

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**BIOPELÍCULAS ORALES EN SUPERFICIES DE  
TITANIO Y ZIRCONIO: RESPUESTA A AGENTES  
ANTISÉPTICOS**

**Gerila Tafaj**

**Tutor: David Herrera González**

**CURSO 2015-2016**

---

## Índice

1. Resumen .....	3
2. Introducción .....	4
3. Hipótesis .....	13
4. Objetivos .....	13
5. Material y métodos .....	14
5.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo .....	14
5.2 Superficies seleccionadas .....	15
5.3 Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas .....	15
5.4 Formación de la biopelícula en las superficies seleccionadas .....	17
5.5 Colutorios utilizados .....	18
5.6 Exposición a los colutorios sin estar sujetos a agitación .....	19
5.7 Exposición a los colutorios con agitación constante .....	19
5.8 Estudio de la vitalidad bacteriana mediante qPCR asociada a PMA .....	20
5.9 Análisis estadístico .....	23
6. Resultados .....	24
6.1 <i>Respuesta de la especie bacteriana A. actinomycetemcomitans</i> .....	24
6.2 <i>Respuesta de la especie bacteriana P. gingivalis</i> .....	36
6.3 <i>Respuesta de la especie bacteriana F. nucleatum</i> .....	46
7. Discusión .....	56
8. Conclusiones .....	60
9. Agradecimientos .....	61
10. Bibliografía .....	62

---

## 1. Resumen

**Objetivos:** Se ha demostrado recientemente que las biopelículas *in vitro* formadas en diferentes superficies de implantes son significativamente diferentes en cuanto a su espesor, en la organización estructural de sus bacterias y a la disposición de la matriz de polisacárido extracelular. El objetivo de este estudio fue evaluar si estas diferencias conllevan una respuesta diferente de las bacterias a la exposición de diferentes agentes antisépticos.

**Material y Métodos:** Se utilizaron seis cepas bacterianas de referencia para desarrollar una biopelícula *in vitro* sobre discos estériles de titanio y de zirconio, recubiertos de saliva, dentro de los pocillos de placas de cultivo celular. Las especies seleccionadas representan colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y colonizadores tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Los agentes antimicrobianos: clorhexidina combinado con cloruro de cetilpiridinio (CHX/CPC), aceites esenciales (EO) y cloruro de cetilpiridinio (CPC) se aplicaron a biopelículas de 72 h de desarrollo, mediante la inmersión de los discos durante 1 min en las soluciones antisépticas y en solución tampón de fosfato (PBS) como control, bajo agitación constante a 90 rpm o en ausencia de ella. Se estudió antes y después de la exposición el número de bacterias viables (unidades formadoras de colonias UFC/mL) de las especies bacterianas *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) combinada con Propidio de Monoazida (PMA), y se realizó un modelo lineal generalizado para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, con el fin de determinar el efecto de cada variable independiente, aislada o interrelacionadas, en el recuento de bacterias viables (UFC/mL).

**Resultados:** No se observaron diferencias significativas en el número de bacterias viables (UFC viables/mL) para las tres cepas seleccionadas cuando se comparó la respuesta bacteriana en superficies de titanio y zirconio después de cada uno de los tratamientos antimicrobianos aplicados (CHX/CPC, EO y CPC), ya sea con o sin agitación. Asimismo, ambas biopelículas respondieron de forma similar al tratamiento mecánico, a pesar de la exposición a las soluciones antisépticas.

