



Universidad Complutense de Madrid
Master en Ciencias Odontológicas



Desarrollo *in vitro* de un modelo de biofilm oral sobre superficies de implantes dentales y estudio de la cinética de formación

Andrea Ravidà

Tutor: David Herrera González

Junio 2016

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción	5
3. Objetivos	12
4. Hipótesis	13
5. Materiales y métodos	14
5.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.....	14
5.2 Material seleccionado	14
5.3 Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas.....	15
5.4 Formación del biofilm sobre implantes comerciales	16
5.5 Observación por técnicas de microscopía del crecimiento del biofilm sobre la superficie del implante para la valoración de su evolución en el tiempo	18
5.6 Análisis cuantitativo de las especies bacterianas que forman parte del biofilm generado en contacto con la superficie del implante	19
5.7 Análisis estadístico	21
6. Resultados	22
6.1 Análisis de los biofilms mediante Microscopía Laser Confocal	22
6.2 Análisis cuantitativo de la presencia de las bacterias en el biofilm formado en la superficie del implante comercial por qPCR	23
7. Discusión	31
8. Conclusiones	37
9. Agradecimientos	38
10. Bibliografía	39

1. Resumen

Antecedentes y objetivos: El biofilm bacteriano oral es uno de los factores más importantes en la patogénesis de las enfermedades periimplantarias, como son las mucositis periimplantarias o periimplantitis. Hoy en día, se sabe muy poco sobre el comportamiento de estas comunidades bacterianas periimplantarias y no hay pruebas suficientes para establecer conclusiones definitivas sobre la prevención y la eliminación de ellas. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo y puesta a punto de un modelo *in vitro* reproducible de biofilm periimplantario, modelo que incluyó seis de las principales bacterias implicadas en su desarrollo *in vivo* sobre implantes dentales disponibles comercialmente. Se estudiaron a lo largo de diferentes tiempos de incubación su dinámica y cinética de formación, lo que puede ayudar a mejorar el conocimiento acerca del comportamiento de estas bacterias sobre dichas superficies, teniendo en cuenta tanto la micro- como la macro-estructura de las superficies del implante.

Material y métodos: Se emplearon seis cepas de referencia estándar para desarrollar biofilms sobre implantes dentales de 10 mm de longitud 3,25/3,4 mm de diametro con superficie patentada sometida a grabado ácido de rugosidad mínima. Los implantes estériles se introducen en una placa de cultivo multipocillo en contacto con la mezcla bacteriana, que incluye colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) durante diferentes tiempos (12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) de incubación. La estructura de los biofilms obtenidos se estudió usando microscopía láser confocal (CLSM). La cinética del biofilm bacteriano y el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/biofilm de cada especie bacteriana se obtuvieron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real (qPCR). El análisis estadístico se realizó con el análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni.

Resultados: Mediante la técnica de CLSM se ha podido comprobar como el biofilm bacteriano evoluciona en el tiempo, estando ya presente desde las primeras 12 horas de incubación como una capa discontinua que evolucionan a agregados multicelulares, sin llegar a cubrir toda la superficie del mismo en ningún momento del estudio. Por qPCR se ha comprobado que las seis cepas bacterianas se encuentran incorporadas en el biofilm desde las 12 h de incubación. La especie *S. oralis* ha demostrado un comportamiento muy estable en el tiempo sobre el material de implante con respecto a su concentración ($p > 0,05$ al comparar entre sí las concentraciones a los diferentes tiempos estudiados). La especie *A. naeslundii* ha presentado únicamente diferencias significativas cuando se compara su concentración a 48 h con 12 y 72 h de incubación ($p = 0,03$ en ambos casos). *V. parvula* se encuentra en mayor concentración en el periodo de 96 h, al igual que *P. gingivalis* ($p = 0,00$ con respecto al resto de tiempos). *F. nucleatum* fue estable sin diferencias entre tiempos ($p > 0,05$). *A. actinomycetemcomitans* presentó sólo diferencias significativas cuando se comparaba su concentración a 24 y 72 h de incubación ($p = 0,012$).

Conclusión: Este estudio demuestra que el modelo de biofilm *in vitro* propuesto es válido para comparar el desarrollo de biofilms sobre diferentes implantes dentales comercializados y permite evaluar el desarrollo del mismo, así como los recuentos bacterianos.

2. Introducción

Las bacterias son las formas de vida más exitosas en la tierra, en términos de biomasa total y en cuanto a la variedad y el alcance de los hábitats colonizados. La razón del éxito es su plasticidad fenotípica (Brown et al. 1985). El genotipo bacteriano es extenso, pero es la capacidad de este genotipo para responder fenotípicamente a los estímulos ambientales lo que ha producido el notable éxito de las bacterias.

La forma habitual de crecimiento de estos microorganismos en la naturaleza es organizados en “biofilms” (Donlan et al. 2002). Entre estos, los biofilms bacterianos se definen como una comunidad bacteriana sésil, inmersa en un medio líquido, donde las bacterias que están unidas a un substrato o superficie, embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y con un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes (Donlan et al. 2002).

La presencia de biofilms microbianos ejerce un enorme impacto en diversos aspectos de nuestra vida. Se observan biofilms recubriendo las piedras de los lechos de los arroyos, ríos y con frecuencia en la superficie de aguas estancadas, en los ambientes más extremos, como por ejemplo, en geiseres con temperaturas muy elevadas, en aguas de manantiales termales de un amplio rango de pH, desde muy ácido a muy alcalino, o en glaciares. Cotidianamente convivimos con ellos en las duchas, en las tablas de cortar alimentos, incluso en las cerdas de un cepillo de dientes (Lasa et al. 2005, Zamora et al. 2008). Aunque están ampliamente distribuidos en la naturaleza y en muchos casos tienen efectos beneficiosos, los biofilms son un problema de salud pública. Podemos encontrar biofilms implicados en la placa dental, en el tratamiento de aguas residuales, en la corrosión de materiales, en la contaminación de alimentos durante su procesamiento en la industria alimentaria, en el colapso de tuberías, en la rizosfera en interacciones planta-microorganismo, en el desarrollo de infecciones crónicas sobre tejido vivo (mastitis, otitis, neumonía, infecciones urinarias, osteomielitis) o asociados a implantes médicos.

Más de 300 años después de que Van Leeuwenhoek observara los “animáculos” en los surcos dentales, estamos todavía intentando descifrar la organización de estos biofilms y la actividad biológica de las bacterias asociadas a la dentición humana y, en la actualidad, a los implantes dentales.

Black fue el primero en describir la placa microbiana como una masa gelatinosa adherida a la superficie dental, debida a la acumulación de más de cien especies bacterianas en un único nicho ecológico (Black et al. 1898). En los años de 1950 existía la tendencia errónea de clasificar a la placa como una entidad única, pero, con el pasar de los años, se comprobó que no se trataba de una estructura uniforme, variando en las distintas localizaciones orales e incluso en distintos sitios del mismo diente, y es que se vio que la placa supragingival era morfológicamente y bacteriológicamente distinta respecto a la subgingival, aunque siempre manteniendo ciertas características comunes en cuando a estructura, composición y dinámica de formación (Friskopp y Hammarstrom 1980).

Este concepto de la placa dental como estructura heterogénea, formada por millones de bacterias, es evidente una vez que esta es definida como un biofilm. Las bacterias en el biofilm cambian su comportamiento (fenotipo y genotipo) con respecto a las mismas en estado planctónico (Costerton et al. 1995), desarrollando mecanismos de protección contra las defensas del huésped, los tratamientos antibacterianos o la remoción mecánica.

El proceso que llevará a la inclusión de las bacterias en un biofilm empieza con la formación de la película adquirida, formada principalmente por glicoproteínas, unos minutos después del cepillado dental. Breck y colaboradores estudiaron la formación temprana de la placa dental, mediante la adhesión de unas tiras de plástico en los caninos y premolares de pacientes, encontrando que, a pesar de cambiar lo enjuagues, la formación del biofilm seguía el mismo esquema (Brex et al. 1981, Rosan et al. 2000).

El biofilm oral, a continuación, se desarrolla por un proceso de colonización selectiva, reproducible y secuencial (Diaz et al. 2006). Entre los colonizadores iniciales predominan especies

de los géneros *Actinomyces*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Streptococcus* y *Veillonella* (Nyvad et al. 1987, Diaz et al. 2006). Los colonizadores secundarios como las fusobacterias coagregan con los colonizadores iniciales y harán de puente para la incorporación de nuevas bacterias, destacando (por su potencial patógeno) las especies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (Kolenbrander et al. 1993, Kolenbrander et al. 2002) (Figura 1).

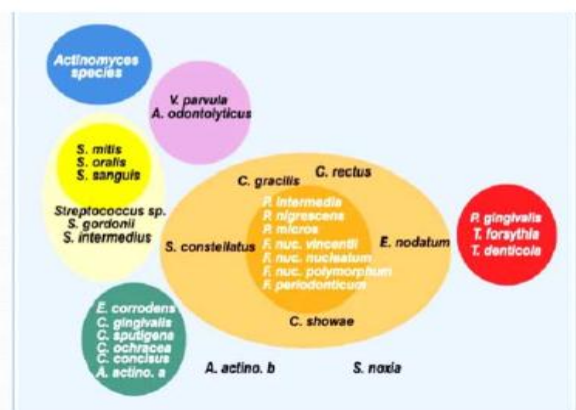


Figura 1. Esquema de la asociación entre especies subgingivales tomado de Socransky et al. 1998. Los datos provienen de 13.261 muestras de placa subgingival tomadas de 185 adultos. Los complejos de la izquierda están compuestos por especies que se cree que colonizan la superficie dentaria y proliferan en estadios tempranos. El complejo naranja se cree que es el puente entre los colonizadores iniciales y las especies del complejo rojo que dominan en etapas tardías (Socransky et al. 1998).

Las bacterias organizadas en el biofilm se consideran uno de los principales factores etiológicos de las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis) y de las enfermedades perimplantares (mucositis periimplantaria y periimplantitis) (Lang et al. 2011). La gingivitis y la mucositis se caracterizan por la inflamación de los tejidos blandos alrededor del diente en el primer caso y alrededor del implante en el segundo, sin pérdida de hueso de soporte. Dicha pérdida es característica de la periodontitis si es alrededor del diente, y de la periimplantitis si aparece alrededor de los implantes.

El término “periimplantitis” fue introducido hace más de treinta años (Levignac et al. 1965, Mombelli et al. 1987). En el primer *Workshop* Europeo de Periodoncia, celebrado en 1993, se acordó que este término se debía utilizar para describir un proceso inflamatorio alrededor del implante osteointegrado en función, que llevaba a una bolsa periimplantaria y a la pérdida de hueso de soporte (Albrektsson et al. 1994).

La relación causa-efecto entre acumulación de placa y mucositis-periimplantitis, ha sido demostrada *in vivo*, tanto en modelos animales como en pacientes (Berglundh et al. 1992,

Pontoriero et al. 1994, Scarano et al. 2004), al igual que la correlación positiva entre higiene oral y pérdida de hueso marginal alrededor de los implantes (Mombelli et al. 1992, Lindquist et al. 1996).

Sin embargo, todavía hay dudas sobre cómo las bacterias interaccionan con los implantes dentales en la cavidad oral. En la literatura hay estudios muy distintos en cuanto a la similitud entre la microbiota de las enfermedades periodontales y la de las enfermedades periimplantarias. Estudios sobre la colonización precoz de las superficies implantares sostienen la existencia de un modelo y una secuencia de sucesión microbiana parecida a la descrita para las superficies dentales (Socransky et al. 2005, Kolenbrander et al. 2006), con la formación de una película adquirida que provee un enlace para los primeros colonizadores como los *Streptococcus* y *Actinomyces* del complejo amarillo. Además, en pacientes parcialmente desdentados, se ha observado una sorprendente similitud en la composición de la microbiota subgingival entre los dientes y los implantes (Lekholm et al. 1986, Apse et al. 1989, Quirynen et al. 1990, Koka et al. 1993, Leonhardt et al. 1993). Sobre la base de esta similitud, se ha sugerido que, al menos en pacientes parcialmente desdentados, los dientes podrían actuar como un depósito para la recolonización de la zona subgingival alrededor de los implantes. En cambio, otros estudios han indicado que en la mayoría de los casos la composición de la microbiota periimplantaria es similar a la flora subgingival, pero pueden ocasionalmente estar vinculados a una microbiota diferente (Mombelli et al. 2011).

Al igual que en el periodonto sano, una vez que la superficie del implante limpio se expone a la cavidad oral, inmediatamente se cubre por una película salival y es colonizado por microorganismos (Elter et al. 2008), y de la misma forma que en la dentición, las bacterias asociadas con los implantes sanos son predominantemente cocos Gram positivos, miembros de los complejos amarillo y morado, o especies independientes como *Actinomyces*. Estas especies crean las condiciones previas para la adhesión de miembros del complejo naranja y de patógenos periodontales como los de los complejos rojo y verde constituidos principalmente por bacterias Gram negativas (Socransky et al. 1998, Quirynen et al. 2006, Lee et al. 2010).

