



Universidad Complutense de Madrid
Máster en Ciencias Odontológicas

**Formación de biofilms bacterianos
sobre dos superficies de implantes
dentales con distinta rugosidad:
estudio *in vitro***

Ana Araoz González

Tutor: David Herrera González

Junio 2018

Índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
3. Objetivos e Hipótesis.....	8
4. Material y método.....	9
4.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.....	9
4.2 Implantes seleccionados.....	9
4.3 Desarrollo del biofilm	10
4.4 Análisis del biofilm mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	11
4.5 Análisis del biofilm mediante Microscopía Láser Confocal (CLSM).....	12
4.6 Aislamiento del ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)	14
4.7 Análisis estadístico.....	16
5. Resultado.....	16
5.1 Análisis del biofilm mediante Microscopía Láser Confocal (CLSM).....	16
5.2 Análisis del biofilm mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	17
5.3 Análisis cuantitativo del biofilm mediante qPCR.....	22
6. Discusión.....	24
7. Conclusiones.....	28
8. Agradecimientos.....	30
9. Bibliografía.....	31

1. Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento de un modelo de biofilm bacteriano multiespecies sobre implantes dentales de diferente rugosidad.

Material y método: Se emplearon seis cepas bacterianas de referencia estándar para generar biofilms sobre implantes dentales de titanio estériles, con rugosidad media y baja. Los implantes se introdujeron en una placa de cultivo multipocillo en contacto con la mezcla bacteriana. Las especies seleccionadas incluyeron colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), fueron incubados durante 96 horas. La estructura, disposición y cuantificación del biofilm sobre los implantes se estudiaron mediante Microscopía Láser Confocal (CLSM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR). La variable principal fue la concentración de cada bacteria expresada en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) la cual se comparó entre los dos tipos de implantes. Se empleó estadística descriptiva y el test de t-Student. La distribución de los datos se comprobó mediante *box-plot* y test de Shapiro-Wilk.

Resultados: Se observó mediante CLSM y SEM que las bacterias se organizaban en microcolonias y se localizaban principalmente en las espiras y los picos de las espiras de los implantes. Por qPCR se cuantificó el número total de bacterias en cada una de las superficies, se encontró que había diferencias estadísticamente significativas ($p=0,03$) siendo mayor la acumulación bacteriana en los implantes con superficie de rugosidad media, frente a aquellos de rugosidad baja. Al analizar de manera individual cada especie se observaron diferencias estadísticamente significativas para dos de ellas, *F. nucleatum* ($p=0,01$) y *A. actinomycetemcomitans* ($p=0,02$), encontrándose en mayor

cantidad en los implantes de rugosidad media frente a los de superficie de rugosidad baja.

Conclusiones: En los implantes de rugosidad media se acumuló mayor cantidad de bacterias que en los de rugosidad baja, con una mayor concentración de *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*.

Palabras clave: biofilm periimplantario; implantes dentales; titanio; rugosidad superficial; CLSM; SEM; qPCR.

2. Introducción

El científico holandés Anton Van Leeuwenhoek fue el primero en observar con un microscopio simple bacterias y microorganismos a los que denominó “animalículos”. Raspó material de su propio diente y describió: “una pequeña materia blanca, tan adhesiva como si fuera mortero”, continuó: “Después, casi siempre vi... que en dicha materia había muchos animalículos vivos muy pequeños” este fue posiblemente el primer avistamiento de bacterias (Lamont, 2014). Las bacterias existen bajo dos formas o estados que expresan en función de su fenotipo: bacterias planctónicas de libre flotación, y bacterias en colonias de microorganismos sésiles (Nazar, 2007). La gran mayoría de los microorganismos se encuentra en la naturaleza en el segundo grupo, adheridos a una superficie en la que crecen formando biopelículas o biofilms (Marsh, 2005). Donlan y Costerton (2002) definieron el biofilm como una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, en el cual las bacterias se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y poseen un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes (Donlan y Costerton, 2002).

La placa dental es un biofilm complejo y dinámico compuesto por más de 800 especies bacterianas distintas, aunque se prevee que este número aumente con el desarrollo de nuevas tecnologías (Filoche et al. 2010). La biopelícula bacteriana se desarrolla de forma secuencial y reproducible (Diaz et al. 2006), la asociación entre las distintas bacterias que forman el biofilm oral no se produce de manera aleatoria sino que hay asociaciones específicas entre las especies bacterianas (Socransky et al. 1998). A los pocos minutos de realizar la eliminación mecánica del biofilm dental se forma sobre la superficie del esmalte la película adquirida: esta se compone de moléculas derivadas del huésped y contiene receptores (mucinas, aglutininas, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en fosfatos y enzimas) a los cuales se unen los colonizadores primarios (Kolenbrander et al. 2002), principalmente especies de *Actinomyces*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Streptococcus* y *Veillonella* (Diaz et al. 2006). El grupo de colonizadores secundarios está formado fundamentalmente por *Fusobacterium nucleatum*. Esta bacteria gram negativa se encuentra en gran número tanto en localizaciones enfermas como sanas, en la organización espaciotemporal del biofilm se sitúa entre los colonizadores iniciales y tardíos ya que es capaz de coagregarse con todos ellos, es decir sirve como “puente” entre ambos grupos de bacterias. Los colonizadores tardíos poseen un alto potencial periodonto-patógeno y destacan las especies *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia*. (Kolenbrander et al. 2002, Kolenbrander y London, 1993).

En condiciones de salud, existe un equilibrio entre el huésped y los microorganismos del biofilm dental, la ruptura de este equilibrio se produce por diversos factores entre los que se encuentran: exposición a alimentos con alto contenido en azúcar, el humo del tabaco, higiene oral deficiente, factores genéticos o cambios inmunitarios en el huésped;

esta disbiosis tiene como resultado la aparición de dos patologías fundamentalmente, caries y enfermedades periodontales. Esta última puede clasificarse en: gingivitis, inflamación de la encía y el tejido conectivo circundante como respuesta a la acumulación bacteriana, o periodontitis, cuando además de esta inflamación inducida por la placa se produce la pérdida de la unión de colágeno entre el diente y el hueso, así como la pérdida del soporte óseo (Filoche et al. 2010).

Los implantes dentales han demostrado ser una solución a largo plazo para la rehabilitación de pacientes total o parcialmente edéntulos, restauran tanto la función como la estética tras la pérdida dental, sin embargo, la osteointegración de estos implantes en el hueso que los rodea puede verse comprometida por diversos factores, entre ellos la presencia de bacterias que desencadenan una respuesta inflamatoria. De la misma manera que las bacterias pueden inducir la aparición de gingivitis y periodontitis en los dientes, en los implantes se produce mucositis periimplantaria y periimplantitis (Quirynen et al. 2002). En el sexto *Workshop* Europeo de Periodoncia en el año 2008 se acordó que las enfermedades periimplantarias son de naturaleza infecciosa, definieron la mucositis periimplantaria como una lesión inflamatoria que reside en la mucosa, mientras que la periimplantitis también afecta al hueso de soporte (Lang y Berglundh, 2011). Para estimar la prevalencia de periimplantitis se realizó una revisión sistemática con meta-análisis en la cual, tomando como definición de periimplantitis la propuesta por Sanz y Chapple 2012, estimaron que el 12.8% de los implantes dentales desarrollan esta enfermedad, siendo la principal causa de fracaso de implantes dentales (Rakic et al. 2018, Schmidlin et al. 2013)

La microbiota periimplantaria en condiciones de salud se asemeja a la que encontramos en salud gingival: fundamentalmente cocos gram-positivos, bacilos no móviles, y un

pequeño número de especies gram-negativas anaerobias (Belibasakis, 2014). De la misma manera, se ha observado que la periimplantitis y la periodontitis están producidas por una microbiota similar: alta proporción de bacilos gram-negativos anaerobios, organismos móviles y espiroquetas (Quirynen et al. 2002, Yeo et al. 2012), aunque no siempre es así, en algunos casos se ha relacionado con la microbiota típica de dispositivos médicos, concretamente con *Peptostreptococci* (*Parvimonas micra*) o estafilococos (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) (Mombelli y Décaillet, 2011). Además, la patogénesis de ambas enfermedades en cuanto a la secuencia del proceso inflamatorio y la composición cualitativa de las células inmunes es bastante similar (Belibasakis, 2014).

