were observed (Table 1), demonstrating similarity between preoperative TG and CG. As the clinical examination I, II clinical examination showed no statistically significant differences when comparing the groups. Measurements of variable WKT-B in the average clinical exam I was 3.66 ± 0.69 while the CG was 3.87 ± 0.76 ($p = 0.604$). On clinical examination II the TG had a mean of 6.67 ± 0.98 and 5.91 ± 0.83 in CG ($p = 0.141$). For the variable WKT-L, the clinical examination I mean was 3.32 ± 0.69 to the TG, while the CG was 3.63 ± 0.76 ($p = 0.435$). On clinical examination II the TG showed a mean of 6.69 ± 0.76 and 5.92 ± 0.68 in CG ($p = 0.068$). For the variable TKT-B in the clinical examination I mean TG was 1.96 ± 0.35 and 1.88 ± 0.51 ($p = 0.74$) in CG, the clinical examination of the average GT II was 3.07 ± 0.21 and 2.95 ± 0.42 ($p = 0.522$) in CG. In variable ETQ-O The average GT I found on clinical examination was 2.15 ± 0.21 , while the CG had a mean of 2.12 ± 0.34 ($p = 0.825$), clinical examination II the average the TG was 2.85 ± 0.46 and the CG was 3.01 ± 0.45 ($p = 0.534$). TKT-L variable in the mean TG found on clinical examination I was 1.73 ± 0.18 , while the CG had a mean of 1.51 ± 0.21 ($p = 0.048$), clinical examination II the average GT was 2.28 ± 0.33 and the CG was 2.28 ± 0.42 ($p = 0.977$). (Table 1).

In intra-group analysis, both (TG and CG) showed a considerable increase in the TKT and WKT (Table 2). Statistically significant differences were found in the TG: WKT-B ranged from 3.66 ± 0.69 to 6.67 ± 0.98 ($p = 0.000096$), WKT-L ranged from 3.32 ± 0.69 to 6.69 ± 0.76 ($p = 0.000007$), TKT-B ranged from 1.96 ± 0.35 to 3.07 ± 0.21 ($p = 0.000175$), The TKT- O ranging 2.15 ± 0.21 to 2.85 ± 0.46 ($p = 0.010773$), TKT-L ranged from 1.73 ± 0.18 to 2.28 ± 0.33 ($p = 0.001804$). In CG statistically significant differences were found for WKT-B ranged from 3.87 ± 0.76 to 5.91 ± 0.83 ($p = 0.000076$), WKT-L ranged from 3.63 ± 0.76 to 5.92 ± 0.68 ($p = 0.000001$), TKT-B ranged from 1.88 ± 0.51 to 2.95 ± 0.42 ($p = 0.00257$), The TKT-O ranging of 2.12 ± 0.34 to 3.01 ± 0.45 ($p = 0.00055$), TKT-L ranged from 1.58 ± 0.21 to 2.28 ± 0.42 ($p = 0.00417$).

Radiographic Results

In the assessment of radiographic bone fill (BF-R) mean the TG was $71.69 \pm 5.11 \text{ mm}^2$ for 8 weeks and $73.64 \pm 5.97 \text{ mm}^2$ at 16 weeks. In the CG the mean of the BF-R was $72.67 \pm 3.97 \text{ mm}^2$ for 8 weeks and $74.11 \pm 4.33 \text{ mm}^2$ at 16 weeks (Table 3). In the comparison between groups variables showed no statistically significant difference, 8 weeks ($p = 0.6963$) and 16 weeks ($p = 0.8703$) (Table 4) For the variable radiographic bone density BD-R mean values BD-Cr showed no statistically significant difference ($p = 0.773$) and the GT ($p = 0.562$) in GC compared: RI, R-8 and R-16, demonstrating good standardization of the images. In TG the average change percentage in the radiographic bone density between RI and R-8 (8 weeks) was 91.17 ± 66.48 , between RI and R-16 (16 weeks) was 107.97 ± 63.35 and between R-8 and R-16 was 10.86 ± 6.92 . In the GC variation between RI and R-8 was 78.74 ± 51.93 , between RI and R-16 was 125.38 ± 84.37 and between R-8 and R-16 was 21.96 ± 10.53 . (Table 5) The groups showed no statistically significant differences when compared. RI - R-8 ($p = 0.392$), RI - R-16 ($p = 0.754$) and R-8 - R-16 ($p = 0.474$). (Table 5).

DISCUSSION

In this study we used biomaterials in order to promote the GBR in critical defects previously created. The use of ADM with or without a new bone allograft that combines particles of cortical and cancellous bone, clinically resulted in increased thickness and width of keratinized tissue in both groups.