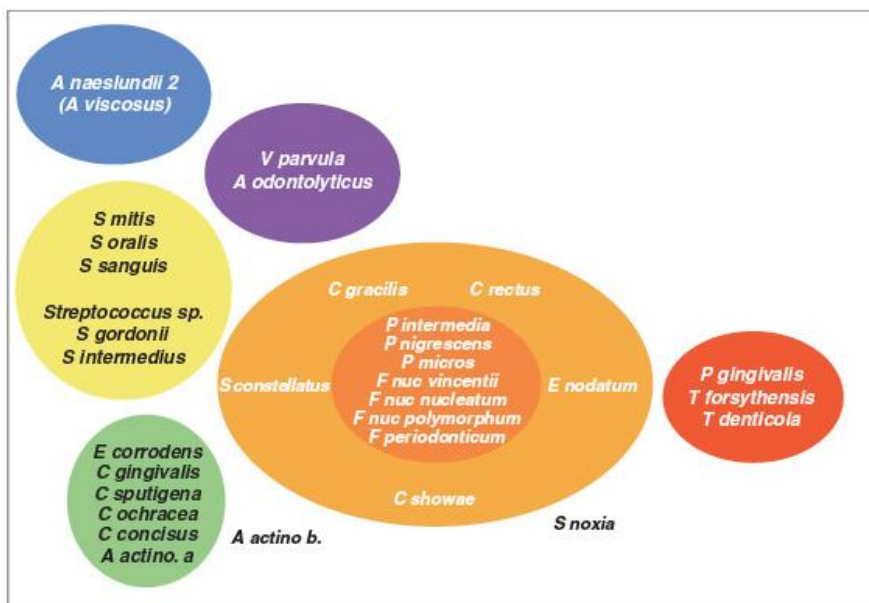
**Conclusiones:** Tres de la principales especies bacterianas asociadas a las enfermedades peri-implantarias (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*) respondieron de manera similar frente a diferentes antisépticos cuando fueron expuestas a los mismos en forma de biopelículas formadas sobre dos superficies de implantes diferentes. Esto ocurrió independientemente de las diferencias de esas biopelículas en cuanto a su espesor, en cuanto a la disposición de la matriz de polisacárido extracelular, o en cuanto en la organización de las células bacterianas en la biopelícula, asociadas a las diferentes características de las superficies.

---

## 2. Introducción

En la cavidad oral, las bacterias, transportadas en la saliva y fluido gingival crevicular, van a encontrar diferentes superficies de contacto, tanto superficies blandas (mucosas, lengua, etc) como duras (dientes o superficies artificiales), donde establecerse y desarrollar biopelículas.

La asociación de las bacterias en las biopelículas orales no es aleatoria, sino que hay asociaciones específicas entre especies bacterianas. Socransky y cols. examinaron más de 13.000 muestras de placa subgingival procedente de 185 adultos e identificaron seis grupos de especies bacterianas asociadas, que incluían colonizadores iniciales, como *Streptococcus oralis*, con capacidad para fijarse a diferentes receptores de la película dental y proveer receptores para especies como *Fusobacterium nucleatum* y otros colonizadores intermedios y tardíos (Socransky y cols. 1998).



**Figura 1:** Esquema de la asociación entre especies subgingivales. 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 (tomado de Socransky y cols. 1998)

Las biopelículas bacterianas están descritas como comunidades microbianas complejas inmersas en un medio líquido, caracterizado por bacterias que se hallan

---

unidas a un sustrato o superficie, y que se encuentren embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas (Donlan y cols. 2002).

Las enfermedades bucales relacionadas con biopelículas microbianas orales son las enfermedades más prevalentes del ser humano y continúan afectando a la mayoría de la población mundial (Sheiham y cols. 2002) incluida la población española (Llodra-Clavo y cols. 2000, Bravo-Pérez y cols. 2006). Entre ellas destacan las enfermedades periodontales (que incluyen las gingivitis, caracterizadas por la inflamación de la encía; y las periodontitis, en las que además de la inflamación superficial hay destrucción de los tejidos de soporte, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular) y la caries dental, causadas por bacterias organizadas en forma de biopelícula sobre las superficies dentarias.

Estas enfermedades bucales de origen infeccioso son la principal causa de pérdida dentaria en adultos, con las concomitantes consecuencias funcionales y estéticas que estas pérdidas conllevan. Para reponer los dientes perdidos se disponen de diferentes técnicas rehabilitadoras, basadas en el uso de prótesis dentales removibles o fijas, estas últimas soportadas por los dientes adyacentes. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha introducido el uso de implantes dentales osteointegrados como soporte tanto para prótesis fijas como removibles, sin necesidad de usar como pilares los dientes remanentes.

Las técnicas de rehabilitación con implantes osteointegrados han revolucionado la práctica de la Odontología, con innumerables rehabilitaciones que, antes del advenimiento de los implantes no era posibles, y con resultados globales satisfactorios (Berglundh y cols. 2002). Es evidente que los resultados altamente predictivos del uso de implantes osteointegrados ha supuesto un importante

---

avance en la rehabilitación protética de los pacientes parcial y totalmente desdentados.