A pesar de estas similitudes entre los biofilms sobre los dientes o la superficie de los implantes, algunas de las características de los biofilms pueden atribuirse a hallazgos microscópicos o/y macroscópicos de la superficie de los implantes (Lang et al. 2011). Resultados de estudios anteriores *in vitro* e *in vivo* han reportado que algunas características de la superficie implantar como la rugosidad, la energía libre superficial, humectabilidad y el grado de esterilización puede afectar a la formación del biofilm y su distribución tridimensional, aunque todavía hay controversia sobre la existencia de estos mecanismos específicos. Estudios recientes que evalúan biofilms sobre pilares de implantes con diferente composición de la superficie y de la topografía han demostrado que existe una correlación entre la rugosidad de la superficie y la biomasa viable en el biofilm (Hahnel et al. 2014, Hahnel et al. 2015).

Estos resultados concuerdan con otros resultantes de modelos *in vitro*, donde la rugosidad de la superficie influye significativamente en la formación del biofilm (Quirynen et al. 1994, Schmidlin et al. 2013, Zhao et al. 2014), mientras en otros, en los que comparan superficies de titanio y zirconio, parecía ser que el factor que determina la adhesión bacteriana inicial es la energía libre superficial y no la rugosidad (Mabboux et al. 2004, Al-Radha et al. 2012). De la misma forma, en algunos modelos se ha demostrado que al aumentar la rugosidad de la superficie se producía un aumento de la colonización bacteriana (Whitehead et al. 2005, Teughels et al. 2006, Xing et al. 2015), mientras que en otros ciertas topografías de titanio podían reducir la adhesión bacteriana, mientras favorecían la adhesión y osteointegración (Puckett et al. 2010, Xing et al. 2015). También la pureza de titanio, y no sólo la topografía de la superficie pueden influir en la colonización bacteriana temprana (Violant et al. 2014).

Nuestro grupo de investigación, utilizando un modelo de biofilm multibacteriano *in vitro*, demostró diferencias significativas en el grosor del biofilm y la estructura tridimensional del mismo cuando se forma en dos superficies de implantes dentales, las superficies de titanio y de zirconio, con una cierta tendencia a encontrar mayor número de colonizadores primarios (*S. oralis*, *V. parvula* y *A. naeslundii*) en los biofilm formados en superficies de zirconio que en las superficies

de titanio (Sanchez et al. 2014), aunque sin llegar a ser estas diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados coinciden con los últimos estudios realizados por de Ávila y colaboradores (2015) que reportaron diferencias cuantitativas y cualitativas entre los biofilms formados en las superficies de titanio frente a los de zirconio (de Avila et al. 2016).

La única forma de entender los sinergismos que ocurren en las comunidades bacterianas y tratar de prevenir sus efectos deletéreos, es estudiar las bacterias patogénicas de biofilms, no como cepas individuales sino en comunidad, de la misma forma que hay que estudiar a fondo las interacciones bacterianas. Por ello es fundamental el desarrollo de modelos *in vitro* de comunidades microbianas organizadas como biofilms, con unas condiciones que reproduzcan el hábitat natural de los mismos, así como reproduciendo las características de las superficies y el medioambiente físico-químico.

Son varios los modelos *in vitro* disponibles en la literatura científica que abordan el estudio de la estructura, la formación y desarrollo de la placa subgingival respecto a materiales de implante, estudios que no están exentos de complicaciones. Algunos intentos se han hecho mediante la colocación de injertos de diferentes materiales en las bolsas de pacientes periodontales (Wecke et al. 2000, Takeuchi et al. 2004), otros mediante el uso de la placa subgingival dispersada, placas de microtitulación o fermentadores de flujo constante (Kuramitsu et al. 2005, Hope et al. 2006). Muy pocos de estos estudios, sin embargo, han proporcionado información *in vitro* precisa sobre como la placa subgingival reacciona frente a la macro y microestructura de los implantes.

En el trabajo que presentamos se ha planteado la utilización de implantes comerciales para abordar el estudio. La ventaja de este estudio con respecto a los anteriores, que utilizaban discos para el estudio de la formación del biofilm (Sánchez et al. 2014, de Avila et al. 2016, entre otros), es la utilización de implantes disponibles comercialmente, y no muestras representativas de los mismos, con el fin de emular más fielmente la situación real, pese a las notables limitaciones de los modelos *in vitro*. La controversia existente en cuanto a la posible relación entre las características de las superficies de implantes y la formación de biofilms peri-implantarios, sumado a la falta de estudios *in vitro* sobre muestras de implantes comerciales como primer paso para comprobar dicho

fenómeno, han llevado a la realización de este estudio como preámbulo de futuras investigaciones clínicas, dado las complicaciones que suponen la experimentación *in vivo*.

3. Objetivos

Se propone el desarrollo y puesta a punto de un modelo *in vitro* reproducible de biofilm periimplantario, estudiando a lo largo de diferentes tiempos de incubación su dinámica y cinética de formación, modelo que incluirá seis de las principales bacterias implicadas en su desarrollo *in vivo*, representadas por colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*), y colonizadores tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), utilizando como superficie de desarrollo implantes dentales de titanio disponibles comercialmente. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Estudiar el desarrollo *in vitro* de un modelo de biofilm partiendo de 6 especies bacterianas seleccionadas previamente, a lo largo de diferentes tiempos de incubación (12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) sobre implantes comerciales de titanio.
- Estudiar la estructura espacial del biofilm generado sobre el implante a los diferentes tiempos de incubación para observar la dinámica evolutiva de los mismos.
- Verificar y cuantificar la presencia de las 6 especies bacterianas introducidas en el biofilm en cada tiempo de incubación para estudiar la cinética de incorporación de las mismas al biofilm.

El estudio se ha desarrollado en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid y en el centro de Microscopía y Citometría de Flujo del Campus de Moncloa, situado igualmente en la Universidad Complutense de Madrid.

4. Hipótesis

Las bacterias orales pueden organizarse *in vitro* en biofilm sobre la superficie de implantes disponibles comercialmente en un modelo de laboratorio reproducible que facilite el estudio cualitativo y cuantitativo de su evolución en el tiempo.

5. Materiales y métodos

5.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

La formación de un biofilm con bacterias orales sobre la superficie de implantes comerciales se ha realizado seleccionando bacterias que representan a los colonizadores primarios, secundarios y tardíos: *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Las cepas utilizadas y las colecciones de cultivo tipo a la que pertenecen se muestran en la Tabla 1. Las cepas se mantienen crio- conservadas a -80°C.

Tabla 1. Cepas seleccionadas en el estudio y colección de cultivo tipo.

Cepa	Referencia
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSMZ ¹ 20482
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ 8324
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC ² 11810
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC ³ 19039
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT ⁴ 907T

¹DMS, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

²NCTC, National Collection of Type Cultures

³ATCC, American Type Cultures Collection

⁴CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

Las bacterias se crecieron en placas de medio Agar Sangre (Oxoid no 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), suplementado con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L), en condiciones de anaeróbicas (10% H₂ 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio) a 37°C durante 24-72h.

5.2 Material seleccionado

Para la el desarrollo y puesta a punto del modelo de biofilm *in vitro* se ha seleccionado un único modelo de implante comercial: implante de titanio (Biomet 3i superficie OSSTEOTITE®), AÑADIR LOS DATOS DEL FABRICANTE, CIUDAD, PAÍS), de 10 mm de longitud 3,25/3,4 mm de diámetro con superficie patentada sometida a grabado ácido de rugosidad mínima.

5.3 Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas

Con el fin de estandarizar las condiciones del estudio e 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, que fueron realizadas con anterioridad, para el desarrollo del modelo de biofilm estático sobre discos de hidroxiapatita (Sánchez et al. 2011). Brevemente, los ensayos se han realizado en 100 mL del medio denominado BHI2, que consiste en medio BHI [medio 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)]. Se preparó un preinóculo a partir de una colonia de un cultivo fresco en placas de medio Agar Sangre suplementado, que se inoculó en 15 mL de medio BHI2, incubándolo en anaerobiosis a 37°C, durante 24-72h en función de la especie bacteriana. A determinados intervalos de tiempo, en función de la especie bacteriana, se fueron realizando medidas de la D.O a 550 nm. Las medidas de la densidad óptica se realizaron en un espectrofotómetro (Figura 2), previamente calibrado con dos cubetas de medio BHI₂, para posteriormente introducir 1 mL de cada una de las bacterias en sus respectivas cubetas y medir su densidad óptica, siempre dejando uno de los controles en el equipo. Igualmente, se fueron tomando alícuotas de 100 µL, que fueron diluidas de forma seriada en buffer PBS estéril (por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*).



Figura 2. Espectrofotómetro utilizado en el estudio, en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Biología molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Estas curvas permitieron relacionar con facilidad los datos de densidad óptica (D.O), tiempo de generación y unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (UFC/mL) (Figura 3).

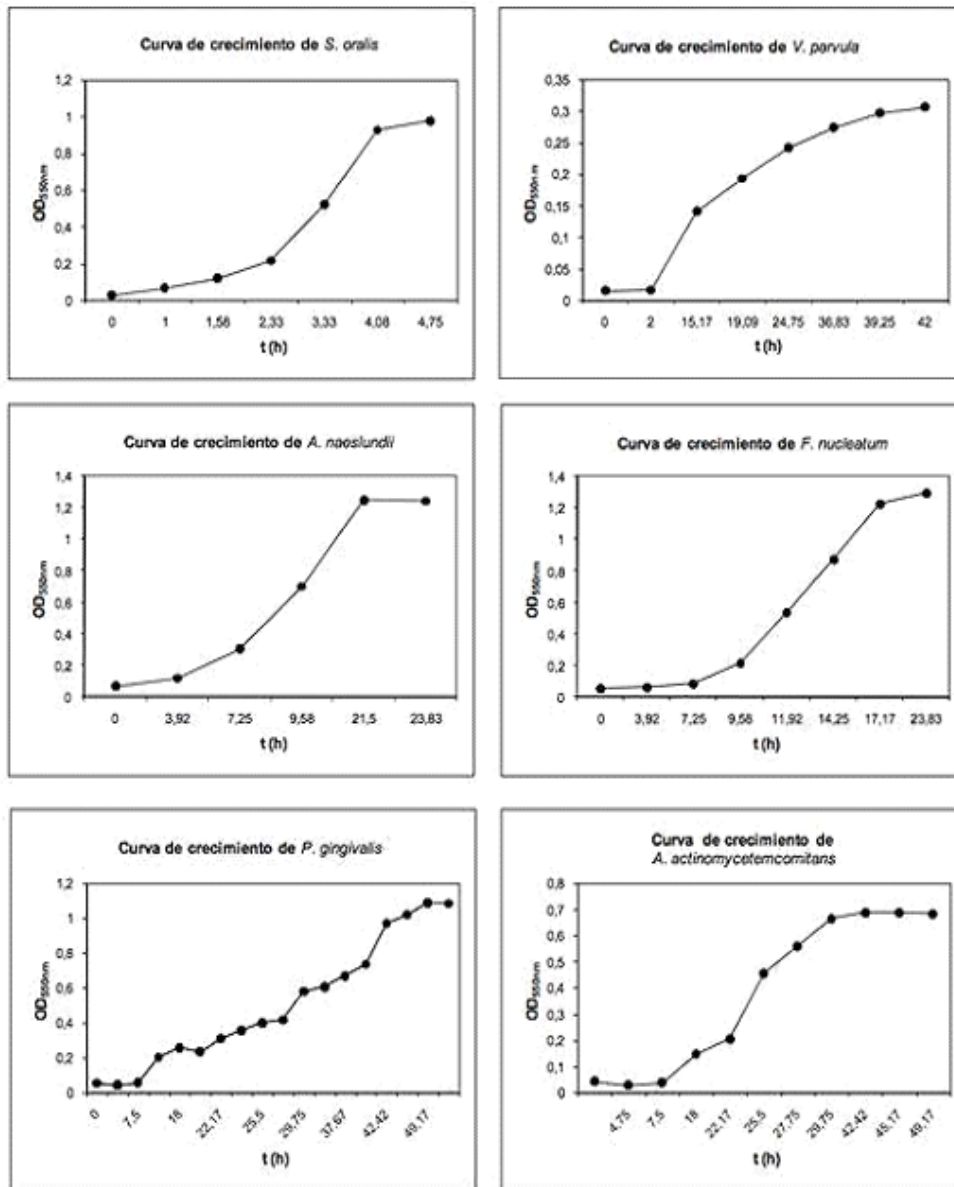


Figura 3. Curvas de crecimiento de las especies bacterianas utilizadas en los ensayos (Sánchez et al 2011).

5.4 Formación del biofilm en las superficies seleccionadas

Se preparó un inóculo que contuviera las 6 especies bacterianas, a un valor de UFC/mL final previamente determinado, y que se mantuvo constante en todos los ensayos a fin de favorecer la reproducibilidad del modelo (Tabla 2). Se ajustó la densidad óptica por dilución en el medio BHI₂ fresco hasta los valores estipulados en el estudio. Estos valores vienen determinados por el tiempo de generación de cada bacteria, corroborado en las curvas de crecimiento (Figura 3).