The GBR technique has been used successfully to treat various types of bone deformities (Dhalin et al. 1988; Crespi et al. 2009; Gapski et al. 2005). There are many advantages of preservation of the alveolar ridge. However, some problems may be associated with this technique when using membrane barriers, whether absorbable or non-absorbable, such as premature exposure of the membrane to the oral cavity and subsequent contamination (Nowzari & Slots 1994; Macht 2001; Rossa et al. 2006). Moreover, the single use of membranes do not promote an increase in width and thickness of keratinized tissue, which would be highly desirable in techniques to treat critical defects (Batista et al. 2001). Thus, in order to minimize such drawbacks related to the use of membranes, the ADM has been proposed as an alternative to the GBR techniques. One of the first clinical reports of the use of ADM as a membrane in GBR was presented by Souza Jr. and Novaes (2001). The ADM was used as a membrane to prevent alveolar collapse after tooth extraction and the bone thickness obtained after 6 months, allowed the fitting of dental implant. Some clinical studies have also used the ADM as a membrane in the GBR in edentulous ridges and in association with immediate implants Novaes et al. (2002a), Fowler et al. (2000). The results of this study, like previous studies of fotek et al. (2009) proved that the ADM can be used as a membrane to prevent

alveolar collapse in GBR procedures. In a study using similar methodology and clinical analysis of the present study, Borges et al. (2009) tested the ability of ADM to act as a barrier for GBR procedures in surgically created bone defects in dogs. They found a statistically significant gain in thickness of keratinized tissue on the lingual surface, whereas in the present study there was an increase of thickness in all aspects measured (RKT-B, $p = 0.0001$; TKT-O, $p = 0.0107$ and TKT -L, $p = 0.0018$). These data corroborate with previous studies, which demonstrated the ability of MDA to promote an increase in keratinized tissue (Allen et al. 1998; Fowler et al. 2000; Aichelmann-Reidy et al. 2001; Novaes et al. 2001) With respect to the width of keratinized tissue, the results are confrontational. While in the present study there was a significantly increase in width of keratinized tissue (WKT-B, and $p = 0.0000$ WKT-L, $p = 0.0000$), the findings of Borges et al. (2009) demonstrated a reduction of the width of keratinized tissue, both on the buccal, and lingual. The authors report that this fact may have occurred due to the coronal displacement of the flap when sutured in a different position in relation to its original position. Although the mucogingival junction tends to return to its original position in later periods (Ainamo et al. 1992), it is likely that the period of four months has been insufficient to the ADM to promote tissue gain in width (de Souza et al. 2008). Moreover, it is known that the increase of this tissue depends on the migration of cells with the ability to stimulate the differentiation of the mucosa, which may vary among different species or even among members of the same species (Paolantonio et al. 2002). This could explain the divergent results depending on the species involved in this and the work of Borges et al. (2009) respectively, minipigs and dogs. Luczyszyn et al. (2005) used the ADM associated or not

with absorbable hydroxyapatite graft in completing wells to preserve the alveolar ridge. There were 15 pairs of teeth indicated for extraction, in which one side was used only ADM and the other, the MDA associated with the hydroxyapatite graft. After six months, there was an increase of keratinized tissue with the use of MDA, which corroborates the clinical findings of this study, no significant differences for the groups associated with grafts, in both studies. Dahlin et al. (1988) demonstrated that when epithelial cells are isolated from the bone defects, new bone formation occurs. However, the space for bone regeneration kept under the membranes is needed. In many cases, in order to maintain this space and serve as a framework conducive for cell migration, suggests an association between bone grafts and membranes, aiming at the GBR. In this study, ADM was firmly fixed with titanium screws, which may have prevented the collapse of the ADM, while maintaining the scaffold and thus justifying the similarity of clinical results in both groups, with or without graft associated. Radiographically, the results of this study were compared with the findings of Borges et al. (2009) regarding the parameters used to evaluate the radiographs in the areas of bone defects surgically prepared and treated with ADM, which was used as a barrier in GBR. The percentage of bone fill obtained by radiographic subtraction, served as an indicator of a possible new bone formation. The percentages found, (71.69% in 8 weeks and 73.64% at 16 weeks) are similar to those found by Borges et al. (2009) (78.41% in 8 weeks and 83.38% at 16 weeks), all compared to the initial radiograph of the defect area. Jovanovic et al. (2007) reported complete radiographic filling, but did not assess the technique of subtraction, but only through conventional images. In this study, in the end of 16 weeks, radiographic results obtained using the

radiographic subtraction technique, and conventional technique, showed no statistically significant differences between groups, but showed similarity in bone formation and bone density. In a case report, Gapski et al. (2008) demonstrated positive results with the use of bone allograft (Mineross) in surgery of maxillary sinus lifting. Radiographic analysis performed 6 months after grafting showed great similarity between the images of the area of the graft and native bone of the patient. Autogenous bone grafts are considered the ideal material for bone grafting procedures for presenting properties osteogenic, osteoinductive and biological osteoconductive. Moreover, they present no risk of transmitting diseases or cause rejection. Moreover, this type of graft causes greater patient discomfort and morbidity due to the addition of donor site, for collection of bone. In order to minimize these drawbacks, some authors suggest the use of bone substitutes as alternatives to autografts (Crespi et al. 2009; De Coster et al. 2009; Matos et al. 2007; Roriz et al. 2006). In procedures for the ROG, the bone allograft is the most widely used allograft demineralized freeze-dried (DFDBA). In this study, we used a new allograft, which links particles of cortical and cancellous bone, the cortical portion of the material serves to maintain structural integrity, while the cancellous portion provides the porous architecture that promotes revascularization and improves its osteoconductive potential, the Mineross. So far there are few studies using Mineross. This study showed no significant differences between groups with or without the use of bone allograft, in the same parameters.

