UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO – FORP

EVANDRO CARNEIRO MARTINS NETO

**AVALIAÇÃO DO PLASMA DE ARGÔNIO NA INTEGRAÇÃO DOS
TECIDOS MOLES E DUROS AOS IMPLANTES E COMPONENTES
PROTÉTICOS: ESTUDO RANDOMIZADO EM CÃES**

RIBEIRÃO PRETO

2017

EVANDRO CARNEIRO MARTINS NETO

**AVALIAÇÃO DO PLASMA DE ARGÔNIO NA INTEGRAÇÃO DOS
TECIDOS MOLES E DUROS AOS IMPLANTES E COMPONENTES
PROTÉTICOS: ESTUDO RANDOMIZADO EM CÃES**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências – Programa: Odontologia (Periodontia) – Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Porfirio Xavier

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

Martins-Neto, Evandro Carneiro

Avaliação do plasma de argônio na integração dos tecidos moles e duros aos implantes e componentes portéticos: estudo randomizado em cães , 2017.

49p. : il. 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Xavier, Samuel Porfirio.

1. Plasma de Argônio. 2. Implantes dentários. 3. Avaliação Histológica. 4. Ósseointegração. 5. Estudo Animal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: MARTINS-NETO, Evandro Carneiro

Título: Avaliação do plasma de argônio na integração dos tecidos moles e duros aos implantes e componentes protéticos: estudo randomizado em cães.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Ciências –
Programa: Odontologia (Periodontia) – Área de
concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A você, que me deu a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade.

A você, que iluminou os caminhos escuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e cheio de esperanças.

A você, que se doou por inteiro e renunciou aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os meus.

Pela longa espera e compreensão durante minha ausência.

A você, mãe por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso.

Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma escrita de exprimir uma emoção ímpar.

Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar-me o caminho nas horas incertas;

A minha querida mãe **Maria Tereza**, exemplo de mãe, de dedicação e amor verdadeiro, por todo apoio oferecido ao longo da minha vida e por sempre acreditar em mim, mesmo quando as circunstâncias mostraram o contrário;

Ao meu pai **Evandro Carneiro Martins Filho**, que mesmo em outro plano, torce por mim e vibra a cada vitória conquistada;

Ao meu irmão **Luís Otávio**, que entendeu minha ausência. Obrigado pelo prazer de ser seu irmão;

À **Marjorie Omori**, por todo carinho e por estar sempre ao meu lado.

À minha **família**, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo;

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP)** pelo acolhimento e estrutura proporcionada durante a pós-graduação;

Aos meus orientadores, Prof. Dr. **Luiz Antonio Salata** e Prof. Dr. **Samuel Porfirio Xavier** pela orientação competente, crítica e esclarecedora, por todos os ensinamentos, desafios e confiança em mim depositada.

Aos colegas a Pós-Graduação pela boa convivência por todos esses anos. Espero poder contar com vocês por muito tempo ainda;

Aos amigos **Aldo, Fábio, Sebastião e Edson** que excederam todas as suas funções, demonstrando antes de tudo, consideração, carinho e amizade;

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia **Isabel, Dulce e Daniela**, pela ajuda e disponibilidade;

Aos professores **Adalberto Luiz Rosa, Alexandre Elias Trivellato, Cássio Edvard Sverzut, Márcio Mateus Beloti, Paulo Tambasco de Oliveira**, pelos conhecimentos e experiências transmitidas;

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro que possibilitou a execução deste projeto;

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de doutorado, possibilitando minha manutenção durante a pós-graduação.

RESUMO

Martins-Neto, E. C. **Avaliação do plasma de argônio na integração dos tecidos moles e duros aos implantes e componentes protéticos: estudo randomizado em cães**, 2017. 49f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Diversas aplicações do plasma de argônio tem sido encontradas na literatura. Na odontologia, suas aplicações se referem a capacidade de limpeza de componentes e aumento da energia de superfície. Os tratamentos para melhorar a energia de superfície são estudados com objetivo de criar um ambiente mais favorável para a adesão celular. Este estudo teve como objetivo avaliar histologicamente as mudanças nos tecidos moles e duros após a inserção de implantes e pilares de titânio limpos e ativados com plasma de argônio. Foram instalados 64 implantes e pilares em 8 cães Beagle, sendo randomizados em dois grupos: tratados com plasma de argônio ou não tratados. Dois tempos experimentais foram realizados: 4 e 8 semanas. Após esse período, os animais foram sacrificados, as mandíbulas foram divididas em blocos individuais e processados para confecção de lâminas para análise histológica. Na análise dos pilares, não houve diferença estatística entre os grupos, apesar de maiores níveis de osso marginal nos locais de teste em comparação com os locais de controle. Em relação aos implantes de titânio, as diferenças entre teste e controle, principalmente no período de 8 semanas, podem sugerir que o uso de plasma de argônio poderia melhorar a integração dos tecidos periimplantares à superfície dos implantes.

Palavras-chave: Plasma de Argônio. Implantes dentários. Avaliação Histológica. Ósseointegração. Estudo Animal.

ABSTRACT

Martins-Neto, E. C. **Evaluation of argon plasma in the integration of soft and hard tissues to implants and prosthetic components: a randomized study in dogs**, 2017. 49f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Several applications of argon plasma have been found in the literature. In dentistry, its applications refer to the ability to clean components and increase surface energy. Treatments for enhancing surface energy were studied in an effort to create a more favorable environment for cell adhesion. This study aimed to histologically evaluate changes in soft and hard tissues after insertion of implants and titanium abutments cleaned and activated with argon plasma. 64 implants and abutments were installed in 8 Beagle dogs, and were randomized into two groups: treated with argon plasma or untreated. Two experimental times were performed: 4 and 8 weeks. After this period, the animals were sacrificed, the jaws were divided into individual blocks and processed for histological analysis. In the analysis of abutments, there was no statistical difference between groups, despite higher levels of marginal bone in test sites compared to the control sites. Regarding titanium implants, the differences between test and control, especially in the 8-week period, may suggest that the use of argon plasma could improve the integration of peri-implant tissues to the implant surface.