Tabla 2. Cepas seleccionadas en el estudio y concentración final (ufc/mL) en el preinoculo.

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

Los implantes comerciales, limpios y estériles, se introdujeron en placas de cultivo celular de 24 pocillos estériles, añadiendo a continuación en cada pocillo con implante 1500 µl del inóculo preparado. En dos pocillos vacíos se pusieron controles de medio BHI2 (1500 µl) para confirmar la esterilidad del medio así como del proceso de manipulación e incubación. El desarrollo del biofilm se llevó a cabo en anaerobiosis, a 37°C durante 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Transcurrido el tiempo estipulado de generación, los implantes fueron retirados del sistema en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (Figura 4), para su posterior estudio.

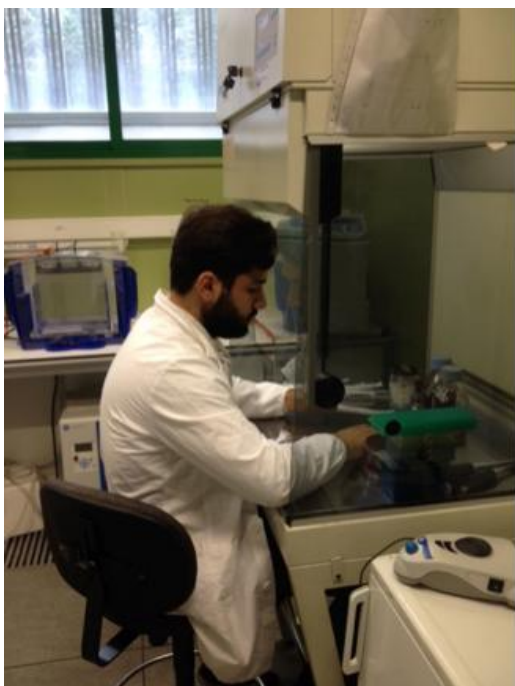


Figura. 4 Campana de flujo laminar utilizada en el estudio, en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

5.5 Observación por técnicas de microscopía del crecimiento del biofilm sobre la superficie del implante para la valoración de su evolución en el tiempo

Se estudiaron las diferentes etapas en el desarrollo del biofilm entre 12 y 120 horas de incubación mediante la técnica de Microscopía Laser Confocal (CLSM, por sus siglas en inglés). El análisis del biofilm por CLSM, y el posterior tratamiento de las imágenes obtenidas con el programa Imaris versión 7.7.0 (Bitplane, Zurich, Suiza) nos ha permitido obtener una proyección tridimensional del mismo y observar la disposición espacial de las células dentro de la matriz que lo compone. Al utilizar los fluorocromos que se citan a continuación, se puede observar la tendencia de distribución de las células viables y no viables a lo largo de todo el biofilm. Previamente al estudio por microscopía, los biofilms generados sobre los implantes fueron lavados secuencialmente en 2 mL de PBS estéril tres veces, durante 10 segundos, para retirar las bacterias no adheridas. A continuación, se tiñe con el Kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), que proporciona una combinación de dos fluorocromos: “SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain” y “Ioduro de Propidio red-fluorescent nucleic acid stain”, que se diferencian en sus características espectrales y en su capacidad de penetración en las células bacterianas. 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.

Cada ensayo se realizó por triplicado en tres días independientes ($n=9$).

5.6 Análisis cuantitativo de las especies bacterianas que forman parte del biofilm generado en contacto con la superficie del implante

Con el objetivo de corroborar que todas las especies con las que se ha trabajado se han incorporado al biofilm (análisis cualitativo), y obtener el número de las mismas incluidas (análisis cuantitativo), se ha llevado a cabo el recuento bacteriano por la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Esta técnica, utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN bacteriano presente en la muestra, se llevó a cabo mediante el uso de sondas de hidrólisis TaqMan, que permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas moleculares dependientes de la secuencia, marcadas por dos fluorocromos. Cada ensayo se realizó por triplicado en tres días independientes ($n=9$). El primer paso para desarrollar este objetivo ha sido la extracción del ADN de todos los biofilms generados. Los implantes fueron lavados tres veces en 2 mL de PBS estéril, durante 10 segundos por lavado, para retirar las bacterias no adheridas en el biofilm. A continuación, las muestras se introdujeron en un tubo de plástico con 1 mL de PBS estéril, y se sometieron a vorteadado hasta completar la disgregación del biofilm, tras lo cual se procedió a la extracción del ADN de las células que componen el biofilm. Para ello, utilizamos el kit de extracción “MolYsis Complete5” (MolzYM GmbH & CoKG, Bremen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue resuspendido en 100 μ L de agua estéril y almacenado a -20°C hasta su análisis. Las secuencias de los cebadores o *primers* [sintetizados por Life Technologies Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)] y sondas [sintetizados por Life Technologies Invitrogen y Roche], dirigidas en todos los casos al gen 16S rRNA, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Primers y sondas empleadas para la cuantificación del ADN genómico para cada bacteria. Primers y sondas fueron dirigidos contra el gen 16 S rRNA.*So, S.oralis; Vp, V.parvula; An, A.naeslundii; Aa, A.actinomycetemcomitans; Fn, F. nucleatum; Pg, P. gingivalis.*

Bacteria	Secuencia (5'-3')	Longitud	Referencia
<i>So</i>			
Forward	CAACGATACATAGCCGACCTGAG	97	(SANCHEZ 2014)
Reverse	TCCATTGCCGAAGATTCC		
Sonda	6FAM-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA-BBQ		
<i>Vp</i>			
Forward	TGCTAATACCGCATACGATCTAACC	66	(SANCHEZ 2014)
Reverse	GCTTATAAATAGAGGCCACCTTTCA		
Sonda	6FAM-CTATCCTCGATGCCGA-TAMRA		
<i>An</i>			
Forward	GGCTGCGATACCGTGAGG	103	(SANCHEZ 2014)
Reverse	TCTGCGATTACTAGCGACTCC		
Sonda	6FAM-CCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT-BBQ		
<i>Pg</i>			
Forward	GCGCTCAACGTTTCAGCC	67	(SANCHEZ 2014)
Reverse	CACGAATTCGCGCTGC		
Sonda	6FAM-CACTGAAGCTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA		
<i>Aa</i>			
Forward	GAACCTTACCTACTCTTGACATCCGAA	80	(SANCHEZ 2014)
Reverse	TGCAGCACCTGTCTCAAAGC		
Sonda	6FAM-AGAAGCTCAGAGATGGGTTTGTGCCTTAGGG-TAMRA		
<i>Fn</i>			
Forward	GGATTTATTGGGCGTAAAGC	162	(SANCHEZ 2014)
Reverse	GGCATTCTACAAATATCTACGAA		
Sonda	6FAM-CTCTACACTTGTAGTCCG-TAMRA		

La reacción se ha realizado en un volumen final de 20 μ L, que contiene:

- 10 μ L de 2x master mixture (LC 480 Probes Master; Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania).
- la concentración óptima de primers y sonda (900, 900 y 300 nM para *S. oralis*; 300, 300 y 300 nM para *A. naeslundii*; 750, 750 y 450 nM para *V. parvula*; 300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 y 300 nM, para *P. gingivalis*, 600, 600 y 300 nM para *F. nucleatum* y 5 μ L de DNA de las muestras de biofilm.

Las muestras serán sometidas a un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 min. Los análisis se han llevado a cabo con el equipo LightCycler® 480 II thermocycler (Roche). Las placas usadas en el estudio han sido FramStar 480 (4titude; The North Barn; Damphurst Lane, Reino Unido), selladas con QPCR Adhesive Clear Seals (4titude). Cada muestra de ADN ha sido analizada por duplicado. El valor de

Cq que proporciona el equipo describe el número de ciclos de la PCR a los cuales la fluorescencia alcanza la línea base, determinado por el software del equipo. La cuantificación derivada de los datos de Cq obtenidos por qPCR se ha basado en curvas estándar. Para ello, 1 mL de cada una de las seis especies utilizada en el estudio, a una concentración de 10^9 UFC/mL, fueron sometidas al mismo proceso de extracción de ADN anteriormente mencionado. Se realizaron diluciones seriadas de cada ADN en agua estéril, con rango de 10^9 - 10^0 UFC/mL, y sometidos a qPCR como se ha descrito. Las curvas estándar se han construido enfrentando los valores de Cq generados en la qPCR frente al log de UFC/mL.

5.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos por qPCR fueron calculados como UFC/mL. Se ha realizado un análisis a nivel de experimento para cada parámetro de estudio ($n = 9$). Los datos se han expresado como medias y desviaciones estándar. Para comprobar el efecto del implante a cada tiempo de incubación sobre la cinética de evolución bacteriana, se ha realizado el análisis de la varianza (ANOVA) y para comparaciones múltiples se han utilizado las pruebas post hoc con la corrección de Bonferroni. Los resultados se han considerado estadísticamente significativas a $p < 0,05$. Se ha utilizado el software IBM® SPSS® Statistics 19.0 para todos los análisis de datos.

6. Resultados

6.1 Análisis de los biofilms mediante Microscopía Laser Confocal

El estudio de la dinámica de formación y la distribución de los biofilms bacterianos sobre la superficie del implante se ha realizado por CLSM, utilizando el Kit LIVE DEAD® BacLight, a los diferentes tiempos de incubación: 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. La figura 5 muestra una selección de las micrografías obtenidas para cada tiempo de generación del biofilm en la superficie del implante comercial de titanio.

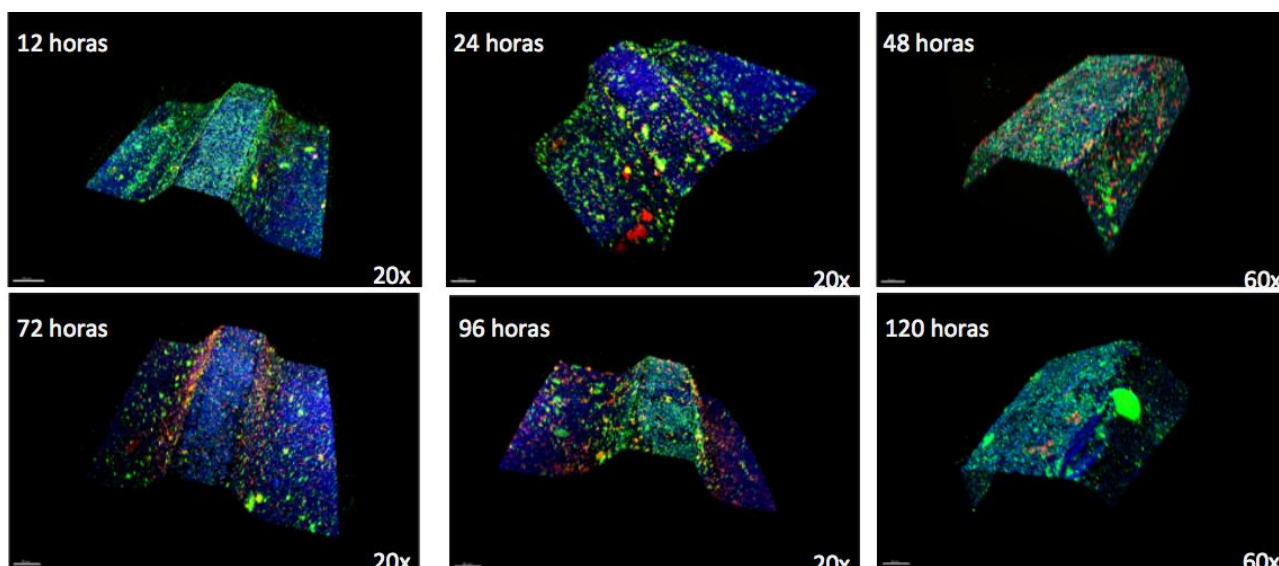


Figura 5. Micrografías obtenidas por CLSM a los diferentes tiempos de incubación (desde 12 horas a 120 horas) analizadas con los objetivos de 20X y 60X de la espira del implante junto con las zonas inter-espira. Las imágenes muestran el biofilm ya formado tras 12 h de incubación sobre la superficie del implante comercial de titanio, como una capa discontinua y de poca altura de bacterias. A las 12 horas casi la totalidad de las bacterias se encuentran vivas (color verde). A medida que avanzan las horas de incubación se observarán ya las bacterias como agregados multicelulares; a partir de este momento aumenta la presencia de bacterias muertas (color rojo), aunque con predominio en todos los casos de las bacterias vivas, a excepción de los biofilms de 72 horas de incubación. En azul podemos ver la superficie del implante.

