

THIAGO ARRUDA

**CICATRIZAÇÃO INICIAL DE ALVÉOLOS ENXERTADOS COM
GRÂNULOS DE TITÂNIO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM CÃES.**

MARINGÁ

2010

THIAGO ARRUDA

**CICATRIZAÇÃO INICIAL DE ALVÉOLOS ENXERTADOS COM
GRÂNULOS DE TITÂNIO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM CÃES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Araújo

MARINGÁ

2010

THIAGO ARRUDA

Cicatrização inicial de alvéolos enxertados com grânulos de titânio.

Estudo experimental em cães.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia Integrada.

Aprovado em 22 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cleverson Oliveira e Silva

Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Adriane Yaeko Togashi

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Prof. Dr. Maurício Guimarães Araújo

Universidade Estadual de Maringá - UEM

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

*À minha esposa **Leila,***

por ter permanecido ao meu lado, incentivando-me a percorrer este caminho, por compartilhar angústias e dúvidas estendendo sua mão amiga em momentos difíceis. Você foi fundamental na execução deste trabalho. Sem você, tudo teria sido mais difícil.

“Amo como ama o amor. Não conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te é que te amo?”

Fernando Pessoa

*Aos meus pais, **Darci e Márcia,***

obrigado por terem me dado condições de sempre poder ir mais longe em todas as etapas da minha vida. Foi por vocês que cheguei até aqui e é por vocês que sou o que sou hoje. Os meus sinceros agradecimentos.

“Para compreender os pais é preciso ter filhos.”

Sofocleto

*À minha filha **Isabela,***

materialização do meu amor pela minha esposa. O desenvolver desse trabalho foi acompanhado pela espera da sua vinda, e sua chegada trouxe sentimentos que nunca puderam ser vividos antes. Você é hoje a motivação de todo meu esforço.

"O homem mais feliz, rei ou camponês, é o que foi pai em seu lar."

Goethe

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

A Deus,

Porque Ele guia meu caminho, me confortando nos momentos difíceis e colocando pessoas iluminadas na minha vida. Tudo o que sou e tenho é porque o Senhor me deu força, sabedoria e saúde para conquistar. Obrigado Senhor.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador professor Dr. Maurício Araújo.

Obrigado pela oportunidade. Exemplo profissional e de dedicação ao ensino. Posso dizer que é uma grande honra tê-lo como orientador e como um amigo. Sua capacidade de desenvolver conhecimento, de motivar e de procurar sempre o melhor para o trabalho fizeram aumentar ainda mais a minha admiração e respeito. É um grande orgulho ter um orientador como você. A jornada foi árdua, mas o mais importante é que conseguimos superar. Muito, muito obrigado.

Aos professores Dr. Adilson Ramos e Dra. Renata Pascotto, coordenadores do Programa de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da UEM.

O meu reconhecimento pela oportunidade de ter cursado o mestrado neste departamento. O compartilhamento de ideias, conhecimento e filosofias foi fundamental na minha formação profissional. Muito obrigado.

Aos outros professores doutores do departamento com os quais tive contato durante o mestrado: André Gasparetto, Ângelo José Pavan, Edevaldo Tadeu Camarini, Liogi Iwaki Filho, Mirian Marubayashi Hidalgo, Mitsue Fujimaki Hayacibara e Raquel Sano Suga Terada, e demais professores convidados do programa.

Pela oportunidade de conviver durante esses dois anos e pelo conhecimento ensinado. Muito obrigado.

Ao professor de Disciplina de Periodontia da UEM, Dr. Cleverson de Oliveira e Silva.

Profundo conhecimento e profissionalismo, você foi um grande exemplo para mim. Obrigado pelo incentivo, consideração e amizade.

Aos meus amigos e colegas de mestrado: Francisco Carlos L. Barbi, Juliana Nunes Botelho, Luciana Manzotti De Marchi, Marlice Azoia Lukjantchuki Barbosa, Milena Peixoto N. de Sá, Patrícia Tiemi Cawahisa, Paula Cabrini Scheibel, Robson Iralla Rezende e Wellington M. Carvalho.

Foi muito bom conviver com vocês. Obrigado pelo convívio agradável, pelo companheirismo e, acima de tudo, pelo respeito sempre demonstrado por todos vocês. A experiência transmitida por vocês fez com que os caminhos se tornassem mais fáceis. Muito obrigado.

Ao professor Dr. Fabiano Carlos Marson, grande amigo, sócio e verdadeiro irmão. Grande motivador de minha entrada na minha vida acadêmica, exemplo de professor e de motivação. Obrigado pelo apoio, pela orientação e pela pessoa que você é.

Agradeço a toda minha família e amigos que, mesmo distantes, nunca deixaram de marcar presença em minha vida durante esse período e que, assim, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá, muito obrigado.

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

RESUMO

Recentemente, o uso de grânulos de titânio como um material de enxerto para promover formação óssea foi proposto. No entanto, não há informações na literatura sobre o efeito deste material na formação óssea inicial que ocorre durante o processo cicatricial. O objetivo do presente estudo foi avaliar a cicatrização inicial de alvéolos enxertados com grânulos de titânio. Foram utilizados cinco cães da raça Beagle. As raízes mesiais dos terceiros pré-molares superiores foram removidas. Em um lado, um enxerto consistindo de grânulos de titânio foi colocado no alvéolo pós-extração, enquanto que o pré-molar correspondente do outro lado foi deixado cicatrizar sem enxerto. Após um mês de cicatrização, os cães foram sacrificados e amostras de tecido foram obtidas. Os tecidos em cicatrização foram descritos e medidas histométricas foram realizadas. Os achados dos exames histológicos revelaram que após um mês de cicatrização o enxerto de titânio estava bem incorporado no tecido conjuntivo provisório ou no osso entrelaçado recém-formado. As mensurações histométricas mostraram, entretanto, que mais osso mineralizado foi formado no alvéolo sem enxerto do que nos alvéolos enxertados. Portanto, o presente estudo demonstrou que (i) o uso de grânulos de titânio em alvéolos dentários foi conducente com a formação óssea, e (ii) a cicatrização destes alvéolos, no intervalo de um mês, parece estar atrasada em relação ao grupo controle. Mais estudos são necessários para avaliar a formação e remodelação óssea em intervalos maiores de tempo.

Palavras-chave: grânulos de titânio, alvéolo, extração, biomaterial, enxerto, formação óssea.

ABSTRACT

Recently, the use of titanium granules as a graft material to promote bone formation was proposed. There are, however, no data in the literature about the effect of such biomaterial in the early bone formation that occurs during the healing process. The aim of the present study was to evaluate the effect on early bone formation of the placement of titanium granules in fresh extraction sockets. Five beagle dogs were used. The mesial roots of the third maxillary premolars were removed. In one side, a graft consisting of titanium granules was placed in the fresh extraction wound, while the corresponding premolar site in the contra-lateral side was left non-grafted. After 1 month of healing, the dogs were sacrificed and biopsies were obtained. The healing tissues were described and histometric measurements were performed. The findings from the histological examinations revealed that after 1 month of healing the titanium graft was well incorporated into provisional connective tissue or newly-formed woven bone. The histometric measurements showed, however, that more mineralized bone was formed in the non-grafted site than in the grafted sites. The present study demonstrated that (i) the use of titanium granules in alveolar sockets following tooth removal was conducive to bone formation, and (ii) the healing in such sockets, at the 1-month time interval, seemed to be delayed in relation to the control group. More studies are necessary for evaluating the bone formation and remodeling in longer time intervals.

Keywords: titanium granules, extraction socket, biomaterial, grafting, bone formation.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE FIGURAS	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 Amostra	19
2.2 Avaliação histológica	20
2.3 Análise dos dados	21
3 RESULTADOS	22
3.1 Exame clínico	22
3.2 Exame histológico	22
3.2.1 <i>Alvéolos com enxerto de grânulos de titânio</i>	22
3.2.2 <i>Alvéolos com coágulo</i>	23
3.3 Medidas morfométricas	23
4 DISCUSSÃO	25
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS	34
ARTIGO EM INGLÊS	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores médios (DP) das proporções (%) dos diferentes tecidos nos alvéolos enxertados e não enxertados.	35
---	----

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1a - Fotografia clínica ilustrando o enxerto de grânulos de titânio colocado em um alvéolo pós-extração. 36
- FIGURA 1b - Vista clínica do alvéolo com coágulo imediatamente após a extração da raiz mesial. 36
- FIGURA 2a - Sítios cicatrizados com grânulos de titânio, exibindo mucosa queratinizada com coloração acinzentada. 36
- FIGURA 2b - Sítios cicatrizados com coágulo, exibindo mucosa queratinizada com coloração normal. 36
- FIGURA 3 - Microfotografia de um corte do tecido conjuntivo da mucosa de alvéolos enxertados ilustrando o epitélio oral recém-formado. 37
- FIGURA 4 - Microfotografia de um corte vestibulo-lingual representando um alvéolo enxertado ilustrando os grânulos de titânio. 37
- FIGURA 5 - Microfotografia de um corte vestibulo-lingual ilustrando os grânulos que estavam expostos à cavidade oral. 38
- FIGURA 6 - Microfotografia ilustrando os grânulos de titânio observados dentro do tecido conjuntivo provisório e células multinucleadas. 38
- FIGURA 7 - Microfotografia de um corte vestibulo-lingual representando um alvéolo com coágulo. 39

1 - INTRODUÇÃO

O enxerto com osso autógeno tem sido considerado o padrão-ouro devido a sua ausência de mecanismos imunológicos de rejeição, presença de células indiferenciadas e fatores de crescimento, e suas propriedades osteoindutiva e osteocondutiva (para revisão, ver Burchardt 1983; Albrektsson & Johansson 2001; Turhani et al. 2005). Uma desvantagem no uso de osso autógeno corresponde ao processo de obtenção do enxerto que requer uma cirurgia adicional no sítio doador, o que leva a uma maior morbidade pós-operatória (Laurie et al. 1984; Nyström et al. 1993; Strandkvist & Hallman 1998; Block & Kent 1997; Nkenke et al. 2002; Schimming & Schmelzeisen 2004; Nkenke et al. 2004). Além disso, a modelação óssea que ocorre durante o processo de cicatrização no procedimento de enxerto de osso autógeno pode levar a resultados clínicos imprevisíveis em longo prazo (Kahnberg et al. 1989; Nyström et al. 1993, 1995; Widmark et al. 1997). Substitutos ósseos osteocondutivos e não-reabsorvíveis podem, por consequência, ser uma vantagem sobre os enxertos ósseos autógenos (Jónsson & Mjöberg, 2009). Substitutos ósseos evitam o procedimento de remoção do enxerto e podem limitar a modelação pós-operatória do enxerto.

