Universidad Complutense de Madrid
Master en Ciencias Odontológicas

Nuevos Recubrimientos Biocidas en Implantología. Evaluación, mediante un biofilm formado por 6 tipos de bacterias subgingivales.

ROQUELINA PIANETA ALVIZ

TUTOR: Dr. DAVID HERRERA GONZALEZ

2014

ÍNDICE

Pág.

1. Resumen……3

2.Introducción……4

3. Objetivos e Hipótesis……13

4. Material y método……14

4.1 Modelo Bacteriano y Cultivo……14

4.2 Materiales, Tipo y Cantidad de Discos Utilizados ……15

4.3 Medición y Ajuste de Concentración Bacteriana……16

4.4 Formación del Biofilm……17

4.5. Extracción del biofilm de los Discos y recuento bacteriano……18

4.6 Análisis Mediante Microscopía Láser Confocal(CLSM)……19

4.7 Análisis estadístico……21

5. Resultados……22

6. Discusión……34

7. Conclusión……43

8. Agradecimientos……44

9. Bibliografía……46

1. Resumen

Antecedentes y objetivos: La biopelícula oral ocupa un lugar importantísimo en el desarrollo de las enfermedades periimplantarias (mucositis o periimplantitis). En la actualidad, se sabe muy poco sobre el comportamiento de estas comunidades bacterianas periimplantarias al ser sometidas a recubrimientos biocidas sobre implantes, pilares y demás aditamentos implantológicos que puedan estar en contacto con ellas. El objetivo de esta investigación fue observar el comportamiento de un material compuesto cerámica-cerámica con recubrimiento con vidrio biocida, sobre un modelo de biofilm in vitro que contiene seis bacterias de la microbiota subgingival, puesto a punto en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid

Material y método: Se emplearon seis cepas de referencia para desarrollar biofilms sobre la superficie de discos de hidroxiapatita (HA) de 7 mm de diámetro y 1.8 mm de espesor y sobre discos de Nano Composite Z10Ce, con recubrimiento con corindón blanco, recubiertos con vidrio CINN (material A2). Se depositaron tres discos de cada material en placas estériles de cultivo celular de 24 pocillos y se cubrieron con 1.5 mL del inóculo (en medio BHI modificado), preparado con el total de las bacterias y se incubaron en anaerobiosis durante 24h, 48h y 72h a 37ºC. Las especies seleccionadas representan colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y tardíos (*Porphyromonas gingivalis y Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). El análisis de viabilidad bacteriana en el biofilm se realizó mediante Microscopía Confocal (CLSM). El número de unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de cada especie presentes en el biofilm se obtuvo mediante recuento visual con microscopio óptico. Para el análisis estadístico, se utilizó un test estadístico de comparación de medias (t test) y el análisis de la varianza (ANOVA).

Resultados: En el presente estudio, según el análisis estadístico, se encontraron pocas diferencias estadísticamente significativas entre el número de bacterias que participan en el desarrollo del biofilm *in vitro* sobre hidroxiapatita (HA) y el material A2. Aunque, según el recuento bacteriano por cultivo, se pudieron observar mayores diferencias entre ambos materiales Estas diferencias se confirman con los resultados de la microscopía láser confocal (CLSM).

Conclusiones: De forma preliminar, este estudio demuestra que el Nano Composite Z10Ce, recubierto con vidrio CINN (material A2), parece que ejerce un efecto biocida en el desarrollo de un modelo de biofilm subgingival *in vitro*, aunque los datos estadísticos no revelan diferencias significativas. Deben llevarse a cabo más experimentos para comprobar los resultados mostrados en este estudio.

2. INTRODUCCION

La boca humana, alberga un número de microorganismos que colonizan una variedad de superficies (Socransky y Haffajee 1994) y se encuentran típicamente en forma de biopelícula o biofilm (Gilbert et al. 1997). Muchos tipos de bacterias orales se encuentran comúnmente adheridas a las superficies del diente, en forma de placa dental (Sreenivasan et al.2002; Marsh 2005; Cabal et al. 2012). El individuo tiene en la microflora de su cavidad oral, aproximadamente más de 800 tipos de bacterias que se expresan según la susceptibilidad del huésped y según factores externos que puedan modificar el medio (Roberts et al. 2013; Sedlacek y Walker 2007).

Las biopelículas orales, se acumulan tanto en los tejidos duros y blandos y se componen de una comunidad de especies microbianas, que interaccionan y que están incrustadas en una matriz de componentes bacterianos, proteínas salivales, péptidos y restos de comida (Allaker 2010). Una característica clave de esta interacción, es la capacidad para co-agregarse (Kolenbrander 1988), que está mediada por adhesinas y receptores específicos que se producen en las superficies de tipos de células genéticamente distintas.

Las comunidades iniciales de bacterias que se encuentran dentro de esta biopelícula supragingival, son de una diversidad relativamente baja en comparación con los presente en las comunidades maduras tanto de la placa supragingival como de la subgingival. Colonizadores iniciales incluyen *Streptococcus oralis* (Cabal et al. 2012), *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mitis*. La co-agregación con estas bacterias

podrían incluir entonces especies predominantemente Gram negativas, como es el caso de *Fusobacterium nucleatum* (especies "puente") , que luego se co- agrega con numerosos colonizadores finales (Allaker 2010), entre los que está el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*Kolenbrander et al. 2006).

Estas bacterias, a través de sus antígenos, lipopolisacáridos y otros factores de virulencia, provocan la respuesta inflamatoria inmediata e inmune, tanto innata como específica del hospedador. Esta respuesta se traduce por un lado, en la producción de anticuerpos y polimorfonucleares contra las bacterias y por el otro, en la producción de citoquinas y prostaglandinas que, junto con las metaloproteinasas y la activación del complemento, provocan la destrucción del tejido conectivo y óseo. Esta destrucción ocasiona cambios macroscópicos, que se traducen en cambios clínicos, como la pérdida de inserción o el aumento de la profundidad de sondaje que, a su vez, modifican el ambiente favoreciendo las condiciones ideales para la supervivencia y mantenimiento del biofilm subgingival. Tanto la respuesta inflamatoria inmune y la destrucción tisular, están influenciadas por factores de riesgo genéticos, medioambientales y adquiridos (Kinane 1999). Los estudios fundamentales de Socransky, Haffajee y colaboradores (2005), han descrito métodos para evaluar la asociación de las comunidades microbianas bucales con el cambio del estado de salud al de enfermedad. Es así que, catalogaron y estratificaron la microbiota en grupos o complejos, que representan los consorcios bacterianos que parecen producirse conjuntamente y que se encuentran en las biopelículas orales, tanto en individuos sanos como en aquellos con gingivitis y periodontitis (Haffajee et al. 1998; Haffajee y Socransky 1994). Los diferentes complejos microbianos han sido relacionados con la secuencia de colonización de la

superficie dentaria y con la intensidad de la enfermedad. El «complejo rojo», que aparece más tarde en el desarrollo de la biopelícula según Socransky y colaboradores (1998), comprende especies consideradas agentes patógenos periodontales: *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*. Estos investigadores han sugerido que el «complejo rojo» se presenta en la biopelícula, en el periodo de clímax de la comunidad, como parte de ésta, y en las zonas que muestran una progresión de la periodontitis (Socransky et al. 1998.) (Fig.1).

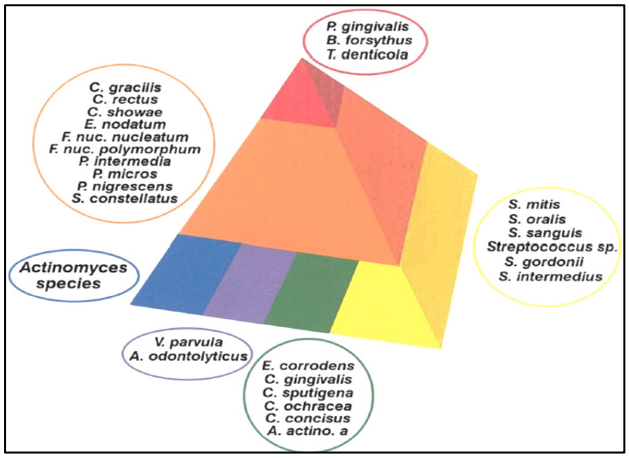


Figura 1. Pirámide de Socransky, asociación entre especies bacterianas subgingivales (Socransky et al. 1998).
Se observan los colonizadores primarios en la base de la pirámide, acompañados por el complejo naranja que se cree, es el puente entre los colonizadores iniciales y las especies del complejo rojo que dominan en las etapas tardías. (Socransky et al. 1998).

Las interacciones bacterianas fueron estudiadas también según las uniones específicas adhesina-receptor (Kolebrander 2006). Este estudio confirma los resultados del modelo de Socransky de 1998.

Estas interacciones se producen en varios niveles e incluyen contacto físico, intercambio metabólico, comunicación molecular e intercambio de material genético.

Sustancias extracelulares poliméricas, producidas por las bacterias en una biopelícula madura, contienen grandes cantidades de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Estos mantienen la integridad estructural de la biopelícula y proporcionar una matriz ideal para el crecimiento y la supervivencia de la célula bacteriana. Este crecimiento de la biopelícula es diferente al crecimiento planctónico por varias características que incluyen, la resistencia a los agentes antimicrobianos a concentraciones que se aproximan a 1.000 veces mayor que la requerida para eliminar microorganismos planctónicos (Lewis 2001; Enkinson y Lamont 2005; Allaker 2010)

La acumulación incontrolada de bacterias orales en la placa dental está asociado a un gran número de condiciones clínicas, incluyendo caries , gingivitis y periodontitis (Socransky Y Haffajee 1992). Por lo tanto, la corriente de odontología preventiva, está dirigida a la reducción de la placa dental en un esfuerzo para disminuir la incidencia de estas condiciones clínicas (Sreenivasan y Gaffar 2002).

A demás, se postula que los biofilms orales pueden producir patologías de origen infeccioso y naturaleza inflamatoria, tanto en las superficies de los implantes como en los tejidos blandos periimplantarios, entre las que está la mucositis periimplantaria y la periimplantitis (Lang y Berglundh 2011).

Dichas infecciones son una de las principales causas de fracaso de los implantes dentales, por lo que los cambios inflamatorios en los tejidos blandos que rodean al implante, los pilares y las tapas de cicatrización (Busscher et al. 2010; Heuer et al. 2007; Cortizo et al. 2013), conducen a una destrucción progresiva del hueso de soporte, lo que se denomina periimplantitis y se observa hasta en el 43% de los individuos tratados con implantes, o de sólo los tejidos blandos, lo que se denomina

mucositis y se observa en hasta el 50% de individuos tratados con implantes (Albrektsson y Isidor 1994; Yoshinari et al. 2001; Scarano et al. 2004; Zitzmann y Berglundh 2008; Lindhe y Meyle 2008; Allaker 2010, Renvert et al. 2012).