Sin embargo, los implantes osteointegrados no están exentos de problemas a medio y largo plazo, y actualmente están adquiriendo gran relevancia las enfermedades peri-implantarias. Dichas enfermedades son de origen infeccioso y de naturaleza inflamatoria, y están causadas por bacterias presentes en las biopelículas orales, organizados sobre las superficies de los implantes, de las prótesis que los soportan y de los tejidos blandos peri-implantarios, lo que resulta en la pérdida del hueso de soporte (Quirynen y cols. 2002; Lang y cols. 2011).

Las enfermedades peri-implantarias son un término colectivo para definir las reacciones inflamatorias en los tejidos que rodean un implante. La mucositis peri-implantaria evidencia inflamación en la mucosa en un implante sin signos de pérdida del hueso de soporte, que, en un estado más avanzado se convierte en peri-implantitis, enfermedad que va acompañada de pérdida de hueso de soporte (Quirynen y cols. 2006). Un estudio reciente sobre la prevención periodontal y peri-implantaria indica que la periodontitis afecta a más del 50% de la población adulta, y en su forma más severa al 11% de los adultos, por lo que la periodontitis severa se considera la sexta enfermedad crónica más prevalente de la humanidad (Tonetti y cols. 2015). El incremento del uso de los implantes dentales como reemplazo de los dientes perdidos crea un nuevo reto como son las enfermedades peri-implantarias. En una revisión sistemática reciente, se ha encontrado una prevalencia del 43% de mucositis peri-implantaria y del 22% en peri-implantitis (Tonetti y cols. 2015).

---

Estudios recientes están poniendo de manifiesto que una de las principales causas del fracaso de los implantes dentales es la infección bacteriana. En primer lugar, numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las bacterias orales pueden adherirse y proliferar en las superficies de los implantes dentales (Quirynen y cols. 2000, Costerton y cols. 2005, Busscher y cols. 2010, Nascimento y cols. 2014). Además, los estudios de la población microbiana alrededor de los implantes dentales han mostrado que, cuando las bacterias colonizan el espacio peri-implantario justo después de la colocación del implante, las especies dominantes son estreptococos y miembros del complejo amarillo y púrpura, destacando diferentes especies del género *Actinomyces*, con el subsiguiente desarrollo en la zona una comunidad multi-microbiana (Quirynen y cols. 2006, Kumar y cols. 2012). Como ocurre en los dientes naturales, los microorganismos asociados a superficies de implantes en estado de salud son predominantemente cocos y bacilos Gram-positivos (Lee y cols. 2010). Sin embargo, cuando la biopelícula madura, miembros de los complejos verde, naranja y rojo colonizarán la zona (Frust y cols. 2007, Nascimento y cols. 2013, Socransky y cols. 1998) y aparecerá la situación clínica asociada a enfermedad peri-implantaria (Kumar y cols. 2012, Shibli y cols. 2008, Mombelli y cols. 1987, Tabanella y cols. 2009).

En los últimos años, distintos autores (Quirynen y cols. 1994) han estudiado la composición de las biopelículas peri-implantarias y los factores que influyen en su formación, destacando:

- La presencia de dientes naturales y su estado periodontal, que condiciona una fuente de patógenos para colonizar las superficies implantaria (Zhao y cols. 2014). Los pacientes con dientes remanentes,

---

frente a los edéntulos completos (Felo y cols. 1997), y los pacientes con periodontitis no tratada, frente a los pacientes con el periodonto sano (Heitz-Mayfield y cols. 2011), tendrán más riesgo de que sus biopelículas peri-implantarias sean colonizadas por patógenos periodontales.

- El tiempo de exposición en la cavidad oral (Van Winkelhoff y cols. 2000). El impacto del tiempo de exposición en la cavidad oral sobre la composición de la microbiota subgingival alrededor de implantes es diferente en pacientes desdentados parciales y totales, con mayor presencia y colonización más rápida de patógenos periodontales en sujetos parcialmente edéntulos y con periodontitis.
- Ajuste pasivo de los componentes de los implantes. La discrepancia (denominada “gap”) entre los diferentes componentes de los implantes (sobre todo los ubicados subgingivalmente), ofrecen un medio ideal para la formación de nueva biopelícula, así como para dificultar su eliminación. El “gap” entre el implante propiamente dicho y los componentes protésicos se ha estimado entre 1-10 y 49  $\mu\text{m}$  (Porrás y cols. 2002), discrepancias que permiten la colonización bacteriana.
- La higiene oral parece influir de manera evidente en la composición de la microbiota peri-implantaria. Se señala además que la higiene oral del paciente tiene un impacto significativo en la estabilidad del hueso marginal alrededor de los implantes, especialmente en fumadores (Thone-Muhling y cols. 2010).