Muitos biomateriais tem sido propostos como substitutos ósseos, como exemplo hidroxiapatita (Simion et al. 1998; Mangano et al. 2003), osso bovino inorgânico (Berglundh & Lindhe 1997; Hallman et al. 2001; Araújo et al. 2008; Araújo et al. 2009), vidro bioativo (Wilson et al. 1981; Moore et al. 2001; Norton & Wilson, 2002) e zircônia (Hisbergues et al. 2009). Recentemente, um biomaterial feito de titânio (Natix™, Tigran Technologies AB, Malmö, Sweden) foi proposto para ser usado em defeitos ósseos (Holmberg et al. 2008). O material consiste de grânulos porosos e irregulares de titânio comercialmente puro de tamanho entre 0.7 a 1.0mm com uma porosidade de aproximadamente 80%, e quando

implantado, os grânulos teoricamente podem imbricar um com outro, criando uma estrutura ininterrupta. O benefício óbvio de usar grânulos de titânio é a sua aclamada biocompatibilidade (Boyan et al. 1996), definida por Williams (1987) como a habilidade de um biomaterial de desempenhar sua função desejada, sem despertar nenhum efeito deletério sistêmico ou local no hospedeiro; e sua capacidade de criar um contato entre a superfície do grânulo e o osso, em um processo similar à osseointegração, que é definido como um contato direto entre o osso vivo e a superfície do implante (Albrektsson et al. 1981; Schroeder et al. 1981). Outro importante aspecto é a osteocondutividade do titânio, que é a habilidade de um material de agir como um arcabouço passivo suportando uma nova formação de osso e capilares (Urist, 1965).

O uso de grânulos de titânio como um material de enxerto foi avaliado em alguns poucos estudos. Alffram et al. (2007) descreveram em 5 pacientes, acompanhados entre 9 e 15 anos, uma técnica cirúrgica para a fixação de uma prótese de titânio de cabeça de fêmur com preenchimento dos espaços com grânulos de titânio entre a prótese e o osso. Os autores observaram que todas as próteses estavam assintomáticas e estáveis por todo o período de acompanhamento. Autópsias e tomografias computadorizadas mostraram que os grânulos se tornaram incorporados pelo osso do hospedeiro. Turner et al. (2007) avaliaram histologicamente o uso de grânulos de titânio porosos para fixação de uma prótese de cabeça de fêmur em um modelo de hemiartroplastia. Após seis meses de cicatrização, radiografias e micrografias eletrônicas de varredura demonstraram a formação de um novo osso ao redor dos grânulos, e exames histológicos revelaram a formação de osso lamelar através dos grânulos de titânio em continuidade com o córtex circundante, resultando na formação de um manto integrado de osso e titânio ao redor das próteses. Somente um estudo (Bystedt & Rasmusson, 2008) foi descrito na literatura avaliando a taxa de sobrevivência de implantes instalados em

seios maxilares enxertados com grânulos de titânio. Dezesesseis pacientes foram incluídos e vinte e três implantes foram instalados. Quando a estabilidade primária era possível, os implantes eram instalados na mesma sessão do levantamento de seio maxilar. Os resultados demonstraram que após 12-36 meses da aplicação de carga protética, uma taxa de sobrevivência de 87% foi alcançada.

Não há na literatura, entretanto, evidências histológicas das reações teciduais iniciais que ocorrem após o enxerto com grânulos de titânio em alvéolos após extração. Estas reações podem influenciar o resultado final da cicatrização após procedimentos de enxerto (Araújo et al. 2010). Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do enxerto de grânulos de titânio na formação óssea inicial no alvéolo após extração dentária. Para isto foi utilizado um modelo experimental fartamente estudado: o alvéolo dentário após extração (Araújo & Lindhe 2005; Araújo et al. 2008; Trombelli et al. 2008).

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Amostra

O Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá aprovou o protocolo de pesquisa (nº 029/2008). Foram utilizados cinco cães Beagle com aproximadamente um ano de idade e pesando 10 kg cada, sistemicamente saudáveis e sem doença periodontal. Durante os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com administração intravenosa de Ketamina (Ketamina Agener[®] 10%, 8ml/kg, União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, Brasil) e Xylazina (Rompun[®] 0,1 ml/kg, Bayer do Brasil S/A, São Paulo, Brasil).

Incisões na crista e no sulco gengival foram feitas na região dos terceiros pré-molares em ambos os lados da maxila. Retalhos de espessura total vestibular e lingual foram elevados para expor a crista óssea alveolar. O canal das raízes distais dos terceiros pré-molares superiores foi tratado e preenchido com guta-percha (Dentsply, Maillefer, Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, Brasil). Os pré-molares foram subsequentemente hemiseccionados com o uso de brocas diamantadas (KG Sorensen 3113, São Paulo, Brasil). As raízes mesiais foram cuidadosamente removidas com o uso de alavancas. Por terem um maior volume na maxila, os alvéolos das raízes mesiais foram escolhidos para serem usados. As raízes distais foram mantidas para preservar a forma do rebordo alveolar. Os alvéolos foram selecionados aleatoriamente para receber um dos seguintes tratamentos: (i) enxerto de grânulos de titânio (Natix[™], Tigran Technologies AB, Malmö, Suécia), até o total preenchimento do alvéolo (Fig. 1a), e (ii) coágulo sanguíneo (Fig. 1b). Os retalhos vestibular e lingual foram reposicionados para cobrir a entrada dos alvéolos. Os retalhos foram mantidos em posição com suturas interrompidas (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil). As

suturas foram removidas após 10 dias. Limpeza dentária mecânica foi realizada de 1 a 3 vezes por semana.

Após um mês de cicatrização, os cães foram sacrificados com uma overdose de Ketamina e perfundidos através das artérias carótidas com um fixador contendo uma mistura de glutaraldeído a 5% e formaldeído a 4% (Karnovsky, 1965). As maxilas foram cortadas em blocos de amostra de tecido contendo os sítios experimentais. Os alvéolos dos pré-molares foram dissecados usando uma serra diamantada (Exakt[®] Apparatebau, Norderstedt, Hamburg, Alemanha), e subsequentemente as amostras foram desidratadas em gradientes de etanol, infiltradas com metacrilato (Technovits 7200 VLC-resin; Kulzer, Friedrichsdorf, Alemanha), polimerizadas e seccionadas no plano vestibulo-lingual usando um dispositivo de corte por desgaste (Exakt[®], Apparatebau). De cada amostra de tecido, um corte histológico vestibulo-lingual representando a área central do alvéolo foi preparado. Os cortes foram reduzidos à espessura de aproximadamente 20µm por micro-desgaste e polimento. Os cortes foram corados com corante para fibrina de Ladewig.

2.2 - Avaliação histológica

Os exames histológicos foram realizados em um microscópio Carl Zeiss[®] Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Alemanha) equipado com um sistema de captura de imagem (AxioCam[®]; Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e um software Axiovision de análise (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Alemanha).

A composição do tecido recém-formado no alvéolo pós-extração foi determinada usando um procedimento de contagem de pontos. Microfotografias digitais (com aumento de 100x) foram tiradas de toda a extensão dos alvéolos. Subsequentemente, essas microfotografias

foram abertas em um programa de edição de imagem Adobe Photoshop CS (Adobe[®], San Jose, Califórnia, EUA). Uma grade composta de 100 pontos (modificada de Schroeder & Münzel-Pedrazzoli, 1973) foi digitalmente sobreposta sobre cada microfotografia do tecido, e então foi determinada a porcentagem de área total do alvéolo ocupada por (i) tecido conjuntivo, (ii) novo osso mineralizado e (iii) osso medular. Além disso, a porcentagem de área ocupada pelos grânulos de titânio (biomaterial) nos alvéolos enxertados também foi calculada.

2.3 - Análise dos dados

Valores médios e desvios-padrões das diferentes variáveis foram calculados usando o cão como unidade estatística. Resultados histológicos foram obtidos em porcentagens médias (\pm DP). As diferenças entre os grupos teste e controle foram analisadas usando o teste *t* de Student para observações pareadas. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando *p* era $<0,05$.

3 - RESULTADOS

3.1 - Exame clínico

A cicatrização ocorreu sem eventos adversos em todos os cães. No momento do sacrifício, a entrada de todos os alvéolos estava fechada por um tecido gengival saudável e queratinizado. Além disso, nos sítios experimentais em que os grânulos foram enxertados, a mucosa queratinizada exibiu uma coloração acinzentada (Fig. 2a, 2b).

3.2 - Exame histológico

Em ambos os grupos, o tecido conjuntivo da mucosa cobrindo os alvéolos apresentou-se rico em células mesenquimais, estruturas vasculares e aglomerados de células inflamatórias. Um epitélio oral recém-formado exibindo vários prolongamentos epiteliais foi observado revestindo o tecido conjuntivo (Fig. 3).

3.2.1 - Alvéolos com enxerto de grânulos de titânio

Em todos os sítios enxertados (Fig. 4), foi possível identificar grânulos de titânio no tecido conjuntivo e dentro do alvéolo. Os grânulos apresentaram tamanhos que variavam entre 0.7 e 1 mm em seu longo eixo e exibiram frequentemente muitos poros. Na porção supra-alveolar da mucosa, os grânulos estavam circundados por um denso tecido conjuntivo coberto com epitélio oral. Em uma amostra (Fig. 5), alguns grânulos estavam expostos na cavidade bucal e um infiltrado inflamatório foi observado no tecido conjuntivo adjacente.

Os alvéolos enxertados estavam ocupados por tecido de granulação, tecido conjuntivo provisório, osso entrelaçado e grânulos de titânio. O biomaterial foi observado principalmente nas porções coronal e média dos alvéolos. Na porção coronal do alvéolo, o biomaterial estava

incluso em um tecido conjuntivo rico em células mesenquimais, fibras colágenas, vasos e pequenos aglomerados de células inflamatórias, enquanto que na porção média do alvéolo os grânulos estavam frequentemente envoltos por um osso entrelaçado recém-formado. Células multinucleadas foram ocasionalmente observadas na superfície do biomaterial (Fig. 6). A superfície do biomaterial apresentava, raramente, células inflamatórias. A porção apical do alvéolo, que frequentemente apresentou-se sem grânulos de titânio, estava ocupada principalmente por osso entrelaçado.

3.2.2 - *Alvéolos com coágulo*

Os sítios com coágulo (alvéolos não enxertados) estavam ocupados por osso entrelaçado e tecido conjuntivo provisório. O tecido conjuntivo provisório remanescente, composto por fibras de tecido conjuntivo densamente agrupadas, células mesenquimais e estruturas vasculares, foi observado na porção central dos alvéolos. Apical e lateralmente ao tecido conjuntivo provisório, o osso entrelaçado recém-formado estendia-se das paredes ocupando a maior parte do alvéolo (Fig. 7). As projeções ósseas circundavam um tecido conjuntivo com fibras colágenas organizadas em um padrão entrelaçado e estruturas vasculares. As trabéculas de osso imaturo estavam margeadas por osteoblastos. Ocasionalmente, osteoclastos isolados, encontrados em baías de reabsorções, podiam ser observados na superfície do osso recém-formado próximo às paredes dos alvéolos. Frequentemente, a região apical dos alvéolos estava em contato direto com o seio maxilar.