Based on the methodology and analysis of the results of this study, we can conclude that the acellular dermal matrix promoted the guided bone

regeneration and provided gains in thickness and width of keratinized tissue, with or without bone association to an allograft.

FIG. 01

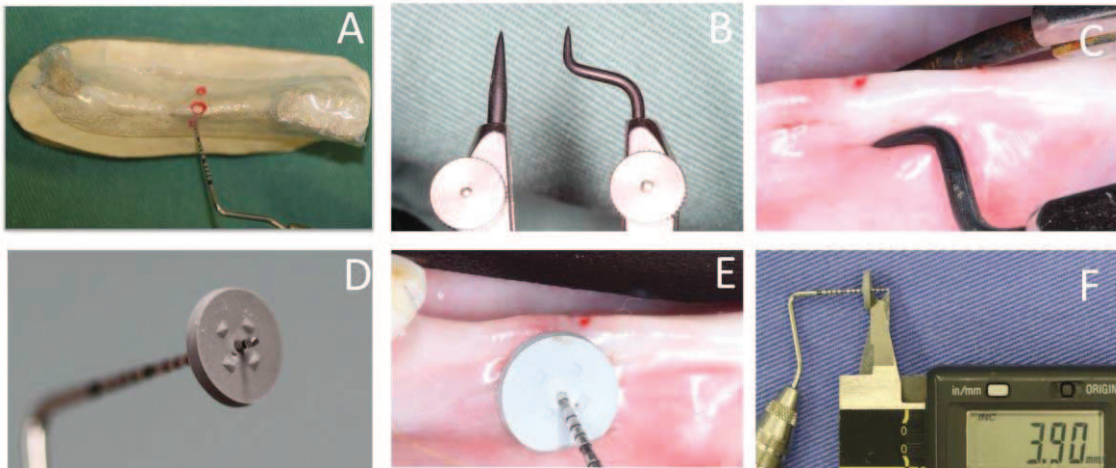


FIG. 1. A – Stent (guide) acetate made, from canine to molar , with buccal, occlusal and lingual marks. B – Compass needle tip. C - measure from occlusal point do the mucogingival junction D – Periodontal probe with silicon cursor E – Measurement of the buccal thickness F – Digital caliper measuring thickness

FIG. 02



Fig. 2: A, Incision with 15 blade B – Creation of bone defect C – Measurements of the defect dimensions.