El titanio comercialmente puro es el material de elección para la fabricación de implantes dentales, es un material relativamente blando y resulta complicado mejorar sus propiedades mecánicas sin reducir su biocompatibilidad; por esto las aleaciones de titanio con otros metales están cobrando gran interés. El éxito de los implantes dentales esta relacionado con sus características superficiales: rugosidad superficial, energía libre superficial, humectabilidad y composición del sustrato, las cuales influyen de manera directa o indirecta en la proliferación y diferenciación de células óseas. Se ha observado que las superficies rugosas están asociadas con la diferenciación de los osteoblastos, mientras que las superficies lisas están relacionadas con la proliferación celular, por tanto la rugosidad es crucial a la hora de mejorar y acelerar la osteointegración de implantes dentales (Cordeiro y Barão, 2017), pero no todo es positivo, la rugosidad superficial fomenta la adhesión y colonización de bacterias orales las cuales son responsables de la aparición de periimplantitis (Schmidlin et al. 2013, Ferraris y Spriano, 2016). Quirynen et al. observaron que cuando aumentaba la

rugosidad superficial aumentaba proporcionalmente la cantidad y maduración de la placa (Quirynen et al. 1993). Para combatir este problema se ha propuesto añadir a la composición de los implantes agentes antimicrobianos inorgánicos como plata, cobre o zinc, su principal problema es que la liberación de estas sustancias es limitada en el tiempo, entre 10 y 30 días, lo cual no es suficiente para obtener los objetivos deseados (Ferraris y Spriano, 2016). La pureza del titanio también influye en la colonización bacteriana temprana (Violant et al. 2014).

Numerosos trabajos se han centrado en el estudio de la relación entre el grado de rugosidad del titanio y la formación y estructura del biofilm, para ello comparan discos y bloques compuestos por titanio de distinta rugosidad, pero ninguno emplea implantes similares a los que se utilizan en pacientes, por tanto, de alguna manera están obviando características que influyen directamente en la colonización bacteriana como son la macroestructura y la topografía de los implantes (Größner-Schreiber et al. 2001, Zhao et al. 2014). El trabajo presentado intenta eludir este hecho utilizando implantes comerciales en lugar de discos o bloques, acercándonos más a las condiciones reales de los pacientes portadores de implantes, aunque sin olvidar las limitaciones propias de un estudio *in vitro*. Utilizamos un modelo de biofilm multibacteriano *in vitro* validado en estudios previos (Sánchez et al. 2014) para realizar un análisis cuantitativo y cualitativo del comportamiento del biofilm oral sobre la superficie de implantes con diferente rugosidad. Se ha observado que tras un periodo de incubación de 96 horas encontramos un biofilm maduro y estable (Hope y Wilson, 2006, Sánchez et al. 2011).

3. Objetivo e Hipótesis

El objetivo de esta investigación fue analizar el comportamiento cuantitativo y cualitativo del biofilm oral sobre la superficie de implantes comerciales de titanio con distinta rugosidad.

Como objetivos específicos, se propuso:

- Desarrollar biofilms con 6 especies bacterianas sobre las dos superficies de implantes seleccionadas.
- Estudiar la estructura espacial del biofilm generado en ambas superficies y la viabilidad de los microorganismos sobre ellas.
- Comparar cuantitativamente los biofilms generados en cada una de las superficies de implante, tanto en número total de bacterias como por especie.

La hipótesis que planteamos fue: la cantidad, formación y estructura de los biofilms de un conjunto de bacterias orales varía en función de la rugosidad de la superficie del implante que colonicen.

Como hipótesis específicas, se propusieron:

- En ambas superficies de implantes se formará un biofilm compuesto por las seis especies bacterianas.
- La estructura espacial del biofilm generado y la viabilidad de los microorganismos será similar en ambos tipos de implantes.
- La cantidad de bacterias adheridas a cada implante dependerá de la rugosidad de la superficie que colonicen.

4. Material y método

4.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

La formación de biofilm oral sobre distintas superficies de implante se ha realizado con cepas de referencia estándar que representan los colonizadores primarios, secundarios y tardíos: *S. oralis* CECT 907T, *V. parvula* NCTC 11810, *A. naeshundii* ATCC 19039, *F. nucleatum* DMSZ 20482, *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 8324 y *P. gingivalis* ATCC 33277. Se han mantenido crio-conservadas a -80°C.

Las bacterias se cultivaron en placas de agar sangre (Oxoid No. 2; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementadas con un 5% de sangre de caballo estéril (Oxoid), 5 mg/L de hemina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 1 mg/L de menadiona (Merck, Darmstadt, Alemania) en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% CO₂ y N₂ en equilibrio) a 37°C durante 24-72 horas.

4.2 Implantes seleccionados

Para comparar el biofilm formado en las dos superficies de estudio se han utilizado implantes dentales comerciales de titanio con diferente rugosidad superficial. Como implante de rugosidad baja [rugosidad media (Ra=1-3 μ)] se ha usado *3i Full OSSEOTITE® Certain®* con una superficie grabada con ácido, longitud de 10 mm y diámetro de 3,25/3,4 mm (Implant Innovations, Inc. 4555 Riverside Drive, Palm Beach Gardens, FL. EE. UU). Como implante de rugosidad media (Ra=3-5 μ) se utilizaron *Nobel Biocare Brånemark System® Mk III Groovy RP* con superficie *TiUnite* (recubrimiento grueso moderadamente rugoso de óxido de titanio altamente cristalino enriquecido con fósforo), longitud de 10 mm y diámetro de 3,75 mm (Nobel Biocare, Gotemburgo, Suecia).

4.3 Desarrollo del biofilm

Para generar el biofilm sobre la superficie de los implantes se siguió el protocolo descrito por el grupo de investigación del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid (Sánchez et al. 2011).

En resumen, el primer paso consiste en realizar cultivos puros de cada bacteria en condiciones de anaerobiosis en un medio de brain-heart infusión modificado [BHI (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE. UU)]; se trata de un medio rico en proteínas suplementado con: 2,5 g/L de mucina; 1,0 g/L de extracto de levadura; 0,1 g/L cisteína; 2,0 g/L de bicarbonato sódico; 5,0 mg/L de hemina; 1,0 mg/L menadiona y 0,25% ácido glutámico, que se incubaba durante 24-48 horas. Tras el periodo de incubación, se mide cada cultivo bacteriano mediante espectrofotometría con el objetivo de realizar la recolección de las bacterias cuando se encuentren en la fase exponencial de crecimiento para así obtener un inóculo de las 6 especies bacterianas con una concentración en unidades formadoras de colonias (UFC)/mL determinada y reproducible, la cual vamos a usar durante todo el experimento (Tabla 1).