3.3 - **Medidas morfométricas**

A porcentagem média de área ocupada pelos vários tecidos e pelos grânulos de titânio nos alvéolos está presente na Tabela 1. A proporção de tecido conjuntivo nos alvéolos enxertados foi de $59,4 \pm 15,1\%$ e nos alvéolos controle de $30,3 \pm 8,4\%$. O osso mineralizado recém-

formado ocupou $40,4 \pm 14,9\%$ da área do alvéolo enxertado. O valor correspondente nos alvéolos não enxertados foi de $58,7 \pm 4,4\%$. A proporção de medula óssea foi de $0,2 \pm 0,5\%$ nos sítios com grânulos e $11,0 \pm 5,7\%$ nos sítios com apenas coágulo. Os grânulos de titânio ocuparam $33,2 \pm 7,7\%$ da área dos alvéolos enxertados. Para os três parâmetros (tecido conjuntivo, osso mineralizado recém-formado e osso medular), as diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes.

4 - DISCUSSÃO

No presente estudo, os alvéolos foram enxertados com grânulos de titânio imediatamente após extração dentária. A cicatrização ocorreu por um mês e amostras de tecido foram obtidas para análise histológica. Observou-se que o biomaterial nos alvéolos enxertados estava bem integrado tanto ao tecido conjuntivo provisório quanto ao osso entrelaçado recém-formado. As medidas histométricas mostraram, entretanto, que os sítios enxertados exibiram uma quantidade significativamente menor de novo osso que os alvéolos não enxertados.

Após um mês de cicatrização, os alvéolos não enxertados estavam quase completamente ocupados por osso entrelaçado e a quantidade de osso mineralizado era de aproximadamente 59%. Esta observação está de acordo com os estudos prévios avaliando a cicatrização de alvéolos em um modelo similar (Araújo & Lindhe 2005; Cardaropoli et al. 2003). Nestes estudos, a cicatrização dos alvéolos em pré-molares inferiores de cães foi avaliada em cortes preparados em planos mesio-distal e vestibulo-lingual. Os autores observaram que entre a 2ª e 4ª semanas de cicatrização, o tecido conjuntivo provisório era gradualmente substituído por um osso entrelaçado até o nível da crista óssea alveolar. Ao longo dessas semanas, o osso entrelaçado era gradualmente substituído (remodelado) por tipos mais maduros de tecido ósseo: osso lamelar e osso medular. Além disso, as paredes alveolares externas foram modeladas e a dimensão total do alvéolo foi reduzida. Sendo assim, a maior atividade da mineralização inicial parece ocorrer no final do primeiro mês de cicatrização.

Os alvéolos enxertados com grânulos de titânio exibiram uma porcentagem menor de área ocupada por osso mineralizado do que os alvéolos que não receberam enxerto. Além disso, também foi observado que a porções mais apicais dos alvéolos em que o biomaterial estava

ausente, a quantidade de osso entrelaçado parece ser similar aos sítios não enxertados. Por outro lado, a proporção de tecido conjuntivo provisório foi maior nos sítios enxertados. Isto tem sido demonstrado em diversos estudos experimentais que durante a cicatrização de alvéolos pós-extração, a formação de osso entrelaçado é precedida pela formação de um tecido conjuntivo provisório (Amler 1969; Cardaropoli et al. 2003; Araújo & Lindhe 2005; Trombelli et al. 2008). Deste modo, o presente estudo sugere que, após um mês de cicatrização, o enxerto do alvéolo com grânulos de titânio imediatamente após a extração dentária atrasou o processo de cicatrização quando comparado com os sítios controle não enxertados (grupo coágulo).

Nas porções coronal e média dos alvéolos enxertados, o tecido conjuntivo provisório que circundava a maior parte dos grânulos de titânio apresentava ocasionalmente células multinucleadas. Essas células multinucleadas podem representar osteoclastos na tentativa de reabsorver o biomaterial. Essa suposição está de acordo com o estudo de Araújo et al. 2010. Os autores observaram que células multinucleadas ao redor de biomateriais nas fases iniciais de processo de cicatrização eram células TRAP-positivas. Muitos estudos que avaliaram a reação tecidual à implantação de biomateriais também observaram que uma cicatrização mais lenta parecia estar relacionada à presença de células multinucleadas (Cardaropoli et al. 2005; Araújo et al. 2008). Além disso, quando a superfície do biomaterial estava livre de células inflamatórias, osso entrelaçado era frequentemente depositado em sua superfície. Parece que o atraso na cicatrização observado nesse estudo pode ter sido influenciado por essas células multinucleadas que ocorreram nos tecidos que abrigavam os grânulos de titânio.

É relevante reconhecer que a reação tecidual ao titânio pode variar de acordo com sua forma. Suzuki & Frangos (2000) reportaram que embora partículas de titânio possam induzir a

formação de células multinucleadas/osteoclastos, a superfície do titânio osseointegra sem intercorrências ao tecido ósseo. Recentemente, a formação óssea inicial ao redor de implantes de titânio com superfícies lisa e tratada foi descrita por Abrahamsson et al. 2004. Os autores descreveram a cicatrização entre 2 horas até 12 semanas após a instalação dos implantes. Os resultados indicaram que nenhuma reação de corpo estranho em direção à superfície do implante ocorreu em qualquer período de tempo.

A alta capacidade de osteocondução do titânio é bem conhecida (Urist, 1965). Muitos estudos demonstraram o alto índice de sucesso na osseointegração do uso de fixações de titânio na implantodontia (para revisão, ver Albrektsson et al. 1981). Além disso, está bem estabelecido que para que uma fixação de titânio favoreça uma osseointegração previsível é essencial que se alcance a estabilidade primária durante as fases iniciais de cicatrização (Turner et al. 2007). No presente experimento, o osso entrelaçado recém-formado foi observado dentro dos poros e na superfície dos grânulos. Assim, sugere-se que os grânulos de titânio puderam alcançar uma estabilidade mecânica inicial devido ao fato de estarem protegidos de qualquer tipo de deslocamento mecânico pelas paredes ósseas dos alvéolos.

Novo osso se formou, em quantidades comparáveis, na porção apical do grupo teste (grânulos de titânio) e do grupo controle (coágulo), enquanto que nas porções remanescentes dos alvéolos enxertados, uma menor quantidade de osso imaturo pode ser encontrada circundando os grânulos. Araújo & Lindhe (2009) afirmaram que há razões para supor que após extração dentária e colocação de enxerto, o fluxo subsequente de sangue na porção apical do alvéolo forçaria o biomaterial em direção coronal. Dessa forma, um vazio seria então criado na porção apical do alvéolo que alojaria apenas um coágulo. Isto poderia explicar porque a porção apical

do alvéolo teste apresentou, aparentemente, quantidades de osso semelhante aos alvéolos não enxertados.

No presente estudo, a mucosa do rebordo exibiu, frequentemente, uma coloração acinzentada na região da entrada do alvéolo cicatrizado. Isso pode ser importante se tratando de áreas estéticas, onde a coloração cinza pode afetar o resultado final. A presença de grânulos de titânio no tecido conjuntivo do rebordo acima do nível da crista óssea é obviamente a razão para tal coloração. Esta observação está de acordo com o estudo de Alffram et al. 2007. Os autores usaram grânulos de titânio em procedimento de reconstrução de quadril. Eles observaram que o manejo do material e sua distribuição e retenção na posição desejada era difícil.

O presente estudo demonstrou que o uso de grânulos de titânio em defeitos contido por paredes (alvéolo dentário) foi conducente com a formação óssea. Este estudo, entretanto, foi de curta duração. Mais estudos são necessários para avaliar a formação e remodelação óssea em períodos maiores de tempo. Também é necessário em longos períodos de cicatrização verificar o efeito do enxerto na modelação das paredes do alvéolo dentário. Seria importante reconhecer o potencial de tal material em preservar as dimensões do alvéolo após extração dentária. Além disso, o osso aumentado com grânulos de titânio deve ser testado como um local apropriado para instalação de implantes.

REFERÊNCIAS

1. ABRAHAMSSON, I.; BERGLUNDH, T.; LINDER, E.; LANG, N.P.; LINDHE, J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, v. 15, p. 381-392, 2004.
2. ALBREKTSSON, T.; BRANEMARK, P.I.; HANSSON, H.A.; LINDSTRÖM, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, v. 52, p. 155-170, 1981.
3. ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, v. 10, n. 2, p. 96-101, Oct. 2001.
4. ALFFRAM, P.A.; BRUCE, L.; BJURSTEN, L.M.; URBAN, R.M.; ANDERSSON, G.B.J. Implantation of the femoral stem into a bed of titanium granules using vibration. A pilot study of a new method for prosthetic fixation in 5 patients followed for up to 15 years. *Upsala Journal of Medical Sciences*, v. 112, p. 175-81, 2007.
5. AMLER, M.H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology*, v. 27, p. 309-318, 1969.
6. ARAÚJO, M.G.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Dynamics of Bio-Oss® Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, v. 21, p. 55-64, 2010.
7. ARAÚJO, M.G.; LINDER, E.; LINDHE, J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research*, v. 20, p. 1-6, 2009.
8. ARAÚJO, M.G.; LINDER, E.; WENNSTRÖM, J.L.; LINDHE J. The influence of Bio-Oss collagen on healing of an extraction socket - An experimental study in the dog. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, v. 28, n. 2, p. 123-135, 2008.
9. ARAÚJO, M.G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 32, p. 212-218, 2005.

10. ARAÚJO, M.G.; LINDHE, J. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, v. 20, p. 545-549, 2009.
11. BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, v. 8, p. 117-124, 1997.
12. BLOCK, M.S.; KENT, J.N. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 55, n. 11, p. 1281-6, 1997.
13. BOYAN, B.D.; HUMMERT, T.W.; DEAN, D.D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, v. 17, n. 2, p. 137-46, 1996.
14. BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 174, p. 28-42, 1983.
15. BYSTEDT, H.; RASMUSSEN, L. Porous Titanium Granules Used as Osteoconductive Material for Sinus Floor Augmentation: A Clinical Pilot Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v. 23, p. 1-5, Jul. 2008.
16. CARDAROPOLI, G.; ARAÚJO, M.G.; HAYACIBARA, R.; SUKEKAVA, F.; LINDHE, J. Healing of extraction sockets and surgically produced – augmented and non-augmented – defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 32, p. 435-440, 2005.
17. CARDAROPOLI, G.; ARAÚJO, M.G.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 30, p. 809-818, 2003.
18. HALLMAN, M.; CEDERLUND, A.; LINDSKOG, S.; LUNDGREN, S.; SENNERBY, L. A clinical histologic study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrin glue for maxillary sinus floor augmentation. Results after 6 to 8 months of healing. *Clinical Oral Implants Research*, v. 12, p. 135-143, 2001.
19. HISBERGUES, M.; VENDEVILLE, S.; VENDEVILLE, P. Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 88, n. 2, p. 519-29, 2009.