FIG. 3

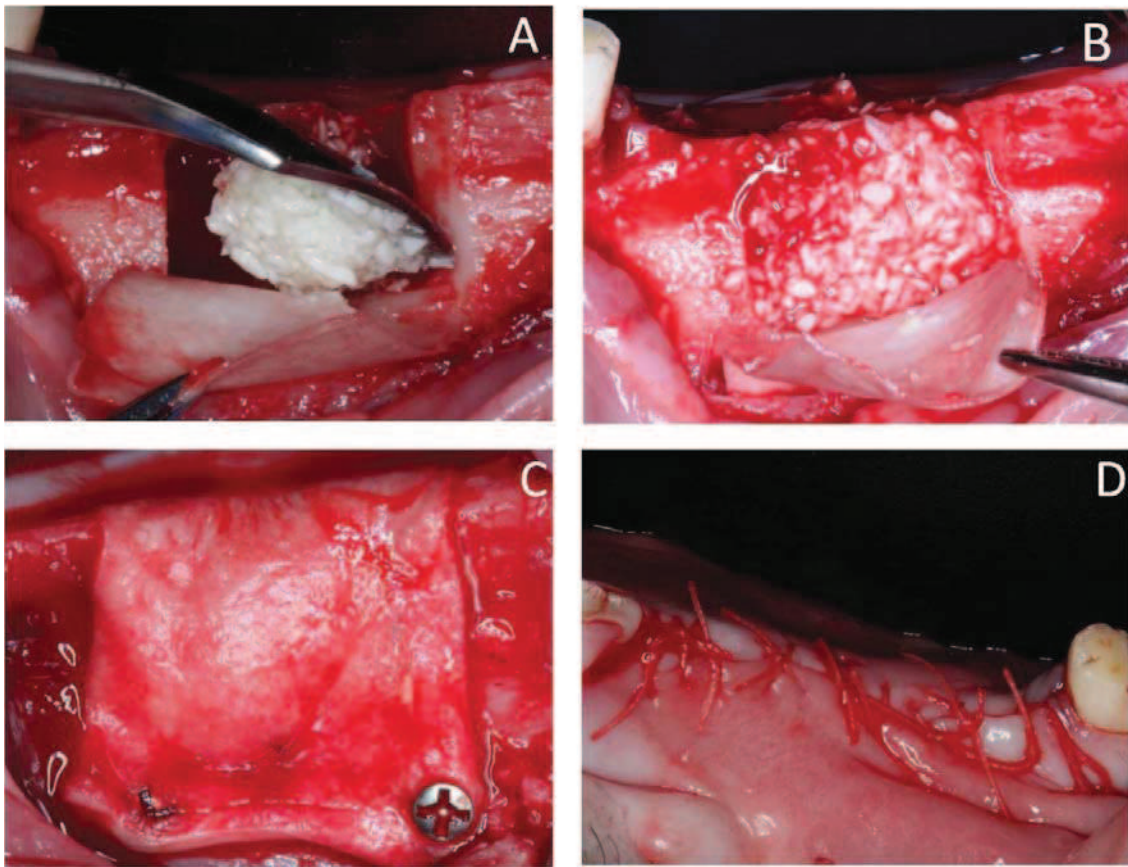
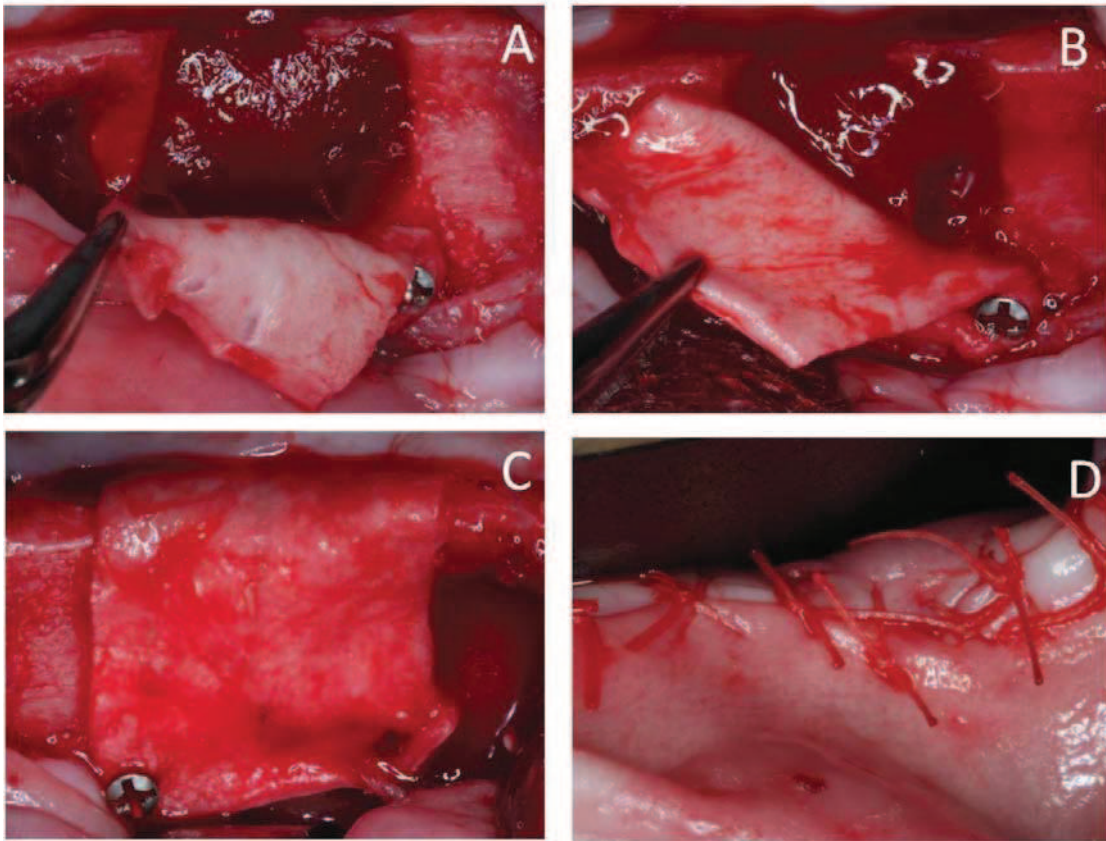


Fig. 3: A-B – Filling of de defect with MINEROSS ®. C –MDA fixed with titanium screws. D –Suture with Vicryl 5-0.

FIG. 04



Pic. 4 – A-B – Bone defect with blood clot. C –ADM fixed with titanium screws. D –Suture with Vicryl 5-0.

FIG. 05



Radiograph positioner associated to an individual bite-block, to standardize the radiographic X-rays