Cepa	Concentración final (UFC/mL)
<i>S. oralis</i> ,	10 ³
<i>A. naeslundii</i>	10 ⁵
<i>V. parvula</i>	10 ⁵
<i>F. nucleatum</i>	10 ⁶
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	10 ⁶
<i>P. gingivalis</i> .	10 ⁶

Tabla 1. Cepas seleccionadas en el estudio y concentración final (UFC/mL) en el preinóculo.

Los implantes estériles fueron colocados en placas de cultivo celular de 24 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania), en los cuales se inocularon 1,5 mL de la suspensión bacteriana mixta previamente mencionada. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% CO₂ y N₂ en equilibrio) durante 96 horas. También se incubaron pocillos con medio de cultivo, sin inóculo, para comprobar la ausencia de contaminación durante el proceso de manipulación e incubación. Durante todo el procedimiento se trabajó bajo una campana de flujo laminar para conservar las condiciones de esterilidad. Una vez transcurrido el tiempo estipulado se retiraron los implantes del sistema para su análisis posterior.

4.4 Análisis del biofilm mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El análisis con SEM se llevó a cabo en el ICTS Centro nacional de microscopía electrónica (Campus de Excelencia Internacional Moncloa, Universidad Complutense, Madrid, España).

Se analizaron 3 muestras de cada una de las superficies (n=6) incubadas durante 96 horas. El primer paso fue el lavado de los implantes con 2 mL de solución de tampón fosfato salino estéril (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate Buffer Saline*), durante 10 segundos para eliminar las bacterias no adheridas, este paso se realizó tres veces consecutivas. Tras esto, los implantes se fijaron con una solución de 4% de paraformaldehído (Panreac. Química, Barcelona, España) y 2,5% de glutaraldehído (Panreac. Química) durante 4 horas a 4°C. A continuación, las muestras se volvieron a lavar con PBS y agua estéril y se procedió a la deshidratación mediante una serie de soluciones graduadas de etanol (30, 50, 70, 80, 90 y 100%) durante 10 segundos. Posteriormente, se llevó a cabo el secado por punto crítico y el recubrimiento con oro.

Se utilizó el microscopio electrónico JSM 6400 (JSM 6400, JEOL, Tokio, Japón), con un detector de electrones retrodispersados y una resolución de imagen 25 kV.



Figura 1. Microscopio electrónico JSM 6400

4.5 Análisis del biofilm mediante Microscopía Confocal Láser de Barrido (CLSM)

El análisis por CLSM asociado a un software nos permite obtener una imagen tridimensional de la disposición espacial de los microorganismos sobre la superficie de los implantes. Además, gracias a los fluorocromos que se utilizan, se puede analizar y semi-cuantificar el número de bacterias vivas y muertas, así como su distribución a lo largo del biofilm. Se ha llevado a cabo en el centro Nacional de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Campus de Excelencia Internacional Moncloa, Universidad Complutense, Madrid, España) con el microscopio confocal Olympus® (Olympus Iberia, Barcelona, Madrid).

Se analizaron 3 muestras de cada una de las dos superficies (n=6) incubadas durante 96 horas. Previo al análisis con microscopía, los implantes se lavaron tres veces con PBS durante 10 segundos para eliminar las bacterias no adheridas. A continuación, se tiñeron con un kit LIVE/DEAD® BacLight® (Molecular Probes B. V. Leiden, Países Bajos) a

temperatura ambiental. Este kit proporciona dos fluorocromos que se diferencian en sus características espectrales y en su capacidad de penetrar en células bacterianas:

1. *SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain*: penetra en todas las células de la muestra, tanto si tienen su membrana celular intacta como dañada.
2. Ioduro de Propidio *red-fluorescent nucleic acid stain*: sólo penetra en aquellas bacterias con membrana dañada.

La combinación de ambos nos permite marcar las bacterias del biofilm de manera que aquellas cuya membrana se encuentre intacta emitirán fluorescencia verde, mientras que aquellas cuya membrana esté dañada emitirán fluorescencia roja.

Se ha utilizado una relación de fluorocromo 1:1 y el tiempo de tinción ha sido de 9 ± 1 minuto. Por último, se han seleccionado tres zonas representativas de la topografía del implante (Figura 2) para su análisis mediante el software Imaris 7.0[®] (Bitplane, Zúrich, Suiza):

1. Espira del implante (azul).
2. El área entre las espiras (amarillo).
3. Pico de las espiras del implante (verde).

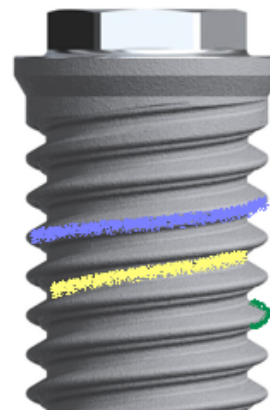


Figura 2. Zonas representativas de la topografía del implante.

4.6 Aislamiento del ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)

Para comprobar que todas las especies se han incorporado al biofilm desarrollado y obtener su cuantificación, se ha realizado su análisis por qPCR. Esta técnica permite la amplificación y cuantificación simultánea del ADN bacteriano presente en la muestra a medida que la reacción progresa, es decir, en “tiempo real”.

Cada ensayo se realizó tres veces con tres implantes de rugosidad media y otros tres de rugosidad baja, en total se analizaron 18 implantes (n=18).

El primer paso consistió en la extracción del ADN de los biofilms generados. Los implantes fueron lavados en 2 mL de PBS durante 10 segundos, este proceso se repitió tres veces, para eliminar la placa bacteriana no adherida. A continuación, las muestras se introdujeron en un tubo de plástico que contenía 1 mL de PBS y se sometieron a un proceso de agitación por vórtex durante 2 minutos a temperatura ambiental para conseguir la disgregación del biofilm. El siguiente paso fue la extracción del ADN bacteriano mediante un kit comercial (MolYsisComplete5; Molzym GmgH y CoKG, Bremen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección y cuantificación del ADN se usó una sonda de hidrólisis 5' nucleasa. Las sondas y los cebadores fueron proporcionados por Life Technologies Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.), Applied Biosystems (Carlsbad, CA, EE. UU.) y Roche (Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania) y eran específicos para el gen 16S rRNA.

La reacción se ha realizado en un volumen final de 10 μ L, el cual contenía:

- 5 μ L de mezcla maestra (LC 480 sonda maestra; Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania)
- La concentración óptima de cebadores y sondas (900, 900 y 300 nM para *S. oralis*; 300, 300 y 300 nM para *A. naeslundii*; 750, 750 y 400 nM para *V.*

parvula; 300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 y 300 nM, para *P. gingivalis* y 600, 600 y 300 nM para *F. nucleatum*).

- 2 μ L de ADN de cada muestra.

El control negativo han sido 2 μ L de agua estéril [plantilla de control negativo (NTC)] (Water PCR grade, Roche). Las muestras se sometieron a un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y un ciclo a 60°C durante 1 minuto. El análisis se realizó con el termociclador LightCycler® 480 II (Roche). Las placas multipocillo usadas en el estudio fueron FramStar 480 de la marca 4titude (The North Barn; Damphurst Lane; Reino Unido) y se sellaron con un adhesivo transparente para qPCR (4titude).