20. HOLMBERG, L.; FORSGREN, L.; KRISTERSON, L. Porous titanium granules for implant stability and bone regeneration - a case followed for 12 years. *Upsala Journal of Medical Sciences*, v. 113, n. 2, p. 217-20, 2008.

21. JÓNSSON, B.; MJÖBERG, B. Surgical treatment of depression fractures of the lateral tibial plateau using porous titanium granules. *Upsala Journal of Medical Sciences*, v. 114, p. 52-54, 2009.

22. KAHNBERG, K.E.; NYSTROM, E.; BARTHOLDSSON, L. Combined use of bone grafts and Brånemark fixtures in the treatment of severely resorbed maxillae. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v. 4, n. 4, p. 297-304, 1989.

23. KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 27, p. 137A-138A, 1965.

24. LAURIE, S.W.S.; KABAN, L.B.; MULLIKEN, J.B.; MURRAY, J.E. Donor site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 73, p. 933-938, 1984.

25. MANGANO, C.; BARTOLUCCI, E.G.; MAZZOCCO, C. A new porous hydroxyapatite for promotion of bone regeneration in maxillary sinus augmentation: clinical and histologic study in humans. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v. 18, p. 23-30, 2003.

26. MOORE, W.R.; GRAVES, S.E.; BAIN, G.I. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ Journal of Surgery*, v. 71, n. 6, p. 354-61, 2001.

27. NKENKE, E.; RADESPIEL-TRÖGER, M.; WILTFANG, J.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; WINKLER, G.; NEUKAM, F.W. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study *Clinical Oral Implants Research*, v. 13, p. 514-521, 2002.

28. NKENKE, E.; WEISBACH, V.; WINCKLER, E.; KESSLER, P.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; WILTFANG, J.; NEUKAM, F.W. Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: A prospective study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 33, p. 157-163, 2004.

29. NORTON, M.R.; WILSON, J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v. 17, p. 249-257, 2002.
30. NYSTRÖM, E.; KAHNBERG, K.E.; GUNNE, J. Bone grafts and Brånemark implants in the treatment of the severely resorbed maxilla: a 2-year longitudinal study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v. 8, p. 45-53, 1993.
31. NYSTRÖM, E.; LEGRELL, P.E.; FORSSELL, A.; KAHNBERG, K.E. Combined use of bone grafts and implants in the severely resorbed maxilla. Postoperative evaluation by computed tomography. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 24, n. 1, p. 20-25, 1995.
32. SCHIMMING, R.; SCHMELZEISEN, R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 62, n. 6, p. 724-9, 2004.
33. SCHROEDER, A.; VAN DER ZYPEN, E.; STICH, H.; SUTTER, F. The reaction of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *Journal of Maxillofacial Surgery*, v. 9, p. 15-25, Feb. 1981.
34. SCHROEDER, H.E.; MÜNDEL-PEDRAZZOLI, S. Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue. *Journal of Microscopy*, v. 99, p. 301-329, 1973.
35. SIMION, M.; JOVANOVIĆ, S.A.; TRISI, P.; SCARANO A.; PIATTELLI, T. Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, v. 18, p. 8-23, 1998.
36. STRANDKVIST, T.; HALLMAN, M. Augmentation of edentulous severely resorbed maxillae by Le Fort 1 procedure for later placement of endosteal implants. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 26, p. 183, 1998.
37. SUZUKI, R.; FRANGOS, J.A. Inhibition of Inflammatory Species by Titanium Surfaces. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 1, n. 372, p. 280-289, 2000.
38. TROMBELLI, L.; FARINA, R.; MARZOLA, A.; BOZZI, L.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 35, p. 630-639, 2008.

39. TURHANI, D.; WEIßENBÖCK, M.; WATZINGER, E.; YERIT, K.; CVIKL, B.; EWERS, R.; THURNHER, D. In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, V. 34, p. 543–550, 2005.
40. TURNER, T.M.; URBAN, R.M.; HALL, D.J.; ANDERSSON, G.B.J. Bone ingrowth through porous titanium granulate around a femoral stem. *Upsala Journal of Medical Sciences*, v. 112, n. 2, p. 191-197, 2007.
41. URIST, M.R. Bone formation by autoinduction. *Science*, v. 150, p. 893-898, 1965.
42. WIDMARK, G.; ANDERSSON, B.; IVANOFF, C.J. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants. Presentation of surgical method. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 26, n. 2, p. 106-9, Apr. 1997.
43. WILLIAMS, D.F. *Definitions in biomaterials: progress in biomedical engineering*. Amsterdam: Elsevier, 1987.
44. WILSON, J.; PIGOTT, G.H.; SCHOEN, F.J.; HENCH, L.L. Toxicology and biocompatibility of bioglasses. *Journal of Biomedical Material Research*, v. 15, p. 805-817, 1981.

ANEXOS

TABELA

Tabela 1 - Valores médios (DP) das proporções (%) dos diferentes tecidos nos alvéolos enxertados e não enxertados.

	Grânulos de titânio	Coágulo	Teste <i>t</i>
Tecido conjuntivo	59,4 (15,1)	30,3 (8,4)	0,0237*
Novo osso	40,4 (14,9)	58,7 (4,4)	0,0436*
Osso medular	0,2 (0,5)	11,0 (5,7)	0,0078*

» o biomaterial ocupou $33,2 \pm 7,7\%$ da área dos alvéolos enxertados.

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

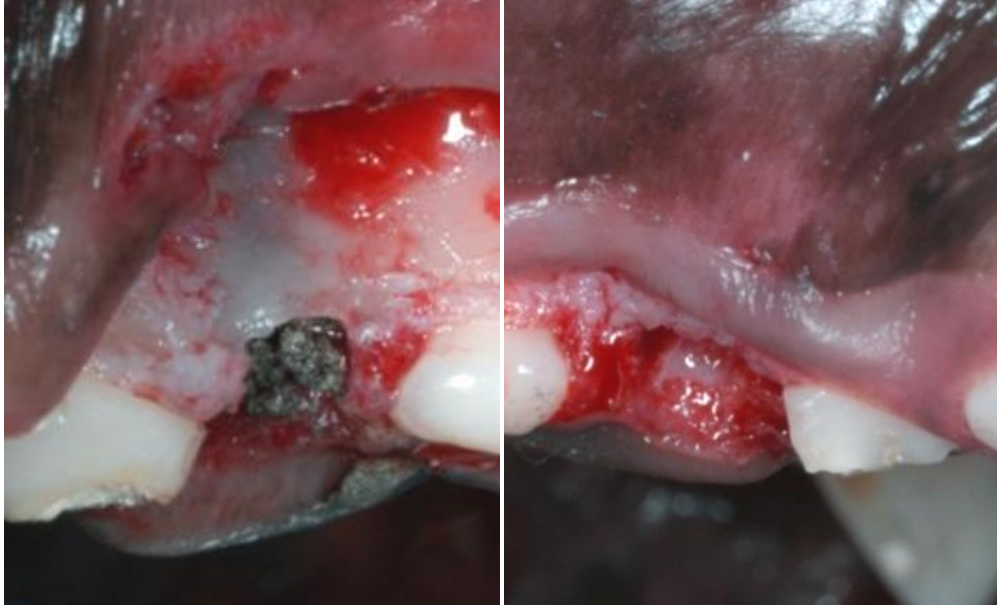
FIGURAS

Figura 1a - Fotografia clínica ilustrando o enxerto de grânulos de titânio colocado em um alvéolo pós-extração.

Figura 1b - Vista clínica do alvéolo com coágulo imediatamente após a extração da raiz mesial.

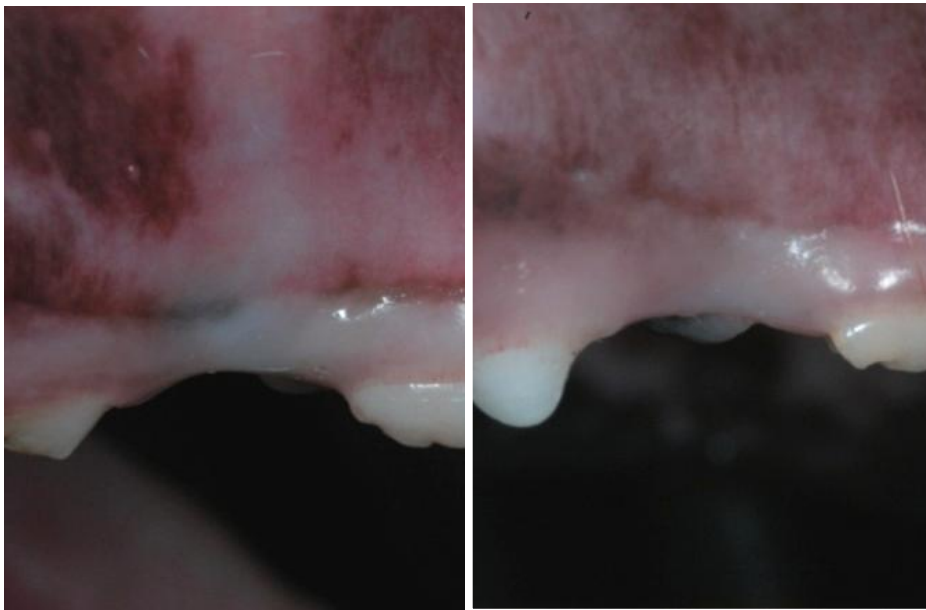


Figura 2a - Fotografias clínicas ilustrando os aspectos da mucosa. Nos sítios com grânulos de titânio, a mucosa queratinizada exibiu uma coloração acinzentada.

Figura 2b - Sítios com coágulo exibindo uma coloração normal da mucosa queratinizada.