Key Words: Argon Plasma, Dental Implants, Histological Evaluation, Osseointegration. Animal Study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cronologia de execução dos procedimentos.....	22
Figura 2.	Distribuição dos grupos experimentais.....	25
Figura 3.	Pontos de referência para análise histométrica.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Comparação entre grupos teste e controle, 4 semanas após cirurgia. Dados apresentados em milímetros na forma de média $\pm$ desvio padrão, (Mediana; Interquartil 25%-75%).....	30
Tabela 2.	Comparação entre grupos teste e controle, 8 semanas após cirurgia. Dados apresentados em milímetros na forma de média $\pm$ desvio padrão, (Mediana; Interquartil 25%-75%).....	31
Tabela 3.	Comparação entre tempos. Dados apresentados em milímetros.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
SP	São Paulo
RJ	Rio de Janeiro
SPSS	Statistical Package for Social Science para Windows
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
PVPI	Plovinil Pirrolidona Iodo

LISTA DE SÍMBOLOS

Pa	Pascal
mm	Milímetro
%	Porcento
ml/kg	Mililitro por kilograma
mg/kg	Miligramo por kilograma
®	Marca registrada
ml	Mililitro
v	Volume
mm	Milímetro
W	Watts
MPa	Mega Pascal
Torr	Torricelli
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 PROPOSIÇÃO.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais.....	22
3.2 Desenho do estudo.....	22
3.3 Cirurgias de exodontia.....	22
3.4 Cirurgias de Implantação.....	24
3.5 Preparação dos implantes e pilares.....	25
3.5.1 Grupo Controle.....	25
3.5.2 Grupo Teste.....	25
3.6 Eutanásia.....	26
3.7 Processamento histológico e Histometria.....	26
3.8 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Pilares.....	30
4.2 Implantes.....	32
5 DISCUSSÃO.....	33
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	38
VERSÃO RESUMIDA EM INGLÊS.....	43

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O plasma é muitas vezes referido como o 4º estado da matéria. Um plasma é caracterizado pela presença de íons positivos e /ou negativos e elétrons carregados em um gás neutro (Lieberman e Lichtenberg, 2005). Os plasmas podem ser categorizados como "plasmas térmicos " ou quentes (como os utilizados historicamente para revestimentos de hidroxiapatita por pulverização de plasma em superfícies de implantes) ou "plasmas de pressão atmosférica" ou frios (PPAs). O plasma é obtido através de uma descarga elétrica em um gás, aplicando uma diferença de potencial entre dois eletrodos inseridos em uma câmara a pressões abaixo de 100 Pa. A diferença de potencial explica a aceleração de elétrons que colidirão com átomos neutros e moléculas do gás, a produzindo íons e novos elétrons. Os íons produzidos são acelerados para o eletrodo catódicamente polarizado, participando de uma série de efeitos. Estes incluem o aquecimento do cátodo por transferência de energia iônica, a criação de defeitos pela remoção de átomos de superfície, colisões elásticas e a reação superficial acelerada causada pela presença de espécies mais ativas do que as encontradas em processos convencionais (Alves Jr. *et al.*, 2005).

Os principais constituintes de plasmas são íons, elétrons e neutrons em equilíbrio termodinâmico. Em PPAs, a maior parte da energia é colocada nos elétrons, permitindo a ativação/modificação da superfície ao operar em temperatura ambiente (Becker *et al.*, 2004). Os plasmas atmosféricos frios e à vácuo foram estudados em odontologia e provaram ser eficazes no aumento do contato de células de titânio (Marin *et al.*, 2008; Granato *et al.*, 2011). As aplicações de microplasma utilizadas no presente trabalho alcançaram significado tecnológico clínico com sucesso, uma vez que foi construído em pequenas dimensões, permitindo a sua portabilidade no cenário clínico e provando fornecer energia suficiente para aumentar a energia da superfície, ao mesmo tempo em que apresenta operação segura nas condições atmosféricas (Tian *et al.*, 2010).

Os plasmas de pressão atmosférica utilizados em aplicações biomédicas mostraram efetivamente mudar a energia e a química das superfícies devido à alta concentração de espécies reativas que são geradas (Foest, R. *et al.*, 2005; Foest, R. *et al.*, 2005). Trabalhos recentes mostraram que misturas de gases, como argônio e

oxigênio são adequados como espécies de gás raro metaestável (carregadores de uma quantidade significativa de energia), levando à formação de espécies reativas de oxigênio através de reações de transferência de energia (Foest, R. *et al.*, 2005; Foest, R. *et al.*, 2005). Assim, dependendo da configuração e da química do plasma, a incorporação de espécies reativas e a limpeza adicional da superfície podem resultar em níveis aumentados de reatividade superficial e energia que podem ser aplicados imediatamente antes da colocação do implante. Este processo eficiente e econômico apresenta benefícios potenciais para qualquer superfície de implante comercialmente disponível (Coelho *et al.*, 2012).

A estabilidade periimplantar de tecidos moles e duros é fundamental para o sucesso de uma restauração implanto suportada, de um ponto de vista funcional, bem como estético (Buser *et al.*, 2004). Tem sido descrita a forma como a relação entre a conexão implante-pilar e tecidos circundantes desempenha um papel importante no estabelecimento da estabilidade mecânica e biológica (Abrahamsson *et al.*, 1996). Na verdade, a literatura demonstrou que, quando um implante é exposto ao ambiente oral após a ligação de um componente protético, alterações no nível do tecido duro periimplantar podem ocorrer (Hermann *et al.*, 1997) e a quantidade de remodelação óssea, caracterizada por perda óssea circunferencial (horizontal e verticalmente), deve manter-se estável após um ano (Manz, 2000).

Vários fatores, em especial, rupturas que ocorrem após a conexão da prótese, podem afetar a reabsorção periimplantar (Schou *et al.*, 2006), uma vez que a contaminação bacteriana da cavidade oral na junção implante-pilar foi mostrada como fator desencadeante de resposta dos tecidos duros (Cochran *et al.*, 1997).

Muitas estratégias têm sido defendidas para minimizar clinicamente o efeito desta contaminação: melhoria mecânica da estabilidade de conexão implante/pilar (Van Assche *et al.*, 2011), distanciamento da conexão implante/pilar do osso vital (Degidi *et al.*, 2008; Vigolo e Givani, 2009; Canullo *et al.*, 2010); no entanto, uma reabsorção óssea mínima (0,5 mm), foi observada na análise longitudinal (Annibali *et al.*, 2012).

Este evento pode estar relacionado com os contaminantes (bactérias, micro-partículas de procedimentos laboratoriais) presentes no pilar no momento da ligação implante/pilar. Na verdade, a presença de contaminantes na superfície do pilar pode ainda ser verificada após o protocolo de limpeza a vapor seguindo procedimentos técnicos de laboratório (Canullo, Micarelli, *et al.*, 2013).

A limpeza do pilar torna-se ainda mais importante uma vez que o pilar entra em contato tanto com osso como com tecido conjuntivo. De fato, a presença de contaminantes no nível da plataforma do implante/pilar tem sido sugerida como causa de uma inflamação que danifica o tecido relacionado; micro-partículas de desgaste do titânio também foram demonstradas como ativadoras da osteoclastogênese (Mishra *et al.*, 2011).

Além disso, tem sido mostrada como as interações entre os componentes celulares e materiais do pilar influenciam no processo de reparo em torno dos implantes e como estas interações são reguladas pela condição da superfície (Piattelli *et al.*, 2011).

Para preservar os pilares de tais poluentes, foi defendida recentemente a limpeza utilizando plasma de argônio em pilares personalizados (Canullo *et al.*, 2014). A limpeza do plasma *in vitro* demonstrou ter um efeito triplo sobre o titânio: limpeza, proteção contra a corrosão e aumento da energia de superfície das superfícies limpas (Tavares *et al.*, 2009).