Cada muestra de ADN se ha analizado por duplicado. El valor del ciclo umbral de cuantificación (Cq) determina el número de ciclos de qPCR necesarios para alcanzar la línea base, este umbral se determinó mediante el software asociado al termociclador (LC 48 Software 1.5; Roche), además este mismo software genera de manera automática la correlación entre los valores Cq obtenidos y la correspondencia en UFC/mL. La cuantificación de células viables mediante qPCR se ha basado en curvas estándar.

Todos los experimentos se llevaron a cabo con un rango de detección lineal determinado por una pendiente de 3,3-3,6 ciclos/log, $r^2 > 0,097$ y un rango de eficiencia de 1,8-2,0.

4.7 Análisis estadístico

La variable principal fue la concentración de cada bacteria, expresada en UFC/mL, y se realizó su comparación en las diferentes superficies de implantes. Para ello se empleó la estadística descriptiva y el test t-Student. La distribución de los datos se comprobó mediante *box-plot* y el test de Shapiro-Wilk. La variable respuesta fue la concentración de cada bacteria.

Se ha considerado un resultado estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$. Para el análisis de los datos se empleó un paquete de software (IBM SPSS Statistics 19.0; IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU).

5. Resultados

5.1 Análisis de los biofilms mediante CLSM

En la Figura 3 se muestra una selección de las micrografías obtenidas con CLSM, en las cuales se aprecia la presencia de bacterias adheridas a la superficie de ambos tipos de implantes comerciales. Las imágenes obtenidas de los implantes con superficie de baja rugosidad muestran una disposición de las bacterias agrupadas en microcolonias y gran predominio de bacterias vivas (en verde) sobre bacterias muertas (en rojo), siendo estas últimas prácticamente imperceptibles (Figuras 3A-B). Puede observarse que las bacterias se encuentran distribuidas a lo largo de toda la superficie del implante, aunque no de manera homogénea, se encuentra una mayor concentración de microcolonias en las espiras y en los picos de las espiras, mientras que el área entre las espiras aparece desprovista de bacterias (en azul).

En las imágenes obtenidas de los implantes de rugosidad media, también se observa mayor predominio de bacterias vivas frente a muertas (Figuras 3C-D) y una disposición y distribución bacteriana similar a la anterior.

5.2 Análisis de los biofilms mediante SEM

Las características estructurales del biofilm se evaluaron mediante SEM. En la Figura 4 se observa la morfología de un implante de rugosidad media y otro de rugosidad baja a distintos aumentos sin biofilm, de manera que se pueden apreciar las diferencias entre la macro y microestructura de ambos. Las imágenes 4A y B se realizaron con un objetivo 200X, la primera corresponde al implante de rugosidad baja y la segunda al de rugosidad media. Las imágenes 4C y D se realizaron con un objetivo de mayor aumento (1000X) para observar las características microestructurales de un implante de rugosidad baja (C) y otro de rugosidad media (D).

La Figura 5A-B corresponde a los implantes de rugosidad baja, se puede observar un biofilm consolidado en el que se distinguen estructuras alargadas en forma de huso y, adheridas a estas, cadenas cortas de estreptococos, que identificamos como *F. nucleatum* y *S. oralis* respectivamente (Figuras 5A-B, flechas azules). Esta red compleja de microorganismos produce una matriz extracelular que recubre la totalidad del implante (Figura 5B, flecha verde). Se agrupan en colonias, pero no colonizan toda la superficie del implante por igual. Se puede apreciar que las bacterias se encuentran agrupadas en pilas (masas de células bacterianas en crecimiento) y estas agrupaciones están conectadas entre sí por medio de canales de gran tamaño (Figura 5B, flechas blancas).

En los implantes de rugosidad media (Figuras 5C-D), encontramos características estructurales similares al caso anterior, es decir, microorganismos con morfología de

huso y cadenas cortas de estreptococos, así como otras especies bacterianas, formando una compleja red de microorganismos agrupados en colonias (Figura 5C, flecha azul), todo ello rodeado de una densa matriz extracelular que cubre por completo la superficie del implante (Figura 5D, flecha verde). Las bacterias se agrupan de nuevo en pilas y están conectadas entre sí mediante canales (Figura 5D, flecha blanca).

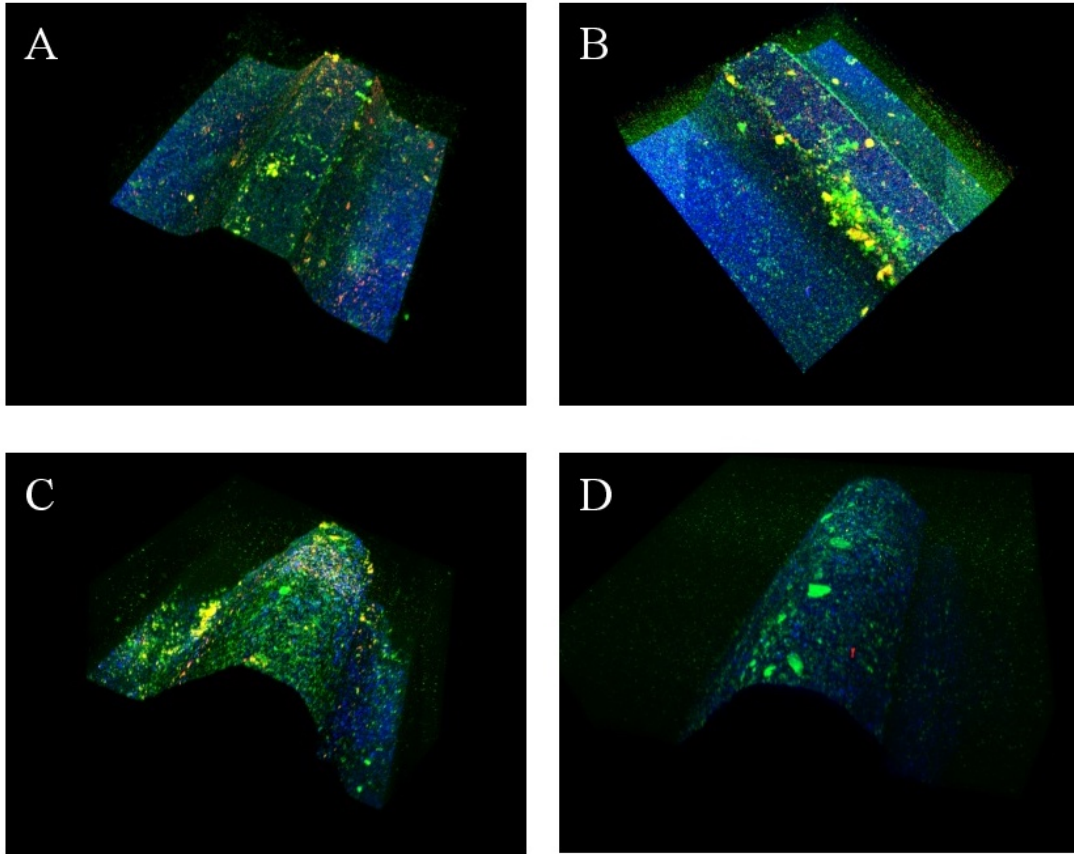


Figura 3. Imágenes obtenidas con Microscopía Láser Confocal tras 96 horas de incubación del biofilm sobre implantes dentales comerciales de rugosidad baja (A-B) y rugosidad media (C-D) usando el kit LIVE/DEAD® BacLight. Pueden diferenciarse las bacterias vivas (en verde), de las bacterias muertas (en rojo) y la superficie de los implantes (en azul). Las imágenes A y B muestran bacterias agrupadas en microcolonias con predominio de bacterias vivas sobre bacterias muertas. Las microcolonias se concentran y cubren completamente la porción lateral y los picos de las espiras, mientras que en el área entre espiras se observa prácticamente desprovista de bacterias. Las imágenes C y D muestran de nuevo el predominio de las bacterias vivas y una distribución y disposición similar a las imágenes anteriores.