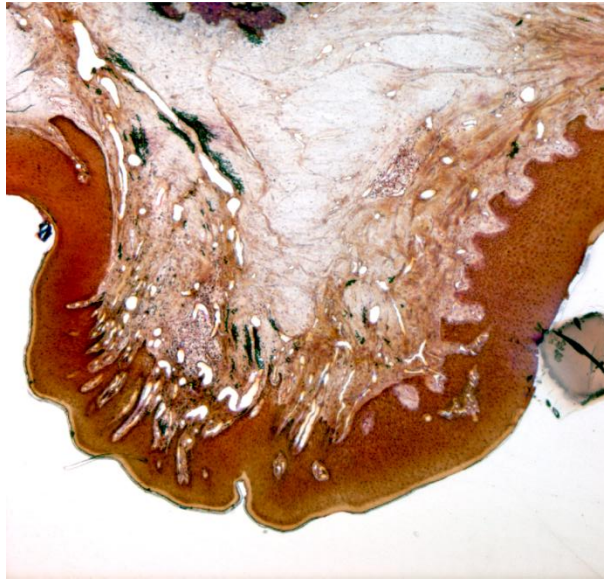


Figura 3 - Microfotografia ilustrando um corte do tecido conjuntivo da mucosa de alvéolos enxertados. Um epitélio oral recém-formado exibindo vários prolongamentos epiteliais foi observado margeando o tecido conjuntivo (corante para fibrina de Ladewig; aumento 20x).

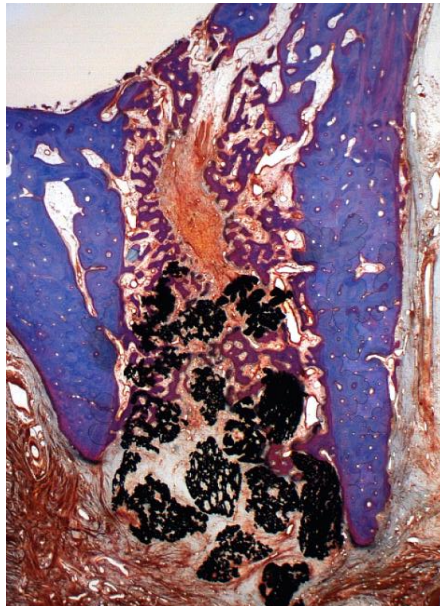


Figura 4 - Microfotografia de um corte vestibulo-lingual representando um alvéolo enxertado. Note que as porções central e marginal do alvéolo estavam ocupadas por grânulos de titânio. Na porção supra-alveolar da mucosa, os grânulos estavam circundados por um tecido conjuntivo denso coberto por um epitélio oral (corante para fibrina de Ladewig; aumento 10x).

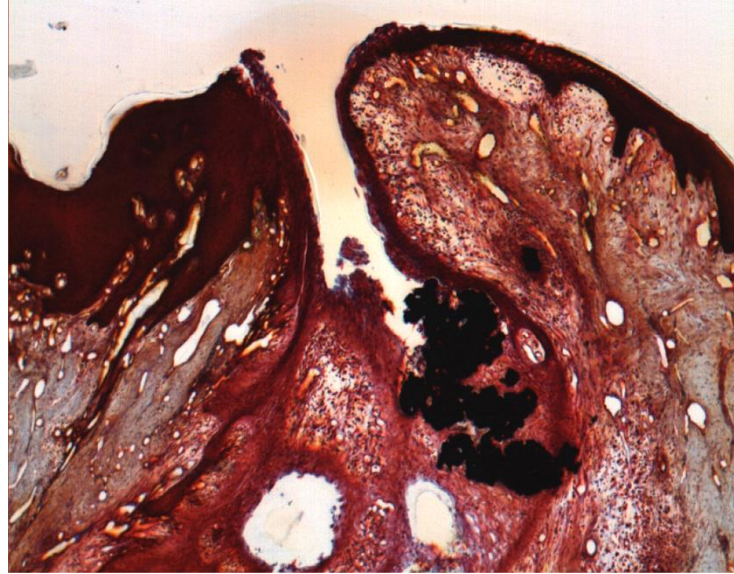


Figura 5 - Microfotografia de um corte vestibulo-lingual ilustrando os grânulos que estavam expostos (uma amostra) à cavidade oral. Um infiltrado inflamatório foi observado no tecido conjuntivo circunjacente (corante para fibrina de Ladewig; aumento 100x).

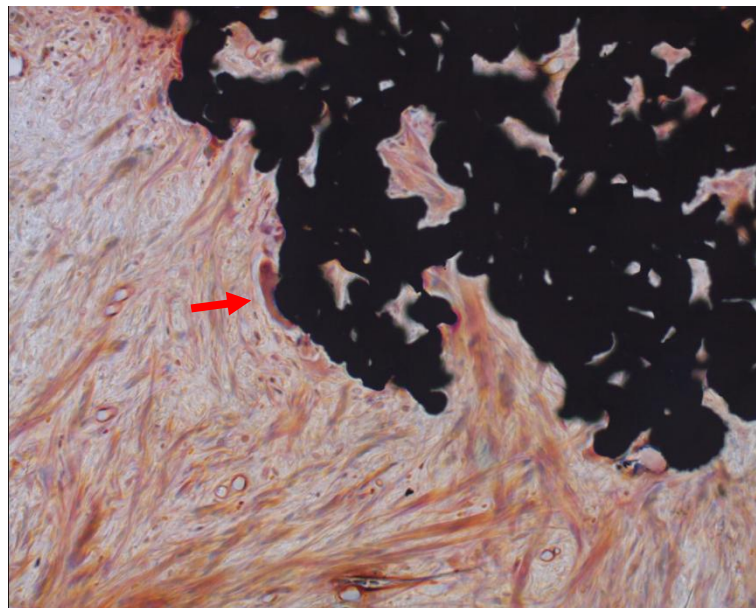


Figura 6 - Microfotografia ilustrando os grânulos de titânio observados dentro do tecido conjuntivo provisório. Note a presença de células multinucleadas na superfície do biomaterial (corante para fibrina de Ladewig; aumento 200x).

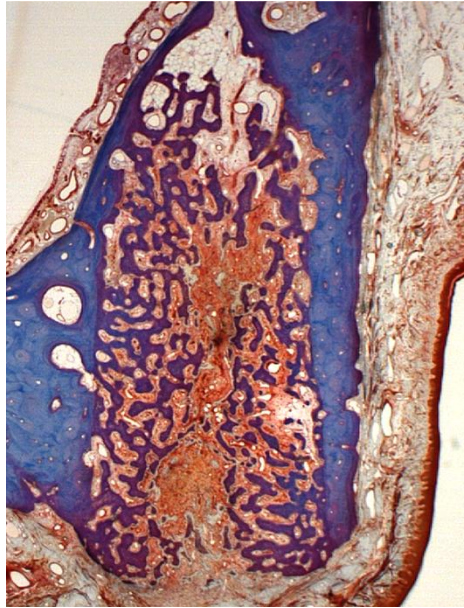


Figura 7 - Microfotografia de um corte vestibulo-lingual representando um alvéolo com coágulo. O local da extração nesse período de tempo (1 mês) está dominado por um osso entrelaçado recém-formado e tecido conjuntivo provisório (corante para fibrina de Ladewig; aumento 10x).

Artigo em inglês, escrito de acordo com as normas da revista *Clinical Oral Implants Research*.

**Early healing of alveolar sockets grafting with titanium granules.
An experimental study in dogs.**

Thiago Arruda¹, Maurício G. Araújo¹, Lars Rasmusson², Jan Lindhe³.

¹ Department of Dentistry, State University of Maringá, PR, Brazil.

² Department of Oral Surgery, Institute of Odontology, The Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden.

³ Department of Periodontology, Institute of Odontology, The Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden.

Correspondence to:

Dr. Mauricio G. Araújo

Rua Silva Jardim, 49/03, 87013-010

Maringá, Paraná

Brazil

Tel/Fax: +55 44 3224 6444

E-mail: odomar@hotmail.com

Early healing of alveolar sockets grafting with titanium granules.

An experimental study in dogs.

ABSTRACT

Recently, the use of titanium granules as a graft material to promote bone formation was proposed. There are, however, no data in the literature about the effect of such biomaterial in the early bone formation that occurs during the healing process. The aim of the present study was to evaluate the effect on early bone formation of the placement of titanium granules in fresh extraction sockets. Five beagle dogs were used. The mesial roots of the third maxillary premolars were removed. In one side, a graft consisting of titanium granules was placed in the fresh extraction wound, while the corresponding premolar site in the contra-lateral side was left non-grafted. After 1 month of healing, the dogs were sacrificed and biopsies were obtained. The healing tissues were described and histometric measurements were performed. The findings from the histological examinations revealed that after 1 month of healing the titanium graft was well incorporated into provisional connective tissue or newly-formed woven bone. The histometric measurements showed, however, that more mineralized bone was formed in the non-grafted site than in the grafted sites. The present study demonstrated that (i) the use of titanium granules in alveolar sockets following tooth removal was conducive to bone formation, and (ii) the healing in such sockets, at the 1-month time interval, seemed to be delayed in relation to the control group. More studies are necessary for evaluating the bone formation and remodeling in longer time intervals.

Keywords: titanium granules, extraction socket, biomaterial, grafting, bone formation.

INTRODUCTION

Grafting with autogenous bone has been considered a gold standard due to lack of immunological rejection mechanisms, presence of stem cells and growth factors, and its osteoinductive and osteoconductive properties (for review, see Burchardt 1983; Albrektsson & Johansson 2001; Turhani et al. 2005). One disadvantage in using autogenous bone corresponds to the harvesting procedure that requires additional surgery at the donor site, which may lead to postoperative morbidity (Laurie et al. 1984; Nyström et al. 1993; Strandkvist & Hallman 1998; Block & Kent 1997; Nkenke et al. 2002; Schimming & Schmelzeisen 2004; Nkenke et al. 2004). In addition, bone modeling that occurs during the healing process on the autogenous bone graft procedure may lead to unpredictable long-term clinical outcomes (Kahnberg et al. 1989; Nyström et al. 1993, 1995; Widmark et al. 1997). Nonresorbable, osteoconductive bone substitutes may therefore be an advantage over autogenous bone grafts (Jónsson & Mjöberg, 2009). Bone substitutes avoid the graft-harvesting operation and may limit postoperative graft modeling.

Several biomaterials have been proposed as bone substitutes, e.g. hydroxyapatite (Simion et al. 1998; Mangano et al. 2003), anorganic bovine bone (Berglundh & Lindhe 1997; Hallman et al. 2001; Araújo et al. 2008; Araújo et al. 2009), bioactive glass (Wilson et al. 1981; Moore et al. 2001; Norton & Wilson, 2002) and zirconia (Hisbergues et al. 2009). Recently, a biomaterial made of titanium (Natix™, Tigran Technologies AB, Malmö, Sweden) was proposed to be used in bone defects (Holmberg et al. 2008). The material consists of irregular and porous granules of commercially pure titanium sized between 0.7-1.0 mm with an open porosity of approximately 80%, and when implanted, the granules theoretically could interlock with each other, creating an uninterrupted structure. The obvious benefit of using

titanium granule is its acclaimed biocompatibility (Boyan et al. 1996), defined by Williams (1987) as the ability of a biomaterial to perform its desired function, without eliciting any undesirable local or systemic effects in the host; and its capacity to create a contact between the granule surface and the bone, in a similar process to osseointegration, which is defined as the direct contact between living bone and a load-carrying implant (Albrektsson et al. 1981; Schroeder et al. 1981). Another important aspect is the titanium osteoconductivity, which is the ability of the material to act as passive scaffolding that supports new bone formation ingrowth of capillaries and bone (Urist, 1965).