Ao mesmo tempo, a alteração das características físicas da superfície do implante/pilar (aumento da energia da superfície e, portanto, da hidrofiliabilidade) pode afetar positivamente a resposta tecidual periimplantar precoce. Do ponto de vista físico-químico, o tratamento com plasma aumenta a energia da superfície e, portanto, reduz o ângulo de contato, promovendo o espalhamento das células (Duske *et al.*, 2012). Além disso, demonstrou-se que o tratamento com plasma ativava as superfícies ao nível atômico e molecular, produzindo superfícies hidrofílicas e aumentando sua molhabilidade (Swart *et al.*, 1992).

A interação célula/superfície do implante é principalmente mediada pelas propriedades físico-químicas da superfície do material. Este evento refere-se à hidrofiliabilidade da superfície que parece estar diretamente correlacionada com a adesão celular: vários estudos *in vitro* demonstraram que superfícies moderadamente hidrofílicas e carregadas positivamente podem promover a adesão celular ao titânio, aumentando as propriedades da rugosidade da superfície. De fato, juntamente com as características da superfície, a alteração das características físicas (aumento da energia da superfície e, portanto, da hidrofiliabilidade) demonstrou impacto claro sobre as respostas ósseas precoces: exposição à luz ultravioleta (Sawase *et al.*, 2008), tratamento alcalino (Tugulu *et al.*, 2010), a corrosão com armazenamento subsequente em solução salina (Rupp *et al.*, 2006), a limpeza de plasma (Coelho *et*

al., 2012; Duske *et al.*, 2012; Canullo, Genova, *et al.*, 2016) podem ser transformadas em superfícies hidrófilas de implantes dentários e, portanto, acelerar a interação de células com o implante.

No entanto, há uma ausência de evidências na literatura a respeito da relevância clínica da utilização do plasma de argônio na limpeza de pilares de implantes dentários, bem como sua utilização em superfícies de implantes, com objetivo de aumentar sua energia de superfície.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivos:

1. Analisar histologicamente a integração dos tecidos periimplantares aos componente tratado com plasma de argônio;
2. Avaliar histologicamente a integração dos tecidos duros aos implantes tratados com plasma de argônio;
3. Avaliar se a utilização do plasma de argônio nos componentes e implantes de titânio pode melhorar o processo de integração dos tecidos periimplantares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados 8 cães machos jovens, da raça Beagle, pesando entre 15 e 23 quilos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais permaneceram em quarentena para aplicação de vacina anti-rábica e tríplice, vermífugos e vitaminas. Os mesmos foram mantidos em baias individuais no biotério da FORP-USP no período pré e pós-operatório, sob adequados cuidados veterinários, com livre acesso a água e suporte nutricional padrão de laboratório durante todo o período de experimentação.

3.2 DESENHO DO ESTUDO

A fase cirúrgica do experimento foi realizada em quatro etapas: a primeira consistiu na exodontia bilateral de dentes pré-molares e primeiro molar mandibulares. Em um segundo momento cirúrgico foram instalados 4 implantes com pilares tratados e não tratados, seguindo randomização determinada previamente. No terceiro tempo, foi realizada a cirurgia no lado contralateral, e no último tempo o sacrifício dos animais e coleta das amostras (Figura 1).

Figura 1- Cronologia de execução dos procedimentos.

3.3 CIRURGIAS DE EXODONTIA

Todos os animais foram submetidos a cirurgias de exodontias bilaterais dos quatro pré-molares e primeiro molar mandibular. Os animais foram pré-anestesiados

por meio de injeção intramuscular de pré-anestésico Xilazina 2% - 20mg/kg (Bayer®) na dosagem de 0,05mL/kg, 30 minutos antes do ato operatório. A seguir, por via endovenosa, foi realizada a anestesia geral com Thiopentax® 1% (Thiopental sódico – Cristália – Produtos químicos farmacêuticos LTDA. – Itapira – SP), na dosagem de 1mL/kg (solução de 20mg/kg diluído em 50ml de soro fisiológico estéril a 0,9%). Durante todo o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos com solução isotônica de cloreto de sódio (Glicolabor Ind. Farm. Ltda. - São Paulo – SP) a 0,9% com 2,5% de glicose. A anti-sepsia externa foi realizada com PVPI tópico (Riodeine Tópico - Rioquímica®) e a anti-sepsia da cavidade bucal foi realizada com solução de cloreto de cetilpiridíneo (Cepacol® - Aventis Pharma Ltda) e água oxigenada 10v (Farmax®). Após a colocação do campo cirúrgico esterilizado sobre o cão, mantendo-se apenas a cabeça exposta, foi realizada anestesia infiltrativa complementar bilateral na região dos pré-molares e molares inferiores, utilizando-se 1,8 ml de anestésico local do tipo mepivacaína a 2% com noradrenalina 1:100.000 (Scandicaine - Septodont - Distribuidora DFL Ind. Com. Ltda - Rio de Janeiro – RJ).

Em seguida foi realizada incisão intrasulcular e descolamento de retalho mucoperiosteal bilateralmente. Os quatro pré-molares inferiores e primeiro molar foram seccionados e extraídos com o emprego de fórceps e/ou elevadores sem danificar as paredes alveolares. Os tecidos foram reposicionados e suturados com fio absorvível de poliglactina 910 (vicryl 4-0, Ethicon® – Johnson & Johnson). Durante o período de recuperação da anestesia o animal foi mantido em sala própria de recuperação onde permaneceu por 24 horas e depois transferido para baias do canil do biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, onde permaneceu durante todo o período experimental. Os animais foram acompanhados durante um período de reparo alveolar de 12 semanas, de acordo com o protocolo de (Roos-Jansaker *et al.*, 2002). Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião, dentro de padrões assépticos e com irrigação abundante com S.F. 0,9% para manutenção da vitalidade óssea. Os animais foram observados durante todo o período experimental e receberam cloridrato de tramadol (Anangon® – Laboratórios Biosintética Ltda. – São Paulo – SP) que foi administrado por via endovenosa (Solução injetável de 50 mg), na dosagem de 3mg/kg de peso do animal, uma vez ao dia, durante 3. A antibioticoterapia também foi instituída utilizando a suspensão de Pentabiótico Veterinário de Pequeno Porte (Fort Dodge®) na dose de 0,5mg/kg.

Quaisquer anormalidades, tais como mudanças de hábitos alimentares, inflamação ou supuração dos tecidos, foram anotadas.

3.4 CIRURGIAS DE IMPLANTAÇÃO

Doze semanas após as cirurgias de exodontia, cada animal foi submetido à inserção de quatro implantes osseointegráveis em um dos lados escolhido aleatoriamente. Todos os procedimentos pré-operatórios de anestesia e anti-sepsia, assim como também os procedimentos cirúrgicos para obtenção de retalho mucoperiosteal foram os mesmos já descritos anteriormente. Após exposição do leito ósseo receptor, o preparo dos sítios para instalação dos implantes foi cirurgicamente padronizado e realizado sob irrigação abundante com soro fisiológico estéril a 0,9%, conforme recomendações do fabricante (Sweden & Martina, Due Carrare, Pádua, Itália). Quatro implantes de 7 x 3,3mm (Switching Platform Premium, Sweden & Martina, Pádua, Itália) foram instalados. O primeiro implante foi escolhido através de randomização e os três seguintes, de forma alternada. Antes da instalação dos pilares, dois deles foram limpos enquanto dois não receberam tratamento. Os pilares não tratados foram instalados aleatoriamente, de forma alternada. O retalho foi suturado de maneira que os pilares não ficassem cobertos.