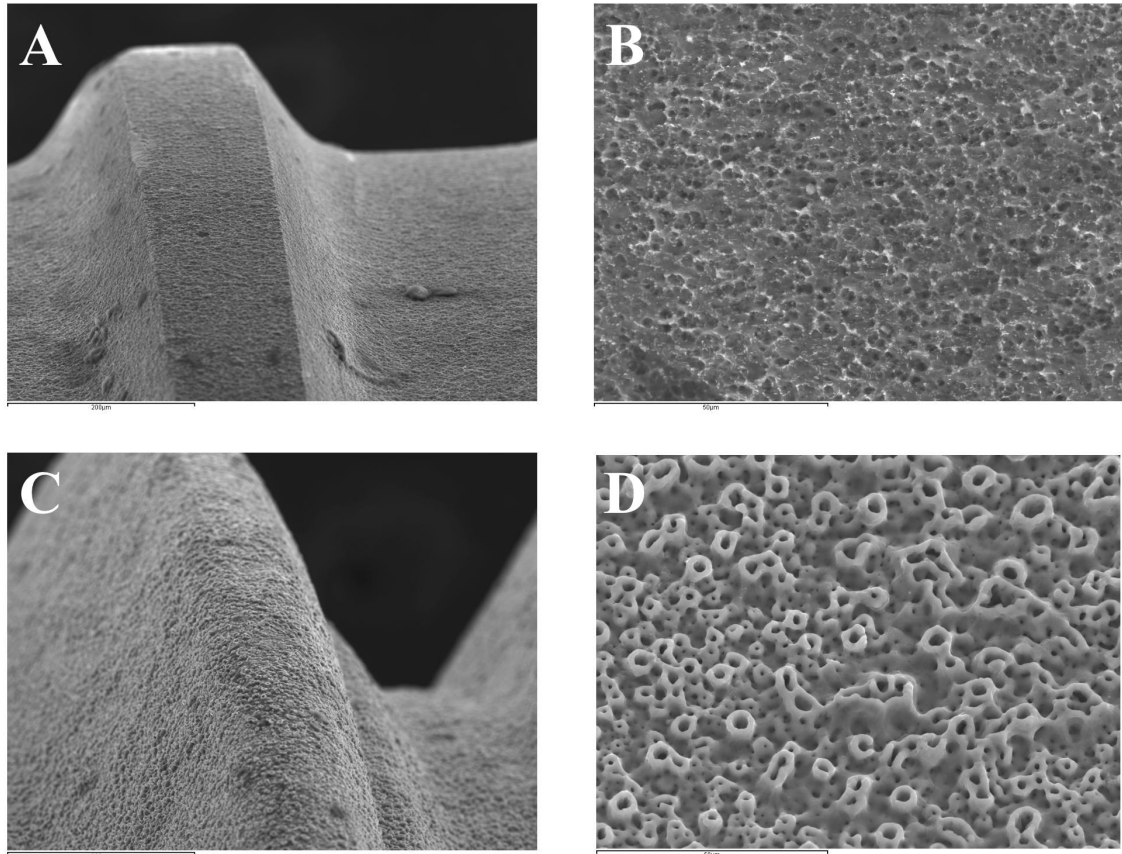


Figura 4. Imágenes de la superficie de implantes comerciales sin biofilm obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido. Imágenes A (200X; barra de escala 200 μm) y C (200X; barra de escala 200 μm) muestran las diferencias en la macroestructura de un implante de rugosidad baja (A) y rugosidad media(C). Imágenes B (1000X; barra de escala 50 μm) y D (1000X; barra de escala 50 μm) muestran las diferencias en la microestructura de un implante de rugosidad baja (B) y rugosidad media(D).

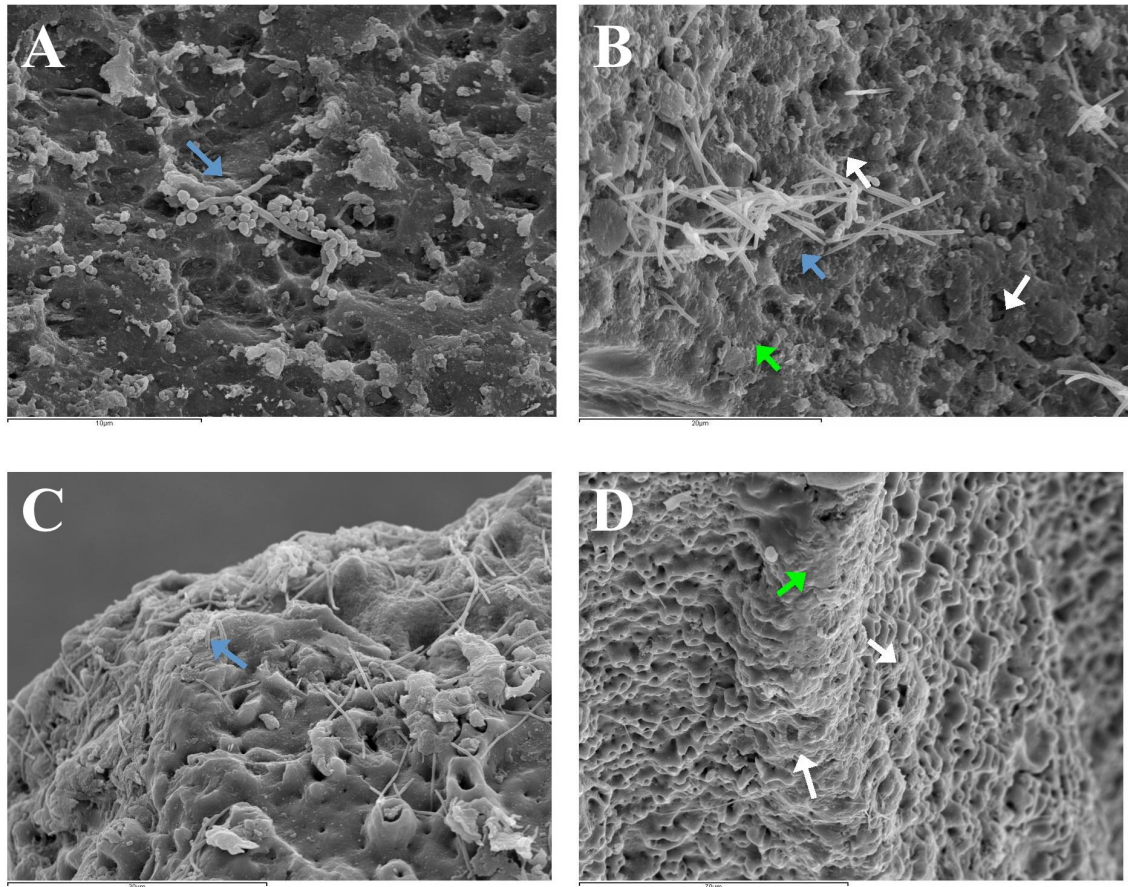


Figura 5. Imágenes de la formación de biofilm sobre la superficie de implantes comerciales obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido. Imágenes A (4000X; barra de escala 10 μm) y B (2500X; barra de escala 20 μm) muestran el biofilm formado sobre un implante de rugosidad baja. Se distinguen estructuras alargadas en forma de huso y, adheridas a estas, cadenas cortas de estreptococos, identificadas como *F. nucleatum* y *S. oralis* respectivamente (A-B, flechas azules) rodeadas de una gruesa matriz extracelular que cubre la totalidad del implante (B, flecha verde). Las bacterias se encuentran apiladas unas sobre otras (masas de células bacterianas en crecimiento) y conectadas entre sí por medio de canales de gran tamaño (B, flechas blancas). Las imágenes C (1800X; barra de escala 10 μm) y D (800X; barra de escala 70 μm) muestran el biofilm formado sobre un implante de rugosidad media con las mismas características estructurales que la superficie anterior: microorganismos alargados en forma de huso y, adheridos a estos, cadenas cortas de estreptococos (C, flecha azul) rodeadas de una gruesa matriz extracelular que cubre la totalidad del implante (D, flecha verde). Las bacterias se encuentran apiladas unas sobre otras (masas de células bacterianas en crecimiento) y conectadas entre sí.