The use of titanium granules as graft material was evaluated in few studies. Alffram et al. (2007) described in 5 patients followed between 9 and 15 years a surgical technique for the fixation of titanium hip stem prostheses by filling the interspaces between the stem and the bone with titanium granules. The authors observed that all stems were asymptomatic for the whole follow up period and the prostheses remained stable. Autopsy and computer tomography showed that the granules became incorporated by the host bone. Turner et al. (2007) evaluated histologically the use of porous titanium granules for cementless fixation of a hip replacement femoral stem in a hemiarthroplasty model. After 6 months of healing, radiographs and scanning electron micrographs demonstrated new bone formation around the granules and histological examination revealed lamellar bone formation through the titanium granules in continuity with the surrounding cortex resulting in the formation of an integrated mantle of bone and titanium granulate around the prosthesis. Only one study was performed in the mouth (Bystedt & Rasmusson, 2008). The aim of the study was to evaluate the survival rate of implants installed in sinuses augmented with titanium granules. Sixteen patients were included and 23 implants were installed. When primary stability was possible, the implants

were installed in the same session of the sinus grafting. The results demonstrated that after 12-36 months of prosthetic loading, an implant survival rate of 87% was achieved.

Histological evidence of the early tissue reactions towards the grafting with titanium granules is missing in the literature. These reactions may affect the healing final outcome after the graft procedure (Araújo et al. 2010). Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect in the early bone formation of titanium granules grafted in the alveolar socket following tooth extraction. The bone healing in postextraction alveolar socket is well studied in the literature, and the use of such a model to study the effect of biomaterials on the early bone formation is well-established (Araújo & Lindhe 2005; Araújo et al. 2008; Trombelli et al. 2008).

MATERIAL AND METHODS

Sample

The ethical committee of the State University of Maringá approved the research protocol. Five beagle dogs about 1 year old and weighing about 10kg each, systemically healthy and without periodontal disease, were used. During surgical procedures, the animals were anesthetized with intravenously administered Ketamine (Ketamina Agener[®] 10%, 8ml/kg, União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, Brazil) and Xylazine (Rompun[®] 0,1 ml/kg, Bayer do Brasil S/A, São Paulo, Brazil).

Pocket and crestal incisions were made in the posterior premolar region in both quadrants of the maxilla. Buccal and lingual full thickness flaps were elevated to disclose the alveolar crest. The canal of the distal roots of the third upper premolars was reamed and filled with

gutta-percha. The premolars were subsequently hemi-sectioned with the use of fissure burs. The mesial roots were carefully removed with the use of elevators. As the mesial roots had higher volume, their sockets were chosen to be used. The distal roots were maintained to preserve the alveolar ridge form. The sockets were randomly selected to receive one of the following treatments: (i) titanium granules graft (Natix™, Tigran Technologies AB, Malmö, Sweden), and (ii) blood clot (Fig. 1a, 1b). The buccal and lingual flaps were repositioned to cover the entrance of the extraction sockets. The flaps were retained with interrupted sutures. The sutures were removed after 10 days. Mechanical tooth cleaning was performed 1-3 days per week.

After 1 month of healing, the dogs were euthanized with an overdose of ketamine and perfused, through the carotid arteries, with a fixative containing a mixture of 5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde (Karnovsky, 1965). The maxillas were cutted in biopsies blocks containing the experimental sites. The premolar sites were dissected using a diamond saw (Exakt® Apparatebau, Norderstedt, Hamburg, Germany), and subsequently the samples were dehydrated in increasing grades of ethanol, infiltrated with methacrylate (Technovits 7200 VLC-resin; Kulzer, Friedrichsdorf, Germany), polymerized and sectioned in the buccal–lingual plane using a cutting–grinding device (Exakt®, Apparatebau). From each biopsy unit, one buccal–lingual section representing the central area of the site was prepared. The sections were reduced to a thickness of about 20µm by micro-grinding and polishing. The sections were stained in Ladewig's fibrin.

Histological evaluation

The histological examinations were performed in a Carl Zeiss® Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Germany) equipped with an image system

(AxioCam[®]; Carl Zeiss, Göttingen, Germany) and AxioVision software (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany).

The composition of the newly formed tissue in the extraction socket was determined using a point counting procedure. Digital microphotographs (magnification x100) were taken from the entire healing sockets. Subsequently, these microphotographs were opened in image editing software Adobe Photoshop CS (Adobe[®], San Jose, California, USA). A grid comprising 100 points (modified from Schroeder & Münzel-Pedrazzoli, 1973) was digitally superimposed over each microphotograph of the tissue, and the percentage area occupied by (i) connective tissue, (ii) new mineralized bone and (iii) bone marrow was determined. In addition, the percentage area occupied by titanium granules (biomaterial) in the grafted sites was also calculated.

Data analysis

Mean values and standard deviations of the different variables were calculated using the dog as the statistical unit. Histological results were expressed in mean percentages (\pm SD). Differences between test/control groups were analyzed using Student's t-test for paired observations, and they were considered statistically significant when p was <0.05 .

RESULTS

Clinical examination

Healing was uneventful in all dogs. At the time of sacrifice, the entrance of all alveolar sockets was closed by healthy and well-keratinized soft tissue. In addition, in the experimental

sites in which titanium granules were grafted, the keratinized mucosa exhibited a grayish discoloration (Fig. 2a, 2b).

Gross histological examination

The connective tissue of the mucosa covering the grafted as well as the non-grafted sockets was rich in mesenchymal cells, vascular structures and clusters of inflammatory cells. A newly-formed oral epithelium exhibiting several rete pegs was observed to line the connective tissue (Fig. 3).

Titanium sites

In all grafted sites (Fig. 4), it was possible to identify titanium granules in the connective tissue and in the socket. The granules appeared in sizes that varied about 0.7-1 mm in its long axis and exhibited frequently several pores. In the supra-alveolar compartment in mucosa, the granules were surrounded by a dense connective tissue covered with an oral epithelium. In one specimen (Fig. 5), the granules were exposed to the oral cavity and an inflammatory infiltrate was observed in the surrounding connective tissue.

The grafted socket was occupied by granulation tissue, provisional matrix, woven bone and titanium granules. The biomaterial was mainly observed at the coronal and middle part of the socket. In the coronal portion of the socket, the biomaterial was mainly enclosed in a connective tissue rich in mesenchymal cells, fibers, vessels and small amounts of inflammatory cells, while in the middle portion, it was frequently involved by the forming woven bone. The biomaterial surface was occasionally coated with multinucleated cells (Fig. 6). The apical portion of the socket, which was frequently devoid of titanium granules, was mostly occupied by woven bone.

Coagulum sites

The coagulum site (non-grafted sockets) was occupied by woven bone and provisional matrix. The remaining provisional matrix, comprised of densely packed connective tissue fibers, mesenchymal cells and vascular structures, was observed in central portions of the socket. Apical and lateral to the provisional matrix, the newly-formed woven bone extended from the socket walls and occupied most of the socket (Fig. 7). The bone projections encircled a connective tissue containing collagen fibers organized in a woven pattern and vascular structures. The trabeculae of immature bone were lined with osteoblasts. Occasionally, isolated osteoclasts, residing in resorption bays, could be observed on the surface of the newly formed bone close to the socket walls. Frequently, the apical region of the socket was in direct contact with the sinus floor.

Morphometric measurements

The percentage area occupied by the various tissues and the titanium granules in the alveolar socket is presented in Table 1. The proportions of connective tissue in the socket were $59.4 \pm 15.1\%$ in the grafted sites and $30.3 \pm 8.4\%$ in the coagulum sites. The newly formed mineralized bone occupied $40.4 \pm 14.9\%$ of the grafted socket area. The corresponding values in the non-grafted sites were $58.7 \pm 4.4\%$. The proportions of bone marrow in the socket were $0.2 \pm 0.5\%$ in the grafted sites and $11.0 \pm 5.7\%$ in the coagulum sites. The titanium granules occupied $33.2 \pm 7.7\%$ of the area in the grafted sockets. For the three parameters (connective tissue, newly-formed mineralized bone and bone marrow), the differences between groups were statistically significant.

DISCUSSION

In the present study, alveolar sockets were grafted with titanium granules immediately after tooth extraction. Healing was allowed for 1 month and tissue samples were obtained for histological analyses. It was found that the biomaterial in the grafted sites was well-integrated with either a provisional connective tissue or with a newly-formed woven bone. The histometric measurements showed, however, that the grafted sites exhibit significantly less new bone than the coagulum site (non-grafted).

Following 1 month of healing, the non-grafted sockets were almost completely occupied by woven bone and the amount of mineralized bone was about 59%. This observation is in accordance with previous studies evaluating the socket healing in a similar model (Araújo & Lindhe 2005; Cardaropoli et al. 2003). In these studies, the healing of the alveolar sockets in lower premolars of dogs was evaluated in sections prepared in mesio-distal and in buccal-lingual planes. The authors observed that between the 2nd and 4th week of healing, the provisional matrix (provisional connective tissue) was gradually replaced by woven bone up to bone crest level. Through the following weeks, the woven bone was gradually replaced by (remodeled into) mature types of bone tissue: lamellar bone and bone marrow. In addition, the external alveolar walls were modeled and the overall dimension of the socket was reduced. Therefore, the burst of initial mineralization seems to occur by the end of the first month of healing.

The sockets grafted with titanium granules exhibited less percentage area occupied by mineralized bone than the sockets in which no graft was placed. In addition, it was also observed that in the more apical portions of the sockets where the biomaterial was absent, the

amount of woven bone appeared to be similar to the non-grafted sites. On the other hand, the proportion of provisional connective tissue was larger in the grafted sites than in the non-grafted sites. It has been demonstrated by several experimental studies that during the healing of extraction sockets, the woven bone formation is preceded by the formation of an undifferentiated connective tissue, e.g. provisional matrix (Amler 1969; Cardaropoli et al. 2003; Araújo & Lindhe 2005; Trombelli et al. 2008). Thus, the present study suggested that, after 1 month of healing, the graft of a socket immediately after tooth extraction with titanium granules delayed the healing process when compared with non-grafted control sites (coagulum group).

In the coronal and middle portions of the grafted sockets, the provisional matrix that surrounded the majority of the titanium granules contained, occasionally, multinucleated cells. These multinucleated cells may represent osteoclasts attempting to resorb the biomaterial. This assumption is in accordance with Araújo et al. 2010. The authors observed that the multinucleated cells around the biomaterials in the early phases of the healing process were TRAP-positive cells. Several studies that evaluated the tissues reaction to the implantation of biomaterials have also observed that delayed healing appeared to be related to the presence of multinucleated cells (Cardaropoli et al. 2005; Araújo et al. 2008). Furthermore, when the biomaterial surface was free of inflammatory cells, woven bone were frequently deposited on its surface. It seemed that delayed wound healing observed in the present study may have been influenced by these multinucleated cells that occurred in tissues harboring the titanium granules.