- 
- El micro medio-ambiente alrededor del implante puede favorecer el desarrollo de gérmenes anaerobios Gram-negativos y la accesibilidad de nutrientes y condiciones físico-químicas favorables. Esto ocurre en casos en que la anatomía y la colocación del implantes han favorecido al formación de bolsas peri-implantarias (Quirynen y cols. 2002).
  - La superficie del implante, que favorezca la adhesión y la formación de biopelículas (Quirynen y cols. 1994). La rugosidad de la superficie no solo favorece la adhesión y acumulación bacteriana, sino que aumenta el área disponible para la adhesión en casi tres veces.

A pesar de todo lo descrito anteriormente, hay que tener en cuenta que la inflamación crónica que define las enfermedades peri-implantarias no depende solo del grado de acumulación microbiana y la composición de la biopelícula adherida a la superficie del implante, sino también de factores relacionados con el implante y el paciente. Algunos de los factores de riesgo pueden ser el comportamiento del paciente, y por lo tanto modificables, como la falta de higiene oral y el tabaquismo; sin embargo, otros factores de riesgo son considerados no modificables como la susceptibilidad genética a la infección y el estado de salud sistémica (por ejemplo, diabetes).

El material más utilizado para la fabricación de implantes es el titanio, especialmente por sus propiedades de bio-compatibilidad, su capacidad de óseo-integración y sus propiedades mecánicas. Igualmente se esta trabajando en la elaboración de materiales alternativos al titanio, como el zirconio, con similares propiedades físicas, pero con mejor afinidad química al hueso y mayor resistencia a la adherencia bacteriana (Wennerberg y cols. 2010). En los últimos años las

---

características microscópicas de las superficies de los implantes dentales han experimentado una importante evolución (rugosidad, composición química, hidrofobicidad, etc.) con el objetivo de favorecer la osteopromoción y así alcanzar un área mayor de contacto hueso-implante, acelerando de este modo los tiempos de tratamiento (Ciancio y cols. 1995). No obstante, estas mismas características han demostrado en estudios experimentales que pueden favorecer la colonización de bacterias procedentes de la biopelícula subgingival.

Estudios anteriores *in vitro* e *in vivo* muestran como algunos de los parámetros de superficie como las superficies rugosas de los implantes, la superficie de energía libre, humectabilidad y el modo de esterilización, son factores que afectan de manera significativa la formación de la biopelícula y la distribución tridimensional de las bacterias asociadas al implante (Al-Radha y cols. 2012, Mabboux y cols. 2004, Teughels y cols. 2006, Whitehead y cols. 2005, Pucked y cols. 2010), aunque hoy en día existe cierta controversia. Al-Radha y cols. o Mabboux y cols. observaron que la energía libre de las superficies puede ser un factor importante que determina la adhesión bacteriana inicial sobre los implantes (Al-Radh y cols. 2012, Mabboux y cols. 2004). Del mismo modo, Teughels y cols. o Whitehead y cols. demostraron que la colonización bacteriana sería mejor cuanto mayor es la rugosidad de la superficie (Teughels y cols. 2006, Whitehead y cols. 2005). Pucket y cols. han demostrado que cierta topografía de titanio puede ser útil para reducir la adhesión bacteriana y una mejora del tejido óseo (Pucket y cols. 2010). Además, Sánchez y cols. encontraron diferencias significativas al observar el grosor de la biopelícula y su estructura tridimensional al comparar las biopelículas desarrolladas en dos superficies de los implantes de diferentes características

---

(Sánchez y cols. 2014). Sin embargo, Schmidlin y cols., Quirynen y cols., o Zhao y cols. observaron que la rugosidad de las superficies tenía una influencia moderada en la formación de la biopelícula, mientras que la humectabilidad o hidrofobicidad no parecían influir en la formación de biopelículas en las condiciones experimentales descritas (Schmidlin y cols. 2013, Quirynen y cols. 1994, Zhao y cols. 2014).