En las imágenes se puede observar en color verde las bacterias vivas, en color rojo las bacterias muertas y en azul la superficie del implante. Con el objetivo de 20X, se observa la espira del implante junto con las zonas inter-espira a uno y otro lado, mientras que con el objetivo de 60X, se observa únicamente la superficie de la parte más externa de la espira del implante. Como resultado de la observación por microscopia confocal, se encontró una distribución discontinua de las bacterias por la superficie del implante, es decir, sin cubrir el total de la superficie del mismo,

sin zonas especiales de acumulación en cuanto a la zona de la espira y las regiones circundantes inter-espira, pudiendo apreciar cómo las bacterias se organizan en colonias discretas a medida que pasa el tiempo. Durante la evolución del biofilm desde 12 a 120 horas, predominan las bacterias vivas frente a las muertas.

6.2 Análisis cuantitativo de la presencia de las bacterias en el biofilm formado en la superficie del implante comercial por qPCR

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos del recuento de las especies bacterianas utilizadas en el modelo de biofilm in vitro mediante qPCR sobre el implante comercial a los diferentes tiempos de incubación, expresados como UFC/mL. En todos los casos el número de réplicas utilizadas ha sido de 9 (N=9 en la tabla). Se puede comprobar cómo a partir de las 12 horas de incubación todas las bacterias incluidas en el inóculo están ya incorporadas al biofilm, fluctuando en mayor o menor medida su concentración según avanza el tiempo de incubación. Todas las especies bacterianas han manteniendo su presencia en el biofilm formado sobre la superficie del implante durante las 120 horas de estudio.

De manera detallada, para cada una de las especies bacterianas utilizadas para el desarrollo del modelo, las Figuras 6 a 11 muestran la dinámica de incorporación y crecimiento de cada una de ellas en el biofilm, representada como el log de las UFC/mL frente a los tiempos de incubación, y las tablas 5 a 10 nos indican las posibles diferencias de concentración expresada como UFC/mL para cada especie entre los diferentes tiempos de incubación, lo que nos ayudará a establecer el momento más adecuado con el que trabajar en el biofilm en estudios posteriores.

Tabla 4. Recuento de las seis especies bacterianas utilizadas en el modelo de biofilm in vitro sobre la superficies del implante de titanio comercial, expresado como número de unidades formadoras de colonia por mililitro, para cada tiempo de incubación estudiado (de 12 a 120 horas). Número de réplicas en cada caso de 9.

	N	Media	Desviación Estandar	Error Estadístico	95%Intervalo de confianza de la media		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
So	12 h	5.20E+06	4.748E+06	1.583E+06	1.55E+06	8.84E+06	1.15E+05	1.72E+07
	24 h	6.46E+06	3.443E+06	1.148E+06	3.82E+06	9.11E+06	2.86E+06	1.26E+07
	48 h	1.34E+07	1.238E+07	4.128E+06	3.85E+06	2.29E+07	2.03E+06	3.17E+07
	72 h	1.02E+07	8.414E+06	2.805E+06	3.71E+06	1.66E+07	2.30E+06	2.68E+07
	96 h	1.44E+07	1.373E+07	4.576E+06	3.86E+06	2.50E+07	1.69E+06	3.69E+07
	120 h	5.41E+06	5.323E+06	1.774E+06	1.32E+06	9.50E+06	8.00E+04	1.50E+07
Vp	12 h	9.40E+04	7.960E+04	2.663E+04	3.28E+04	1.55E+05	1.96E+04	2.70E+05
	24 h	3.27E+06	1.125E+06	3.790E+05	2.41E+06	4.14E+06	1.73E+06	5.03E+06
	48 h	4.44E+06	2.564E+06	8.547E+05	2.47E+06	6.41E+06	6.73E+05	9.29E+06
	72 h	3.28E+06	2.062E+06	6.873E+05	1.70E+06	4.87E+06	1.12E+06	7.88E+06
	96 h	1.24E+07	1.116E+07	3.719E+06	3.78E+06	2.09E+07	1.31E+06	3.28E+07
	120 h	7.76E+06	2.602E+06	8.674E+05	5.76E+06	9.76E+06	4.46E+06	1.06E+07
An	12 h	3.25E+05	1.836E+05	6.121E+04	1.84E+05	4.66E+05	1.01E+05	6.84E+05
	24 h	3.62E+05	3.286E+05	1.095E+05	1.10E+05	6.15E+05	8.20E+04	9.18E+05
	48 h	1.15E+06	9.317E+05	3.106E+05	4.31E+05	1.86E+06	3.28E+05	3.01E+06
	72 h	3.12E+05	2.045E+05	6.816E+04	1.55E+05	4.69E+05	9.02E+04	6.14E+05
	96 h	7.05E+05	6.520E+05	2.173E+05	2.04E+05	1.21E+06	5.87E+04	1.83E+06
	120 h	9.03E+05	5.415E+05	1.805E+05	4.87E+05	1.32E+06	4.23E+04	1.73E+06
Fn	12 h	6.79E+06	4.208E+06	1.403E+06	3.55E+06	1.00E+07	1.42E+06	1.18E+07
	24 h	7.00E+06	5.053E+06	1.684E+06	3.12E+06	1.09E+07	1.63E+06	1.62E+07
	48 h	2.97E+06	2.052E+06	6.842E+05	1.40E+06	4.55E+06	2.11E+05	7.41E+06
	72 h	3.17E+06	2.073E+06	6.910E+05	1.58E+06	4.76E+06	1.20E+06	7.76E+06
	96 h	1.03E+07	8.445E+06	2.815E+06	3.79E+06	1.68E+07	1.49E+06	2.56E+07
	120 h	9.26E+06	1.084E+07	3.614E+06	9.25E+05	1.76E+07	2.64E+03	2.96E+07
Pg	12 h	2.19E+05	8.381E+04	2.794E+04	1.55E+05	2.84E+05	1.04E+05	3.86E+05
	24 h	2.41E+05	8.941E+04	2.980E+04	1.73E+05	3.10E+05	1.01E+05	3.95E+05
	48 h	2.98E+05	3.527E+05	1.176E+05	2.64E+04	5.69E+05	2.50E+04	1.14E+06
	72 h	1.35E+06	2.456E+06	8.185E+05	-5.33E+05	3.24E+06	4.64E+02	7.15E+06
	96 h	1.98E+07	1.070E+07	3.567E+06	1.15E+07	2.80E+07	9.29E+06	1.75E+07
	120 h	6.59E+06	5.981E+06	1.994E+06	1.99E+06	1.12E+07	2.25E+03	3.69E+07
Aa	12 h	2.90E+07	1.648E+07	5.492E+06	1.64E+07	4.17E+07	1.13E+07	5.99E+07
	24 h	8.09E+07	7.572E+07	2.524E+07	2.27E+07	1.39E+08	1.08E+07	2.35E+08
	48 h	2.85E+07	1.246E+07	4.152E+06	1.90E+07	3.81E+07	1.01E+07	4.72E+07
	72 h	1.52E+07	1.313E+07	4.375E+06	5.14E+06	2.53E+07	2.09E+06	3.95E+07
	96 h	6.11E+07	3.217E+07	1.072E+07	3.64E+07	8.69E+07	1.23E+07	1.15E+08
	120 h	5.13E+07	4.152E+07	1.384E+07	1.94E+07	8.32E+07	8.20E+04	1.09E+08

- **Dinámica del colonizador primario *Streptococcus oralis* en el biofilm:** *S. oralis* se detecta en el biofilm desde las 12 horas de incubación. Se puede comprobar como su concentración se mantiene muy constante hasta las 120 horas sin grandes fluctuaciones en la misma (Figura 6), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos estudiados ($p > 0,05$ en todos los casos) (Tabla 5).

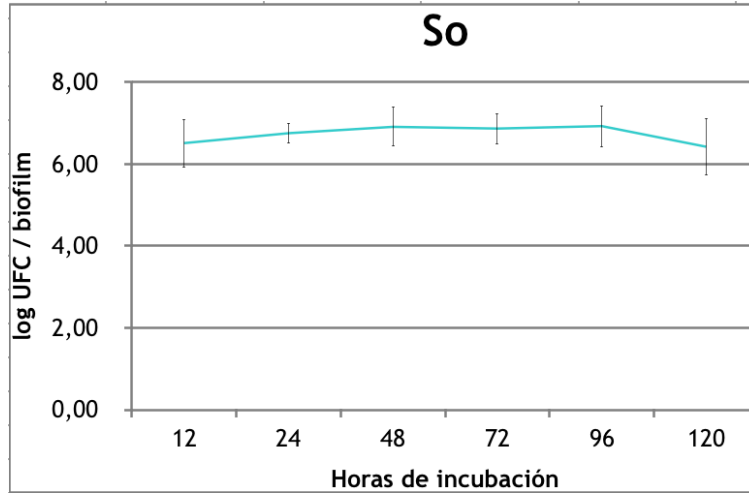


Figura 6. Representación gráfica de la cinética de incorporación de *Streptococcus oralis* en el biofilm formado sobre la superficie del implante de titanio comercial, expresado como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Tabla 5. Análisis estadístico de las diferencias de las medias obtenidas para la bacteria *Streptococcus oralis*, expresado como el número de unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Variable dependiente		Diferencia de las medias(I-J)	Error Estadístico	Significación estadística	95%Intervalo de confianza de las medias		
					Limite inferior	Limite superior	
So	12 h	24 h	-1,27E+06	4,20E+06	1,000	-1,42E+07	1,17E+07
		48 h	-8,17E+06	4,20E+06	0,86	-2,11E+07	4,79E+06
		72 h	-4,99E+06	4,20E+06	1,000	-1,79E+07	7,97E+06
		96 h	-9,22E+06	4,20E+06	0,492	-2,22E+07	3,74E+06
		120 h	-2,14E+05	4,20E+06	1,000	-1,32E+07	1,27E+07
	24 h	12 h	1,27E+06	4,20E+06	1,000	-1,17E+07	1,42E+07
		48 h	-6,90E+06	4,20E+06	1,000	-1,99E+07	6,06E+06
		72 h	-3,72E+06	4,20E+06	1,000	-1,67E+07	9,24E+06
		96 h	-7,95E+06	4,20E+06	0,96	-2,09E+07	5,01E+06
	48 h	12 h	1,05E+06	4,20E+06	1,000	-1,19E+07	1,40E+07
		24 h	8,17E+06	4,20E+06	0,86	-4,79E+06	2,11E+07
		72 h	6,90E+06	4,20E+06	1,000	-6,06E+06	1,99E+07
		96 h	3,18E+06	4,20E+06	1,000	-9,78E+06	1,61E+07
	72 h	12 h	-1,05E+06	4,20E+06	1,000	-1,40E+07	1,19E+07
		24 h	7,96E+06	4,20E+06	0,95	-5,01E+06	2,09E+07
		48 h	4,99E+06	4,20E+06	1,000	-7,97E+06	1,79E+07
		96 h	3,72E+06	4,20E+06	1,000	-9,24E+06	1,67E+07
	96 h	12 h	-3,18E+06	4,20E+06	1,000	-1,61E+07	9,78E+06
		24 h	-4,23E+06	4,20E+06	1,000	-1,72E+07	8,73E+06
		48 h	4,77E+06	4,20E+06	1,000	-8,19E+06	1,77E+07
		72 h	9,22E+06	4,20E+06	0,492	-3,74E+06	2,22E+07
	120 h	12 h	7,95E+06	4,20E+06	0,962	-5,01E+06	2,09E+07
		24 h	1,05E+06	4,20E+06	1,000	-1,19E+07	1,40E+07
		48 h	4,23E+06	4,20E+06	1,000	-8,73E+06	1,72E+07
72 h		9,01E+06	4,20E+06	0,553	-3,96E+06	2,20E+07	
	12 h	2,14E+05	4,20E+06	1,000	-1,27E+07	1,32E+07	
	24 h	-1,05E+06	4,20E+06	1,000	-1,40E+07	1,19E+07	
	48 h	-7,96E+06	4,20E+06	0,959	-2,09E+07	5,01E+06	
	72 h	-4,77E+06	4,20E+06	1,000	-1,77E+07	8,19E+06	
		-9,01E+06	4,20E+06	0,553	-2,20E+07	3,96E+06	

*. La diferencia entre medias es significativa a $p \leq 0,05$.

- **Dinámica del colonizador primario *Actinomyces naeslundii* en el biofilm:** igual que ocurre con *S. oralis*, la especie bacteriana *A. naeslundii* se detecta en el biofilm a las 12 horas de incubación, aunque en menor concentración que este, detectándose un pico de incremento en su concentración media en el biofilm a las 48 horas (Figura 7). Se observan diferencias estadísticamente significativas cuando se compara la concentración de dicha bacteria en el biofilm a las 48 horas con las concentraciones frente a la obtenida a las 12 y 72 horas ($p < 0,05$ en ambos casos) (Tabla 6).