5.3 Análisis cuantitativo de los biofilms mediante qPCR

El análisis de qPCR nos permitió obtener el recuento de las especies bacterianas que se han encontrado sobre las superficies de los implantes estudiados. Las seis especies bacterianas se pudieron detectar tanto en la superficie de rugosidad baja como en la de rugosidad media tras 96 horas de incubación. En total se han analizado 9 implantes del primer grupo y 9 del segundo (n=18). En la Figura 6 se presenta el resultado del análisis estadístico realizado con los datos obtenidos en la qPCR en UFC/mL.

Cuando comparamos la concentración de *S. oralis* en ambas superficies no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,77$). La concentración para los implantes de rugosidad baja fue de $2,84 \times 10^7$ UFC/mL (desviación estándar. D.E.= $1,4 \times 10^7$) frente a $2,66 \times 10^7$ (D.E.= $1,2 \times 10^7$) para los de rugosidad media.

A. naeshundii presentó una concentración de $2,65 \times 10^6$ UFC/mL (D.E.= $1,8 \times 10^5$) en los implantes de rugosidad baja y de $3,13 \times 10^5$ (D.E.= $1,0 \times 10^5$) en los implantes de rugosidad media, sin diferencias estadísticamente significativas entre estas ($p=0,49$).

V. parvula tampoco demostró diferencias estadísticamente significativas entre las dos superficies ($p=0,59$). Su concentración para la superficie de rugosidad baja fue $2,4 \times 10^7$ UFC/mL (D.E.= $2,1 \times 10^7$) y $1,99 \times 10^7$ UFC/mL (D.E.= $7,5 \times 10^6$) para la superficie de rugosidad media.

Como colonizador secundario *F. nucleatum* presentó una concentración de $4,88 \times 10^6$ UFC/mL (D.E.= $3,6 \times 10^6$) para la superficie de baja rugosidad frente a $8,38 \times 10^7$ UFC/mL (D.E.= $3,1 \times 10^6$) para la superficie de rugosidad media. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas concentraciones ($p=0,013$).

P. gingivalis mostró una concentración de $1,23 \times 10^7$ UFC/mL (D.E.= $9,5 \times 10^6$) en la superficie de baja rugosidad frente a $1,43 \times 10^7$ UFC/mL (D.E.= $3,7 \times 10^6$) en la superficie de media rugosidad, sin diferencia estadísticamente significativa entre estas ($p=0,56$).

Por último, *A. actinomycetemcomitans* estaba presente en el biofilm con una concentración de $2,72 \times 10^8$ UFC/mL (D.E.= $1,4 \times 10^7$) para la superficie de baja rugosidad, y $5,57 \times 10^7$ UFC/mL (D.E.= $1,6 \times 10^7$) para la superficie de rugosidad media, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las dos concentraciones ($p=0,002$).

Cuando comparamos el número total de bacterias (suma de células) entre las dos superficies, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,03$), siendo la concentración bacteriana para la superficie de rugosidad media mayor que la de rugosidad baja, $1,26 \times 10^8$ UFC/mL (D.E.= $2,38 \times 10^7$) frente a $1,00 \times 10^8$ UFC/mL (D.E.= $2,45 \times 10^7$).

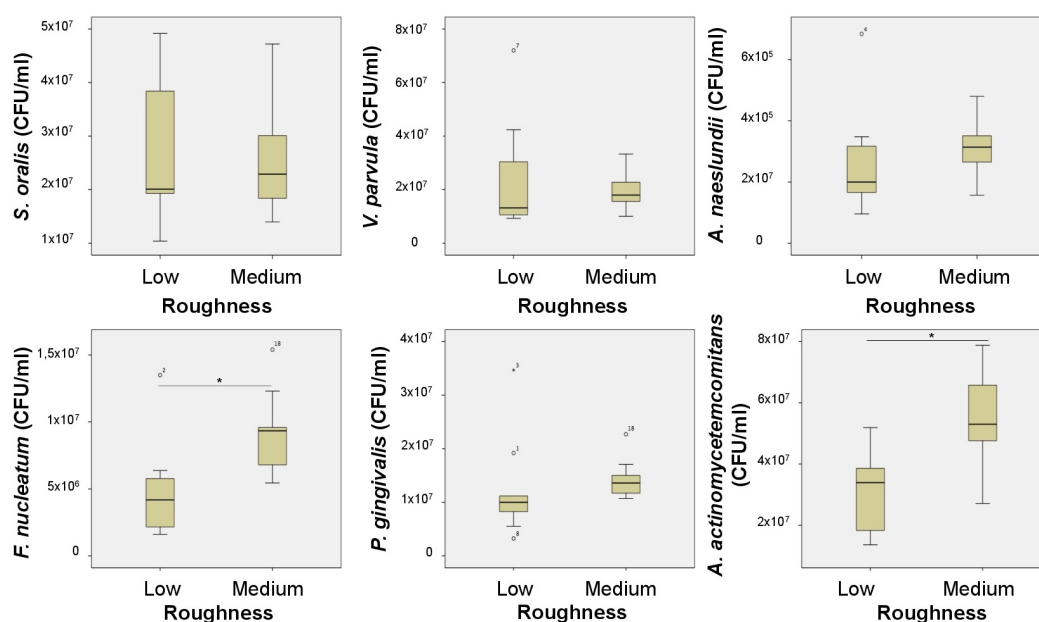


Figura 6. Distribución de los datos resultantes tras el análisis estadístico de las concentraciones de biofilms (UFC/mL) obtenidas con qPCR en implantes comerciales de rugosidad baja ($n=9$) y rugosidad alta ($n=9$). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos superficies para las especies bacterianas *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* (★, $p<0.05$).

6. Discusión

En este estudio se ha realizado un análisis cuantitativo y cualitativo de la formación *in vitro* de un modelo de biofilm sobre dos tipos de implantes comerciales con diferente rugosidad superficial, media y baja. Los resultados obtenidos mediante CLSM y SEM mostraron que las bacterias se organizaban en microcolonias y se localizaban fundamentalmente en las espiras y los picos de las espiras en ambos tipos de implantes. El análisis cuantitativo de las bacterias por qPCR reveló que se acumulaba mayor cantidad de microorganismos en los implantes de rugosidad media, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,03$). Al analizar de manera individual cada especie bacteriana se observó que *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* se encontraban en mayor proporción en los implantes de rugosidad media con diferencias estadísticamente significativas, $p=0,013$ y $p=0,02$, respectivamente.