Los estudios nombrados muestran un análisis de la interacción entre las superficies de implantes con las bacterias. Sin embargo, aunque en varios estudios se ha observado el efecto antibacteriano de productos antisépticos *in vivo* e *in vitro* en implantes dentales relacionados con las biopelículas peri-implantarias (Zhao y cols. 2014, Felo y cols. 1997, Heitz-Mayfield y cols. 2011, Porras y cols. 2002, Thone-Muhling y cols. 2010, Ciancio y cols. 1995, Trejo y cols. 2006), muy pocas investigaciones se han enfocado al análisis de cómo las características del implante podrían afectar a la respuesta bacteriana a los agentes antimicrobianos, llevando a cabo un estudio comparativo de la influencia de diferentes materiales de implantes sobre la viabilidad de bacterias que se incluyen en las biopelículas después de un tratamiento antiséptico.

Por tanto, la finalidad del presente estudio fue comparar la respuesta de la biopelícula formada sobre dos superficies de implante, titanio y zirconio, frente a diferentes agentes antibacterianos: clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio (CHX/CPC), aceites esenciales (EO) y cloruro de cetilpiridinio (CPC).



---

### 3. Hipótesis

La diferente estructura tridimensional que presentan las biopelículas orales *in vitro* formadas en los materiales de implantes, titanio y zirconio rugosos, pueden condicionar la respuesta bacteriana a agentes antisépticos.

### 4. Objetivos

Evaluar si las diferencias estructurales observadas en las biopelículas orales sobre dos superficies de implantes dentales, titanio y zirconio, provocan diferencias en la respuesta a diferentes agentes antisépticos en las bacterias periodontopatógenas incluidas.

El objetivo principal fue la evaluación de la respuesta de las biopelículas maduras formadas en las dos superficies implantarias al tratamiento con tres agentes antibacterianos, sujetos o no a agitación constante durante el tratamiento, y utilizando como unidad de medida el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) de células viables presentes en la biopelícula.

---

## 5. Material y métodos

### 5.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

La formación de una biopelícula con bacterias orales sobre distintas superficies de implantes 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.

Las bacterias se hicieron crecer en placas de medio Agar Sangre (Oxoid nº2; 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% H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en equilibrio) a 37°C entre 24- 72h.

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

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

<sup>1</sup>DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen

<sup>2</sup>NCTC, National Collection of Type Cultures

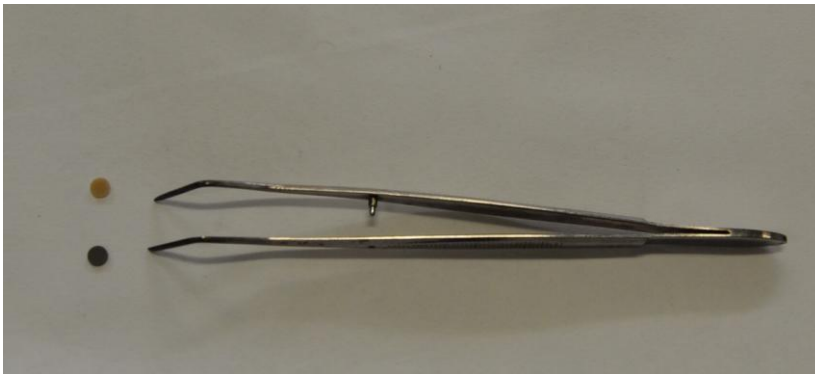
<sup>3</sup>ATCC, American Type Cultures Collection