Após 4 semanas, os procedimentos cirúrgicos foram também aplicados ao lado contralateral da mandíbula, seguindo a mesma randomização utilizada no lado anterior. No total, 64 implantes foram instalados em todos os sítios experimentais. A recuperação anestésica ocorreu de forma semelhante à descrita anteriormente. Desta forma, foram estudados dois grupos experimentais para análise dos implantes e dois para os pilares, diferindo entre si em relação ao tempo de sacrifício dos animais (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição dos grupos experimentais.

Os cães receberam tratamento periodontal básico (raspagem, polimento e alisamento) a cada duas semanas a fim de manter a higiene bucal e evitar contaminação das feridas cirúrgicas. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião, dentro de padrões e com suficiente irrigação, para manutenção da vitalidade óssea. Os cuidados pós-operatórios com os animais foram os mesmos instituídos após a cirurgia de exodontia.

3.5 PREPARAÇÃO DOS IMPLANTES E PILARES

3.5.1 GRUPO CONTROLE

Os implantes foram instalados conforme orientação do fabricante (Sweden & Martina, Due Carrare, Pádua, Itália).

Os pilares do grupo controle, foram limpos por vapor por 30 segundos (VAP 1; Zhermack, Colônia, Alemanha) antes de serem instalados.

3.5.2 GRUPO TESTE

Os implantes e pilares do grupo teste, se submeteram a tratamento com plasma de argônio (75 W de potência e -10 MPa de pressão por 12 minutos em temperatura ambiente) em um reator de plasma (Diener Electronic GmbH, Jettingen, Alemanha) que estava presente na mesma estrutura clínica, mas em salas diferentes antes de serem instalados.

3.6 EUTANÁSIA

Decorrido o período experimental de quatro e oito semanas após as cirurgias de implantação, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica de Thiopentax®. Após a eutanásia foram realizados procedimentos para obtenção dos espécimes histológicos, isto é, os segmentos das mandíbulas foram removidos, dissecados e posteriormente reduzidos em blocos individuais contendo os grupos experimentais a serem estudados.

3.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Após a remoção, os segmentos ósseos foram fixados em solução de formol 4% tamponado (pH=7) por 48 horas. Os espécimes foram transferidos para uma solução de etanol 70%, onde permaneceram por três dias. Os mesmos foram desidratados em uma série crescente de concentração de álcoois e incluídos em resina acrílica (LR White®). Os implantes foram seccionados ao meio, no sentido vestibulo-lingual, utilizando serra de precisão Microslice 2 (Ultra Tec®) e foram polidos utilizando lixas de diferentes granulações. De cada implante foi obtida uma peça para observação em microscopia de luz. Nesta peça, a face polida foi colocada em uma lâmina de vidro e o bloco foi novamente cortado, deixando aderido à lâmina um corte com espessura aproximada de 30µm a 40µm, que foi desgastado e polido até apresentar aproximadamente 10µm a 20µm de espessura. Esta face foi submetida à coloração utilizando a combinação de *Stevenel's blue* com *Alizarin Red*, conforme descrito por (Maniatopoulos *et al.*, 1986).

As medidas histométricas foram realizadas considerando o contato osso-implante no tempo experimental de sacrifício. O grau de contato osso-implante foi medido e expresso através de médias totais de contato osso-implante, sendo medido do primeiro contato ósseo ao implante até a região apical. A avaliação foi realizada em microscópio Leitz® equipado com um sistema de microvídeo para medidas histométricas, por meio do analisador de imagens (Image tool), sem o conhecimento prévio dos espécimes experimentais.

Com uma ampliação de 100x, os seguintes pontos de referência foram identificados: o ombro do implante (IS), o contato osso-implante mais coronal (B), a parte superior da crista óssea adjacente (C), a parte superior da mucosa periimplantar

(PM) e da terminação apical do epitélio juncional (aJE), de acordo com Caneva *et al.*, 2013. As seguintes medidas lineares foram realizadas paralelamente ao longo eixo do implante: a distância vertical entre IS-B, IS-C, PM-C e PM-AJE. Foi determinada a formação de osso novo, bem como o osso antigo ligado à superfície do implante, de B à terminação apical do implante (Figura 3).

Figura 3 - Pontos de referência para análise histométrica: ombro do implante (IS), contato osso-implante mais coronal (B), parte superior da crista óssea adjacente (C), parte superior da mucosa periimplantar (PM) e a terminação apical do epitélio juncional (aJE).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após obtenção dos dados, foi criado um banco de dados no software estatístico SPSS, versão 15.0, e aplicados os testes estatísticos para verificação da significância das informações obtidas. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sem intercorrências. Todos os animais permaneceram com boa saúde durante o período experimental e durante o período de reparo, 2 pilares foram perdidos. No total, a amostra constituiu-se de 64 implantes e 62 pilares.

4.1 PILARES

Após 4 semanas de reparo, no grupo de teste, no aspecto bucal, IS-B foi $1,43 \pm 0,99$ mm, IS-C foi $0,67 \pm 0,53$ mm, PM-C foi $2,61 \pm 0,37$ mm e PM-AJE foi $2,39 \pm 0,33$ mm. No grupo controle, IS-B era $1,61 \pm 0,74$ mm, IS-C era $0,50 \pm 0,59$ mm, PM-C era $2,59 \pm 0,36$ mm e PM-AJE era $2,59 \pm 0,41$ mm. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p > 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre grupos teste e controle, 4 semanas após cirurgia. Dados apresentados em milímetros na forma de média $\pm$ desvio padrão, (Mediana; Interquartil 25%-75%).

	IS-B	IS-C	PM-C	PM-AJE
Teste	$1,43 \pm 0,99$ (1,25; 0,89- 1,93)	$0,67 \pm 0,53$ (0,51; 0,26- 0,96)	$2,61 \pm 0,37$ (2,54; 2,38- 2,78)	$2,39 \pm 0,33$ (2,36; 2,29- 2,48)
Controle	$1,61 \pm 0,74$ (1,53; 1,35- 1,81)	$0,50 \pm 0,59$ (0,37; 0,22- 0,81)	$2,59 \pm 0,36$ (2,55; 2,33- 3,75)	$2,59 \pm 0,41$ (2,48; 2,32- 2,82)
p	0,711	0,562	0,960	0,342

Após oito semanas de reparo, no grupo de teste, IS-B foi de $1,72 \pm 0,70$ mm, IS-C foi de $0,50 \pm 0,48$ mm, PM-C foi de $2,59 \pm 0,27$ mm e PM-AJE foi $2,78 \pm 0,44$ mm. No grupo de controle, IS-B foi $2,18 \pm 0,71$ mm, IS-C foi de $0,91 \pm 0,64$ mm, PM-C foi de $2,86 \pm 0,84$ mm e PM-AJE foi de $2,42 \pm 0,64$ mm. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p > 0,05$; Tabela 2). Os

resultados entre os tempos experimentais não mostraram diferenças estatisticamente significantes nos grupos de teste e controle, com exceção de PM-AJE do grupo teste, com valores maiores observados 8 semana após a instalação dos implantes (Tabela 3).