Hasta la fecha, todas las terapias propuesta para el manejo de la periimplantitis se basan en tratamientos que, en los últimos decenios, han sido orientados para las infecciones periodontales. La razón de esto, es debido al hecho de que el desarrollo de la biopelícula adherida sobre la superficie del implante, es similar a la biopelícula adherida a la superficie expuesta de los dientes naturales. Pequeñas cantidades de placa, compuesta principalmente de *Streptoc*occus y *Actinomyces spp.*, se acumulan en los implantes que tienen éxito (Busscher et al. 2010; Cortizo et al. 2013). Sin embargo, en la periimplantitis, predominan microorganismos Gram negativos anaerobios (Allaker y Hardie 1998), similares a los que se encuentra alrededor de los dientes naturales en pacientes con periodontitis avanzada (Mombelli y Lang 1992; Pontoriero et al. 1994; Leonhardt et al . 1999; Junior et al. 2001; Heitz-Mayfield y Lang 2010; Nociti; APP 2013), produciéndose así, la co- agregación con *F. nucleatum, P. gingivalis* y algunas especies de *Prevotella.*

La más reciente generación de implantes con porosidades abiertas, no sólo permiten la osteointegración rápida, sino también que haya un mayor riesgo de infección microbiana asociada a biopelículas y aunque la unión del implante al tejido óseo ha podido facilitarse por el aumento de la rugosidad de la superficie, presentan el inconveniente de una mayor adherencia microbiana y la formación de biopelículas (Teughels et al. 2006; Berglundh 2007; Verredt el al. 2011; López-Píriz 2012) .

Debido a lo anterior, se han diseñado múltiples estrategias para el tratamiento y prevención, de las periimplantitis en los últimos años. Los esfuerzos han estado encaminados a prevenir la pérdida de hueso, tanto en los modelos de implantes y sus superficies, como en el diseño de los pilares y conexiones (Pye et al. 2009; López-Píriz 2012).También, se ha hecho énfasis en que la eliminación mecánica de placa con los procedimientos de higiene bucal adecuados, desempeñan un papel importante como alternativa preventiva, sin embargo, el pobre cumplimiento del paciente ha reducido su efectividad (Wilson 1996; Löe 2000).

Además, una vez instaurada la periimplantitis, las formas actuales de tratamiento, son a menudo inadecuadas y puede resultar en infección crónica, lo que requiere la retirada del implante, cirugías resectivas y procedimientos regenerativos en un intento de restaurar y remodelar y se sabe que a corto plazo, hay limitadas mejoras clínicas y microbiológicas, al tratamiento no quirúrgico de la periimplantitis (Renvert et al. 2007, 2009; Serino y Ström 2009; Persson et al . 2010 , 2011; Heitz -Mayfield et al . 2011; Schwarz et al. 2011; Renvert et al. 2012).Se ha recurrido incluso al uso de antibióticos locales y sistémicos (Esposito et al. 2004, 2012), con el inconveniente de que la alta densidad celular de las biopelículas microbianas, se asocia a una mayor resistencia a los antimicrobianos (López-Píriz 2012; Rams et al 2014) .

Una alternativa en la prevención de la pérdida de los implantes debido a la formación de biopelícula microbiana, es mediante la neutralización de la adhesión de los microorganismos sobre la superficie del implante (Verredt et al. 2011).Las modificaciones de las superficies incluyen, cambios en la hidrofobicidad, rugosidad o composición química, etc (Ábalos 2005). Además de la modificación de la superficie

para evitar la adhesión bacteriana, existen los dispositivos de liberación de fármacos, que afectan el crecimiento de bacterias a través de un suministro controlado de sustancias bioactivas sobre el implante (Verredt et al. 2011; López-Píriz 2012). Según estudios, la aplicación de estos agentes biocidas por medios de liberación controlada, parece ser una alternativa adecuada (Jones y Medlicott 1995; Medlicott et al 1996 , 1999; Riggs et al 2000; Zilberman 2005; Cortizo et al. 2013).

Entre los sistemas inorgánicos de recubrimiento de liberación controlada en implantes y pilares de titanio, se han reportado la clorhexidina, los de sílice o de óxido de titanio (Zilberman 2005; Ayón et al. 2006; Radin y Ducheyne 2007; Anglin et al. 2008), y en especial, biovidrios dopados con nano partículas como los vidrios de cobre, de sodio-calcio, con recubrimiento de nano partículas de plata (López-Píriz 2012), sobre distintos sustratos tanto metálicos (aleaciones de titanio), como cerámicos (alúmina – zirconio), en las que especies Gram negativas (*Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia,* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), mostraron ser más susceptibles que las especies Gram positivas (*Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces viscosus*) (Esteban-Tejeda et al 2012).

La clorhexidina, tiene algunas ventajas sobre un antibiótico debido a la ocurrencia limitada de la resistencia y su amplio espectro de actividad (Verredt el al. 2011). Es ampliamente utilizado como componente activo en enjuagues bucales, pero como las infecciones en los implantes están en general situadas en la región transgingival, enjuagar la cavidad oral no es suficiente para prevenir infecciones alrededor de los

implantes dentales. Esto inspiró a la idea de adicionar la clorhexidina en los implantes, para ser liberado durante el período crítico de curación (Verredt et al. 2011).

Se han realizado también estudios *in vivo* comparando distintos tipos de antisépticos biocidas, como clorhexidina, triclosán, aceites esenciales, peróxido de hidrógeno y ácido cítrico, y se ha encontrado, que al ponerlos en contacto con superficies de implantes, en comparación con un tampón salival de PBS, todos han logrado disminuir la cantidad total de microorganismos (Gosau el al. 2010).

A pesar de lo anterior, al estudiar los mismos antisépticos sin combinación de recubrimientos *in vitro*, se observó un efecto poco significativo sobre microorganismos de tipo *Streptococcus,* sobre las superficies de implantes (Bürgers et al. 2012).

Todavía hay limitada información sobre los efectos de las características de las superficies de los implantes, en el riesgo de contraer periimplantitis. Los datos disponibles provienen de estudios experimentales que sugieren que las características superficiales pueden tener un efecto sobre la progresión de una periimplantitis ya establecida (Renvert et al. 2011, Renvert et al. 2012).

El único modo de entender las asociaciones que ocurren en estas comunidades bacterianas y tratar de prevenir sus efectos deletéreos, es estudiar las bacterias patogénicas de dichos biofilms, no como cepas individuales sino en comunidad, así

como sus interacciones. Por ello es fundamental el uso de modelos *in vitro* de comunidades microbianas organizadas con unas condiciones que reproduzcan el hábitat natural de estos biofilms, incluyendo las condiciones de superficie, así como las características específicas de accesibilidad de nutrientes, medio- ambiente físico-químico, etc. Existe un modelo de biofilm subgingival, puesto a punto (Sánchez et al. 2011) y probado a varios tiempos de incubación, el cual, ha sido utilizado en investigaciones, para comprobar la influencia de los materiales de implantes conocidos hasta hoy (titanio y zirconio), sobre la biopelícula causante de las enfermedades periimplantarias.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El propósito de esta investigación fue el de observar el efecto biocida *in vitro*, del Nano composite Z10Ce, recubierto con vidrio CINN, sobre el modelo específico de 6 bacterias subgingivales, puesto a punto en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, utilizando como referencia a la hidroxiapatita (Sánchez et al. 2011)

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Exponer el material estudiado al modelo específico de 6 especies bacterianas subgingivales, durante diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas).
- Comparar y comprobar la presencia bacteriana, entre los tipos de materiales de estudio, por bacteria y en los tres tiempos de incubación, teniendo como control la hidroxiapatita (HA).
- Determinar la viabilidad del biofilm en el material estudiado (A2), con respecto a la hidroxiapatita (HA), mediante microscopía confocal.
- Observar la evolución bacteriana en cada tiempo de incubación.

HIPOTESIS:

El material estudiado produce efectos antimicrobianos *in vitro* en el modelo específico de 6 bacterias.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MODELO BACTERIANO Y CULTIVO:

Se utilizó el modelo de biofilm *in vitro*, pre-establecido y puesto a punto en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid (Sánchez et al. 2011), constituido por cepas que se mantienen crio- conservadas a -80ºC. y que corresponden a *Streptococcus oralis y Actinomyces naeslundii, Veillonella parvula, Fusobacterium nucleatum, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis* (Tabla 1).

Las bacterias se cultivaron, tanto en placas de medio Agar Sangre (Oxoid no 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), como en placas de medio Dentaid-1 (Fumarato Sódico 1,5 g, Formato Sódico 1g, Extracto de Levadura 5g, BHI agar, 52 g) y en medio BHI modificado (Brain Heart Infusion, Becton, Dickinson and Company; EE.UU.) suplementado con: Mucina (2,5 g/L), Extracto de levadura (1,0 g/L), Cisteína (0,1 g/L), Bicarbonato sódico (2,0 g/L), Hemina (5 mg/L), Menadiona (1 mg/L), 0,25% de ácido glutámico (v/v)). El Agar Sangre, se pone a esterilizar en autoclave a 121º C y luego se tempera a 45º C a baño maría y posteriormente se suplementa con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L). El medio Dentaid-1 se pone a esterilizar en autoclave a 121º C, luego se tempera a 45º C a baño maría y posteriormente se añade vancomicina (1,8 ml), esterilizada por filtración.

Tabla 1. Cepas modelo – Colección de Cultivo Tipo

Cepa	Referencia	Colección de Cultivo Tipo
Fusobacterium nucleatum	DSMZ 20482	DMS, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	DSMZ 8324	
Veillonella parvula	NCTC 11810	NCTC, National Collection of Type Cultures
Actinomyces naeslundii	ATCC 19039	ATCC, American Type Cultures Collection
Porphyromonas gingivalis	ATCC 33277	
Streptococcus oralis	CECT 907T	CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

4.2. MATERIALES, TIPO Y CANTIDAD DE DISCOS UTILIZADOS:

Dos materiales diferentes (control y experimental), se utilizaron en el desarrollo de este estudio y fueron dispuestos en dos tipos de discos (Fig. 2):

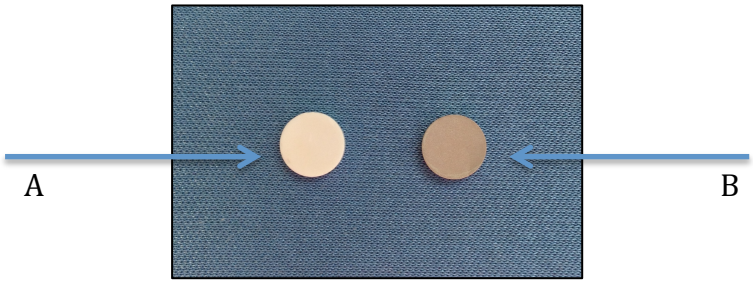
A. Disco experimental - **A2**: material compuesto cerámico-cerámico Nanocomposite Z10Ce, recubiertos con vidrio biocida CINN, elaborados en el Centro de Investigación en Nanomateriales y Nanotecnología (CINN), el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Oviedo (UNIOVI) , de 7 mm de diámetro y 1,8 mm de espesor.