FIG.06

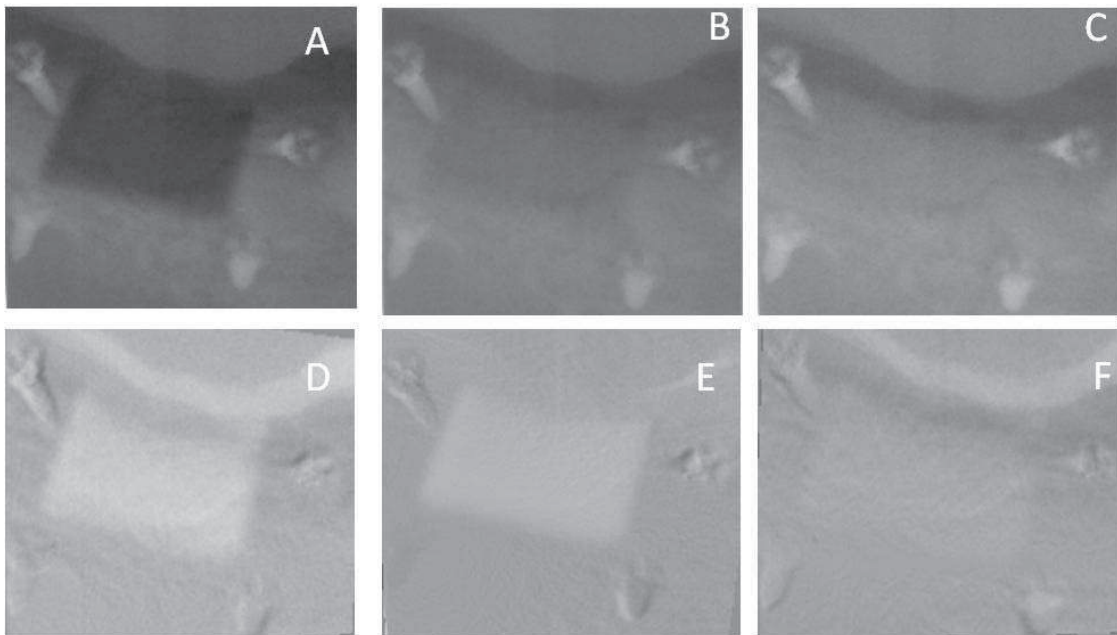


FIG. 6 – A- Inicial X-Ray (R-1). B - 8-weeks (R-8). C – 16 weeks (R-16); D – I-16 image; E – I-8 image; F – 8-16 image.

FIG. 07

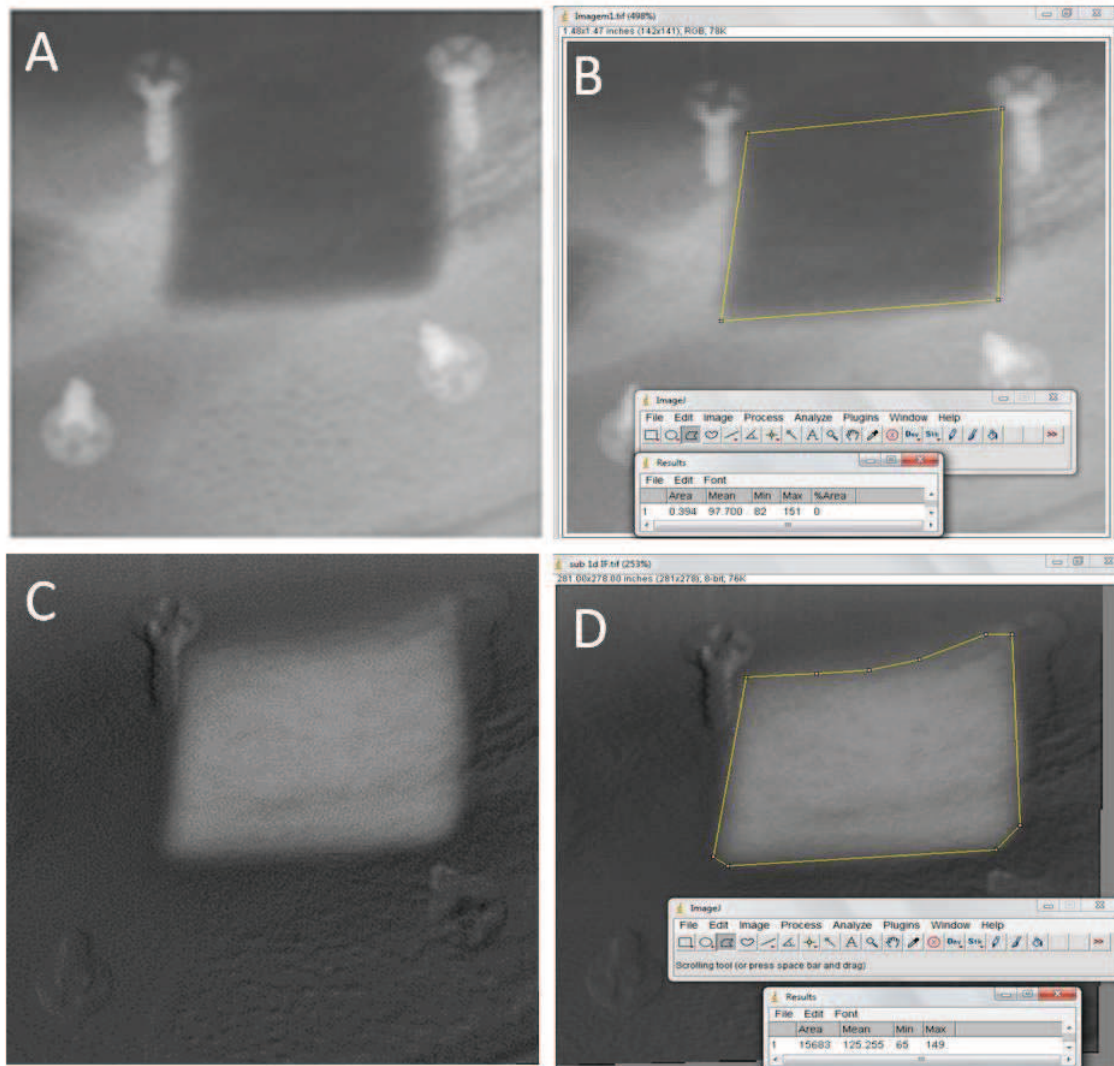


FIG. 7; A – R – I. B Measurement of bone defect using image J software. C – I-16sub. D – Measurement of the área of bone fill in 16 weeks I-16.