Tabela 2. Comparação entre grupos teste e controle, 8 semanas após cirurgia. Dados apresentados em milímetros na forma de média $\pm$ desvio padrão, (Mediana; Interquartil 25%-75%).

	IS-B	IS-C	PM-C	PM-AJE
Teste	1,72 $\pm$ 0,70 (1,64; 1,28-2,29)	0,50 $\pm$ 0,48 (0,45; 0,23-0,66)	2,29 $\pm$ 0,27 (2,51; 2,45-2,70)	2,78 $\pm$ 0,44 (2,79; 2,55-3,05)
Controle	2,18 $\pm$ 0,71 (1,98; 1,56-2,58)	0,91 $\pm$ 0,64 (0,64; 0,49-1,20)	2,86 $\pm$ 0,84 (2,59; 2,40-3,02)	2,42 $\pm$ 0,64 (2,69; 1,95-2,81)
p	0,453	0,222	0,904	0,327

Tabela 3. Comparação entre tempos. Dados apresentados em milímetros.

		IS-B	IS-C	PM-C	PM-AJE
Teste	4 semanas	1,43 $\pm$ 0,99	0,67 $\pm$ 0,53	2,61 $\pm$ 0,37	2,39 $\pm$ 0,33
	8 semanas	1,72 $\pm$ 0,70	0,50 $\pm$ 0,48	2,59 $\pm$ 0,27	2,78 $\pm$ 0,44
p		0,385	0,131	0,879	0,042
Controle	4 semanas	1,61 $\pm$ 0,74	0,50 $\pm$ 0,59	2,59 $\pm$ 0,36	2,59 $\pm$ 0,41
	8 semanas	2,18 $\pm$ 0,71	2,91 $\pm$ 0,64	2,86 $\pm$ 0,84	2,42 $\pm$ 0,64
p		0,360	0,274	0,342	0,520

4.2 IMPLANTES

Após 4 semanas de reparo, o novo osso em contato próximo com a superfície do implante foi encontrado em porcentagens elevadas nos implantes tratados ($60,1 \pm 15,6\%$) e não tratados ($57,2 \pm 13,1\%$). As baixas porcentagens de osso antigo foram encontradas neste estágio de reparo, isto é, $4,4 \pm 3,0\%$ e $3,4 \pm 3,1\%$ nos implantes tratados e não tratados, respectivamente. A quantidade total de osso foi de $64,5 \pm 16,5\%$ no grupo teste e $60,6 \pm 14,6\%$ nos implantes não tratados (controle). Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa (Tabela 4).

Após oito semanas de reparo, o novo osso aumentou em porcentagem, atingindo o valor de $72,5 \pm 12,4\%$ no grupo teste. O osso antigo estava presente em $3,1 \pm 1,7\%$ da superfície analisada, de modo que o osso total atingiu $75,6 \pm 13,0\%$. No grupo controle, o osso novo também aumentou para $64,7 \pm 17,3\%$. O osso antigo foi encontrado em porcentagens de $3,8 \pm 1,9\%$. O osso total foi de $68,4 \pm 16,8\%$. Todas as diferenças entre os locais tratados e não tratados foram estatisticamente significantes, excluindo a porcentagem de osso antigo. Não foram encontradas diferenças entre os períodos de reparo de 4 e 8 semanas para qualquer uma das variáveis analisadas (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de contato osso-implante (BIC) representados em porcentagem (%)

		Osso novo	Osso antigo	Osso total	Tec. Mole
4 semanas	Teste	$60,1 \pm 15,6$	$4,4 \pm 3,0$	$64,5 \pm 16,5$	$35,5 \pm 16,5$
	Controle	$57,2 \pm 13,1$	$3,4 \pm 3,1$	$60,6 \pm 14,6$	$39,4 \pm 14,6$
	p	0,400	0,726	0,208	0,208
8 semanas	Teste	$72,5 \pm 12,4$	$3,1 \pm 1,7$	$75,6 \pm 13,0$	$24,4 \pm 13,0$
	Controle	$64,7 \pm 17,3$	$3,8 \pm 1,9$	$68,4 \pm 16,8$	$31,6 \pm 16,8$
	p	0,012	0,270	0,018	0,018

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Uma área de pesquisa muito importante é o desenvolvimento de tecnologias eficientes à vácuo, capazes de limpar e ativar superfícies para substituir os métodos convencionais de limpeza de superfícies metálicas ou poliméricas. Neste contexto, a tecnologia de plasma a frio representa uma alternativa eficiente e tem sido objeto de crescente atenção. O equipamento de plasma de baixa temperatura funciona dentro de uma câmara de vácuo em que os gases atmosféricos são evacuados tipicamente abaixo de 0,1 Torr. Esta baixa pressão permite um caminho livre de elétrons e íons acelerados. Uma vez que os íons e as partículas neutras estão próximas ou em temperatura ambiente, e os elétrons, que estão em alta temperatura, têm relativamente poucas colisões com moléculas a essa pressão, a reação permanece a baixa temperatura. Com parâmetros adequados, o plasma de argônio remove todos os vestígios químicos de tratamentos anteriores, produzindo superfícies mais limpas e melhor controladas do que com os métodos de preparação convencionais (Moisan *et al.*, 2002). Além disso, as vantagens da limpeza do plasma podem ser exploradas para melhorar a resposta do tecido mole durante a fase protética. A mudança na molhabilidade superficial do titânio puro comercial pode determinar a resposta funcional dos fibroblastos e, portanto, é um fator crítico para a adesão do tecido mole ao pilar de titânio.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças em relação aos pilares entre os grupos de teste e controle para o primeiro tempo experimental (4 semanas). No entanto, no segundo tempo (8 semanas), apesar da ausência de diferenças estatisticamente significantes, observou-se uma tendência que mostra níveis de osso marginal ligeiramente melhores no grupo de teste, em comparação com o grupo controle. Isso pode explicar por que um estudo publicado anteriormente mostrou uma melhor manutenção do nível ósseo ósseo (radiograficamente) em seres humanos após o acompanhamento de dois e cinco anos nos sítios tratados (Canullo, Tallarico, *et al.*, 2016). Isso pode sugerir que, em um acompanhamento mais longo, a significância estatística também pode ser alcançada em estudos experimentais. Embora um estudo *in vitro* publicado recentemente não apresentasse diferenças quantitativas em termos de adesão celular entre os discos de titânio tratados com plasma ou apenas esterilizados após 8 horas, o mesmo estudo relatou diferenças

qualitativas em termos de espreadimento celular (Canullo, Cassinelli, *et al.*, 2013). Isso pode sugerir que um tempo de análise mais curto só poderia mostrar diferenças em nível microscópico.