B. Disco Control - **HA**: Hidroxiapatita, de 7 mm de diámetro y 1,8 mm de espesor (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, EE.UU.).

El disco experimental está constituido por una cara pulida y sin vidrio biocida y una cara tratada, en la que se realizará el experimento. El disco control está recubierto en sus dos caras por hidroxiapatita.

Se utilizaron para el experimento, SEIS discos en total: TRES discos correspondientes al control (HA) y TRES discos experimentales (A2).

Figura 2. Materiales y discos utilizados durante el estudio.



A. Disco control de Hidroxiapatita - HA.
B. Discos experimental – A2.

4.3. MEDICIÓN Y AJUSTE DE CONCENTRACIÓN BACTERIANA :

Cada bacteria seleccionada y crio-conservada a -80ºC, se sembró en una placa independiente de medio Agar Sangre suplementado, y se almacenó en condiciones de anaerobiosis (10% H_2, 10% de CO_2 y N_2 en equilibrio) a una temperatura de 37° C, durante el tiempo necesario para que se produzca la formación de colonias.

Una vez que se han formado las colonias en la placa de Agar Sangre suplementado, las bacterias se cultivaron en un medio de cultivo líquido de BHI modificado (pre inóculos). Para ello, se recogió una colonia de cada una de las especies, y se introdujeron en distintos Falcon de 50 mL que contenían 10 mL de medio de cultivo BHI modificado, para proceder a la medición de la densidad óptica bacteriana.

Además se tomó un tubo que contiene BHI modificado estéril, como control negativo.

Los tubos se almacenaron en una jarra y se incubaron en condiciones de anaerobiosis, a una temperatura de 37° C, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento en cada uno de ellos, la cual se comprueba mediante la medida espectrofotométrica a 550 nm.

Con el objetivo de inocular una concentración constante de cada una de las cepas en todos los ensayos, favoreciendo así la reproducibilidad del modelo, se emplearon las curvas de crecimiento de cada bacteria, desarrolladas por Sánchez et al. en 2011, para el modelo de biofilm estático. Estas curvas permitieron relacionar los datos de densidad óptica (D.O), obtenidos mediante medición en espectrofotómetro, con el estado de crecimiento bacteriano y las unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (UFC/mL).

Tabla 2. Modelo bacteriano y concentración final, en unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL) en el pre inóculo

Cepa	Concentración final (ufc/mL)
Streptococcus oralis	10^3
Actinomyces naeslundii	10^5
Veillonella parvula	10^5
Fusobacterium nucleatum	10^6
Porphyromonas gingivalis	10^6
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	10^6

4.4. FORMACIÓN DEL BIOFILM:

Se preparó un tubo Falcon de 50 mL con un inóculo de 10 mL que contiene las 6 especies bacterianas seleccionadas (6 mL de las especies bacterianas y 4 mL de medio BHI modificado), al valor de UFC/mL anteriormente descrito en la Tabla 2, y que se mantenía constante en todos los ensayos a fin de favorecer la reproducibilidad del modelo Se agitó por vórtex y se añadieron 1,5 mL de este inóculo a una placa de cultivo celular de 24 pocillos estéril (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania) (Fig. 3) en la que previamente se han depositado los discos correspondientes a cada material con una pinza estéril (Figura 7), y se ha añadido medio BHI modificado sin bacterias como control negativo. Al finalizar el proceso, la placa se incuba en condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 37º C durante el periodo de estudio que variará entre 24, 48 y 72 horas.

Figura 4. Placa de cultivo celular de 24 pocillos con el medio de cultivo y los discos estudiados.

4.5. EXTRACCIÓN DEL BIOFILM DE LOS DISCOS Y RECUENTO BACTERIANO:

Pasados los distintos tiempos de incubación del biofilm (24, 48 y 72 h), los discos se sacaron de la placa de cultivo en condiciones de esterilidad, se introdujeron en un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de buffer PBS estéril (*Phosphate Buffered Saline*) y se agitó por vórtex durante 2 min con el fin de separar el biofilm de la superficie del disco y disgregarlo para separar las diferentes especies bacterianas que lo componen. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 µL, que se diluyeron de forma seriada en PBS y se sembraron en placas de Agar Sangre suplementado y de Dentaid-1, siempre por duplicado, por el método de siembra en superficie. Las placas inoculadas se incubaron en anaerobiosis a 37ºC. Después de 7-10 días de incubación, se realizaron los recuentos de las UFC por placa de cada especie bacteriana, para determinar el número total de UFC/mL.

4.6. ANALISIS MEDIANTE MICROSCOPÍA LÁSER CONFOCAL (CLSM):

Se procedió a la obtención de mapas topográficos del crecimiento y maduración del biofilm sobre la superficie del material en estudio y de la hidroxiapatita. Se estudiaron las diferentes etapas en el desarrollo del biofilm a las 24, 48 y 72 horas de incubación mediante la técnica de Microscopía Confocal, CLSM (por sus siglas en inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*) Este análisis se llevó a cabo en el Centro de Asistencia a la Investigación - Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

En cada tiempo de incubación se analizó un disco para el material A2 y otro para la hidroxiapatita. El análisis del biofilm por CLSM ha permitido obtener una proyección tridimensional del mismo. Al utilizar los fluorocromos que se citan continuación, se puede analizar y semi-cuantificar el número de bacterias vivas y muertas. El fluorocromo SYTO 9 es capaz de penetrar en todas las bacterias presentes en una muestra, tanto con las membranas celulares intactas como dañadas. En contraste, el Ioduro de Propidio penetra únicamente en bacterias con membranas dañadas, causando una reducción de la fluorescencia del SYTO 9 cuando los dos fluorocromos están presentes en la misma célula. Por tanto, la combinación adecuada de ambos fluorocromos, permite marcar las células bacterianas de una muestra, de forma que las bacterias con sus membranas celulares intactas presentarán fluorescencia verde, mientras que las bacterias con la membrana dañada emitirán fluorescencia roja. La máxima excitación/emisión para estos fluorocromos, es de aproximadamente 480/500 nm para SYTO 9 y 490/635 nm para Ioduro de Propidio.

Para obtener la señal óptima de fluorescencia se ha puesto a punto la técnica previamente, utilizando diferentes ratios de concentración de los fluorocromos y

diferentes tiempos de tinción. Se ha seleccionado el ratio 1:1 y el tiempo de tinción de 9±1 min.

Es así entonces, que al utilizar los fluorocromos, se puede analizar de forma preliminar, el número de bacterias vivas y muertas. Además permite conocer su espesor o altura.

La observación del biofilm por esta técnica mediante el objetivo de 10X, permite obtener una visión global del biofilm desarrollado y de su estructura.

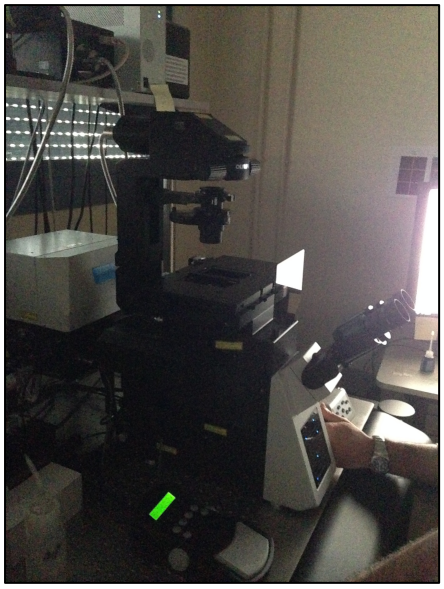


Figura 4. Microscopio Confocal, Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Universidad Compluense de Madrid).

Figura 5. Microscopio Confocal, Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Universidad Compluense de Madrid).

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizaron dos análisis estadísticos correspondientes a una comparación de medias y un análisis de la varianza (ANOVA). En ambos análisis, se aplicó previamente el test de Kolmogorov-Smirnov para cada variable y los datos se expresaron como medias y desviaciones estándar (DE). Se han utilizado Box-plots para la presentación gráfica.

El análisis de comparación de medias (t de Student), se utilizó para comparar el crecimiento bacteriano, en UFC/mL, transformado en logaritmo para obtener una distribución normal, de cada microorganismo sobre ambas superficies (HA y material experimental A2) y para cada tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas). Se utilizaron tres discos de cada material (n=3).

Para analizar el comportamiento de cada especie en ambas superficies durante el tiempo, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA): se evaluó si hubo cambios significativos en el crecimiento bacteriano entre las diferentes visitas, para cada especie bacteriana y material, mediante análisis de la varianza (ANOVA).

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a $p= < 0,05$.

El programa estadístico empleado fue STATGRAPHICS Plus para Windows 5.1 (Statistical Graphics Corp.).

5. RESULTADOS

ANÁLISIS CUANTITATIVO Y EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD BACTERIANA:

Posterior a la siembra por duplicado de las bacterias que forman parte del biofilm obtenido de los discos de hidroxiapatita y el material experimental A2, se determinó el recuento bacteriano según el tiempo de incubación (24, 48, 72 horas). Para cuantificar el número de bacterias en cada disco, se utiliza un microscopio óptico (Fig. 6) y un contabilizador manual.

Una vez determinado el recuento global, se procede al análisis comparativo de la presencia de cada tipo de bacteria, entre el disco experimental (A2) y el disco control (HA), y al análisis sobre la evolución y maduración bacteriana, por cada tipo de bacteria.

Mediante las imágenes obtenidas de la microoscopía confocal (CLSM), se pudo evaluar, la evolución y viabilidad del biofilm bacteriano en los materiales estudiados.

Figura 6. Microscopio Óptico. Laboratorio de Microbiología Universidad Complutense de Madrid.

5.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS:

5.1.1 Identificación y recuento bacteriano, en los dos materiales de estudio, a los distintos tiempos de incubación:

Tras las 24 horas de incubación (Tabla 3.) (Fig. 7), en cuanto a la presencia de *S. oralis* (p=0,326) y *V. parvula* (p=0,53), tras el análisis estadístico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos tipos de materiales.

En el caso de *F. nucleatum*, los resultados del análisis estadístico apuntan a que existen diferencias significativas entre ambos materiales estudiados, encontrándose en mayor cantidad en el disco control que en el disco experimental (P=0,014).

En cuanto a colonizadores tardíos como *A. actinomycetemcomitans* (P=0,419) según el análisis estadístico, se encuentran sin presentar diferencias significativas entre ambos materiales estudiados.