Un parámetro importante para el éxito clínico de los implantes dentales es su osteointegración en el hueso circundante, la rugosidad superficial mejora este proceso mediante la estimulación de la actividad osteoblástica, la formación de matriz extracelular y la mineralización ósea. (Kubies et al. 2011, Rosa et al. 2012, Ferreira Ribeiro et al. 2016). Por otro lado, la rugosidad proporciona protección para las bacterias contra las fuerzas de cizalla, que las pueden separar de la superficies a la que se encuentran adheridas, además de aumentar la dificultad de los mecanismos de limpieza (Zaugg et al. 2017, Pita et al. 2015). Kolenbrander et al. han demostrado que la formación de la placa supragingival es mas rápida en una superficie rugosa (Kolenbrander et al. 2006).

El papel que juega el biofilm en el desarrollo de la inflamación periimplantaria está bien estudiado (Busscher et al. 2010), lo que aún no está totalmente probado es si la

modificación de la microestructura superficial favorece la adhesión y formación de biofilms en los implantes, induciendo la aparición de estas enfermedades periimplantarias (Al-Radha et al. 2012, Schmidlin et al. 2013, Fröjd et al. 2011).

Para poder analizar como influye la rugosidad superficial en la generación de biofilms se ha realizado este estudio *in vitro* en el que hemos evaluado cualitativa y cuantitativamente la formación de un biofilm, representativo del que se encuentra en la zona periimplantaria, sobre implantes de titanio comerciales con diferentes rugosidades, media y baja. Los microorganismos que forman este modelo *in vitro* coinciden con la microbiota presente en las zonas periimplantarias *in vivo* (Fürst et al. 2007), incluye *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, especies bacterianas que se han asociado fuertemente con periodontitis y periimplantitis (Quirynen et al. 2002).

Los resultados obtenidos mediante CLSM y SEM muestran que la estructura y disposición del biofilm es similar en ambas superficies, las bacterias se agrupan en colonias con una notable predilección por las espiras y los picos de las espiras, dejando el área entre las espiras casi desprovista de microorganismos. Sin embargo, cuando comparamos el número total de bacterias (mediante qPCR) adheridas a cada tipo de implante encontramos que había mayor acumulación en los implantes de rugosidad media, con diferencias estadísticamente significativas, por tanto un incremento en la rugosidad parece facilitar la colonización bacteriana, como también han afirmado otros autores (Teughels et al. 2006, Almaguer-Flores et al. 2012).

Cuando analizamos de manera individual cada especie bacteriana pudimos observar que las únicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas fueron *F. nucleatum*

y *A. actinomycetemcomitans*, estando en mayor número en las superficies de rugosidad media. Estas dos especies bacterianas corresponden a colonizadores secundarios y tardíos, de lo cual podríamos interpretar que en las primeras etapas de formación del biofilm la microtopografía no tiene gran influencia, pero una vez que se han establecido los colonizadores iniciales la rugosidad promueve el desarrollo de un biofilm más agresivo. Ferreira et al. realizaron un estudio *in vivo* en el que evaluaban, entre otros parámetros, la influencia de la microtopografía superficial de tres tipos de discos de titanio sobre la formación de biofilm a las 24 horas; concluyeron que la adhesión bacteriana había sido similar en las tres superficies y por tanto que la rugosidad superficial no favorecía la colonización bacteriana inicial (Ferreira Ribeiro et al. 2016). Schmindlin et al. encuentran resultados similares, realizaron un estudio *in vitro* en el que analizaron la formación de un biofilm multiespecies tras 2, 4, 8 y 16,5 horas de incubación sobre 7 superficies diferentes de discos de titanio, determinaron que la rugosidad superficial influye sobre la generación de biofilm, siendo menos notable en las primeras horas.

Numerosos estudios analizan la formación de biofilm sobre implantes con diferente topografía, uno de los grandes problemas que encontramos en este tipo de estudios es que, la mayoría de ellos, utilizan como superficie de trabajo discos de titanio. En sus resultados encuentran que la distribución del biofilm se produce de manera homogénea, sin predilección por ningún área en concreto (Sánchez et al. 2014, Ferreira Ribeiro et al. 2016). Sin embargo, en este trabajo hemos analizado la distribución del biofilm sobre la superficie de implantes comerciales y los resultados que hemos obtenido son contrarios al resto de autores, observamos que las bacterias se acumulan de manera desigual a lo

largo del implante, con mayor predilección por la zona de las espiras y los picos de estas.

El análisis del biofilm mediante CLSM y el posterior tratamiento de las imágenes obtenidas mediante el software Imaris 7.0[®], han permitido obtener una proyección tridimensional de los microorganismos, así como observar la disposición espacial de las células. Al utilizar los fluorocromos “SYTO 9 green-fluorescent stain” y “Ioduro de Propidio red-fluorescent nucleic acid stain”, hemos podido analizar la distribución de las bacterias vivas y muertas a lo largo del biofilm. Hemos observado que las bacterias vivas tienen tendencia por asentarse en las espiras y los picos de las espiras, esto podría significar que estas dos localizaciones son más accesibles y tienen mayor cantidad de nutrientes y que las bacterias tienen menor afinidad por el área entre las espiras. En este sentido no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las dos superficies de estudio. Es importante remarcar que los resultados obtenidos de la observación mediante microscopía no se pueden comparar con otros trabajos, ya que no usan implantes dentales completos sino discos o bloques y no siempre de titanio.

En las imágenes realizadas con SEM encontramos la morfología bacteriana que esperábamos, comunidades de microorganismos apilados y conectados entre sí mediante canales, sin diferencias entre las dos superficies. Esta morfología es similar a la que encuentran otros autores (Hope y Wilson, 2006).

Los resultados encontrados por Pita et al. se asemejan a los encontrados en este estudio en cuanto a la distribución y las características observadas. En este estudio *in vitro* analizan la formación de biofilm de 5 estreptococos orales sobre dos superficies de

discos de titanio, una tratada con chorreado de arena y la otra con grabado ácido. Concluyen que el aumento de la rugosidad promueve la acumulación de placa bacteriana, pero no encuentran diferencias en la distribución de estas bacterias sobre las dos superficies (Pita et al. 2015).

Una de las principales limitaciones de este estudio experimental *in vitro* es la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos, también debemos tener en cuenta que se han podido producir variaciones en las condiciones de los instrumentos con los que se realizaron las mediciones. Además, debido al diseño del estudio, no se pudo realizar aleatorización por lo que puede existir alguna variable no controlada que se distribuya de manera desigual entre los dos grupos de implantes.

7. Conclusiones

A pesar de las limitaciones inherentes a un estudio observacional, podemos concluir que:

El presente estudio ha permitido examinar cómo afecta la rugosidad superficial de implantes comercializados a la disposición y desarrollo estructural de biofilms, así como realizar un análisis cuantitativo de las bacterias adheridas a cada tipo de implante.

El modelo de biofilm *in vitro* utilizado permitió el desarrollo de biofilms periimplantarios con seis cepas bacterianas, que incluían colonizadores iniciales (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*), sobre ambas superficies de implantes.

La estructura y disposición de los biofilms orales generados era similar en las dos superficies de implantes cuando se analizaron con CLSM y SEM: en ambos casos las bacterias se localizaban preferentemente en las espiras y en los picos de las espiras del implante. Se observó predominio de bacterias vivas.

Los resultados obtenidos por qPCR demuestran que el implante con mayor rugosidad fue más densamente colonizado, cuando se comparaba el número total de células adheridas a cada superficie: concretamente dos de las seis cepas bacterianas mostraron diferencias estadísticamente significativas, *F. nucleatum* (p=0,01) y *A. actinomycetemcomitans* (p=0,02).