It is relevant to recognize that the tissue reaction to titanium may vary according to its format. Suzuki & Frangos (2000) reported that although titanium particles induce the formation of

multinucleated cells/osteoclasts, the titanium surfaces uneventfully osseointegrate with the bone tissue. Recently, the early bone formation on titanium implants with turned and modified surfaces was described by Abrahamsson et al. 2004. The authors described the healing between 2 hours up and 12 weeks after implant installation. The results indicated that no foreign body reaction towards the implant surface had occurred at any time interval.

It is well-known the high osteoconduction capacity of the titanium (Urist, 1965). Several studies have reported high osseointegration success rate with the use of titanium fixtures in implant dentistry (for review, see Albrektsson et al. 1981). In addition, it is well established that in order a titanium fixture to be conducive to predictable osseointegration it is mandatory to achieve primary stability during the early phases of healing (Turner et al. 2007). In the current experiment, the newly-formed woven bone was observed inside the granules porous and on the granule surface. Thus, it is suggested that titanium granules did achieved initial mechanical stability for bone ingrowth in the alveolar socket which represents a self-contained defect.

New bone had formed, in comparable amounts, in the apical portion of the test (titanium granules) and control (coagulum) sites, while in the remaining portions of the grafted sockets, smaller amount of immature bone could be found surrounding the granules. Araújo & Lindhe (2009) asserted that there are reasons to suppose that following root extraction and graft placement, the ensuing flow of blood into the apical portion of the socket force the grafting material in coronal direction. A void was hereby established in the apical zone of the socket that could lodge a coagulum. This could explain the reason the apical portion of the test socket showed, apparently, the same amount of bone of non-grafted sites.

Frequently, the ridge mucosa in the present study exhibited a grayish discoloration on the entrance of the healed socket. This might be important when treating aesthetic areas, where the grayish color could affect the final result. The presence of titanium granules in the ridge connective tissue above the crestal bone level is obviously the reason for such discoloration. This observation is in accordance with the study of Alffram et al. 2007. The authors have used titanium granules in hip reconstruction procedure. They observed that the handling of the material and its distribution and retention in the desirable position was difficult.

The present study demonstrated the use of titanium granules in self-contained defects (alveolar socket) was conducive to bone formation. This study was, however, of short term duration. It is necessary more studies for evaluating the bone formation and remodeling in longer time intervals. It is also necessary in longer periods of healing to verify the effect of such a graft on the modeling of the alveolar sockets walls. It would be important to recognize the potential of such material to preserve the socket dimensions following tooth extraction. Furthermore, the bone augmented with titanium granules have to be tested as a suitable site for implant installation.

REFERENCES

1. Abrahamsson, I., Berglundh, T., Linder, E., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2004) Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 381-392.
2. Albrektsson, T. & Johansson, C. (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* **10(2)**: S96-101.
3. Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A. & Lindström, J. (1981) Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **52**: 155-170.
4. Alffram, P.A., Bruce, L., Bjursten, L.M., Urban, R.M. & Andersson, G.B.J. (2007) Implantation of the femoral stem into a bed of titanium granules using vibration. A pilot study of a new method for prosthetic fixation in 5 patients followed for up to 15 years. *Uppsala Journal of Medical Sciences* **112**: 175-81.
5. Amler, M.H. (1969) The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology* **27**: 309-318.
6. Araújo, M.G. & Lindhe, J. (2005) Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 212-218.
7. Araújo, M.G. & Lindhe, J. (2009) Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 545-549.
8. Araújo, M.G., Liljenberg, B. & Lindhe, J. (2010) Dynamics of Bio-Oss[®] Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 55-64.

9. Araújo, M.G., Linder, E. & Lindhe, J. (2009) Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 1-6.
10. Araújo, M.G., Linder, E., Wennström, J.L. & Lindhe J. (2008) The influence of Bio-Oss collagen on healing of an extraction socket - An experimental study in the dog. *International. Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **28(2)**: 123-135.
11. Berglundh, T. & Lindhe, J. (1997) Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 117-124.
12. Block, M.S. & Kent, J.N. (1997) Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **55(11)**: 1281-6.
13. Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D. & Schwartz, Z. (1996) Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* **17(2)**: 137-46.
14. Burchardt, H. (1983) The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **174**: 28-42.
15. Bystedt, H. & Rasmusson, L. (2008) Porous Titanium Granules Used as Osteoconductive Material for Sinus Floor Augmentation: A Clinical Pilot Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **23**: 1-5.
16. Cardaropoli, G., Araújo, M.G. & Lindhe, J. (2003) Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* **30**: 809-818.
17. Cardaropoli, G., Araújo, M.G., Hayacibara, R., Sukekava, F. & Lindhe, J. (2005) Healing of extraction sockets and surgically produced – augmented and non-augmented – defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 435-440.

18. Hallman, M., Cederlund, A., Lindskog, S., Lundgren, S. & Sennerby, L. (2001) A clinical histologic study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrin glue for maxillary sinus floor augmentation. Results after 6 to 8 months of healing. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 135-143.
19. Hisbergues, M., Vendeville, S. & Vendeville, P. (2009) Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **88(2)**: 519-29.
20. Holmberg, L., Forsgren, L. & Kristerson, L. (2008) Porous titanium granules for implant stability and bone regeneration - a case followed for 12 years. *Upsala Journal of Medical Sciences* **113(2)**: 217-20.
21. Jónsson, B. & Mjöberg, B. (2009) Surgical treatment of depression fractures of the lateral tibial plateau using porous titanium granules. *Upsala Journal of Medical Sciences* **114**: 52-54.
22. Kahnberg, K.E., Nystrom, E. & Bartholdsson, L. (1989) Combined use of bone grafts and Brånemark fixtures in the treatment of severely resorbed maxillae. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **4(4)**: 297-304.
23. Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A-138A.
24. Laurie, S.W.S., Kaban, L.B., Mulliken, J.B. & Murray, J.E. (1984) Donor site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plastic and Reconstructive Surgery* **73**: 933-938.
25. Mangano, C., Bartolucci, E.G., Mazzocco, C. (2003) A new porous hydroxyapatite for promotion of bone regeneration in maxillary sinus augmentation: clinical and histologic study in humans. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **18**: 23-30.

26. Moore, W.R., Graves, S.E. & Bain, G.I. (2001) Synthetic bone graft substitutes. *ANZ Journal of Surgery* **71(6)**: 354-61.
27. Nkenke, E., Radespiel-Tröger, M., Wiltfang, J., Schultze-Mosgau, S., Winkler, G. & Neukam, F.W. (2002) Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study *Clinical Oral Implants Research* **13**: 514-521.
28. Nkenke, E., Weisbach, V., Winckler, E., Kessler, P., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J. & Neukam, F.W. (2004) Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: A prospective study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **33**: 157-163.
29. Norton, M.R. & Wilson, J. (2002) Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **17**: 249-257.
30. Nyström, E., Kahnberg, K.E. & Gunne, J. (1993) Bone grafts and Brånemark implants in the treatment of the severely resorbed maxilla: a 2-year longitudinal study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **8**: 45-53.
31. Nyström, E., Legrell, P.E., Forssell, A. & Kahnberg, K.E. (1995) Combined use of bone grafts and implants in the severely resorbed maxilla. Postoperative evaluation by computed tomography. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **24(1 Pt1)**: 20-25.
32. Schimming, R. & Schmelzeisen, R. (2004) Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62(6)**: 724-9.
33. Schroeder, A., Van der Zypen, E., Stich, H. & Sutter, F. (1981) The reaction of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *Journal of Maxillofacial Surgery* **9**: 15-25.

34. Schroeder, H.E. & Münzel-Pedrazzoli, S. (1973) Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue. *Journal of Microscopy* **99**: 301-329.
35. Simion, M., Jovanovic, S.A., Trisi, P., Scarano A. & Piattelli, T. (1998) Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **18**: 8-23.
36. Strandkvist, T. & Hallman, M. (1998) Augmentation of edentulous severely resorbed maxillae by Le Fort 1 procedure for later placement of endosteal implants. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **26**: 183.
37. Suzuki, R. & Frangos, J.A. (2000) Inhibition of Inflammatory Species by Titanium Surfaces. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1(372)**: 280-289.
38. Trombelli, L., Farina, R., Marzola, A., Bozzi, L., Liljenberg, B. & Lindhe, J. (2008) Modeling and remodeling of human extraction sockets. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 630-639.
39. Turhani, D., Weißenböck, M., Watzinger, E., Yerit, K., Cvikl, B., Ewers, R. & Thurnher, D. (2005) In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **34**: 543–550.
40. Turner, T.M., Urban, R.M., Hall, D.J. & Andersson, G.B.J. (2007) Bone ingrowth through porous titanium granulate around a femoral stem. *Upsala Journal of Medical Sciences* **112(2)**: 191-197.
41. Urist, M.R. (1965) Bone formation by autoinduction. *Science* **150**: 893-898.
42. Widmark, G., Andersson, B. & Ivanoff, C.J. (1997) Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants. Presentation of surgical method. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **26(2)**: 106-9.

- 43.** Williams, D.F. (1987) Definitions in biomaterials: progress in biomedical engineering. Amsterdam: Elsevier.
- 44.** Wilson, J., Pigott, G.H., Schoen, F.J. & Hench, L.L. (1981) Toxicology and biocompatibility of bioglasses. *Journal of Biomedical Material Research* **15**: 805-817.

TABLE**Table 1.** Mean values (SD) of the proportions (%) of the different tissues in the grafted and non-grafted alveolar sockets.

	Titanium granules	Coagulum	t-test
Connective tissue	59.4 (15.1)	30.3 (8.4)	0.0237*
New bone	40.4 (14.9)	58.7 (4.4)	0.0436*
Bone marrow	0.2 (0.5)	11.0 (5.7)	0.0078*

» the biomaterial occupied $33.2 \pm 7.7\%$ of the area in the grafted sites.