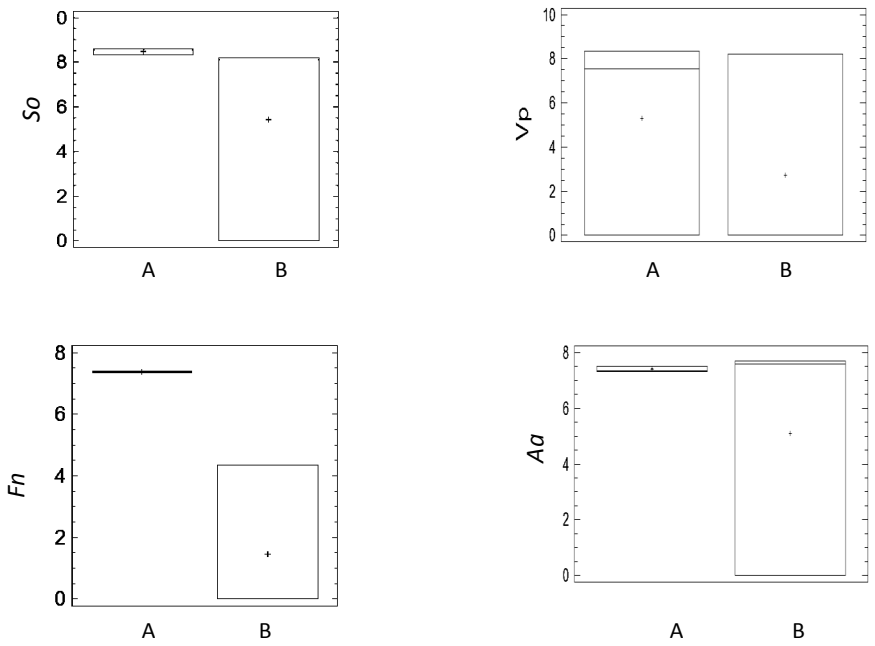
En el caso de *A. naeslundii y P. gingivalis,* no se pudieron evaluar estadísticamente los resultados, debido a que no hubo crecimiento bacteriano en ninguno de los discos de, al menos, uno de los materiales.

Tabla 3. Datos estadísticos (media y desviación estándar) relativos a cada bacteria, a las 24 horas y en cada material estudiado.

Bacteria	Media/ *DE -HA	Media/*DE -A2	*Valor p=*
So	8,49/0,17	5,44/4,71	0,326
Vp	5,3/4,60	2,73/4,73	0,537
An	6,22	0	No evaluable
Fn	7,37/0,030	1,44/2,50	**0,014**
Aa	7,4/0,0105	0,10/4,419	0,419
Pg	5,52	0	No evaluable

- *DE- HA: desviación estándar en el material control de hidroxiapatita.
- *DE- A2: desviación estándar en el material experimental.

Figura 7. Representación gráfica en Box-plot. Comparación de la presencia bacteriana, entre tipos de discos, por bacteria, a las 24 horas.



- A, corresponde al disco control de hidroxiapatita
- B, corresponde al disco experimental A2.

Hay ausencia del gráfico para *Fn* y *Aa*,

En las siguientes 48 horas (Tabla 4.) (Fig. 8), los colonizadores primarios *S. oralis* (p=0,247) y *A. naeslundii* (p=0,650), no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ambos materiales.

Los colonizadores tempranos, como *V. parvula* (p=0,053), no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto entre ambos materiales como sucedió a las 24 horas, aunque se muestra una tendencia a la significación

En el caso de *F. nucleatum* y *P. gingivalis,* no se pudo hacer análisis estadístico, por lo explicado previamente

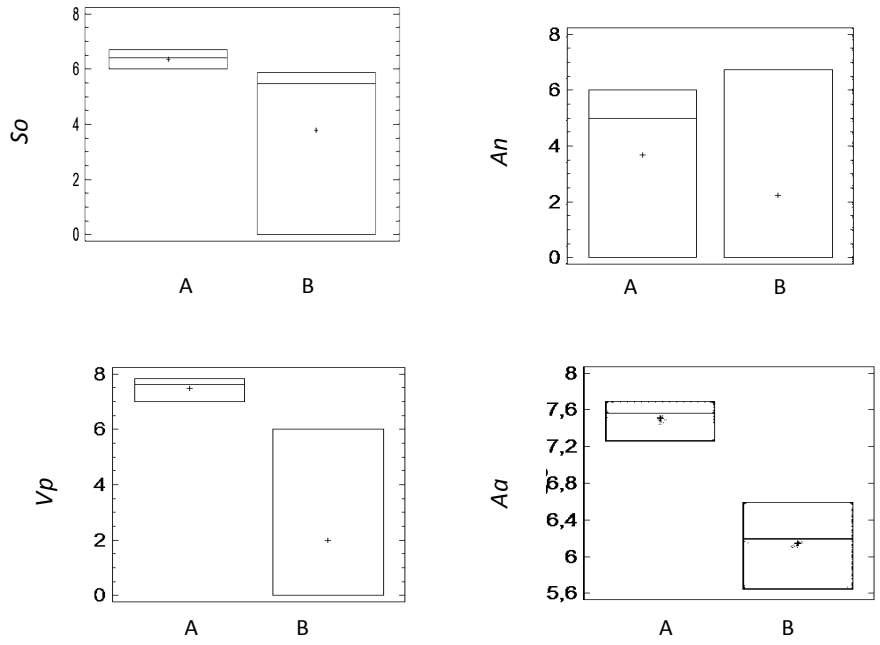
Se observó mayor presencia de *A. actinomycetemcomitans* en la hidroxiapatita (HA), resultando diferencias estadísticamente significativas entre los materiales estudiados (p=0,010).

Tabla 4. Datos estadísticos (media y desviación estándar) relativos a cada bacteria, a las 48 horas y en cada material estudiado

Bacteria	Media/ *DE-HA	Media/*DE-A2	Valor p=
So	6,36/0,35	3,78/3,28	0,247
Vp	7,48/0,43	2,0/3,46	0,053
An	3,66/3,21	2,24/3,88	0,65
Fn	6,49	0	No evaluable
Aa	7,503/0,220	6,14/0,476	**0,01**
Pg	4,56	0	No evaluable

- *DE- HA: desviación estándar en el material control de hidroxiapatita.
- *DE- A2: desviación estándar en el material experimental.

Figura 8. Representación gráfica en Box-plot. Comparación de la presencia bacteriana, entre tipos de discos, por bacteria, a las 48 horas.



- A, corresponde al disco control de hidroxiapatita .
- B, corresponde al disco experimental A2.

Hay ausencia del gráfico para F*n* y *Pg*.

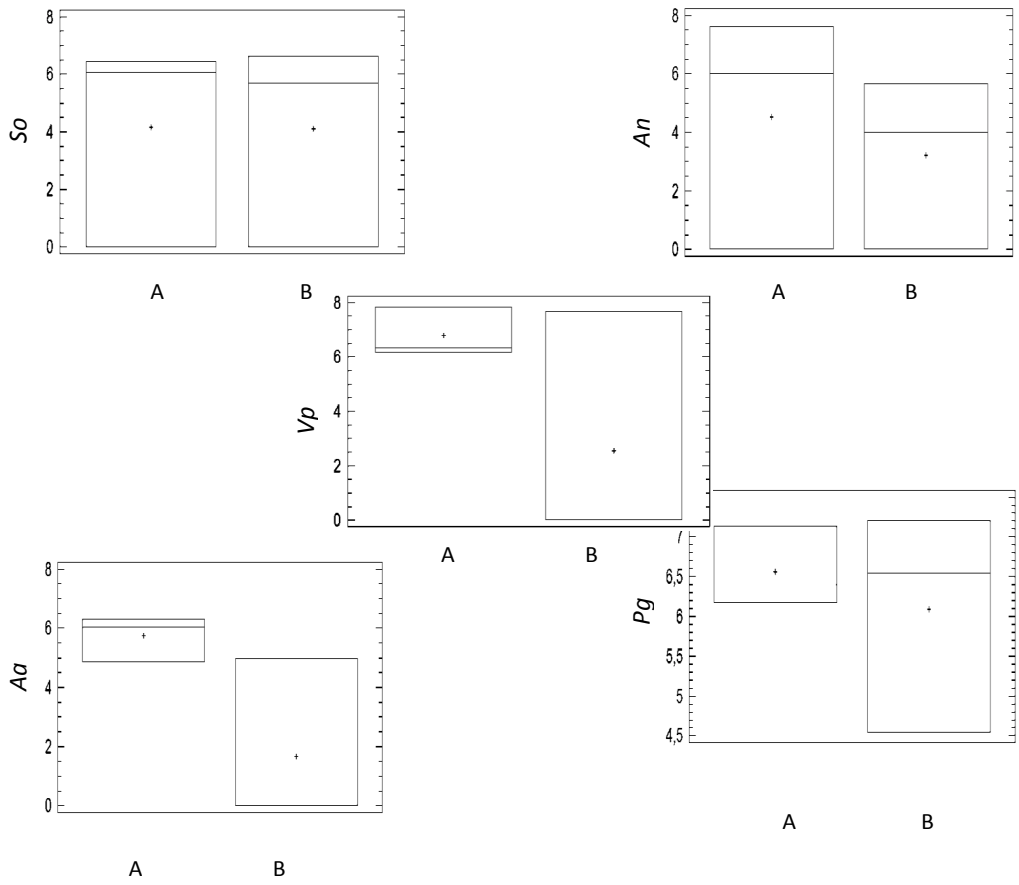
Tras las 72 horas de incubación del biofilm, se ha observado mediante el análisis estadístico (Tabla 5.) (Fig. 9), que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos materiales, para ninguna de las especies bacterianas incluidas en el biofilm (*S. oralis* (p= 0,078), *V. parvula* (0,180). *A. naeslundii* (p=0,668), *A. actinomycetemcomitans* (p=0,982), *P. gingivalis* (p=0,607)). En el caso de *F. nucleatum,* no se pudo hacer análisis estadístico, según lo explicado previamente.

Tabla 5. Datos estadísticos (media y desviación estándar) relativos a cada bacteria, a las 72 horas y en cada material estudiado.

Bacteria	Media/ *DE-HA	Media/*DE-A2	Valor p=
So	6,566/0,501	6,09/1,38	0,607
Vp	6,77/0,90	2,55/4,42	0,18
An	4,53/4,01	3,21/2,90	0,668
Fn	6,45	0	No evaluable
Aa	4,16/3,61	4,09/3,57	0,982
Pg	4,16/3,61	4,09/3,57	0,982

- *DE- HA: desviación estándar en el material control de hidroxiapatita.
- *DE- A2: desviación estándar en el material experimental.

Figura 9. Representación gráfica en Box-plot. Comparación de la presencia bacteriana, entre tipos de discos, por bacteria, a las 72 horas.



- A, corresponde al disco control de hidroxiapatita .
- B, corresponde al disco experimental A2.

Hay ausencia del gráfico para F*n* y *Pg*.