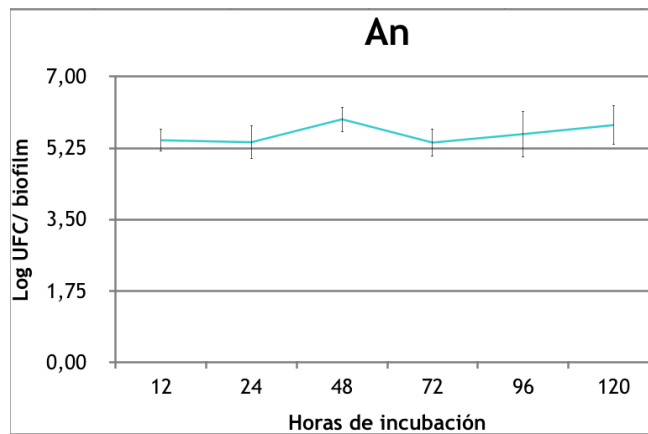


Figura 7. Representación gráfica de la cinética de incorporación de *Actinomyces naeslundii* en el biofilm formado sobre la superficie del implante de titanio comercial, expresado como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Tabla 6. Análisis estadístico de las diferencias de las medias de *Actinomyces naeslundii*, expresado como el número de unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Variable dependiente		Diferencia de las medias(I-J)	Error Estadístico	Significación estadística	95%Intervalo de confianza de las medias		
					Limite inferior	Limite superior	
An	12 h	24 h	-3,72E+04	2,56E+05	1,000	-8,28E+05	7,54E+05
		48 h	-8,22E+05	2,56E+05	0,035	-1,61E+06	-3,13E+04
		72 h	1,33E+04	2,56E+05	1,000	-7,78E+05	8,04E+05
		96 h	-3,80E+05	2,56E+05	1,000	-1,17E+06	4,11E+05
		120 h	-5,78E+05	2,56E+05	0,429	-1,37E+06	2,13E+05
		24 h	3,72E+04	2,56E+05	1,000	-7,54E+05	8,28E+05
	24 h	48 h	-7,85E+05	2,56E+05	0,053	-1,58E+06	5,92E+03
		72 h	5,05E+04	2,56E+05	1,000	-7,40E+05	8,41E+05
		96 h	-3,43E+05	2,56E+05	1,000	-1,13E+06	4,48E+05
		120 h	-5,41E+05	2,56E+05	0,599	-1,33E+06	2,50E+05
		48 h	8,22E+05	2,56E+05	0,035	3,13E+04	1,61E+06
		24 h	7,85E+05	2,56E+05	0,053	-5,92E+03	1,58E+06
	48 h	72 h	8,35E+05	2,56E+05	0,031	4,46E+04	1,63E+06
		96 h	4,42E+05	2,56E+05	1,000	-3,49E+05	1,23E+06
		120 h	2,44E+05	2,56E+05	1,000	-5,47E+05	1,04E+06
		12 h	-1,33E+04	2,56E+05	1,000	-8,04E+05	7,78E+05
		24 h	-5,05E+04	2,56E+05	1,000	-8,41E+05	7,40E+05
		48 h	-8,35E+05	2,56E+05	0,031	-1,63E+06	-4,46E+04
	72 h	96 h	-3,93E+05	2,56E+05	1,000	-1,18E+06	3,98E+05
		120 h	-5,91E+05	2,56E+05	0,379	-1,38E+06	2,00E+05
		12 h	3,80E+05	2,56E+05	1,000	-4,11E+05	1,17E+06
		24 h	3,43E+05	2,56E+05	1,000	-4,48E+05	1,13E+06
		48 h	-4,42E+05	2,56E+05	1,000	-1,23E+06	3,49E+05
		72 h	3,93E+05	2,56E+05	1,000	-3,98E+05	1,18E+06
96 h	120 h	-1,98E+05	2,56E+05	1,000	-9,89E+05	5,93E+05	
	12 h	5,78E+05	2,56E+05	0,429	-2,13E+05	1,37E+06	
	24 h	5,41E+05	2,56E+05	0,599	-2,50E+05	1,33E+06	
	48 h	-2,44E+05	2,56E+05	1,000	-1,04E+06	5,47E+05	
	72 h	5,91E+05	2,56E+05	0,379	-2,00E+05	1,38E+06	
	120 h	1,98E+05	2,56E+05	1,000	-5,93E+05	9,89E+05	

*. La diferencia entre medias es significativa a $p \leq 0,05$.

- **Dinámica del colonizador temprano *Veillonella parvula* en el biofilm:** desde las 12 horas de incubación ya se puede encontrar a esta bacteria incluida en el biofilm. El recuento de *V. parvula* sufre un aumento considerable entre las 12 y las 24 horas de formación del biofilm, manteniéndose luego más constante durante el resto de horas de incubación (Figura 8). En este caso si se aprecian diferencias significativas entre la concentración media medida a los diferentes tiempos de generación del biofilm, como se puede ver en la Tabla 7.

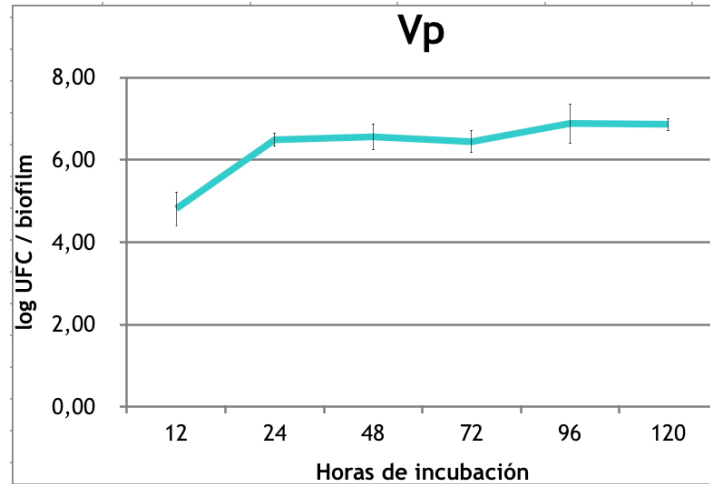


Figura 8. Representación gráfica de la cinética de incorporación de *Veillonella parvula* en el biofilm formado sobre la superficie del implante de titanio comercial, expresado como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Tabla 7. Análisis estadístico de las diferencias de las medias de *Veillonella parvula*, expresado como el número de unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Variable dependiente			Diferencia de las medias(I-J)	Error Estadístico	Significación estadística	95%Intervalo de confianza de las medias	
						Limite inferior	Limite superior
Vp	12 h	24 h	-3,18E+06	2,30E+06	1,000	-1,03E+07	3,94E+06
		48 h	-4,34E+06	2,30E+06	0,982	-1,15E+07	2,77E+06
		72 h	-3,19E+06	2,30E+06	1,000	-1,03E+07	3,93E+06
		96 h	-1,23E+07	2,30E+06	0	-1,94E+07	-5,14E+06
		120 h	7,7E+06	2,30E+06	0,025	-1,48E+07	-5,44E+05
		24 h	3,18E+06	2,30E+06	1,000	-3,94E+06	1,03E+07
	24 h	48 h	-1,16E+06	2,30E+06	1,000	-8,28E+06	5,96E+06
		72 h	-9,42E+03	2,30E+06	1,000	-7,13E+06	7,11E+06
		96 h	-9,08E+06	2,30E+06	0,003	-1,62E+07	-1,96E+06
		120 h	-4,48E+06	2,30E+06	0,864	-1,16E+07	2,64E+06
		48 h	4,34E+06	2,30E+06	0,982	-2,77E+06	1,15E+07
		72 h	1,15E+06	2,30E+06	1,000	-5,96E+06	8,27E+06
	48 h	96 h	-7,91E+06	2,30E+06	0,018	-1,50E+07	-7,99E+05
		120 h	-3,32E+06	2,30E+06	1,000	-1,04E+07	3,80E+06
		12 h	3,19E+06	2,30E+06	1,000	-3,93E+06	1,03E+07
		24 h	9,42E+03	2,30E+06	1,000	-7,11E+06	7,13E+06
		72 h	-1,15E+06	2,30E+06	1,000	-8,27E+06	5,96E+06
		96 h	-9,07E+06	2,30E+06	0,003	-1,62E+07	-1,95E+06
	72 h	120 h	-4,47E+06	2,30E+06	0,872	-1,16E+07	2,65E+06
		12 h	1,23E+07	2,30E+06	0	5,14E+06	1,94E+07
		24 h	9,08E+06	2,30E+06	0,003	1,96E+06	1,62E+07
		48 h	7,91E+06	2,30E+06	0,018	7,99E+05	1,50E+07
		96 h	9,07E+06	2,30E+06	0,003	1,95E+06	1,62E+07
		120 h	4,60E+06	2,30E+06	0,774	-2,52E+06	1,17E+07
	96 h	12 h	7,66E+06	2,30E+06	0,025	5,44E+05	1,48E+07
		24 h	4,48E+06	2,30E+06	0,864	-2,64E+06	1,16E+07
		48 h	3,32E+06	2,30E+06	1,000	-3,80E+06	1,04E+07
		72 h	4,47E+06	2,30E+06	0,872	-2,65E+06	1,16E+07
120 h		-4,60E+06	2,30E+06	0,774	-1,17E+07	2,52E+06	
96 h		-4,60E+06	2,30E+06	0,774	-1,17E+07	2,52E+06	

*. La diferencia entre medias es significativa a $p \leq 0,05$.

- **Dinámica del colonizador secundario *Fusobacterium nucleatum* en el biofilm:** los niveles de *F.nucleatum* como constituyente del biofilm sobre la superficie del implante de titanio comercial permanecen muy estables a lo largo del tiempo de estudio (Figura 9), no encontrándose significación estadística entre ninguno de los tiempos estudiados (Tabla 8).

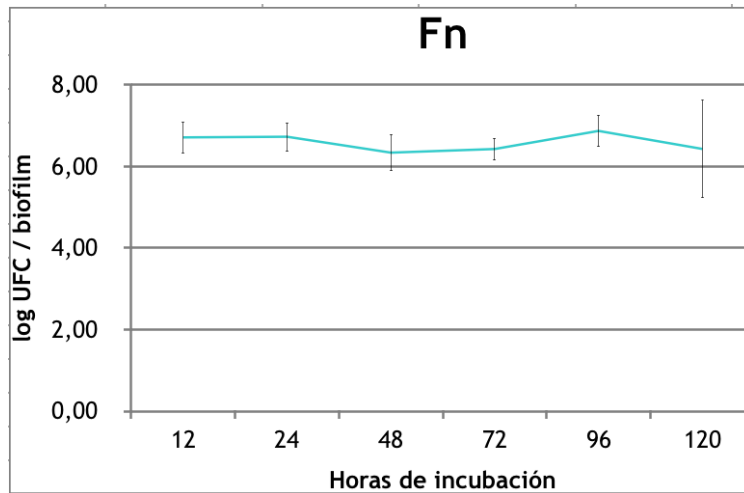


Figura 9. Representación gráfica de la cinética de incorporación de *Fusobacterium nucleatum* en el biofilm formado sobre la superficie del implante de titanio comercial, expresado como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Tabla 8. Análisis estadístico de las diferencias de las medias de *Fusobacterium nucleatum*, expresado como el número de unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Variable dependiente			Diferencia de las medias(I-J)	Error Estadístico	Significación estadística	95%Intervalo de confianza de las medias	
						Limite inferior	Limite superior
Fn	12 h	24 h	-2,16E+05	2,99E+06	1,000	-9,44E+06	9,01E+06
		48 h	3,81E+06	2,99E+06	1,000	-5,41E+06	1,30E+07
		72 h	3,62E+06	2,99E+06	1,000	-5,61E+06	1,28E+07
		96 h	-3,49E+06	2,99E+06	1,000	-1,27E+07	5,73E+06
		120 h	-2,47E+06	2,99E+06	1,000	-1,17E+07	6,75E+06
		24 h	2,16E+05	2,99E+06	1,000	-9,01E+06	9,44E+06
	24 h	48 h	4,03E+06	2,99E+06	1,000	-5,19E+06	1,33E+07
		72 h	3,83E+06	2,99E+06	1,000	-5,39E+06	1,31E+07
		96 h	-3,28E+06	2,99E+06	1,000	-1,25E+07	5,95E+06
		120 h	-2,26E+06	2,99E+06	1,000	-1,15E+07	6,97E+06
		48 h	-3,81E+06	2,99E+06	1,000	-1,30E+07	5,41E+06
		24 h	-4,03E+06	2,99E+06	1,000	-1,33E+07	5,19E+06
	48 h	72 h	-1,96E+05	2,99E+06	1,000	-9,42E+06	9,03E+06
		96 h	-7,30E+06	2,99E+06	0,271	-1,65E+07	1,92E+06
		120 h	-6,28E+06	2,99E+06	0,607	-1,55E+07	2,94E+06
		72 h	-3,62E+06	2,99E+06	1,000	-1,28E+07	5,61E+06
		24 h	-3,83E+06	2,99E+06	1,000	-1,31E+07	5,39E+06
		48 h	1,96E+05	2,99E+06	1,000	-9,03E+06	9,42E+06
	72 h	96 h	-7,11E+06	2,99E+06	0,319	-1,63E+07	2,11E+06
		120 h	-6,09E+06	2,99E+06	0,703	-1,53E+07	3,13E+06
		96 h	3,49E+06	2,99E+06	1,000	-5,73E+06	1,27E+07
		24 h	3,28E+06	2,99E+06	1,000	-5,95E+06	1,25E+07
		48 h	7,30E+06	2,99E+06	0,271	-1,92E+06	1,65E+07
		72 h	7,11E+06	2,99E+06	0,319	-2,11E+06	1,63E+07
96 h	120 h	1,02E+06	2,99E+06	1,000	-8,20E+06	1,02E+07	
	12 h	2,47E+06	2,99E+06	1,000	-6,75E+06	1,17E+07	
	24 h	2,26E+06	2,99E+06	1,000	-6,97E+06	1,15E+07	
	48 h	6,28E+06	2,99E+06	0,607	-2,94E+06	1,55E+07	
	72 h	6,09E+06	2,99E+06	0,703	-3,13E+06	1,53E+07	
	120 h	-1,02E+06	2,99E+06	1,000	-1,02E+07	8,20E+06	

*. La diferencia entre medias es significativa a p ≤ 0,05.