<sup>4</sup>CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

---

## 5.2 Superficies seleccionadas

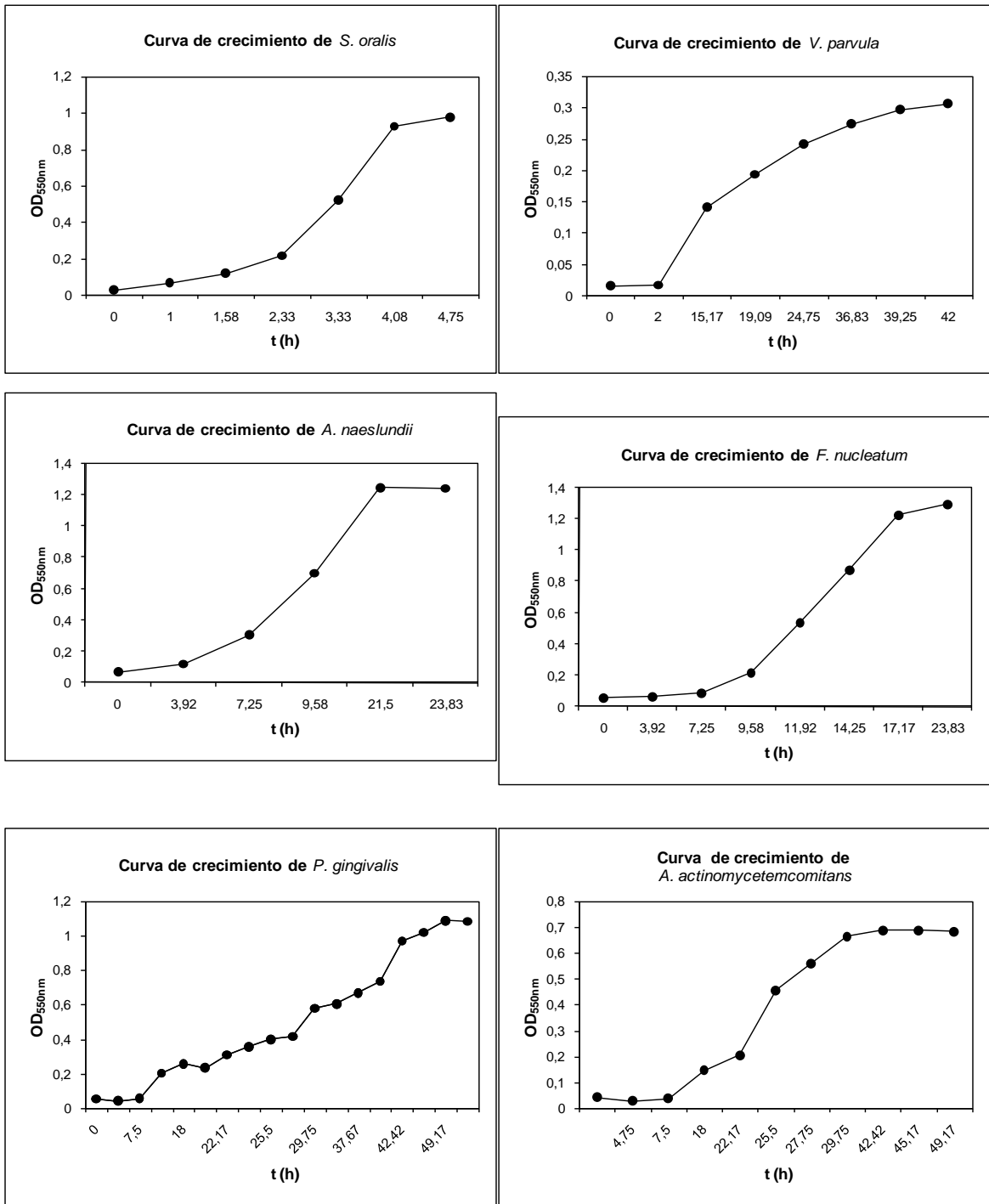
Se utilizaron dos superficies de crecimiento, discos de titanio grado 2, superficie SLA de 5 mm de diámetro (Straumann; Instituto Straumann AG, Baseilea, Suiza) y discos de ZrO<sub>2</sub> de 5 mm de diámetro (Straumann; Instituto Straumann AG, Basilea, Suiza).



**Figura 2:** Materiales utilizados en el estudio  
Titanio: negro  
Zirconio: blanco

## 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 biopelícula estático (Sánchez y cols. 2011).



**Figura 3.** Curvas de crecimiento de los microorganismos utilizados en el modelo *in vitro* de biopelícula oral (Sánchez y cols. 2011).

---

#### 5.4 Formación de la biopelícula en las superficies seleccionadas

Una vez conocidas las curvas de crecimiento, se procedió a la generación de la biopelícula sobre las diferentes superficies seleccionadas. Se inoculó una única colonia de cada aislado en 15 mL de medio BHI2, que se incubó en anaerobiosis a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento en cada uno de ellos, que se comprobó con la medida espectrofotométrica de la densidad óptica (D.O.) a 550 nm. Se preparó un inóculo que contuviera las 6 especies bacterianas seleccionadas, 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).



**Figura 4. Espectrofotómetro**  
Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de Universidad Complutense de Madrid.