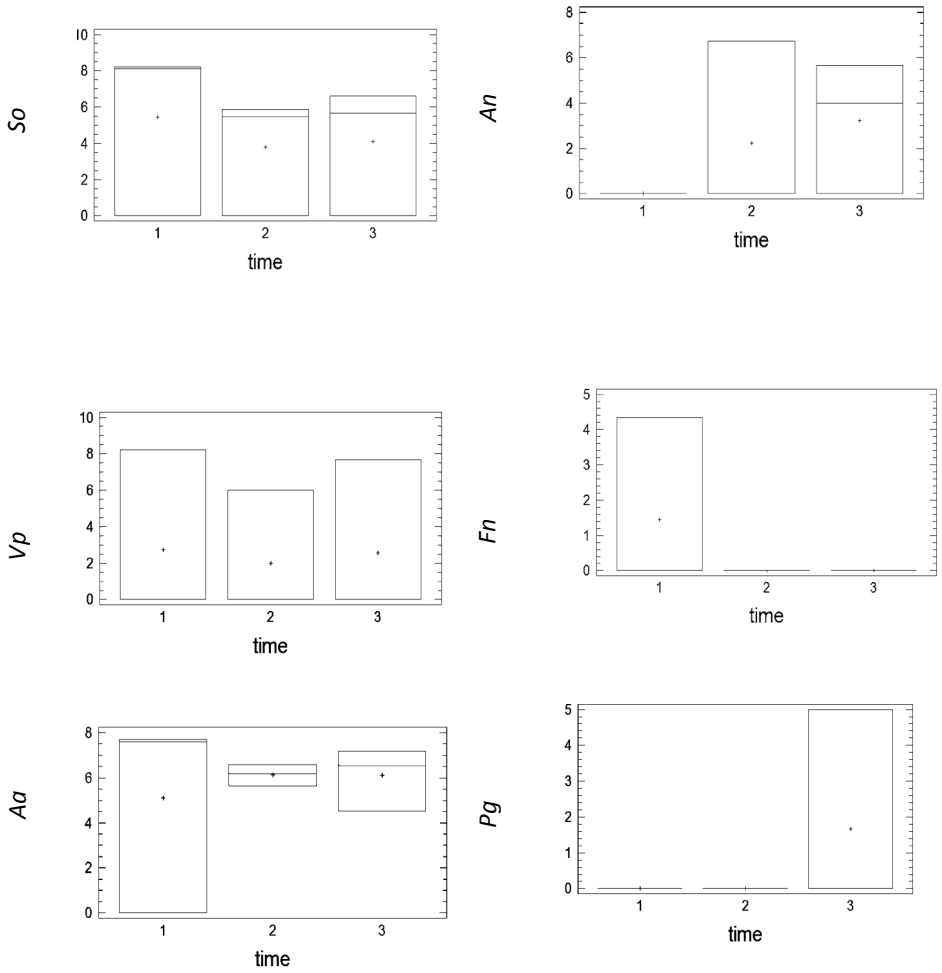
5.1.2 Comparación de la evolución de cada especie bacteriana en el tiempo, en ambos tipos de materiales:

En cuanto a la evolución en el tiempo de cada bacteria presente en el biofilm, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los diferentes tiempos de incubación (24, 72 y 48 horas), para ambos materiales. Podemos decir entonces, que la evolución bacteriana fue similar en ambos materiales estudiados (Tabla 6.) (Fig. 10), y para cada una de las 6 bacterias

Tabla 6. Resumen estadístico de la evolución y maduración del biofilm en los tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas), en ambos tipos de materiales.

Bacteria	Media/ 24horas	*DE/24 horas	Media/ 48 horas	*DE/48 horas	Media/ 72 horas	*DE/72 horas	*Valor p=*
So	5,44	4,71	3,78	3,28	4,09	3,57	0,86
Vp	2,73	4,73	2	3,46	2,55	4,42	0,97
An	0	0	15,09	3,88	3,21	8,44	0,40
Fn	1,44	2,5	0	0	0	0	0,42
Aa	5,103	4,41	6,14	0,47	6,09	1,38	0,87
Pg	0	0	0	0	1,66	2,88	0,42

Figura 10. Representación gráfica en Box-plot. Comparación de la evolución bacteriana en el tiempo, por bacteria.



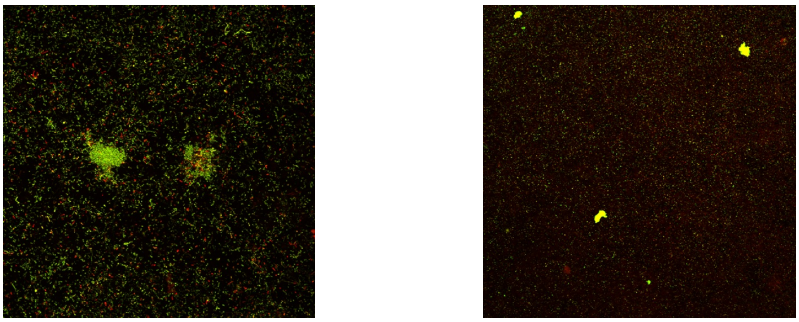
En la base de la gráfica (Time), 1, corresponde a 24 horas, 2, corresponde a 48 horas y 3, corresponde a 72 horas.

MICROSCOPIA CONFOCAL (CLSM) :

Mediante la microscopía confocal, se determinó la viabilidad, y maduración bacteriana, en los discos de hidroxiapatita (HA) y del material experimental A2, en los tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas).

5.2.1 Análisis de la viabilidad bacteriana en los tres tiempos de incubación, en los dos materiales de estudio:

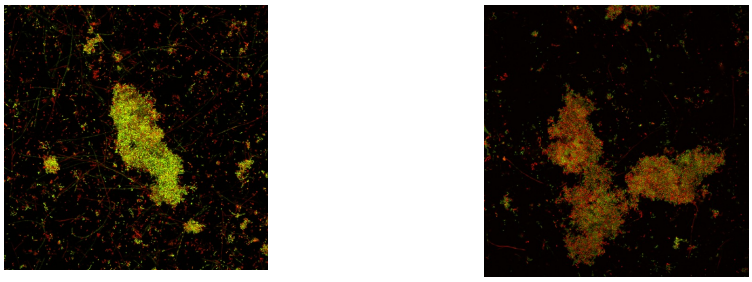
A las 24 horas (Fig. 11) el análisis mediante microscopía confocal (CLSM), muestra el inicio de la formación del biofilm. En el caso de la HA, en el centro de la imágen se observa, la ordenación de torres con predominante tinción de color verde, lo que demuestra la presencia de celulas bacterianas vivas en gran cantidad. En el caso del A2, se encuentran estructuras bacterianas aisladas y predominio bacteriano disperso de tinción roja, lo que denota la presencia de gran número de bacterias inviables.



HA A2

Figura 11. CLSM. Las imágenes muestran el biofilm crecido tras 24h de incubación, sobre hidroxiapatita (HA) y sobre el material experimental (A2).

En las siguientes 48 horas (Fig. 12), mediante CLSM, se observa una estructura bacteriana mucho más formada en la hidroxiapatita (HA), acompañada de colonias aisladas y se destaca la tinción verde generalizada, que demuestra predominio de viabilidad. En el caso del material experimental A2, a pesar de observarse mayor cantidad de bacterias formando torres, la imágen muestra presencia generalizada de tinción color rojo, lo que denota muerte celular.



HA A2

Figura 12. CLSM. Las imágenes muestran el biofilm crecido tras 48h de incubación, sobre hidroxiapatita (HA) y sobre el material experimental (A2).

A las 72 horas (Fig. 13) el disco de hidroxiapatita, muestra una proliferación bacteriana mayor y aparentemente un biofilm más consolidado, con respecto a la formada en A2. Además se observa predominio de bacterias viables.

En el caso del A2, el color amarillo, indica una transición a muerte celular.

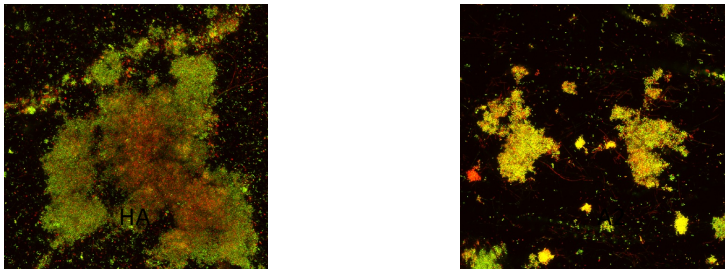


Figura 13. CLSM. Las imágenes muestran el biofilm crecido tras 72h de incubación, sobre hidroxiapatita (HA) y sobre el material experimental (A2).

5.2.2 Comparación de la evolución y maduración bacteriana, en el tiempo, por material estudiado:

Mediante las imágenes aportadas por la microscopía confocal, se pudo determinar de forma global, que la evolución del biofilm por tipo de material estudiado, se presentó de la siguiente manera:

En el caso de la hidroxiapatita (HA) (Fig.14), a las 24 horas se observa poca presencia de torres bacterianas aisladas, con predominio de células vivas.

Pasadas la 48 horas, se presenta un agregado multicelular, acompañado de colonias aisladas y de predominio viable, y ya a las 72 horas, hay presencia de una masa compacta, donde se empiezan a observar zonas de muerte celular.

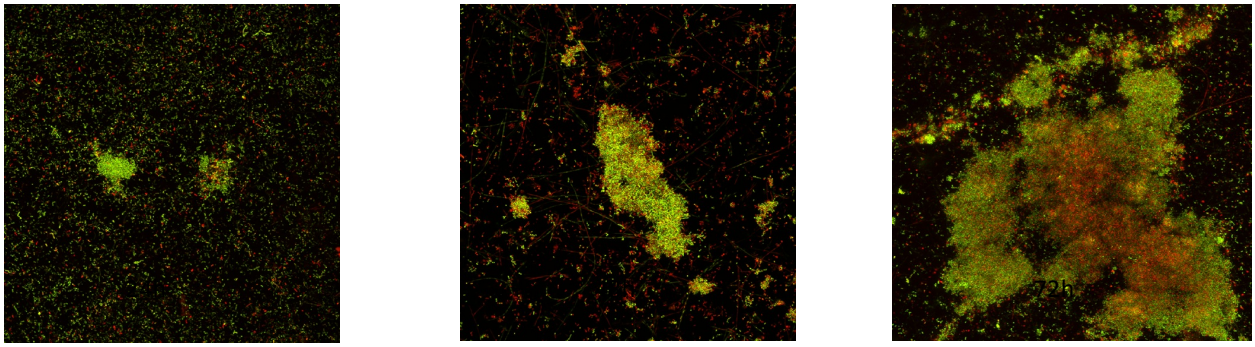


Figura 14. CLSM. Las imágenes muestran el biofilm crecido sobre el material control de hidroxiapatita (HA), durante los tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas).

En el material experimental A2 (Fig. 15), a las primeras 24 horas, se observa un desarrollo casi nulo de biofilm bacteriano. Se presentan pocas colonias bacterianas aisladas y viables. Posterior a las 48 horas de incubación, se observa una estructura más compacta, pero con predominio de muerte celular. En el último intervalo estudiado (72 horas), se observa la transición a muerte celular. No se observan diferencias respecto a las 48 horas de incubación.