- *Dinámica del colonizador tardío *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el biofilm:* no

hay grandes fluctuaciones en el recuento de *A. actinomycetemcomitans* a lo largo del tiempo de estudio del biofilm (Figura 10), siendo estadísticamente significativo solamente la concentraciones obtenidas entre las 48h y las 72h ($p < 0,05$) (Tabla 9). Al igual que para las bacterias anteriormente detalladas, a las 12 horas ya podemos detectar su presencia en el biofilm.

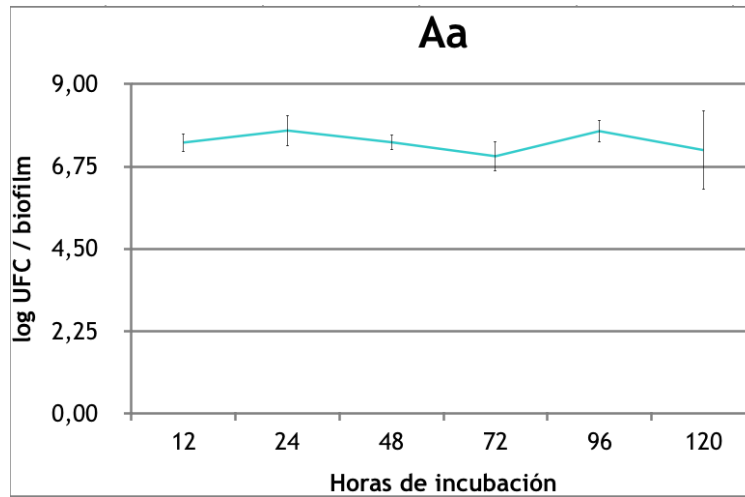


Figura 10. Representación gráfica de la cinética de incorporación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el biofilm formado sobre la superficie del implante de titanio comercial, expresado como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Tabla 9. Análisis estadístico de las diferencias de las medias de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, expresado como el número de unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Variable dependiente			Diferencia de las medias(I-J)	Error Estadístico	Significación estadística	95%Intervalo de confianza de las medias		
						Limite inferior	Limite superior	
Aa	12 h	24 h	-5,18E+07	1,83E+07	0,102	-1,09E+08	4,84E+06	
		48 h	5,19E+05	1,83E+07	1,000	-5,62E+07	5,72E+07	
		72 h	1,38E+07	1,83E+07	1,000	-4,29E+07	7,05E+07	
		96 h	-3,21E+07	1,83E+07	1,000	-8,88E+07	2,46E+07	
		120 h	-2,23E+07	1,83E+07	1,000	-7,90E+07	3,44E+07	
		24 h	5,18E+07	1,83E+07	0,102	-4,84E+06	1,09E+08	
	24 h	48 h	5,24E+07	1,83E+07	0,095	-4,32E+06	1,09E+08	
		72 h	6,56E+07	1,83E+07	0,012	8,98E+06	1,22E+08	
		96 h	1,98E+07	1,83E+07	1,000	-3,69E+07	7,64E+07	
		120 h	2,96E+07	1,83E+07	1,000	-2,71E+07	8,63E+07	
		48 h	12 h	-5,19E+05	1,83E+07	1,000	-5,72E+07	5,62E+07
		24 h	-5,24E+07	1,83E+07	0,095	-1,09E+08	4,32E+06	
	48 h	72 h	1,33E+07	1,83E+07	1,000	-4,34E+07	7,00E+07	
		96 h	-3,26E+07	1,83E+07	1,000	-8,93E+07	2,41E+07	
		120 h	-2,28E+07	1,83E+07	1,000	-7,95E+07	3,39E+07	
		72 h	12 h	-1,38E+07	1,83E+07	1,000	-7,05E+07	4,29E+07
		24 h	-6,56E+07	1,83E+07	0,012	-1,22E+08	8,98E+06	
		48 h	-1,33E+07	1,83E+07	1,000	-7,00E+07	4,34E+07	
	72 h	96 h	-4,59E+07	1,83E+07	0,237	-1,03E+08	1,08E+07	
		120 h	-3,61E+07	1,83E+07	0,825	-9,28E+07	2,06E+07	
		96 h	12 h	3,21E+07	1,83E+07	1,000	-2,46E+07	8,88E+07
		24 h	-1,98E+07	1,83E+07	1,000	-7,64E+07	3,69E+07	
		48 h	3,26E+07	1,83E+07	1,000	-2,41E+07	8,93E+07	
		72 h	4,59E+07	1,83E+07	0,237	-1,08E+07	1,03E+08	
96 h	120 h	9,83E+06	1,83E+07	1,000	-4,69E+07	6,65E+07		
	120 h	12 h	2,23E+07	1,83E+07	1,000	-3,44E+07	7,90E+07	
	24 h	-2,96E+07	1,83E+07	1,000	-8,63E+07	2,71E+07		
	48 h	2,28E+07	1,83E+07	1,000	-3,39E+07	7,95E+07		
	72 h	3,61E+07	1,83E+07	0,825	-2,06E+07	9,28E+07		
	96 h	-9,83E+06	1,83E+07	1,000	-6,65E+07	4,69E+07		

*. La diferencia entre medias es significativa a $p \leq 0,05$.

- **Dinámica del colonizador tardío *Porphyromonas gingivalis* en el biofilm:** desde las 12h hasta la 72h su presencia es relativamente estable (Figura 11), aumentando significativamente a las 96 h ($p < 0,01$) con respecto a todos tiempos estudiados (Tabla 10).

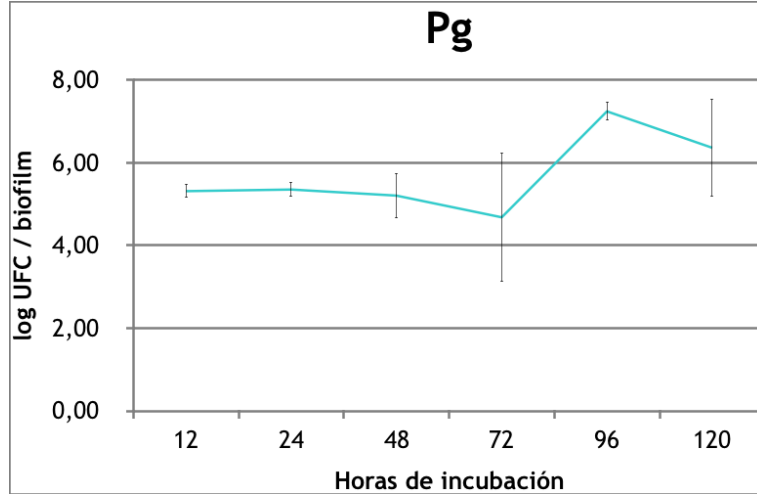


Figura 11. Representación gráfica de la cinética de incorporación de *Porphyromonas gingivalis* en el biofilm formado sobre la superficie del implante de titanio comercial, expresado como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Tabla 10. Análisis estadístico de las diferencias de las medias de *Porphyromonas gingivalis*, expresado como el número de unidades formadoras de colonias por biofilm, entre las 12 y 120h de incubación.

Variable dependiente		Diferencia de las medias(I-J)	Error Estadístico	Significación estadística	95%Intervalo de confianza de las medias		
					Limite inferior	Limite superior	
Pg	12 h	24 h	-2,18E+04	2,41E+06	1,000	-7,46E+06	7,41E+06
		48 h	-7,81E+04	2,41E+06	1,000	-7,51E+06	7,36E+06
		72 h	-1,14E+06	2,41E+06	1,000	-8,57E+06	6,30E+06
		96 h	-1,95E+07	2,41E+06	0	-2,70E+07	-1,21E+07
		120 h	-6,37E+06	2,41E+06	0,165	-1,38E+07	1,07E+06
		24 h	2,18E+04	2,41E+06	1,000	-7,41E+06	7,46E+06
	24 h	48 h	-5,63E+04	2,41E+06	1,000	-7,49E+06	7,38E+06
		72 h	-1,11E+06	2,41E+06	1,000	-8,55E+06	6,32E+06
		96 h	-1,95E+07	2,41E+06	0	-2,70E+07	-1,21E+07
		120 h	-6,35E+06	2,41E+06	0,168	-1,38E+07	1,09E+06
		12 h	7,81E+04	2,41E+06	1,000	-7,36E+06	7,51E+06
		24 h	5,63E+04	2,41E+06	1,000	-7,38E+06	7,49E+06
	48 h	72 h	-1,06E+06	2,41E+06	1,000	-8,49E+06	6,38E+06
		96 h	-1,94E+07	2,41E+06	0	-2,69E+07	-1,20E+07
		120 h	-6,29E+06	2,41E+06	0,179	-1,37E+07	1,15E+06
		12 h	1,14E+06	2,41E+06	1,000	-6,30E+06	8,57E+06
		24 h	1,11E+06	2,41E+06	1,000	-6,32E+06	8,55E+06
		48 h	1,06E+06	2,41E+06	1,000	-6,38E+06	8,49E+06
	72 h	96 h	-1,84E+07	2,41E+06	0	-2,58E+07	-1,10E+07
		120 h	-5,23E+06	2,41E+06	0,52	-1,27E+07	2,20E+06
		12 h	1,95E+07	2,41E+06	0	1,21E+07	2,70E+07
		24 h	1,95E+07	2,41E+06	0	1,21E+07	2,70E+07
		48 h	1,94E+07	2,41E+06	0	1,20E+07	2,69E+07
		72 h	1,84E+07	2,41E+06	0	1,10E+07	2,58E+07
96 h	120 h	1,31E+07	2,41E+06	0	5,74E+06	2,06E+07	
	12 h	6,37E+06	2,41E+06	0,165	-1,07E+06	1,38E+07	
	24 h	6,35E+06	2,41E+06	0,168	-1,09E+06	1,38E+07	
	48 h	6,29E+06	2,41E+06	0,179	-1,15E+06	1,37E+07	
	72 h	5,23E+06	2,41E+06	0,52	-2,20E+06	1,27E+07	
	120 h	-1,31E+07	2,41E+06	0	-2,06E+07	-5,74E+06	

*. La diferencia entre medias es significativa a $p \leq 0,05$.

7. Discusión

El fracaso de los implantes y las enfermedades periimplantarias son problemas a los que debe enfrentarse el dentista a diario, y es que una proporción significativa de los implantes médicos, incluyendo los implantes dentales, se convierte en un foco de infección. Estas infecciones resultan difíciles de erradicar debido a la organización de las bacterias causantes en biofilms bien desarrollados (Costerton y Montanaro, 2005). Investigaciones recientes estiman que, de las infecciones microbianas que afectan al cuerpo humano, entre el 66-80% están causadas por bacterias organizadas en biofilms (Lewis et al. 2001). Es evidente que la formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos; en el interior de estas comunidades las bacterias son más resistentes a los antibióticos y al sistema inmune, lo cual explica el carácter crónico y la dificultad del tratamiento de estas infecciones (Lasa et al. 2005, Marsh et al. 2011). Mientras que las infecciones agudas suelen ser eliminadas tras un corto tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, y producen episodios recurrentes (Lasa et al. 2005). Utilizando diferentes mecanismos, las bacterias pueden ser hasta mil veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en estado planctónico.

En este estudio se ha puesto a punto un modelo experimental *in vitro* de biofilm periimplantario con la novedad de utilizar implantes comercializados, en este caso de titanio con superficie de rugosidad mínima. Se ha realizado a diferentes tiempos el análisis estructural y cuantitativo de la formación y desarrollo *in vitro* del biofilm oral, que como ya describimos, es representativo del encontrado en la zona periimplantaria. Los resultados obtenidos han corroborado la idoneidad del modelo experimental puesto a punto como una herramienta útil para el estudio de interacción de las bacterias orales y los implantes dentales, capaces estas de organizarse en biofilm sobre la superficie de los mismos, lo que nos permitirá su futura aplicabilidad en la evaluación de diferentes aspectos que atañen a la terapia de infecciones implantarias, quizá difíciles de llevar a cabo utilizando modelos *in vivo*.