Pode-se especular que as diferenças em termos de IS-B, IS-C e PM-C entre os grupos de teste e controle, embora não tenham atingido níveis significantes, poderiam ser a expressão precoce de uma melhor organização do tecido mole periimplar. Esta especulação pode ser apoiada pelos resultados diferentes relatados por dois estudos com diferentes tempos experimentais. Na verdade, enquanto (Canullo, Dehner, *et al.*, 2016) relataram uma ausência de diferenças histológicas após uma semana, (Garcia *et al.*, 2017) observaram resultados significativamente melhores após duas semanas em termos de adesão de células conjuntivas e arranjo de tecidos moles em pilares limpos pelo plasma em comparação com pilares esterilizados. Por esse motivo, os resultados da presente investigação devem ser tomados com cautela devido o curto tempo experimental não ter revelado diferenças entre os grupos de pilares.

Ao se analisar os implantes, os dados do presente estudo estão de acordo com os resultados publicados anteriormente que mostram que a ativação da superfície do implante de titânio através do tratamento com plasma pode afetar positivamente a adesão dos osteoblastos, aumentando as células ósseas e a adsorção de proteínas no titânio (Junker *et al.*, 2009; Tavares *et al.*, 2009; Canullo *et al.*, 2017). Numa visão clínica, os resultados apresentados podem sugerir a ativação da superfície do implante que pode acelerar e melhorar qualitativamente o processo de osseointegração.

Os resultados do presente estudo foram alcançados em cães, apesar do relevante padrão regenerativo do próprio modelo animal. Estudos demonstraram o efeito positivo da funcionalização superficial no caso de modelos animais com implantes inseridos com um *gap* ósseo (Ueno *et al.*, 2010). Na verdade, apesar das diferenças serem sempre observadas entre teste e controle, a significância estatística foi alcançada somente na comparação de oito semanas (em relação aos implantes). Isso pode sugerir que um modelo menos eficaz poderia demonstrar significância mesmo em uma fase precoce. Do ponto de vista clínico, esta abordagem pode ser ainda mais determinante no caso de deficiência quantitativa e/ou qualitativa do suporte ósseo.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações do presente estudo, ao se analisar os pilares, encontrou-se uma tendência de melhores níveis de osso marginal no grupo teste em comparação com o grupo controle, embora essas diferenças não tenham alcançado significância, não permitindo afirmar que sua utilização em pilares traria uma melhora na integração dos tecidos moles. Já em relação aos implantes de titânio, as diferenças entre teste e controle, principalmente no período de 8 semanas, podem sugerir que o uso de plasma de argônio poderia melhorar a integração dos tecidos periimplantares à superfície dos implantes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. ABRAHAMSSON, I. et al. The peri-implant hard and soft tissues at different implant systems. A comparative study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 7, n. 3, p. 212-9, Sep 1996.
2. ALVES JR., C. et al. Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge. **Surface and Coatings Technology**, v. 294, n. 2-3, p. 196-202, 2005.
3. ANNIBALI, S. et al. Peri-implant marginal bone level: a systematic review and meta-analysis of studies comparing platform switching versus conventionally restored implants. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 11, p. 1097-1113, Nov 2012.
4. BECKER, K. H. et al. **Non-Equilibrium Air Plasmas at Atmospheric Pressure** 2004.
5. BUSER, D.; MARTIN, W.; BELSER, U. C. Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 19 Suppl, p. 43-61, 2004.
6. CANEVA, M. et al. Connective tissue grafts in conjunction with implants installed immediately into extraction sockets. An experimental study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 1, p. 50-6, Jan 2013.
7. CANULLO, L. et al. Plasma of argon accelerates murine fibroblast adhesion in early stages of titanium disk colonization. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 28, n. 4, p. 957-62, Jul-Aug 2013.
8. CANULLO, L. et al. Soft Tissue Response to Titanium Abutments with Different Surface Treatment: Preliminary Histologic Report of a Randomized Controlled Trial. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 2952530, 2016.
9. CANULLO, L. et al. Platform switching and marginal bone-level alterations: the results of a randomized-controlled trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 1, p. 115-21, Jan 2010.
10. CANULLO, L. et al. Morphometric Changes Induced by Cold Argon Plasma Treatment on Osteoblasts Grown on Different Dental Implant Surfaces. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 37, n. 4, p. 541-548, Jul/Aug 2017.
11. CANULLO, L. et al. Plasma of Argon Affects the Earliest Biological Response of Different Implant Surfaces: An In Vitro Comparative Study. **J Dent Res**, v. 95, n. 5, p. 566-73, May 2016.
12. CANULLO, L.; MICARELLI, C.; IANNELLO, G. Microscopical and chemical surface characterization of the gingival portion and connection of an internal hexagon abutment before and after different technical stages of preparation. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 6, p. 606-11, Jun 2013.

13. CANULLO, L. et al. Microscopical and microbiologic characterization of customized titanium abutments after different cleaning procedures. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, n. 3, p. 328-36, Mar 2014.
14. CANULLO, L. et al. Implant Abutment Cleaning by Plasma of Argon: 5-Year Follow-Up of a Randomized Controlled Trial. **J Periodontol**, v. 87, n. 4, p. 434-42, Apr 2016.
15. COCHRAN, D. L. et al. Biologic width around titanium implants. A histometric analysis of the implanto-gingival junction around unloaded and loaded nonsubmerged implants in the canine mandible. **J Periodontol**, v. 68, n. 2, p. 186-98, Feb 1997.
16. COELHO, P. G. et al. Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 7, p. 1901-6, Jul 2012.
17. DEGIDI, M. et al. Immediately loaded titanium implant with a tissue-stabilizing/maintaining design ('beyond platform switch') retrieved from man after 4 weeks: a histological and histomorphometrical evaluation. A case report. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 3, p. 276-82, Mar 2008.
18. DUSKE, K. et al. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 4, p. 400-7, Apr 2012.
19. FOEST, R. et al. Non-thermal atmospheric pressure discharges for surface modification. **Plasma Physics and Controlled Fusion**, v. 47, n. 12B, 2005.
20. FOEST, R.; SCHMIDT, M.; BECKER, K. Microplasmas, a New World of Low Temperature Plasmas. **Int. Journal of Mass Spectrometry**, v. 248, 2005.
21. GARCIA, B. et al. Influence of plasma cleaning procedure on the interaction between soft tissue and abutments: a randomized controlled histologic study. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n. 10, p. 1269-1277, Oct 2017.
22. GRANATO, R. et al. Thin bioactive ceramic-coated alumina-blasted/acid-etched implant surface enhances biomechanical fixation of implants: an experimental study in dogs. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 13, n. 2, p. 87-94, Jun 2011.
23. HERMANN, J. S. et al. Crestal bone changes around titanium implants. A radiographic evaluation of unloaded nonsubmerged and submerged implants in the canine mandible. **J Periodontol**, v. 68, n. 11, p. 1117-30, Nov 1997.
24. JUNKER, R. et al. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 20 Suppl 4, p. 185-206, Sep 2009.
25. LIEBERMAN, M. A.; LICHTENBERG, A. J. **Principles of plasma discharges and materials processing**. New York: 2005.