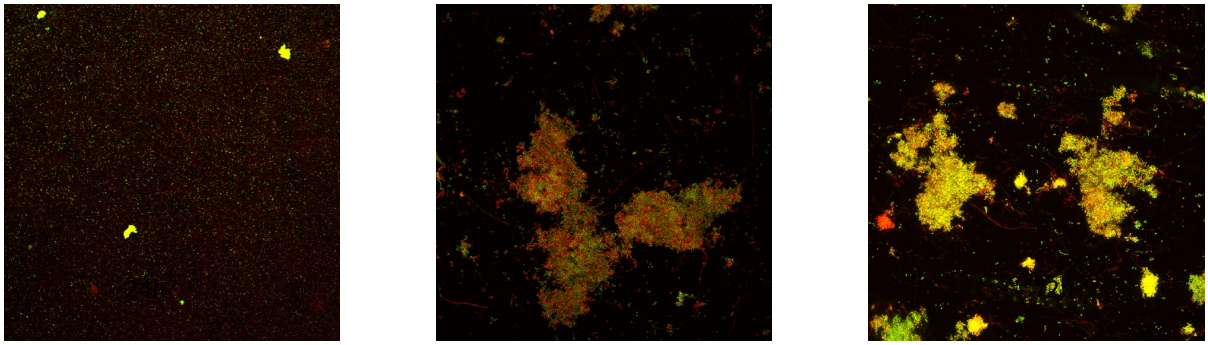


Figura 15. CLSM. Las imágenes muestran el biofilm crecido sobre el material experimental A2, durante los tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas).

6. DISCUSIÓN

Los implantes dentales son ampliamente utilizados debido a su excelente biocompatibilidad y propiedades mecánicas indiscutibles (Das et al. 2008). Sin embargo, la exposición del implante a la cavidad oral da origen a la interacción con las bacterias del huésped, a la formación de biofilm periimplantario y al consecuente riesgo de sufrir enfermedades periimplantarias. En concreto, las características físico- químicas de la superficie de estos materiales influyen de manera significativa en la adhesión bacteriana y la formación de biofilms (Teughels et al. 2006) y se ha sugerido que la rugosidad en la superficie del implante puede desempeñar un papel importante en este proceso (Quirynen et al. 2002; Bürgers et al. 2010).

Los microorganismos incluidos en el modelo de biofilm periimplantario *in vitro* utilizado en este estudio, están en concordancia con la microbiota existente en implantes *in vivo*, tanto con microorganismos asociados con implantes sanos, como con implantes fracasados (Furst et al. 2007, Mombelli et al. 1987, Shibli et al. 2008).

Los resultados obtenidos han corroborado la idoneidad del modelo de biofilm *in vitro* empleado como una herramienta para desarrollar biofilms periimplantarios *in vitro* y han confirmado su aplicabilidad para evaluar problemas en la terapia de implantes como, por ejemplo, el efecto de la superficie de implantes en la formación del biofilm.

En los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias para el tratamiento de las enfermedades periimplantitarias. Esto se refiere a los nuevos diseños de implantes, los cuales han sido desarrollados buscando reducir el remodelado óseo después de la osteointegración así como innovaciones en la conexión del pilar del implante (por ejemplo, conexión de cono Morse) para minimizar la filtración

bacteriana, aunque la formación de la placa subgingival es, en todo caso, inevitable alrededor de los implantes dentales

Además se suma a lo anterior la afirmación, según estudios, de que el sellado del tejido blando en la superficie del implante, juega un papel en la prevención de las enfermedades periimplantarias (Berglundh et al. 1996; Berglundh et al. 1991; Lindhe et al. 1998), concluyendo así que los elementos transmucosos deben tener una superficie pulida para impedir la adherencia del biofilm (Zitzmann et al. 2002; Schwartz et al. 2006; . Albouy et al. 2012). En este respecto, el uso de un revestimiento que pueda reducir la actividad bacteriana en el tejido peri - implante es un tema interesante, ya que conduce a una mayor estabilidad en el sellado gingival (Martínez et al. 2014).

Encaminados a probar nuevas alternativas de recubrimientos a nivel de aditamentos transmucosos implantológicos dentales, ha sido realizada esta investigación, teniendo como objetivo observar el efecto biocida *in vitro*, del material compuesto cerámico - cerámico Nanocomposite Z10Ce, recubierto con vidrio CINN (material experimental A2), sobre un modelo específico de biofilm subgingival, que representa el biofilm bacteriano de la zona periimplantaria. Lo anterior se fundamenta en que un nuevo enfoque de las infecciones asociadas a dispositivos implantados biomédicos, está basado en materiales biocidas (Sreenivasan et al.2002), y teniendo en cuenta, que a pesar de que en la literatura consta que el uso de antibióticos locales y biocidas antiplaca, además del desbridamiento manual parece ser un tratamiento adecuado (Baron et al. 2000; Sham et al. 2011; Esposito 2012), el desarrollo de resistencia a los antibióticos es inevitable.

Además, el desarrollo de materiales con la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, ha sido de gran interés en los últimos años. Diversos grupos de investigación están estudiando nuevos agentes, con el objetivo de obtener una mayor efectividad contra los microorganismos (Esteban-Tejeda L. et al 2009; Simchi et al. 2011).

Dentro de estas investigaciones actuales se ha determinado que agentes biocidas orgánicos han limitado sus aplicaciones, debido a su baja resistencia al calor, alta descomponibilidad y corta vida. En este sentido, existe un interés especial en el desarrollo de nuevos bactericidas, basados en materiales inorgánicos como alternativa a los agentes orgánicos tradicionales (Esteban-Tejeda et al 2009).

Según estudios, estos materiales antibacterianos inorgánicos tienen varias ventajas sobre los agentes orgánicos tradicionalmente utilizados, como son estabilidad química, resistencia térmica, período de acción prolongado, etc (Fang et al. 2006). Además se ha conocido que se basan generalmente en iones metálicos como la plata o el cobre, con propiedades antibacterianas, que se cargan en una matriz cerámica, los cuales se están desarrollando actualmente en materiales nanoestructurados que contienen nanopartículas de plata o cobre, y con el fin de reducir la dosis total de plata o de cobre y mejorar su biocompatibilidad (Rai et al 2009; Huh et al. 2011) .

Según estudios, los materiales nanoestructurados muestran una eficiencia más alta debido a la gran superficie específica de plata, que es inversamente proporcional a el tamaño de partícula. Este hecho facilita sus aplicaciones en la ciencia biológica, medicina y otros campos (Kim et al. 2007), garantizando según estudios, actividad

biocida contra bacterias Gram positivas y negativas y también contra levaduras (Esteban-Tejeda et al. 2012).

En el caso de este estudio, la exposición del vidrio biocida al biofilm subgingival *in vitro* puso de manifiesto, que a las 24 horas de incubación, no existían diferencias estadísticamente significativas respecto a la presencia de colonizadores primarios como *S. oralis*. A pesar de lo anterior, según el recuento bacteriano por cultivo de *S. oralis,* se observó presencia casi nula de esta cepa bacteriana a este tiempo de incubación, en el material experimental A2.

Estos resultados corroboran a lo descrito por Cabal y colaboradores (2012). Según estos autores, estos biovidrios son capaces *in vitro,* de neutralizar a intervalos de incubación de 24 horas, cepas bacterianas de tipo *S. oralis* inoculadas en discos revestidos con vidrios biocidas, siendo estudiados en comparación con discos sin vidrio biocida

S. *oralis,* según estudios *in vitro* e *in vivo,* es uno de los primeros colonizadores más comúnmente detectados en la superficie del diente (Wecke et al 2000; Sánchez et al. 2011). Los colonizadores primarios alteran la superficie no sólo por su presencia física sino que también es probable que representen un nuevo fenotipo ''unido a la superficie'' con distintas propiedades metabólicas, modificando así su entorno y la creación de nuevos nichos para otras que colonicen otro tipo de bacterias (Davey et al. 2006).

A las 48 y 72 horas, *S. oralis* tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas con relación a la hidroxiapatita. A su vez, en el recuento bacteriano por cultivo a ambos intervalos de tiempo, se presenta incluso en gran cantidad en ambos

materiales. Lo anterior podría poner de manifiesto, una disminución o ausencia en la actividad biocida, del material experimental A2 a estos intervalos de incubación.

En el caso de *A. naeslundii* a las 24 horas de incubación, no se pudo hacer análisis estadístico, debido a que ninguno de los discos presentó crecimiento bacteriano en uno de los materiales. *A. naeslundii*, según el recuento bacteriano por cultivo, prolifera en el biofilm bacteriano de ambos materiales estudiados a partir de las 48 horas, pero en el material experimental A2, se presenta en menor cantidad que en la hidroxiapatita a las 72 horas de incubación.

Esto podría representar un hallazgo preliminar, puesto que en la cavidad oral, y según la asociación de las especies bacterianas de Socransky et al. (1998), es necesaria la presencia de colonizadores primarios como *A. naeslundii* y *S. oralis,* para que continúe la co-agregación, interacción bacteriana y formación del biofilm subgingival (Kolebrander 2006). Es así, que si durante las etapas críticas de cicatrización periimplantaria se impide la colonización primaria, podría pensarse que de esta manera existiría la posibilidad de conseguirse, la neutralización de la secuencia de colonización y maduración bacteriana posterior.

En cuanto a los colonizadores tempranos, representados por *V. parvula*, a pesar de que los resultados del análisis estadístico, a los tres tiempos de incubación no presentan diferencias significativas entre ambos materiales estudiados, el recuento bacteriano por cultivo apunta a una presencia casi nula de esta cepa bacteriana en el material experimental A2, durante los dos primeros intervalos de tiempo (24 y 48 horas). A las 72 horas se incorpora de manera similar en ambos materiales, lo que confirma el análisis estadístico. Lo anterior podría mostrar de forma preliminar, que

el material experimental A2, posiblemente actuaría en la neutralización de los colonizadores tempranos a intervalos de 24 y 48 horas.

Las especies relacionadas con los colonizadores secundarios o las llamadas especies puente, representadas por *F. nucleatum* dentro del biofilm *in vitro* utilizado para este estudio, presentaron diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas. Además a las 48 y 72 horas, no se pudo hacer análisis estadístico, debido a que ninguno de los discos presentó crecimiento bacteriano para uno de los materiales. A pesar de esto, el recuento bacteriano por cultivo mostró que, a los tres tiempos de incubación, se presentaron de forma nula o casi nula en el material experimental A2, haciendo más evidente su efecto en los tiempos de incubación de 48 y 72 horas, en comparación con lo ocurrido en el control de hidroxiapatita.

Ante estos resultados, existe un posible efecto del material experimental A2, en la neutralización de cepas puente, encargadas del inicio de la colonización y formación del "grupo rojo", principal desencadenante de las enfermedades periodontales y periimplantarias (Socransky et al. 1998; Kolebrander 2006; Mombelli y Lang 1992; Pontoriero et al . 1994; Leonhardt et al . 1999; Heitz-Mayfield y Lang 2010; Nociti Junior et al. 2001; APP 2013)).

En el caso de los colonizadores tardíos, *A. actinomycetemcomitans,* a las 24 y a las 72 horas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos materiales, contrariamente a lo sucedido a las 48 horas donde sí se presentaron diferencias. Es importante conocer que en el análisis del recuento bacteriano por cultivo, este tipo de bacteria presentó una proliferación mayor en el material experimental A2, en comparación con la hidroxiapatita al inicio del estudio (24 horas); lo que tiende a disminuir y a igualarse para ambos materiales, en el

transcurso de los intervalos de incubación, siendo levemente menor a las 48 horas en el material experimental A2.