FIG. 08

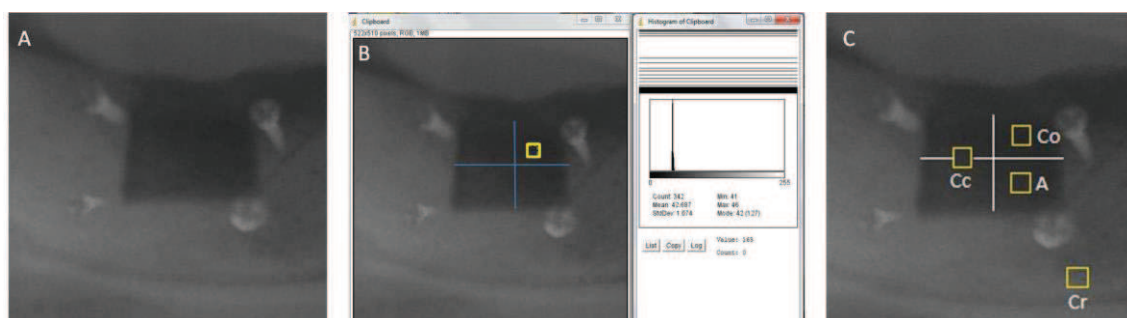


Fig. 8 - A – Initial X-ray (RI); B – measurement of the bone density using image J software; C- Schematic draw representing the areas to be evaluated.

Table 1. Comparison between the test group (TG) and control group (CG) of the mean (mm) for the sites examined in clinical exams I and II.

Site	Exam I		P	Exam II		P
	TG	CG		TG	CG	
WKT.-B	3,66 ± 0,69	3,87 ± 0,76	0,604	6,67 ± 0,98	5,91 ± 0,83	0,141
WKT.-L	3,32 ± 0,69	3,63 ± 0,76	0,435	6,69 ± 0,76	5,92 ± 0,68	0,068
TKT - B	1,96 ± 0,35	1,88 ± 0,51	0,74	3,07 ± 0,21	2,95 ± 0,42	0,522
TKT - O	2,15 ± 0,21	2,12 ± 0,34	0,825	2,85 ± 0,46	3,01 ± 0,45	0,534
TKT - L	1,73 ± 0,18	1,58 ± 0,21	0,048	2,28 ± 0,33	2,28 ± 0,42	0,977

WKT.-B, Width of keratinized tissue in buccal area; WKT -L, Width of keratinized tissue in the lingual area;
 TKT - B, Thickness of keratinized tissue in buccal area; TKT - O, Thickness of keratinized tissue in occlusal area;
 TKT - L, Thickness of keratinized tissue in lingual area
 T de Student Test

Table 2.. Comparison of the clinical exams I and II of the values in mm for the test group and control group (intra-group comparison)

Site	Test Group			P	Control Group			P
	Exam	I	II		I	II		
WKT-B		3,66 ± 0,69	6,67 ± 0,98	0,000096*		3,87 ± 0,76	5,91 ± 0,83	0,000076*
WKT.-L		3,32 ± 0,69	6,69 ± 0,76	0,000007*		3,63 ± 0,76	5,92 ± 0,68	0,000001*
TKT-B		1,96 ± 0,35	3,07 ± 0,21	0,000177*		1,88 ± 0,51	2,95 ± 0,42	0,00257*
TKT-O		2,15 ± 0,21	2,85 ± 0,46	0,010773*		2,12 ± 0,34	3,01 ± 0,45	0,00055*
TKT-L		1,73 ± 0,18	2,28 ± 0,33	0,001803*		1,58 ± 0,21	2,28 ± 0,42	0,00417*

* - Diferença estatisticamente relevante ($p < 0.05$)
 L WKT.-B, Width of keratinized tissue in buccal area; WKT -L, Width of keratinized tissue in the lingual area;
 TKT - B, Thickness of keratinized tissue in buccal area; TKT - O, Thickness of keratinized tissue in occlusal area;
 TKT - L, Thickness of keratinized tissue in lingual area
 Teste T de Student

Table 3. Radiographic measurements of radiographic bone fill for each animal at 8 and 16 weeks.