26. MANIATOPOULOS, C. et al. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 1, n. 1, p. 31-7, Summer 1986.
27. MANZ, M. C. Factors associated with radiographic vertical bone loss around implants placed in a clinical study. **Ann Periodontol**, v. 5, n. 1, p. 137-51, Dec 2000.
28. MARIN, C. et al. Removal torque and histomorphometric evaluation of bioceramic grit-blasted/acid-etched and dual acid-etched implant surfaces: an experimental study in dogs. **J Periodontol**, v. 79, n. 10, p. 1942-9, Oct 2008.
29. MISHRA, P. K. et al. Micrometer-sized titanium particles can induce potent Th2-type responses through TLR4-independent pathways. **J Immunol**, v. 187, n. 12, p. 6491-8, Dec 15 2011.
30. MOISAN, M. et al. Plasma sterilization. Methods and mechanisms. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 3, p. 349-358, 2002.
31. PIATTELLI, A. et al. Histologic studies on osseointegration: soft tissues response to implant surfaces and components. A review. **Dent Mater**, v. 27, n. 1, p. 53-60, Jan 2011.
32. ROOS-JANSACKER, A. M. et al. Dog model for study of supracrestal bone apposition around partially inserted implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 13, n. 5, p. 455-9, Oct 2002.
33. SAWASE, T. et al. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 5, p. 491-6, May 2008.
34. SCHOU, S. et al. Outcome of implant therapy in patients with previous tooth loss due to periodontitis. **Clin Oral Implants Res**, v. 17 Suppl 2, p. 104-23, Oct 2006.
35. SWART, K. M. et al. Short-term plasma-cleaning treatments enhance in vitro osteoblast attachment to titanium. **J Oral Implantol**, v. 18, n. 2, p. 130-7, 1992.
36. TAVARES, J. C. et al. Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro. **Toxicology**, v. 262, n. 2, p. 138-45, Aug 03 2009.
37. TIAN, Y. et al. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* by a direct-current, cold atmospheric-pressure air plasma microjet. **J Biomed Res**, v. 24, n. 4, p. 264-9, Jul 2010.
38. TUGULU, S. et al. Preparation of superhydrophilic microrough titanium implant surfaces by alkali treatment. **J Mater Sci Mater Med**, v. 21, n. 10, p. 2751-63, Oct 2010.
39. UENO, T. et al. Enhancement of bone-titanium integration profile with UV-photofunctionalized titanium in a gap healing model. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1546-57, Mar 2010.

40. VAN ASSCHE, N. et al. Microbiological outcome of two screw-shaped titanium implant systems placed following a split-mouth randomised protocol, at the 12th year of follow-up after loading. **Eur J Oral Implantol**, v. 4, n. 2, p. 103-16, Summer 2011.
41. VIGOLO, P.; GIVANI, A. Platform-switched restorations on wide-diameter implants: a 5-year clinical prospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 1, p. 103-9, Jan-Feb 2009.

VERSÃO RESUMIDA EM INGLÊS

Evaluation of argon plasma in the integration of soft and hard tissues to implants and prosthetic components: a randomized study in dogs

INTRODUCTION

Plasma is often referred to as the 4th state of matter. A plasma is characterized by the presence of positive and / or negative ions and charged electrons in a neutral gas (Lieberman and Lichtenberg, 2005). Plasmas can be categorized as "thermal plasmas" or hot (such as those historically used for hydroxyapatite coatings by plasma spraying on implant surfaces) or "atmospheric pressure plasmas" or cold (PPAs). The potential difference explains the acceleration of electrons that will collide with neutral atoms and molecules of the gas, producing ions and new electrons. The produced ions are accelerated to the cathodically polarized electrode, participating in a series of effects. These include the heating of the cathode by transfer of ionic energy, the creation of defects by the removal of surface atoms, elastic collisions and the accelerated surface reaction caused by the presence of more active species than those found in conventional processes (Alves Jr. et al. ., 2005).

The microplasma applications used in the present study have reached clinical technological significance with success since it was built in small dimensions, allowing portability in the clinical scenario and proving to provide enough energy to increase the surface energy, while at the same time operating safe in atmospheric conditions (Tian et al., 2010). The atmospheric pressure plasmas used in biomedical applications have effectively changed the energy and chemistry of the surfaces due to the high concentration of reactive species that are generated (Foest, R. et al., 2005; Foest, R. et al., 2005) . Recent studies have shown that gas mixtures such as argon and oxygen are suitable as rare metastable gas species (chargers of a significant amount of energy), leading to the formation of reactive oxygen species through energy transfer reactions (Foest, R. et al., 2005; Foest, R. et al., 2005). Thus, depending on plasma configuration and chemistry, incorporation of reactive species and additional surface cleaning may result in increased levels of surface reactivity and energy that can be applied immediately prior to implant placement. This efficient and economical process has potential benefits for any commercially available implant surface (Coelho et al., 2012).

However, there is a lack of evidence in the literature regarding the clinical relevance of the use of argon plasma in dental implant abutment cleansing, as well as its use on implant surfaces, in order to increase its surface energy.

MATERIAL AND METHODS

Eight beagle dogs were used for the experiment. The animals were pre-anesthetized for all surgical procedures with Acepran 0.2% (0.05 mg/kg; Univet-vetnil, Sao Paulo, Brazil) and sedated with Zoletil (10 mg/kg; Virbac, St. Louis, Mo. U.S.), and the maintenance of the anesthesia was performed with inhalation of Forane (Baxter Hospitalar, Sao Paulo, Brazil). All mandibular premolars and the first molars were extracted bilaterally and after three months, a crestal incision was performed in the premolar–molar region of one randomly selected side of the mandible. Full-thickness mucoperiosteal flaps were elevated, and four experimental sites were selected in the edentulous alveolar ridges of the mandible. The surgical preparation of the sites was performed according to the manual of the implant system used. Twist drills were used to prepare each recipient site. Four implants (Premium, Sweden & Martina, Due Carrare, Italy), 7 mm long and 3.3 mm wide, were subsequently inserted. Before connection, two of the four abutments were detoxified (test group), while two were left untreated (control group). One abutment of each group was placed on to one of the two mesially and one of the two distally located implants, respectively, according to the randomization allocation. The flaps were sutured to allow nonsubmerged healing. After one month of healing, the surgical procedures were applied on the other side of the mandible, again following a randomization protocol. After every surgery, the animals underwent antibiotic treatment for ten days (Stomorgyl 10, one tablet/10 kg daily; Merial Saude Animal, Paulinia, Brazil) and received anti-inflammatory drugs for five days (Maxicam 2 mg, one tablet/20 kg daily; Ourofino Saude Animal, Cravinhos, Brazil) and an analgesic for three days (Tramal 50 mg, 4 mg/kg, subcutaneous; every 8 h; Uniao Quimica Farmaceutica Nacional, Pouso Alegre, Brazil). The animals were kept in kennels at the university's field laboratory with free access to water and feed of moistened balanced dog food. Daily inspection of the wounds for clinical signs of complications and cleaning of the healing abutments were performed. The animals were euthanized one month after the last surgery by applying an overdose of thiopental (Cristalia, Campinas, Brazil) and 25 meq of potassium chloride IV.