Son pocos los modelos *in vitro* de biofilm descritos en la literatura científica, y es que su desarrollo no está exento de dificultades. Stoodley et al. (2004) atribuyen gran parte del retraso en el estudio de los biofilms a la dificultad de trabajar con estas poblaciones heterogéneas en comparación con los estudios que se venía realizando de poblaciones planctónicas homogéneas. En un artículo de 2004, en *Nature Reviews*, Stoodley y colaboradores describen muchas de las razones por las que los biofilms son extremadamente difíciles de estudiar *in vitro*, tales como la difusión de líquido a través de un biofilm o las condiciones de crecimiento. Según Stoodley y colaboradores, la necesidad de dominar estas técnicas de laboratorio ha disuadido a muchos científicos de trabajar con biofilms *in vitro*.

Uno de los puntos críticos descritos al trabajar con biofilms es obtener un crecimiento reproducible de los microorganismos implicados, siendo el aporte de nutrientes un factor clave que afectará a la coagregación intra- e inter-especies (unión de dos microorganismos en suspensión que se produce por medio de interacciones específicas entre componentes de las superficies respectivas de las células) (Guggenheim et al. 2001). Para favorecer el crecimiento óptimo de las seis especies bacterianas seleccionadas y facilitar su convivencia en el biofilm, hemos utilizado un medio de cultivo con un alto contenido en proteínas, principalmente mucina, reproduciendo la fuente de carbono y energía disponibles para las bacterias en la cavidad oral (Marsh et al. 2011). Además, se ha incluido ácido glutámico, uno de los aminoácidos no esenciales más abundantes en la naturaleza, que favorecerá el crecimiento de *F. nucleatum*, algo que ha resultado complicado de conseguir para otros autores en sus modelos de biopelículas *in vitro* (Schmidlin. et al. 2013), y los factores de crecimiento hemina y menadiona. La hemina, producto de la descomposición de la hemoglobina, y la vitamina K3 o menadiona, considerada como una de las provitaminas fundamentales, son factores relevantes para el crecimiento de la bacteria *P. gingivalis*, tanto *in vivo* como *in vitro* (Holt et al. 1994, Koneman et al. 1999, Bartelt et al. 2000).

Por ende, el modelo descrito nos va a permitir controlar las condiciones de anaerobiosis, de temperatura y de pH, que serán siempre las mismas inter- e intra- experimentos.

En tercer lugar, el modelo experimental desarrollado nos permite determinar la composición bacteriana que lo constituye, a diferencia de trabajar con placa dental de pacientes como inóculo o con férulas parciales, donde si bien la composición bacteriana será más diversa, la variabilidad de la misma presumiblemente será muy alta entre experimentos llevados a cabo en diferentes días. Las especies seleccionadas para este modelo experimental están en concordancia con la microbiota existente en implantes *in vivo*, tanto con microorganismos asociados con implantes sanos, como con implantes fracasados (Mombelli et al. 1987, Furst et al. 2007). Entre las cepas bacterianas utilizadas aparecen *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, identificadas como las especies con una asociación fuerte con la periodontitis y la periimplantitis (de Oliveira et al. 2012); estas bacterias, comúnmente asociadas con las enfermedades periodontales, poseen factores de virulencia que podrían ser relevantes en el estudio de la progresión de la periimplantitis y su tratamiento (Listgarten et al. 1999, Quirynen et al. 2002).

El modelo experimental desarrollado es pionero en utilizar implantes comercializados y no discos u otros dispositivos que simulan el implante. Algunos grupos de investigación han utilizado *in vitro* implantes comerciales pero con finalidades diferentes; así por ejemplo, Schmidt y colaboradores evalúan cómo se vería afectada la colonización de la superficie del implante tras aplicar a la misma diferentes mecanismos de limpieza (Schmidt et al. 2016).

La estructura del biofilm y la distribución espacial de las bacterias en el mismo sobre la superficie del implante se ha evaluado utilizando CLSM en conjunción con la tinción de fluorescencia. Se trata de una técnica de microscopía no invasiva y no destructiva, que se utiliza con frecuencia en los trabajos de investigación que abordan el estudio de la estructura del biofilm oral, estando descrito en diferentes modelos tales como aquellos desarrollados en férulas parciales portadas por voluntarios sanos, en modelos *in vitro* utilizando como inóculo placa dispersada de pacientes, o en modelos experimentales en fermentadores de flujo continuo (Netuschil et al. 1998, Pratten et al. 2000, Auschill et al. 2001, Diaz et al. 2006, Hope et al. 2006, Dige et al. 2009). Por esta técnica descrita de microscopía confocal hemos podido comprobar como, a diferencia de los

resultados obtenidos por otros investigadores que utilizan discos u otros dispositivos para simular la superficie, no toda la superficie del implante se encuentra cubierta por bacterias, sino que éstas forman agregados multicelulares dispersos de forma discontinua por la superficie, muy similar a lo que se ha podido observar en implantes *in vivo* fracasados. La gran mayoría de estudios que utilizan otros dispositivos para estudiar el comportamiento de las bacterias en relación a los implantes refieren como la totalidad de los mismos están recubiertos por el biofilm (Al-Ahmad et al. 2010, Sanchez et al. 2014, John et al. 2016). Esto demuestra la importancia de trabajar con la estructura real, es decir con la macroestructura, y no solo con la microestructura, para simular lo que ocurre en la cavidad oral y por tanto reafirma la validez del modelo experimental.

Mediante qPCR, los resultados corroboran la formación de biofilms bacterianos en la superficie del implantes, pudiendo observar la presencia bacteriana ya a las 12 horas de incubación, lo que coincide con las afirmaciones, entre otros, de Guggenheim y colaboradores en su estudio de un modelo *in vitro* de placa supregingival (Guggenheim et al. 2001). Periasamy y Kolenbrander detallaron que *P. gingivalis* no era capaz de crecer junto a *S. oralis*, favoreciendo el crecimiento cuando era inoculado con otras bacterias como *Veillonella* spp., *F. nucleatum* o *A. actinomycetemcomitans* (Periasamy et al. 2009). En el modelo experimental propuesto hemos sido capaces de demostrar que estas seis bacterias son capaces de , conjuntamente, desarrollar un biofilm definido y estructurado.

Entre las bacterias utilizadas para desarrollar el biofilm, no se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas en la concentración de la bacteria *S. oralis* durante las 120 horas de estudio, datos que coinciden con lo descrito en estudios anteriores que utilizan como superficie de desarrollo materiales de implante (Sanchez et al. 2014). Igualmente, la bacteria *F. nucleatum*, de difícil crecimiento y mantenimiento en el tiempo en otros modelos *in vitro* descritos en la literatura (Schmidlin et al. 2013), ha estado presente de manera muy estable en el biofilm desde las 12 hasta las 120 h, demostrando la idoneidad del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento del

modelo experimental desarrollado frente a otros que no detectan esta bacteria a partir de 16,5 h de su inclusión en un modelo de biofilm oral (Schmidlin et al. 2013).

La especie bacteriana *A. naeslundii* alcanzó su máxima concentración a las 24 h; esto no coincide plenamente con los datos de estudios anteriores, donde sobre superficies de titanio rugoso encuentran mayor proporción a las 48 h (Sanchez et al. 2014). Esto podría indicar una mayor facilidad de incorporación de esta especie a este tipo de estructura. Por otro lado, en nuestro estudio no hay cambios significativos entre las 72h y 120h, contrariamente a otros estudios que utilizan implantes de titanio *in vivo* (Al-Ahmad et al. 2010).

Llama la atención como las especies bacterianas *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* se encontraron en el biofilm a las 12 h a una proporción relativamente elevada, lo que podría indicarnos una mayor predisposición de dichas bacterias por los materiales con la rugosidad y composición que presentan los materiales usados o un mejor y más rápido establecimiento del biofilm primario frente a los discos de hidroxiapatita, zirconio o titanio utilizados en estudios anteriores, en los que, a las 12h, estas bacterias presentan una concentración en el biofilm menor (Sanchez et al. 2014).

Al comparar los diferentes tiempos de desarrollo estipulados (de 12 a 120 horas), se ha podido observar que, después de una disminución generalizada del número de UFC/mL a las 72 horas de evolución del biofilm, el número de bacterias vuelve a aumentar de nuevo a las 96 horas; esto podría explicarse como consecuencia de la constante evolución y renovación de los biofilms. Diferentes estudios (Donlan et al. 2002, Tabenski et al. 2014) han demostrado que, en la última fase de formación de un biofilm bacteriano, una parte de éste se disgrega para colonizar nuevas áreas mientras que las condiciones de humedad y nutrición sean adecuadas (Figura 12), lo que habría ocurrido en nuestro modelo experimental a las 72 horas, al alcanzar la madurez, para continuar evolucionando, una vez ya alcanzada la madurez, a lo largo de los siguientes tiempos de incubación.

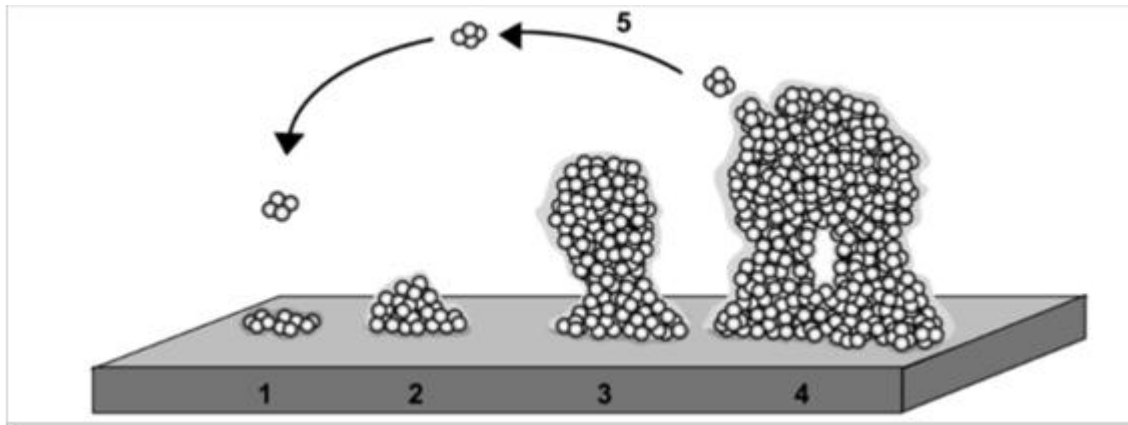


Figura 12. Fases de la formación de un biofilm: 1) Adhesión reversible; 2) Adhesión irreversible; 3) Acumulación en colonias con matriz polimérica; 4) Formación del biofilm maduro; 5) Dispersión de bacterias bien plactónicas o como pequeños fragmentos de biofilm para colonizar nuevas superficies.

El trabajo de investigación desarrollado por tanto nos ha permitido cumplir el objetivo que nos planteamos de evaluar la idoneidad de un modelo experimental de biofilm oral *in vitro* desarrollado sobre implantes comerciales para investigar los elementos más relevantes que pueden ser de interés en relación a la periimplantitis, implicando tanto las propiedades macro- como micro-estructurales de las superficies de los implantes como ejemplo de variable de estudio.

8. Conclusiones

1. Este estudio demuestra que el modelo de biofilm *in vitro* propuesto es válido para el desarrollo de biofilms periimplantarios, y permite el recuento bacteriano y el estudio de la estructura tridimensional de los biofilms orales, desarrollados con seis especies bacterianas que incluyen colonizadores iniciales (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*), en un modelo estático.
2. El uso combinado de microscopía CLSM y la técnica de qPCR demostraron su utilidad para el estudio de la distribución espacial del biofilm generado sobre cada uno de los implantes utilizados.
3. Los resultados obtenidos por microscopía CLSM demuestran una distribución discontinua de las bacterias por la superficie del implante en forma de agregados multicelulares, sin cubrir el total de la superficie del mismo. Durante la evolución del biofilm desde 12 a 120 horas, predominan las bacterias vivas frente a las muertas.
4. Los resultados obtenidos por qPCR revelan que todas las especies bacterianas utilizadas están presentes en el biofilm formado sobre la superficie del implante ya a las 12 h de incubación, fluctuando su concentración en mayor o menor medida hasta las 120 horas. Se establece el tiempo de incubación óptimo para el estudio en 96 horas, como base para estudios posteriores que se centrarán en la comparación de diferentes superficies de implantes comerciales.

9. Agradecimientos

En primer lugar, gracias a mi tutor, Doctor David Herrera, por darme esta oportunidad. Además quiero dar un especial agradecimiento a la Doctora María del Carmen Sánchez por su infinita disponibilidad, paciencia, atención, profesionalismo constante y sin reserva. Una ineludible contribución a mi crecimiento profesional y humano, el cual ha sido fundamental para conseguir esta meta profesional. A Patricia Berbejo por su ayuda y disponibilidad en el laboratorio. Y Para finalizar quiero agradecer al apoyo incondicional de toda mi familia, de mi novia Simona y dedicar este logro a mi primo Giancarlo.