<i>Animal</i>	ABD-R	ANB - R - 8	ANB- R – 16	BF-R - 8	BF-R - 16
TG					
1	107.96	82.34	81.13	76,26	75.14
2	105.87	69.43	70.01	65,58	66.12
3	112.3	81.02	82.73	72.14	73.66
4	101.09	67.09	70.56	66.36	69,79
5	105.87	83.65	89.66	79,01	84.68
6	109.04	80.72	82.84	74.02	75.97
7	112.89	77.25	79.13	68.42	70.09
				71.69 ± 5.11	73,64 ± 5.97
CG					
1	106.76	74.97	75.09	70.22	70.33
2	100.4	77.04	77.93	76.73	77.89
3	103.1	70.26	72.41	68.14	70.23
4	104.23	79.12	82.98	75.90	79.61
5	109.43	76.14	76.85	69.57	70.22
6	103.4	72.70	74.45	70.3	72
7	102.00	79.33	80.30	77.77	78.72
				72,66 ± 3.97	74.11 ± 4.33
TG, Test Group; CG, Control Group; ABD-R, Area of bone defect; ANB-R, Area of new bone 8 e 16 weeks; BF-R radiographic Bone Fill in 8 and 16 weeks. Student T test					

Table 4. Comparison between groups, means of the BF-R at 8 and 16 weeks.

<i>Mean</i>	BF-R-8	BF-R-16
TG	71.69 ± 5.11	76.94 ± 5.97
CG	72.66 ± 3.97	74.11 ± 4.33
<i>P</i>	0.6963	0.8703

TG – Test Group; CG, Control Group; BF-R - 8, Radiographic bone fill in 8 weeks; BF - R – 16, Radiographic bone fill in 16 weeks.
Teste T de Student

Table 5. Percentage of the variation in radiographic bone density between the TG and CG groups.

<i>Period</i>	I – 8	I – 16	8-16
TG	91.17 ± 66.48	107.97 ± 63.35	10,86 ± 6.92
CG	78.74 ± 51.93	125.38 ± 84.37	21,96 ± 10.53
<i>p</i>	0.392	0.754	0.474

TG, Test Group; CG, Control Group; I - 8, Variation of radiographic bone density in % between I/8 weeks; I - 16 Variation of radiographic bone density in % between I/16 weeks; 8 -16, Variation of radiographic bone density in % between 8/16weeks
Mann-whitney test

REFERENCES

- Aichelmann-Reidy, M.E., Yukna, R.A., Evans, G.H., Nasr, H.F. & Mayer, E.T. (2001) Clinical evaluation of acellular allograft dermis for the treatment of human gingival recession. *Journal of Periodontology* **72**: 998–1005.
- Ainamo, A., Bergenholtz, A., Hugoson, A. & Ainamo, J. (1992) Location of the mucogingival junction 18 years after apically repositioned flap surgery. *Journal of Clinical Periodontology* **19**:49–52.
- Amler, M.H. (1969) The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* **27**(3) : 309-318.
- Andrade, P.F., Felipe, M.E., Novaes, A.B. Jr, Souza, S.L., Taba, M. Jr, Palioto, D.B. & Grisi, M.F. (2008) Comparison between two surgical techniques for root coverage with an acellular dermal matrix graft. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 263–269.
- Atwood, D.A., Coy, W.A. (1971) Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges. *Journal of Prosthetic Dentistry* **26**: 280-295.
- Batista, E.L. Jr., Batista, F.C. & Novaes, A.B. Jr. (2001) Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *Journal of Periodontology* **72**: 265–273.
- Batista, E.L. Jr., Batista, F.C., Novaes, A.B. Jr. (2001) Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *Journal of Periodontology* **72**:265-273.
- Borges, G.J., Novaes, A.B. Jr., Grisi, M.F.M., Palioto, D.B., Taba, M. Jr., de Souza, S.L. (2009) Acellular dermal matrix as a barrier in guided bone

regeneration: A clinical, radiographic and histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 1105-1115.

Crespi, R., Cappare, P., Gherlone, E. (2009) Magnesium-enriched hydroxyapatite compared to calcium sulfate in the healing of human extraction sockets: Radiographic and histomorphometric evaluation at 3 months. *Journal of Periodontology* **80**:210-218.

Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J., Nyman, S. (1988) Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery* **81**: 672-676.

De Coster, P., Browaeys, De Bruyn, H., (2009) Healing of Extracion Socket Filled with Bone Ceramic® Prior to Implant Placement: Preliminary Hitological Findings. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **77**: 1280-1297.

de Queiroz Cortes, A., Sallum, A.W., Casati, M.Z., Nociti, F.H. Jr & Sallum, E.A. (2006) A two-year prospective study of coronally positioned flap with or without acellular dermal matrix graft. *Journal of Clinical Periodontology* **33**: 683–689.

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

Fotek, P.D., Neiva, R.F., Wang, H.L. (2009) Comparison of dermal matrix and polytetrafluoroethylene membrane for socket bone augmentation: A clinical and histologic study. *Journal of Periodontology* **80**:776-785.

Fowler, E.B., Breault, L.G., Rebitski, G. (2000) Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and demineralized freeze-dried bone allograft: Part

II. Immediate endosseous implant placement. *Journal of Periodontology* **71**: 1360-1364.

Gapski, R., Misch, C., Stapleton D, Mullins S, Cobb C, Vansanathan A, Reissner M. (2008) Histological, histomorphometric, and radiographic evaluation of a sinus augmentation with a new bone allograft: a clinical case report. *Implants Dentistry*. **17**(4): 430-438.

Gapski, R., Parks, C.A., Wang, H.L. (2005) Acellular dermal matrix for mucogingival surgery: A meta-analysis. *Journal of Periodontology* **76**: 1814-1822.