RESULTS

In total, 64 implants were placed in eight beagle dogs. All of the animals remained in good health during the experimental period and no complications occurred during the healing period. An $n = 8$ was reached at the one-month period, while an $n = 7$ was reached at the two-month period because one dog lost implants in the control group. After one month of healing (Table 1), in the test group, at the buccal aspect, IS-B was 1.43 ± 0.99 mm, IS-C was 0.67 ± 0.53 mm, PM-C was 2.61 ± 0.37 mm and PM-AJE was 2.39 ± 0.33 mm. In the control group, IS-B was 1.61 ± 0.74 mm, IS-C was 0.50 ± 0.59 mm, PM-C was 2.59 ± 0.36 mm and PM-AJE was 2.59 ± 0.41 mm. No statistically significant differences were found between the groups ($p > 0.05$).

After two months of healing in the test group, IS-B was 1.72 ± 0.70 mm, IS-C was 0.50 ± 0.48 mm, PM-C was 2.59 ± 0.27 mm and PM-AJE was 2.78 ± 0.44 mm. In the control group, IS-B was 2.18 ± 0.71 mm, IS-C was 0.91 ± 0.64 mm, PM-C was 2.86 ± 0.84 mm and PM-AJE was 2.42 ± 0.64 mm. No statistically significant differences were found between the groups ($p > 0.05$). The results between the first and the second time points showed no statistically significant differences between the test and control groups, except for PM-AJE of the test group, with higher values observed two months after implant placement.

After 1 month of healing, new bone in close contact with the implant surface was found at high percentages at both the treated ($60.1 \pm 15.6\%$) and untreated ($57.2 \pm 13.1\%$) implants. Low percentages of old bone were found at this stage of healing, i.e. $4.4 \pm 3.0\%$ and $3.4 \pm 3.1\%$ at the treated and untreated implants, respectively. The total amount of mineralized bone was $64.5 \pm 16.5\%$ at the treated, and $60.6 \pm 14.6\%$ at the untreated implants. None of the differences was statistically significant. After two months of healing, new bone increased in percentage, reaching at the treated sites $72.5 \pm 12.4\%$. Old bone was present on $3.1 \pm 1.7\%$ of the analyzed surface so that the total mineralized bone reached $75.6 \pm 13.0\%$. At the untreated sites, new bone also increased to $64.7 \pm 17.3\%$. Old bone was found in percentages of $3.8 \pm 1.9\%$. The total mineralized bone was $68.4 \pm 16.8\%$. All differences between treated and untreated sites were statistically significant, excluding the old bone percentage. No differences were found between the 1- and 2-month periods of healing for any of the variable analyzed.

DISCUSSION

A very important area of research is the development of efficient high-vacuum technologies able to clean and functionalize surfaces to replace conventional methods of cleaning metallic or polymeric surfaces. In this context, cold plasma technology represents an efficient alternative and has been the subject of increasing attention. Low-temperature plasma equipment works within a vacuum chamber in which atmospheric gases have been evacuated typically below 0.1 torr. This low pressure allows for a relatively long free path of accelerated electrons and ions. Since the ions and neutral particles are at or near ambient temperatures and the electrons, which are at high-temperature or electronvolt levels, have relatively few collisions with molecules at this pressure, the reaction remains at low temperature. With appropriate plasma parameters, argon plasma removes all chemical traces of previous treatments, in effect producing cleaner and better controlled surfaces than with conventional preparation methods.²³

Furthermore, the advantages of plasma cleaning can be exploited to enhance the soft tissue response during the prosthetic implant phase. Change in the surface wettability of commercial pure titanium, in fact, might determine the functional response of fibroblasts and is therefore a critical factor for the adhesion of soft tissue to the titanium abutment. In the present study, no differences were found between the test and control groups for

the first time point (one month of healing). However, at the second time point (two months), despite the absence of statistically significant differences, a trend showing slightly better marginal bone levels in the test group, compared with the control group, was observed. This may explain why a previously published study showed statistically significantly better radiographic bone level maintenance in humans after two- and five-year follow-up at the treated sites.²⁴ This may suggest that, in a longer followup, statistical significance could also be reached in experimental studies.

Although a recently published *in vitro* study presented no quantitative differences in terms of cell adhesion between plasma-cleaned or only sterilized titanium disks after 8 h, the same study reported qualitative differences in terms of cell spreading.²⁵ This may suggest that a shorter analysis time frame may only show differences at the microscopical level. It can be speculated that the differences in terms of IS-B, IS-C and PM-C between the test and control groups, although they did not reach significant levels, could be the early expression of better organization of

periimplant soft tissue due to a more “proactive” abutment. This speculation could be supported by the dissimilar outcomes reported by two studies with different time points. In fact, while Canullo et al. reported an absence of histological differences after one week,²⁶ Garcia et al. observed significantly better outcomes after two weeks in terms of connective cell adhesion and soft-tissue arrangement around abutments cleaned by plasma compared with sterile abutments.²⁷ For this reason, the outcomes of the present investigation should be taken with caution owing to the short follow-up that may have failed to disclose differences.

Data from the present study are in accordance with previously published results showing that activation of the titanium implant surface through plasma treatment can positively affect osteoblast adhesion, thus enhancing bone cells and protein adsorption on titanium. From a clinical point of view, the results presented might suggest the activation of the implant surface that may speed up and qualitatively enhance the osseointegration process. The promising results from the present study were reached in the dog model, although the relevant regenerative pattern of the animal model itself. In fact, despite differences were always observed between test and control, significance was reached only at two-month-comparison. This might suggest that a less performant model might highlight significance even at an earlier stage. In fact, recently published in vitro study on this topic (Canullo et al. 2016) highlighted significant differences between test (plasma of Argon) and control (untreated) using culture media with low level of proteins and cell to simulate clinical environment in elderly patients. From a clinical point of view, this surgical approach might be even more determinant in case of quantitative and/or qualitative deficiency of the bone support. Studies, in fact demonstrated the positive effect of surface functionalization in case of animal models with implant inserted with a bone gap (Uedo et al . 2009).

CONCLUSION

Within the limitations of the present study, when analyzing the abutments, there was a trend of better levels of marginal bone in the test group compared to the control group, although these differences did not reach significance, not allowing to state that their use in pillars would bring about an improvement in soft tissue integration. Regarding titanium implants, the differences between test and control,

especially in the 8-week period, may suggest that the use of argon plasma could improve the integration of the peri-implant tissues to the surface of the implants.