10. Bibliografía

- Al-Ahmad, A., M. Wiedmann-Al-Ahmad, J. Faust, M. Bachle, M. Follo, M. Wolkewitz, C. Hannig, E. Hellwig, C. Carvalho and R. Kohal (2010). "Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 95(1): 101-109.
- Albrektsson, T & Isidor, F (1994). Consensus report of session IV. "In Proceedings of the First European Workshop on Periodontology", eds. Lang, N.P & Karring, T., pp. 365–369. London: Quintessence.
- Al-Radha, A. S., D. Dymock, C. Younes and D. O'Sullivan (2012). "Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion." *J Dent* 40(2): 146-153.
- Auschill, T. M., N. B. Arweiler, L. Netuschil, M. Brex, E. Reich and A. Sculean (2001). "Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms." *Arch Oral Biol* 46(5): 471-476.
- Apse, P., R. P. Ellen, C. M. Overall and G. A. Zarb (1989). "Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients." *J Periodontal Res* 24(2): 96-105.
- Bartelt, M.(2000). *Diagnostic bacteriology*. Davis Company. Philadelphia, USA.
- Berglundh, T., J. Lindhe, C. Marinello, I. Ericsson and B. Liljenberg (1992). "Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog." *Clin Oral Implants Res* 3(1): 1-8.
- Black GV (1898). Dr. Blacks conclusions reviewed again. *Dent Cosmos*, 40: 440.
- Brex, M., J. Theilade and R. Attstrom (1981). "Ultrastructural estimation of the effect of sucrose and glucose rises on early dental plaque formed on plastic films." *Scand J Dent Res* 89(2): 157-164.
- Brown, M. R. and P. Williams (1985). "The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections." *Annu Rev Microbiol* 39: 527-556.
- Costerton, J. W., L. Montanaro and C. R. Arciola (2005). "Biofilm in implant infections: its production and regulation." *Int J Artif Organs* 28(11): 1062-1068.

- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber and H. M. Lappin-Scott (1995). "Microbial biofilms." *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745.
- de Avila, E. D., M. J. Avila-Campos, C. E. Vergani, D. M. Spolidorio and A. Mollo Fde, Jr. (2016). "Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces." *J Prosthet Dent* 115(4): 428-436.
- de Oliveira, G. R., L. Pozzer, L. Cavalieri-Pereira, P. H. de Moraes, S. Olate and J. R. de Albergaria Barbosa (2012). "Bacterial adhesion and colonization differences between zirconia and titanium implant abutments: an in vivo human study." *J Periodontal Implant Sci* 42(6): 217-223.
- Diaz, P. I., N. I. Chalmers, A. H. Rickard, C. Kong, C. L. Milburn, R. J. Palmer, Jr. and P. E. Kolenbrander (2006). "Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel." *Appl Environ Microbiol* 72(4): 2837-2848.
- Dige, I., M. K. Raarup, J. R. Nyengaard, M. Kilian and B. Nyvad (2009). "Actinomyces naeslundii in initial dental biofilm formation." *Microbiology* 155(Pt 7): 2116-2126.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms." *Clinical Microbiology Reviews* 15(2): 167-193.
- Elter, C., W. Heuer, A. Demling, M. Hannig, T. Heidenblut, F. W. Bach and M. Stiesch-Scholz (2008). "Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics." *Int J Oral Maxillofac Implants* 23(2): 327-334.
- Friskopp, J. and L. Hammarstrom (1980). "A comparative, scanning electron microscopic study of supragingival and subgingival calculus." *J Periodontol* 51(10): 553-562.
- Furst, M. M., G. E. Salvi, N. P. Lang and G. R. Persson (2007). "Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants." *Clin Oral Implants Res* 18(4): 501-508.
- Guggenheim, B., E. Giertsen, P. Schupbach and S. Shapiro (2001). "Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque." *J Dent Res* 80(1): 363-370.

- Guggenheim, M., S. Shapiro, R. Gmur and B. Guggenheim (2001). "Spatial arrangements and associative behavior of species in an in vitro oral biofilm model." *Appl Environ Microbiol* 67(3): 1343-1350.
- Hahnel, S., D. S. Wastl, S. Schneider-Feyrer, F. J. Giessibl, E. Brambilla, G. Cazzaniga and A. Ionescu (2014). "Streptococcus mutans biofilm formation and release of fluoride from experimental resin-based composites depending on surface treatment and S-PRG filler particle fraction." *J Adhes Dent* 16(4): 313-321.
- Hahnel, S., A. Wieser, R. Lang and M. Rosentritt (2015). "Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials." *Clin Oral Implants Res* 26(11): 1297-1301.
- Holt, J., N. Krieg, P. Sneath, J. Staley (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9^a Ed. Williams&Wilkins. Baltimore, USA.
- Hope, C. K. and M. Wilson (2006). "Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque." *J Microbiol Methods* 66(3): 390-398.
- John, G., J. Becker and F. Schwarz (2016). "Effects of different titanium zirconium implant surfaces on initial supragingival plaque formation." *Clin Oral Implants Res*: 1-7.
- Koka, S., M. E. Razzoog, T. J. Bloem and S. Syed (1993). "Microbial colonization of dental implants in partially edentulous subjects." *J Prosthet Dent* 70(2): 141-144.
- Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, D. S. Blehert, P. G. Egland, J. S. Foster and R. J. Palmer (2002). "Communication among Oral Bacteria." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3): 486-505.
- Kolenbrander, P. E. and J. London (1993). "Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence." *J Bacteriol* 175(11): 3247-3252.
- Kolenbrander, P. E., R. J. Palmer, Jr., A. H. Rickard, N. S. Jakubovics, N. I. Chalmers and P. I. Diaz (2006). "Bacterial interactions and successions during plaque development." *Periodontol* 2000 42: 47-79.

- Koneman, E., S. Allen, W. Janda, P. Schreckenberger, W. Winn (1999). *Diagnóstico Microbiológico*. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Kuramitsu, H. K., W. Chen and A. Ikegami (2005). "Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*." *J Periodontol* 76(11 Suppl): 2047-2051.
- Lang, N. P., T. Berglundh and P. Working Group 4 of Seventh European Workshop on (2011). "Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology." *J Clin Periodontol* 38 Suppl 11: 178-181.
- Lasa, I., J. L. d. Pozo, J. R. Penadés and J. Leiva (2005). "Biofilms bacterianos e infección." *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28(2).
- Lee, A. and H. L. Wang (2010). "Biofilm related to dental implants." *Implant Dent* 19(5): 387-393.
- Lekholm, U., I. Ericsson, R. Adell and J. Slots (1986). "The condition of the soft tissues at tooth and fixture abutments supporting fixed bridges. A microbiological and histological study." *J Clin Periodontol* 13(6): 558-562.
- Leonhardt, A., B. Adolfsson, U. Lekholm, M. Wikstrom and G. Dahlen (1993). "A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients." *Clin Oral Implants Res* 4(3): 113-120.
- Levignac, J. (1965). "[Periimplantation osteolysis- periimplantosis - periimplantitis]." *Rev Fr Odontostomatol* 12(8): 1251-1260.
- Lindquist, L. W., G. E. Carlsson and T. Jemt (1996). "A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss." *Clin Oral Implants Res* 7(4): 329-336.
- Listgarten, M. A. and C. H. Lai (1999). "Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth." *J Periodontol* 70(4): 431-437.
- Marsh, P. D., A. Moter, D. A. Devine (2011). "Dental plaque biofilms: communities conflict and control." *Periodontol* 2000 55(1):16-35.

- Mabboux, F., L. Ponsonnet, J. J. Morrier, N. Jaffrezic and O. Barsotti (2004). "Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials an in vitro study." *Colloids Surf B Biointerfaces* 39(4): 199-205.
- Mombelli, A. and F. Decaillet (2011). "The characteristics of biofilms in peri-implant disease." *J Clin Periodontol* 38 Suppl 11: 203-213.
- Mombelli, A. and N. P. Lang (1992). "Antimicrobial treatment of peri-implant infections." *Clin Oral Implants Res* 3(4): 162-168.
- Mombelli, A., M. A. van Oosten, E. Schurch, Jr. and N. P. Land (1987). "The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants." *Oral Microbiol Immunol* 2(4): 145-151.
- Netuschil, L., E. Reich, G. Unteregger, A. Sculean and M. Brex (1998). "A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography." *Arch Oral Biol* 43(4): 277-285.
- Nyvad, B. and M. Kilian (1987). "Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo." *Scand J Dent Res* 95(5): 369-380.
- Periasamy, S. and P. E. Kolenbrander (2009). "Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel." *J Bacteriol* 191(22): 6804-6811.
- Pontoriero, R., M. P. Tonelli, G. Carnevale, A. Mombelli, S. R. Nyman and N. P. Lang (1994). "Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans." *Clin Oral Implants Res* 5(4): 254-259.
- Pratten, J., C. S. Andrews, D. Q. Craig and M. Wilson (2000). "Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions." *FEMS Microbiol Lett* 189(2): 215-218.
- Puckett, S. D., E. Taylor, T. Raimondo and T. J. Webster (2010). "The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment." *Biomaterials* 31(4): 706-713.

- Quirynen, M., C. M. Bollen, H. Eyssen and D. van Steenberghe (1994). "Microbial penetration along the implant components of the Branemark system. An in vitro study." *Clin Oral Implants Res* 5(4): 239-244.
- Quirynen, M. and M. A. Listgarten (1990). "Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark." *Clin Oral Implants Res* 1(1): 8-12.
- Quirynen, M., M. De Soete and D. van Steenberghe (2002). "Infectious risks for oral implants: a review of the literature." *Clin Oral Implants Res* 13(1): 1-19.
- Quirynen, M., R. Vogels, W. Peeters, D. van Steenberghe, I. Naert and A. Haffajee (2006). "Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets." *Clin Oral Implants Res* 17(1): 25-37.
- Rosan, B. and R. J. Lamont (2000). "Dental plaque formation." *Microbes Infect* 2(13): 1599-1607.
- Sanchez, M. C., A. Llama-Palacios, E. Fernandez, E. Figuero, M. J. Marin, R. Leon, V. Blanc, D. Herrera and M. Sanz (2014). "An in vitro biofilm model associated to dental implants: structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces." *Dent Mater* 30(10): 1161-1171.
- Scarano, A., M. Piattelli, S. Caputi, G. A. Favero and A. Piattelli (2004). "Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study." *J Periodontol* 75(2): 292-296.
- Schmidlin, P. R., P. MÜLLer, T. Attin, M. Wieland, D. Hofer and B. Guggenheim (2013). "Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics." *Journal of Applied Oral Science* 21(1): 48-55.
- Schmidt, K. E., T. M. Auschill, C. Heumann, R. Frankenberger, S. Eick, A. Sculean and N. B. Arweiler (2016). "Influence of different instrumentation modalities on the surface characteristics and biofilm formation on dental implant neck, in vitro." *Clin Oral Implants Res*: 1-8.
- Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2005). "Periodontal microbial ecology." *Periodontol* 2000 38: 135-187.

- Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith and R. L. Kent, Jr. (1998). "Microbial complexes in subgingival plaque." *J Clin Periodontol* 25(2): 134-144.
- Stoodley, L., J. W. Costerton, P. Stoodley (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nat Rev Microbiol* 2:95-108.
- Tabenski, L., T. Maisch, F. Santarelli, K. A. Hiller and G. Schmalz (2014). "Individual growth detection of bacterial species in an in vitro oral polymicrobial biofilm model." *Arch Microbiol* 196(11): 819-828.
- Takeuchi, H., Y. Yamanaka and K. Yamamoto (2004). "Morphological analysis of subgingival biofilm formation on synthetic carbonate apatite inserted into human periodontal pockets." *Aust Dent J* 49(2): 72-77.
- Teughels, W., N. Van Assche, I. Sliepen and M. Quirynen (2006). "Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development." *Clin Oral Implants Res* 17 Suppl 2: 68-81.
- Violant, D., M. Galofre, J. Nart and R. P. Teles (2014). "In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm on different implant surfaces." *Biomed Mater* 9(3): 035007.
- Wecke, J., T. Kersten, K. Madela, A. Moter, U. B. Gobel, A. Friedmann and J. Bernimoulin (2000). "A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets." *FEMS Microbiol Lett* 191(1): 95-101.
- Whitehead, K. A., J. Colligon and J. Verran (2005). "Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions." *Colloids Surf B Biointerfaces* 41(2-3): 129-138.
- Xing, R., I. L. Witso, D. Jugowiec, H. Tiainen, M. Shabestari, S. P. Lyngstadaas, J. Lonn-Stensrud and H. J. Haugen (2015). "Antibacterial effect of doxycycline-coated dental abutment surfaces." *Biomed Mater* 10(5): 055003.
- Zamora A, de la Rosa C, Mosso MA, Guijarro JF, Rodríguez C. Biofilmes, "Escenarios de biodiversidad: e pluribus unum. *Sanid. Mil*". 2009; 65 (4): 246-258.

Zhao, B., H. C. van der Mei, G. Subbiahdoss, J. de Vries, M. Rustema-Abbing, R. Kuijer, H. J. Busscher and Y. Ren (2014). "Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials." *Dent Mater* 30(7): 716-727.