P. gingivalis mostró un análisis estadístico sin resultados en los dos primeros tiempos de incubación (24 y 48 horas), por que no se pudo hacer análisis estadístico, y a las 72 horas no se observaron diferencias estadísticamente significativas para este tipo de bacteria. En el recuento bacteriano por cultivo, se muestran resultados importantes debido a no encontrarse esta bacteria en el material experimental A2, en contraste con el material control de hidroxiapatita. Estos hallazgos señalan, la posibilidad de que el material experimental A2, presente algún tipo de actividad biocida ante algunos colonizadores tardíos, a distintos tiempos de incubación.

Al estudiar la evolución bacteriana durante los diferentes tiempos de incubación, en los dos materiales utilizados, los resultados del análisis estadístico mostraron ausencia de diferencias significativas en ambos materiales en los tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas). Al observar el recuento bacteriano por cultivo se encontró, que la evolución del biofilm fue mayor para *A. actinomycetemcomitans* en el material experimental A2 al compararlo con la hidroxiapatita. Además algunas bacterias no evolucionaron en el material A2, como fue el caso de *F. nucleatum o P. gingivalis.* El resto de bacterias se desarrollaron de manera similar para ambos materiales.

En cuanto al análisis con microscopía confocal (CLSM), a las 24 horas en el material experimental A2, se observó menos presencia bacteriana en comparación con la

hidroxiapatita. Esto demuestra una posible neutralización inicial del biofilm bacteriano, en el material experimental A2.

A las 48 horas, las imágenes de microscopía confocal, mostraron que en el material experimental A2, a pesar de presentar gran cantidad de bacterias formando torres, predominó la muerte celular, lo que podría determinar actividad biocida a este intervalo de incubación.

A las 72 horas, las imágenes de microscoscopía confocal, mostraron una mayor proliferación y maduración bacteriana en el disco control de hidroxiapatita que en el disco del material experimental A2. Esto demuestra, de forma preliminar, una posible disminución en la actividad bacteriana en el material experimental A2, a las 72 horas de incubación.

En cuanto a la evolución global del crecimiento y maduración del biofilm bacteriano, durante los tres intervalos de incubación (24, 48 y 72 horas) en los dos materiales estudiados, las imágenes del microscopio confocal, muestran diferencias en cuanto a viabilidad bacteriana, observándose en el disco de HA una mayor presencia de células vivas respecto al disco del material A2. También se apreciaron diferencias respecto a la estructura del biofilm en ambos materiales, formándose mayor número de torres en la HA. Estos resultados son congruentes con el posible efecto biocida del material A2.

El fracaso de los implantes y las enfermedades periimplantarias se han convertido en unos de los problemas más importantes en la odontología. Está bien documentado

que los biofilms en los implantes dentales juegan un papel preponderante en la génesis de la inflamación periimplantaria (Busscher et al. 2010, Lee y Wang 2010).

A pesar de eso, en la actualidad, estamos aún en un terreno nuevo y lleno de experimentaciones sin evidencia suficiente, que permita realizar conclusiones definitivas, sobre las implicaciones clínicas de los parámetros que se han descrito para determinar el éxito o el fracaso de los implantes.

A lo largo de los resultados, se han observado diferencias entre los datos estadísticos y los datos de recuento bacteriano por cultivo, esto se debe a que son experimentos preliminares y se necesita aumentar el número de repeticiones, para que sean corroborados

7. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de este estudio se ha podido observar el efecto del material compuesto cerámico – cerámico Nanomposite Z10Ce, recubierto con vidrio CINN (material A2) sobre un modelo de biofilm subgingival.

Los resultados fueron producto de un análisis fundamentado en la presencia en los discos de experimentación de las 6 cepas bacterianas incluidas en la investigación y su evolución.

La evaluación de las variables planteadas al inicio de este estudio, demuestran que existen evidencias preliminares de que el material experimental estudiado (A2), tiene un efecto sobre el biofilm subgingival *in vitro*, en comparación con el control de hidroxiapatita que, en general, no llega a ser estadísticamente significativo.

Se recomienda realizar más estudios y con más réplicas biológicas, para comprobar el efecto biocida de este nuevo biovidrio como revestimiento implantológico.

8. AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad proyecto nº MATBIO2012-38645, estando este proyecto cofinanciado por el FEDER

En primer lugar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente , por haber sido mi compañero y guía en los momentos en que me sentí sola, pero sobre todo, por haber puesto en mi camino a todas las personas que han sido mi soporte y fuente de conocimiento durante todo este periodo de estudio.

Gracias al Dr. Mariano Sanz, por su guía y consejo, al momento de iniciar esta etapa.

Ser un buen profesor, implica el enseñar y transmitir a los alumnos, las fuentes del conocimiento. Ser un excelente maestro, es ser un buen profesor con generosidad intelectual y disponibilidad absoluta para asistir a su alumno, sin importar el momento o la circunstancia, además de inspirarlo y apoyarlo en su camino hacia el aprendizaje. Gracias Dr. David Herrera, no sólo por ser un buen profesor, si no por haber sido para mí, un excelente maestro.

Y esa inspiración en mi caso, durante el transcurso de este estudio, fue además alimentada día a día por el afán de explorar un campo desconocido. Y todo esto gracias a ti Arancha. Tu dedicación, tu disposición infinita a enseñarme y tu ayuda incondicional, han repercutido en mis ganas de encauzar mi camino hacia el desarrollo de la ciencia.

Gracias María, Ana, Itziar y María José, por estar siempre dispuestas a ayudarme y a proporcionarme todo lo necesario, para la realización de este estudio.

Agradecer la colaboración y asistencia técnica de Alfonso Cortés del Centro de Microscopía y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid

Gracias Paco, por apoyarme en todo momento, por estar a mi lado y por ser además de mi esposo, mi mejor amigo y compañero de batallas. Sin tu ayuda y sacrificio, todo esto habría sido imposible.

Gracias a mi madre Maru, que aunque lejos, ha sido mi soporte y guía absoluta. A mi padre Moisés Pianeta Muñoz (D.E.P.), por heredarme este deseo de ser docente, y por transmitirme estas ganas infinitas de enseñar.

Gracias a mi suegro (D.E.P.), que durante el tiempo que me acompañó en esta etapa estudiantil, fue mi consejero y mi segundo padre.

Gracias a mi familia en general y a mis amigos, por los buenos deseos y por su ayuda infinita.

Gracias Giacomo y Honorato, por el cariño y por todo lo que hicieron por mí, durante estos meses de trabajo.

La posibilidad de realizar un sueño, es lo que hace que la vida sea interesante.

Paulo Coelho

9. BIBLIOGRAFIA

1. Ábalos C. (2005). Adhesión bacteriana a biomateriales. *Av. Odontoestomatol* 21-1: 347-353.
2. Afya S. D. A-R, Dymock D., Younes C., O'Sullivan D. (2012). Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent* 40: 146-153
3. Albouy J.P., Abrahamsson I., Berglundh T. (2012). Spontaneous progression of of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2012 Feb;39(2):182-7.
4. Albrektsson, T. & Isidor, F. (1994) Concensus report of session IV. In: Lang, N.P. & Karring, T., eds. *Proceedings of the First European Workshop on Periodontology*, 365–369.
5. Allaker R. (2010). The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. *Journal of Dental Research* 89: 1175 – 1186.
6. Allaker R.P., Hardie J.M. (1998). Oral infections. In: Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 9th ed. Collier L, Balows A, Sussman M, editors. London: *Hodder Arnold Publications*, Vol. 3, pp. 373-390.
7. Anglin, E.J., Cheng, L., Freeman, W.R., Sailor, M.J. (2008). Porous silicon in drug delivery devices and materials. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 60, 1266–1277.
8. Ayon, A.A., Cantu, M., Chava, K., Agrawal, C.M., Feldman, M.D., Johnson, D., Patel, D., Marton, D., Shi, E. (2006). Drug loading of nanoporous TiO2 films. *Biomed. Mater*. L11–L15
9. Baron M., Haas R., Dörtbudak O., Watzek (2000). Experimentally induced periimplantitis: a review of different treatment methods described in the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15: 533–544.
10. Berglundh T., Gotfredsen K., Zitzmann N.U., Lang N.P., Lindhe J. (2007). Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implant Res* 18: 655–661.

11. Berglundh T., Lindhe J. (1996). Dimension of the peri-implant mucosa. Biological width revisited. *J Clin Periodontol* 23: 971–973.
12. Berglundh T., Lindhe J., Ericsson I., Marinello C.P., Lijenberg B., et al. (1991) The soft Tissue barrier at implants and teeth. *Clinical Oral Implants Res* 2: 81–90.
13. Buergers R., Gerlach T., Hahnel S., Schwarz F., Handel G, et al. (2010) In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Res* 2: 156–164
14. Bürgers R., Witecy C., Hahnel S., Gosau M. (2012). The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on Staphylococcus epidermidis, Candida albicans, and Streptococcus sanguinis. *Archives of Oral Biology* – El Sevier 57: 940
15. Bürgers R., Gerlach T., Hahnel S., Schwarz F., Handel G. et al. (2010). In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Res* 21(2): 156–64.
16. Busscher H., Rinastiti M., Siswomihardjo W., Van der Mei H.C. (2010). Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *Journal of Dental Research* 89: 657–65.
17. Cabal B., Cafini F., Esteban-Tejeda L., Alou L., Bartolomé J.F., Sevillano D., López-Piriz R., Torrecillas R., Moya J.S. (2012). Inhibitory effect on in vitro Streptococcus oralis biofilm of a soda-lime glass containing silver nanoparticles coating on titanium alloy. *PLoS One* 7(8):e42393.
18. Cortizo M., Oberti T., Cortizo A. (2012). Chlorhexidine delivery system from titanium/polybenzyl acrylate coating: Evaluation of cytotoxicity and early bacterial adhesion. *Journal of Dentistry* – El sevier 329 – 337.
19. Das K., Bose S., Bandyopadhyay A., Karandikar B., Gibbins B.L. (2008). Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants. *J. Biomed. Mater. Res.* Part B 87: 455–460.
20. Davey M.E., Costerton J.W. (2006). Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontol 2000* 42:13-26.