* statistically significant ($p < 0.05$)

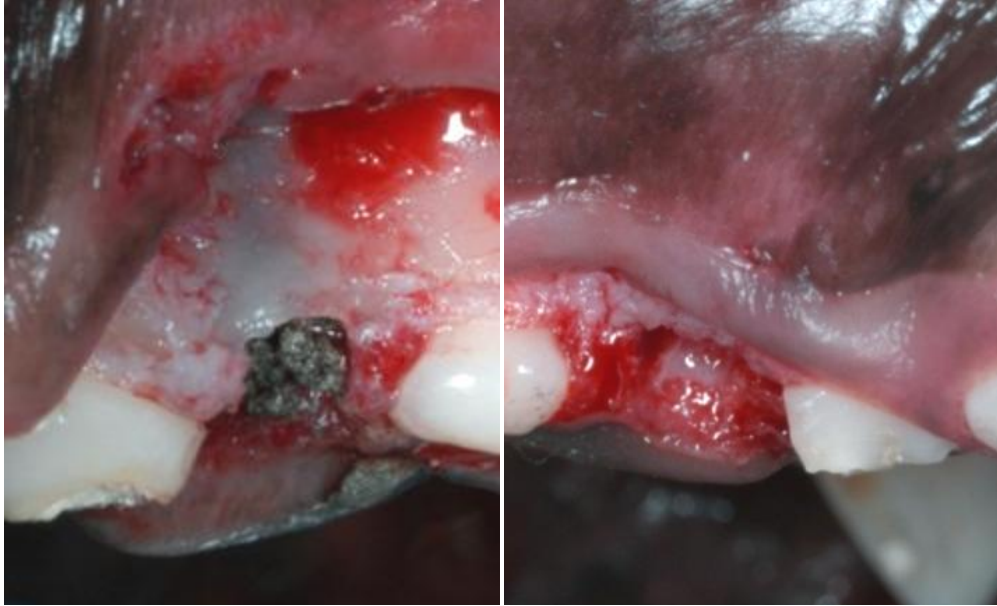
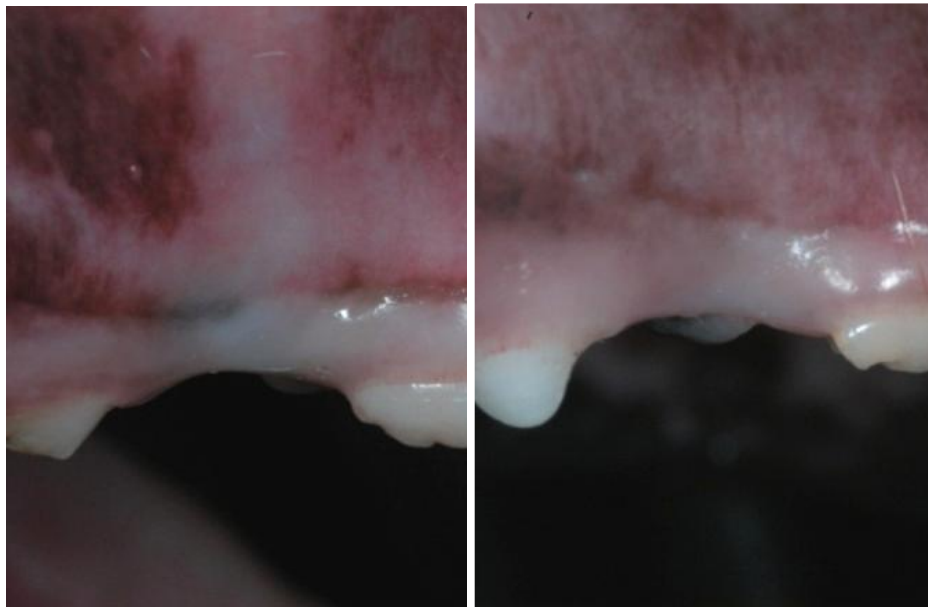
FIGURES

Fig. 1a: Clinical photograph illustrating the graft of titanium granules placed in the fresh extraction socket.

Fig. 1b: Clinical view of the coagulum site immediately after mesial root extraction.



Clinical photographs illustrating the mucosa aspects. In the titanium granules sites, the keratinized mucosa exhibited a grayish discoloration (Fig. 2a), while in the coagulum sites, the keratinized mucosa exhibited a normal discoloration (Fig. 2b).

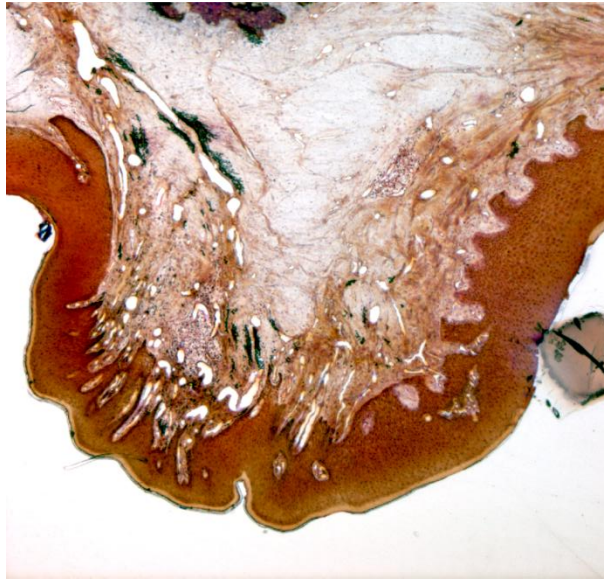


Fig. 3: Microphotograph illustrating the connective tissue of the mucosa of the grafted sockets. A newly-formed oral epithelium exhibiting several rete pegs was observed to line the connective tissue (Ladewig fibrin stain; original magnification 20x).

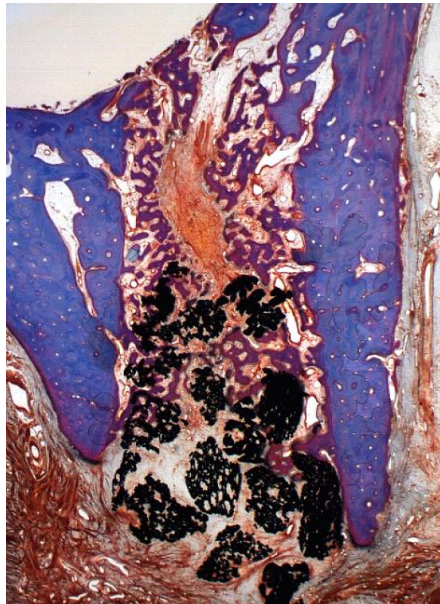


Fig. 4: Microphotograph of a buccal-lingual section representing a grafted site. Note that the central and marginal portions of the socket were occupied by the titanium granules. At the supraalveolar compartment in mucosa, the granules were surrounded by a dense connective tissue covered with an oral epithelium (Ladewig fibrin stain; original magnification 10x).

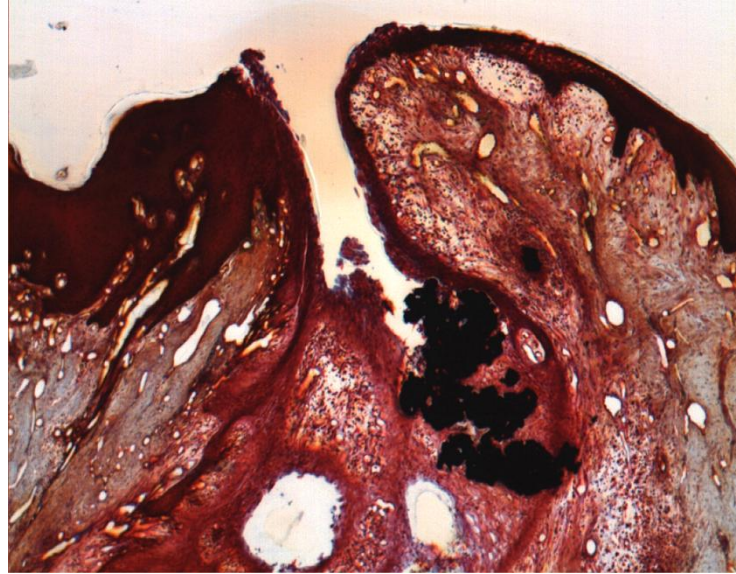


Fig. 5: Microphotograph illustrating the granules that were exposed (in one specimen) to the oral cavity. An inflammatory infiltrate was observed in the surrounding connective tissue (Ladewig fibrin stain; original magnification 100x).

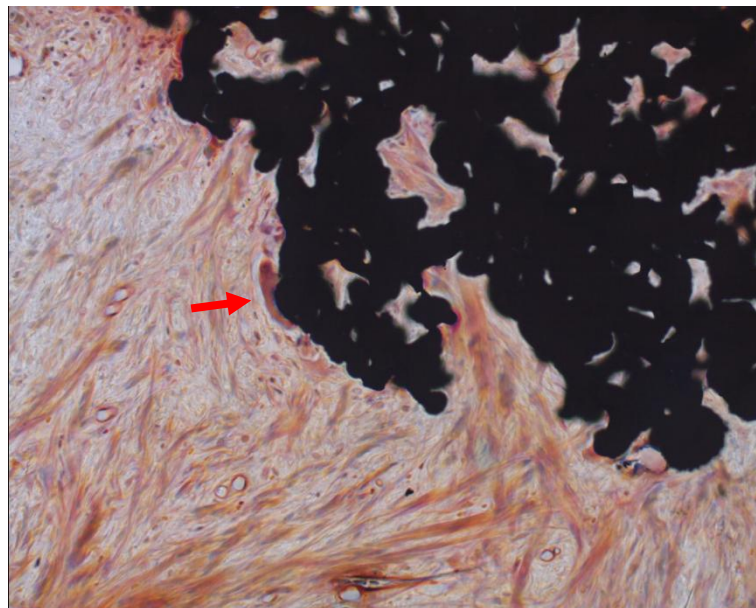


Fig. 6: Microphotograph illustrating the titanium granules observed in the provisional matrix. The biomaterial surface was occasionally coated with multinucleated cells (Ladewig fibrin stain; original magnification 200x).

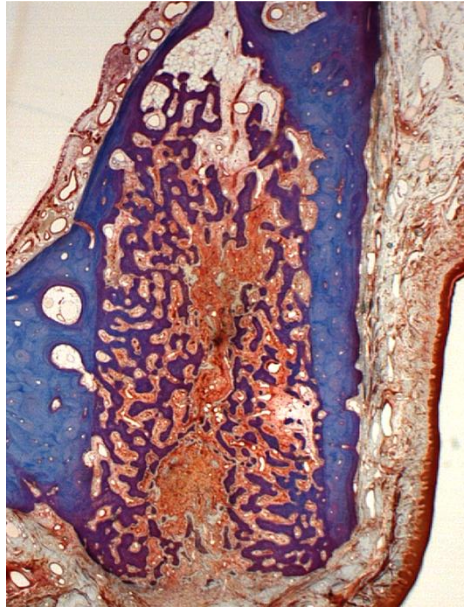


Fig. 7: Microphotograph of a buccal-lingual section representing a non-grafted site. The remaining provisional matrix, comprised of densely packed connective tissue fibers, mesenchymal cells and vascular structures, was observed in central portions of the socket. Apical and lateral to the provisional matrix, the newly-formed woven bone extended from the socket walls and occupied most of the socket (Ladewig fibrin stain; original magnification 10x).