Griffin, T.J., Cheung, W.S. & Hirayama, H. (2004) Hard and soft tissue augmentation in implant therapy using acellular dermal matrix. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **24**: 352–361.

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

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

Kirkland, G., Greenwell, H., Drisko, C., Wittwer, J.W., Yancey, J., Rebitski, G. (2000) Hard tissue ridge augmentation using a resorbable membrane and a particulate graft without complete flap closure. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **20**: 382-389.

Lindhe, J., Pontoriero, R., Berglundh, T. & Araujo, M. (1995) The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of

degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* **22**: 276–283.

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

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

Matos, S.M., Guerra, F.A., Krauser, J., Marques, F., Ermida, J.M., Sanz, M. (2007) Clinical evaluation of the combination of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cellbinding peptide (P-15) in particulate and hydrogel form as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month reentry controlled clinical study. *Journal of Periodontology* **78**:1855-1863.

McAllister, B.S., Haghghat, K. (2007) Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology* **78**:377-396.

Novaes, A.B. Jr., Papalexiou, V., Luczyszyn, S.M., Muglia, V.A., Souza, S.L.S., Taba, M. Jr. (2002a). Immediate implant in extraction socket with acellular dermal matrix graft and bioactive glass: A case report. *Implant Dentistry* **11**: 343-348.

Novaes, A.B. Jr., Pontes, C.C., Souza, S.L., Grisi, M.F. & Taba, M. Jr (2002b) The use of acellular dermal matrix allograft for the elimination of gingival melanin pigmentation: case presentation with 2 years of follow-up. *Practical Procedure and Aesthetic Dentistry* **14**: 619–623; quiz 624.

Novaes, A.B. Jr., Souza, S.L.S. (2001) Acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration: A case report. *Implant Dentistry* **10**: 192-196.

Nowzari, H. & Slots, J. (1994) Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* **21**: 203–210.

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

Pinho, M.N., Roriz, V.L., Novaes, A.B. Jr. (2006) Titanium membranes in prevention of alveolar collapse after tooth extraction. *Implant Dentistry* **15**:53-61.

Pontes, A.E., Pontes, C.C., Souza, S.L., Novaes, A.B. Jr, Grisi, M.F. & Taba, M. Jr (2006) Evaluation of the efficacy of the acellular dermal matrix allograft with partial thickness flap in the elimination of gingival melanin pigmentation. A comparative clinical study with 12 months of followup. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* **18**: 135–143; discussion 143

Roriz, V.M., Souza, S.L.S., Taba, M. Jr., Palioto, D.B., Grisi, M.F.M. (2006) Treatment of Class III furcation defects with expanded polytetrafluoroethylene membrane associated or not with anorganic bone matrix/synthetic cell-binding peptide: A histologic and histomorphometric study in dogs. *Journal of Periodontology* **77**:490-497.

Rossa, M.L., Lima, L.A., Pustiglioni, F.E., Hespanhol, A.M., Kon, S., Grigolli Filho, J. & Novo, N.F. (2006) Sem analyses of bacterial contamination of e-ptfe membranes and GTR clinical results. *Journal of the International Academy of Periodontology* **8**: 115–124.

Schenk, R.K., Buser, D., Hardwick, W.R. & Dahlin, C. (1994) Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the

canine mandible. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **9**: 13–29.

Seibert, J. & Nyman, S. (1990) Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. *Journal of Periodontology* **61**: 157–165.

Simon, B.I., Von Hagen, S., Deasy, M.J., Faldu, M., Resnansky, D. (2000) Changes in alveolar bone height and width following ridge augmentation using bone graft and membranes. *Journal of Periodontology* **71**:1774-1791.

Wainwright, D.J. (1995) Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns* **21**: 243-248.

Woodyard, J.G., Greenwell, H., Hill, M., Drisko, C., Iasella, J.M. & Scheetz, J. (2004) The clinical effect of acellular dermal matrix on gingival thickness and root coverage compared to coronally positioned flap alone. *Journal of Periodontology* **75**: 44–56.

Zubillaga, G., Von Hagen, S., Simon, B.I., Deasy, M.J. (2003) Changes in alveolar bone height and width following post-extraction ridge augmentation using a fixed bioabsorbable membrane and demineralized freeze-dried bone osteoinductive graft. *Journal of Periodontology* **74**:965-975.

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 10 published pages are subject to a charge of USD 160 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. In vitro, in vivo, in situ and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., Ps. for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

5.2. Structure

All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* should include Title Page, Abstract, Main Text and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract: should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information.

Main Text of Original Research Article should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

Introduction: Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and Methods: Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

Discussion: Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Short Communications: Short communications are limited to two printed pages including illustrations and references and need not follow the usual division into material and methods, etc., but should have an abstract.

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support should be acknowledged.

5.3. References

References should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977). A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

- a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.
- b) The order of the items in each reference should be:
 - (i) for journal references:
name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.
 - (ii) for book references:
name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.
- c) Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C.
Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.
- d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).
- c) The title of the paper should be included, without quotation marks.
- f) The journal title should be written in full, italicised, and followed by volume number in bold type, and page numbers.

Examples:

Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* **4**: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of exogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. Protein turnover and lysosome function, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here:

www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it:
<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.