21. Esposito M., Coulthard P., Oliver R., Thomsen P., Worthington H.V. (2004). Antibiotics to prevent complications following dental implant treatment. *Australian Dental Journal* 49:(4): 205.
22. Esposito M., Grusovin M.G., Wothington H.V. (2012). Treatment of periimplantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol*. 5Sppl: 21–41.
23. Esteban-Tejeda L., Malpartida F., Díaz L.A., Torrecillas R., Rojo F., et al. (2012). Glass-(nAg, nCu) Biocide Coatings on Ceramic Oxide Substrates. *PLoS ONE* 7(3):e33135.
24. Esteban-Tejeda L., Malpartida F., Esteban-Cubillo A., Pecharromán C., Moya J.S. (2009). Antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing copper nanoparticles. *Nanotechnology* 16;20(50):505701.
25. Esteban-Tejeda L., Malpartida F., Esteban-Cubillo A., Pecharromán C., Moya J.S. (2009). The antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing silver nanoparticles. *Nanotechnology* 25;20(8):085103.
26. Fang M., Chen J.H., Xu X.L., Yang P.H., Hildebrand H.F. (2006). Antibacterial formation in oral isolates. *Periodontology 2000* 42: 13–26.
27. Furst M.M., Salvi G.E., Lang N.P., et al. (2007). Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clinical Oral Implants Res* 18:501-508.
28. Gilbert, P., Das, J. & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research* 11, 160–167
29. Gosau M., Hahnel S., Schwarz F. (2010). Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clinical Oral Implants Res* 21: 866 – 872.
30. Haffajee, A.D., Cugini M.A., Tanner A., Pollack R.P., Smidth C., Kent R.L., Socransky, S.S. (1998). Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 25: 346-353.
31. Haffajee, A.D., Socransky, S.S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal deseases. *Periodontol 2000* 5: 78-11.
32. Heitz-Mayfield L.J., Lang N.P. (2010). Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000* 53:167-181.

33. Heitz-Mayfield, L. J., Salvi, G. E., Botticelli, D., Mombelli, A., Faddy, M. & Lang, N. P. (2011). On Behalf of the Implant Complication Research Group (ICRG) Anti-infective treatment of peri-implant mucositis: a randomised controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Res* 22, 237–241.
34. Heuer W., Elter C., Demling A., Neumann A., Suerbaum S., Hannig M., et al. (2007). Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *Journal of Oral Rehabilitation* 34:377–82.
35. Huh A.J., Kwon Y.J. (2011). ‘‘Nanoantibiotics’’: A new paradigm for treating. *Implants Res* 17 Suppl 2: 68–81.
36. Jenkinson H.F., Lamont R.J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* 13:589-595.
37. Jones, D.S., Medlicott, N.J., (1995). Casting solvent controlled release of chlorhexidine from ethylcellulose films prepared by solvent evaporation. *Int. J. Pharm.* 114, 257–261.
38. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3(1): 95–101.
39. Kinane D.F. (1999). Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol* 4:54-63.
40. Kolenbrander P.E. (1988). Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annu Rev Microbiol* 42:627-656.
41. Kolenbrander P.E., Palmer R.J., Rickard A.H., Jakubovics N.S., Chalmers N.I., Diaz P.I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000* 42:47-79.
42. Lang, N.P. y Berglundh, T. (2011). Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 38 Suppl 11: 178-181.
43. Lee A. y Wang H-L. (2010). Biofilm Related to Dental Implants. *Implant Dentistry*; volume 19, number 5:387-393.
44. Lee B.C., Jung G.Y, Kim D.J, Han J.S. (2011). Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. *J Adv Prosthodont* 3:81-4.
45. Leonhardt A., Renvert S. & Dahle´n G. (1999) Microbial findings at failing implants. *Clinical Oral Implant Res* 10: 339–345.

46. Lewis K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45:999-1007
47. Lindhe J. y Meyle J. (2008). Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 35: 282-285
48. Löe H. (2000). Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *International Dental Journal* 50, 129–139
49. López-Píriz R., Solá-Linares E., Granizo J.J., Díaz-Güemes I, Enciso S., et al. (2012). Radiologic Evaluation of Bone Loss at Implants with Biocide Coated Titanium Abutments: A Study in the Dog. *PLoS ONE* 7(12): e52861.
50. Marsh P.D. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32(Suppl.6): 7-15.
51. Martinez A., Guitián F., López-Píriz R., Bartolomé J.F., Cabal B., Esteban-Tejeda L., Torrecillas R., Moya J.S. (2014).Bone loss at implant with titanium abutments coated by soda lime glass containing silver nanoparticles: a histological study in the dog. *PLoS One*. 22;9(1):e86926.
52. Medlicott, N.J., Holborow, D.W., Rathbone, M.J., Jones, D.S., Tucker, I.G. (1999). Local delivery of chlorhexidine using a tooth-bonded delivery system. *J. Control. Release* 61, 337–343.
53. Medlicott, N.J., Tucker, I.G., Rathbone, M.J., Holborow, D.W., Jones, D.S. (1996). Chlorhexidine release from poly (e-caprolactone) films prepared by solvent evaporation. *Int. J. Pharm*. 143, 25–35.
54. Mombelli A. & Lang N.P. (1992). The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontology 2000* (17): 63–76.
55. Mombelli A., van Oosten M.A., Schurch E. Jr, et al. (1987). The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 2: 145-151.
56. Nociti Junior F.H., Cesco De Toledo R., Machado M.A., Stefani C.M., Line S.R., Goncalves R.B. (2001). Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced periimplantitis and periodontitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 12:295-300.

57. Ortega Morente E., Fernández-Fuentes M., Grande Burgos M. (2013). Riview. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of food microbiology* - El Sevier 162: 13-25.
58. Page R.C, Kornman K.S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000* 14:9-11.
59. Persson G.R., Roos-Jansaker A.M., Lindahl C. & Renvert S. (2011). Microbiological results following non- surgical ER:YAG Laser or air abrasive treatment of peri-implantitis. A randomized clinical trial. J *Periodontol* 82, 1267–1278.
60. Persson G.R., Samuelsson E., Lindahl C. & Renvert S. (2010). Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a single-blinded randomized longitudinal clinical study. II. Microbiological results. *J Clin Period* 37, 563–573.
61. Pontoriero, R., Tonelli, M.P., Carnevale, G., Mombelli, A., Nyman, S.R. & Lang, N.P. (1994). Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clinical Oral Implants Res* 5: 254–259.
62. Pye A.D., Lockhart D.E.A., Dawson M.P., Murray C.A., Smith A.J. (2009). A review of dental implants and infection. *Journal of Hospital Infection* 72: 104–110.
63. Quirynen M., De Soete M., van Steenberghe D. (2002). Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res* 13(1): 1–19.
64. Radin, S., Ducheyne, P. (2007). Controlled release of vancomycin from thin sol–gel films on titanium alloy fracture plate material. *Biomaterials* 28, 1721–1729.
65. Rai M., Yadav A., Gade A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 27(1):76-83.
66. Rams T.E., Degener J.E., Van Winkelhoff A.J. (2014). Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. *Clinical Oral Impantl. Res*. 25: 82–90.
67. Renvert S., Lindahl C., Rutger Persson G. (2012). The incidence of peri-implantitis for two different implant systems over a period of thirteen years. J *Clin Periodontol* 39: 1191–1197.

68. Renvert S., Polyzois I., Claffey N. (2011). How do implant surface characteristics influence peri-implant disease? *J Clin Periodontol* 38 (Suppl.11): 214- 222.
69. Renvert S., Roos-Jansaker A.M., Lindahl C., Renvert H. & Persson, G. R. (2007). Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clinical Oral Implants Res* 18, 509–516.
70. Renvert S., Samuelsson E., Lindahl C. & Persson G. R. (2009). Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a double-blind randomized longitudinal clinical study. I: clinical results. *J Clin Periodontol* 36, 604–609
71. Riggs P.D., Braden M., Patel M. (2000). Chlorhexidine release from room temperature polymerising methacrylate systems. *Biomaterials* 21, 345–351.
72. Rimondini L., Cerroni L., Carrassi A., Torricelli P. (2002). Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. Int. *J Oral Maxillofac Implants* 17: 793-8.
73. Sánchez MC1, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. 2011. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res*. 2011 Apr;46(2):252-60.
74. Scarano A., Piatelli M., Caputi S., Favero G.A., Piatelli A. (2004). Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J. Periodontol*. Vol. 75. N. 2. 292-296.
75. Schwarz F., Sahm N., Iglhaut G. & Becker J. (2011). Impact of the method of surface debridement and decontamination on the clinical outcome following combined surgical therapy of peri-implantitis: a randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol* 38, 276–284.
76. Schwarzt F., Papanicolau P., Rothamel D., Beck B., Herten M., Becker J. (2006). Influence of plaque biofilm removal on reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res* A. 1;77(3):437-44.
77. Sedlacek M.J. y Walker C. (2007). Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol* 22(5): 333-339

78. Serino G. & Ström C. (2009). Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. *Clinical Oral Implants Res* 20, 169–174.
79. Sham N., Becker J., Santel T., Schwartz F. (2011). Non surgical treatment of periimplantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of clorhexidine: a prospective, randomized, controlled clinical study. *J Clin Periodontol*. 38(9):872-838: 872–8.
80. Shibli J.A., Melo L., Ferrari D.S., et al. (2008) Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* 19:975-982.
81. Simchi A., Tamjid E., Pishbin F., Boccaccini A.R. (2011). Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications. *Nanomedicine* 7(1):22-39.
82. Socransky S. S. & Haffajee A. D. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal diseases: current concepts. *Periodontology 2000* 63, 322–331.
83. Socransky S. S. & Haffajee A. D. (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology 2000* 5, 7–25.
84. Socransky S. S. & Haffajee A. D. (2005). Periodontal Microbial Ecology. *Perdiodontol 2000* 38: 135-187
85. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent Jr. RL. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25: 134-144.
86. Sreenivasan P., Gaffar A. (2002). Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol* 29: 965–974.
87. Sreenivasan P., Gaffar A. (2002). Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol* 29: 965–974.
88. Stefan R., Ioannis P., Noel C. (2012). Surgical treatment of peri-implantitis. *Clin. Oral Implants Res.* (Suppl. 6), 84–94
89. Teughels W., Van Assche N., Sliepen I., Quirynen M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Implants Res.* 17, 68–81.

90. Teughels W., Van Assche N., Sliepen I., Quirynen M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* Suppl 2:68-81.
91. The American Academy of Periodontology (AAP) (2013). Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis. *J Periodontol* Vol. 84, Num. 4: 436-443
92. Verredt E., Braem A., Chaudari A. (2011). Controlled release of chlorhexidine antiseptic from microporous amorphous silica applied in open porosity of an implant surface. *International Journal of Pharmaceutics* - El Sevier 419:28– 32
93. Wecke J., Kersten T., Madela K., Moter A., Göbel U.B., Friedmann A., Bernimoulin J. (2000). A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol* Lett. 191(1):95-101.
94. Wilson M., Patel H., Fletcher J. (1996). Susceptibility of biofilms of *Streptococcus sanguis* to chlorhexidine gluconate and cetylpyridinium chloride. *Oral Microbiol Immunol* 11(3):188-92.
95. Yoshinari M., Oda Y., Kato T., Okuda K. (2001). Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. *Biomaterials* 22: 2043-2048
96. Zilberman M. 2005. Dexamethasone loaded bioresorbable films used in medical support devices: structure, degradation, crystallinity and drug release. *Acta Biomater*. 1, 615–624.
97. Zitzmann N.U., Abrahamsson I., Berglundh T., Lindhe J. (2002). Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 29(5):456-61.
98. Zitzmann N.U., Berglundh T .(2008). Definition and prevalence of periimplant diseases. *J Clin Periodontol* 35: 286-291.