8. Agradecimientos

En primer lugar, gracias a mi tutor, David Herrera, por guiar este trabajo.

Así mismo, quiero agradecer al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología, en especial a Patricia Bermejo, por su ayuda y dedicación.

9. Bibliografía

1. Almaguer-Flores, A., Olivares-Navarrete, R., Wieland, M., Ximénez-Fyvie, L. A., Schwartz, Z., y Boyan, B. D. (2012). Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro. *Clinical Oral Implants Research*, 23(3), 301-307. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02184.x>
2. Al-Radha, A. S. D., Dymock, D., Younes, C., y O'Sullivan, D. (2012). Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *Journal of Dentistry*, 40(2), 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.12.006>
3. Belibasakis, G. N. (2014). Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Archives of Oral Biology*, 59(1), 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.09.013>
4. Busscher, H. J., Rinastiti, M., Siswomihardjo, W., y van der Mei, H. C. (2010). Biofilm Formation on Dental Restorative and Implant Materials. *Journal of Dental Research*, 89(7), 657-665. <https://doi.org/10.1177/0022034510368644>
5. Cordeiro, J. M., y Barão, V. A. R. (2017). Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1201-1215. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.025>
6. Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer, R. J., y Kolenbrander, P. E. (2006). Molecular Characterization of Subject-Specific Oral Microflora during Initial Colonization of Enamel. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2837-2848. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2837-2848.2006>
7. Donlan, R. M., y Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically

- Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
<https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
8. Ferraris, S., y Spriano, S. (2016). Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 965-978.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.062>
 9. Ferreira Ribeiro, C., Cogo-Müller, K., Franco, G. C., Silva-Concílio, L. R., Sampaio Campos, M., de Mello Rode, S., y Claro Neves, A. C. (2016). Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Archives of Oral Biology*, 69, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.05.006>
 10. Filoche, S., Wong, L., y Sissons, C. H. (2010). Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. *Journal of Dental Research*, 89(1), 8-18.
<https://doi.org/10.1177/0022034509351812>
 11. Fröjd, V., Chávez de Paz, L., Andersson, M., Wennerberg, A., Davies, J. R., y Svensäter, G. (2011). In situ analysis of multispecies biofilm formation on customized titanium surfaces: Biofilms on titanium surfaces. *Molecular Oral Microbiology*, 26(4), 241-252. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2011.00610.x>
 12. Fürst, M. M., Salvi, G. E., Lang, N. P., y Persson, G. R. (2007). Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*, 18(4), 501-508. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01381.x>
 13. Größner-Schreiber, B., Griepentrog, M., Haustein, I., Müller, W.-D., Briedigkeit, H., Göbel, U. B., y Lange, K.-P. (2001). Plaque formation on surface modified dental implants. *Clinical Oral Implants Research*, 12(6), 543-551.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2001.120601.x>
 14. Hope, C. K., y Wilson, M. (2006). Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 390-398.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.01.003>

15. Kolenbrander, P E, y London, J. (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3247-3252.
16. Kolenbrander, Paul E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G., Foster, J. S., y Palmer, R. J. (2002). Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 486-505. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.486-505.2002>
17. Kolenbrander, Paul E., Palmer, R. J., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., y Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*, 42(1), 47-79. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x>
18. Kubies, D., Himmlová, L., Riedel, T., Chánová, E., Balík, K., y Doud, M. (2011). The Interaction of Osteoblasts With Bone-Implant Materials: 1. The Effect of Physicochemical Surface Properties of Implant Materials, 60, 17.
19. Lamont, R. J., Hajishengallis, G., y Jenkinson, H. F. (2014). *Oral microbiology and immunology*. Washington, DC: ASM Press.
20. Lang, N. P., y Berglundh, T. (2011). Periimplant diseases: where are we now? – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(s11), 178-181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x>
21. Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(s6), 7-15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00790.x>
22. Mombelli, A., y Décaillot, F. (2011). The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(s11), 203-213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01666.x>
23. Nazar C, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de*

- cabeza y cuello*, 67(1), 161-172. <https://doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>
24. Pita, P. P. C., Rodrigues, J. A., Ota-Tsuzuki, C., Miato, T. F., Zenobio, E. G., Giro, G.; Shibli, J. A. (2015). Oral Streptococci Biofilm Formation on Different Implant Surface Topographies. *BioMed Research International*, 2015, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2015/159625>
25. Quirynen, M., Van Der Mei, H. C., Bollen, C. M. L., Schotte, A., Marechal, M., Doornbusch, G. I., Van Steenberghe, D. (1993). An in vivo Study of the Influence of the Surface Roughness of Implants on the Microbiology of Supra- and Subgingival Plaque. *Journal of Dental Research*, 72(9), 1304-1309. <https://doi.org/10.1177/00220345930720090801>
26. Quirynen, Marc, De Soete, M., y van Steenberghe, D. (2002). Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical Oral Implants Research*, 13(1), 1-19. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130101.x>
27. Rakic, M., Galindo-Moreno, P., Monje, A., Radovanovic, S., Wang, H.-L., Cochran, D., Canullo, L. (2018). How frequent does peri-implantitis occur? A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 22(4), 1805-1816. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2276-y>
28. Rosa, M. B., Albrektsson, T., Francischone, C. E., Schwartz Filho, H. O., y Wennerberg, A. (2012). The influence of surface treatment on the implant roughness pattern. *Journal of Applied Oral Science*, 20(5), 550-555. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000500010>
29. Sánchez, M. C., Llama-Palacios, A., Blanc, V., León, R., Herrera, D., y Sanz, M. (2011). Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota: An in vitro subgingival biofilm model. *Journal of Periodontal Research*, 46(2), 252-260. <https://doi.org/10.1111/j.1600->

0765.2010.01341.x

30. Sánchez, M. C., Llama-Palacios, A., Fernández, E., Figuero, E., Marín, M. J., León, R., Sanz, M. (2014). An in vitro biofilm model associated to dental implants: Structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dental Materials*, 30(10), 1161-1171. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.07.008>
31. Schmidlin, P. R., Müller, P., Attin, T., Wieland, M., Hofer, D., y Guggenheim, B. (2013). Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *Journal of Applied Oral Science*, 21(1), 48-55. <https://doi.org/10.1590/1678-7757201302312>
32. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., y Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>
33. Teughels, W., Assche, N. V., Sliepen, I., y Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17(S2), 68-81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
34. Violant, D., Galofré, M., Nart, J., y Teles, R. P. (2014). In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm on different implant surfaces. *Biomedical Materials*, 9(3), 035007. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/3/035007>
35. Yeo, I.-S., Kim, H.-Y., Lim, K. S., y Han, J.-S. (2012). Implant Surface Factors and Bacterial Adhesion: A Review of the Literature. *The International Journal of Artificial Organs*, 35(10), 762-772. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000154>
36. Zaugg, L. K., Astasov-Frauenhoffer, M., Braissant, O., Hauser-Gerspach, I., Waltimo, T., y Zitzmann, N. U. (2017). Determinants of biofilm formation and cleanability of titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 28(4), 469-475. <https://doi.org/10.1111/clr.12821>

37. Zhao, B., van der Mei, H. C., Subbiahdoss, G., de Vries, J., Rustema-Abbing, M., Kuijer, R., Ren, Y. (2014). Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. *Dental Materials*, 30(7), 716-727. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.04.001>