**Tabla 2.- Cepas seleccionadas en el estudio y concentración final (unidades formadoras de colonia por mililitro, UFC/mL) en el preinóculo**

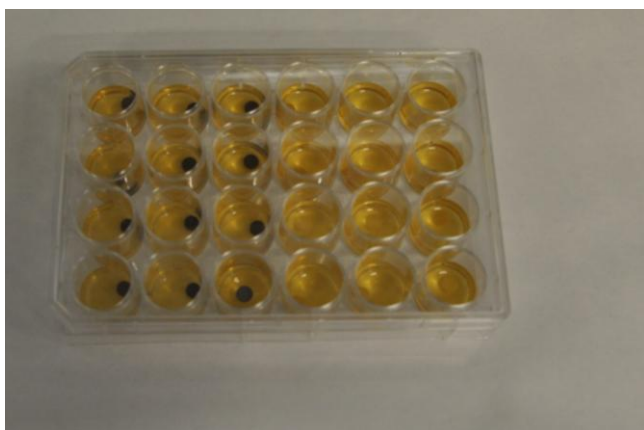
Cepa	Concentración final (UFC/mL)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10 <sup>8</sup>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10 <sup>8</sup>
<i>Veillonella parvula</i>	10 <sup>5</sup>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10 <sup>5</sup>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10 <sup>8</sup>
<i>Streptococcus oralis</i>	10 <sup>3</sup>

---

---

Los discos se introdujeron en placas estériles de cultivo celular de 24 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania), vertiendo en cada pocillo con disco 1.500  $\mu$ l del inóculo preparado. Se utilizaron controles de medio BHI2 para confirmar la esterilidad del medio así como del proceso de manipulación e incubación.

El desarrollo de la biopelícula se llevó a cabo en anaerobiosis, a 37°C durante 72 horas. Transcurrido el tiempo estipulado de generación, los discos fueron retirados del sistema en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar para su posterior tratamiento.



**Figura 5. Placa multipocillo**  
Cultivo de las biopelículas de titanio y zirconio.

### 5.5 Colutorios utilizados

Se utilizaron los siguientes colutorios disponibles comercialmente: PerioAid Tratamiento® (Dentaid, Cerdanyola, España) que contiene 0,12% de clorhexidina (CHX) y 0,05% de cloruro de cetilpiridinio (CPC) como principios activos, sin alcohol (acrónimo CHX/CPC); Listerine Zero® (Johnson & Johnson, Madrid, España) que contiene una mezcla de aceites esenciales (acrónimo EO) como principios activos (timol 0,06%, eucalipto 0,09%, metil salicilato 0,06%, y mentol

---

0,01%) en solución sin alcohol; Oral-B Pro-Expert (Procter & Gamble, Weybridge, Inglaterra), con CPC como principio activo (acrónimo CPC). El tampón de fosfato salino (PBS) fue utilizado como control negativo.

### **5.6 Exposición a los colutorios sin estar sujetos a agitación**

Los discos fueron lavados tres veces en 2 mL de PBS estéril, durante 10 segundos por lavado, para retirar las bacterias no adheridas. Para evaluar la respuesta de las biopelículas generadas sobre las diferentes superficies, se dispusieron 2 mL de cada uno de los colutorios, así como del control positivo PBS, en una placa multipocillo, y cuando las biopelículas de 72 horas de incubación estuvieron dispuestas, se sometieron a su acción durante 1 minuto por inmersión. Tras la exposición al colutorio, los discos se lavaron tres veces consecutivas en 2 mL de PBS durante 10 segundos, para retirar posibles restos de producto.

En cada ensayo, los tres colutorios y el control fueron testados simultáneamente. Los experimentos se repitieron en tres ocasiones, con tríos de biopelícula por cada material.

### **5.7 Exposición a los colutorios con agitación constante**

Los discos fueron lavados tres veces en 2 mL de PBS estéril, durante 10 segundos por lavado, para retirar las bacterias no adheridas. Para evaluar la respuesta de las biopelículas generadas sobre las diferentes superficies, se dispusieron 2 mL de cada uno de los colutorios, así como del control positivo PBS, en una placa multipocillo, y cuando las biopelículas de 72 horas de incubación estuvieron dispuestos, se sometieron a su acción durante 1 minuto por inmersión sometidos a una agitación constante de 90 rpm en un vortex. Tras la exposición al colutorio, los

---

discos se lavaron tres veces consecutivas en 2 mL de PBS durante 10 segundos, para retirar posibles restos de producto. En cada ensayo, los tres colutorios y el control fueron testados simultáneamente. Los experimentos se repitieron en tres ocasiones, con tríos de biopelícula por cada material.

### **5.8 Estudio de la vitalidad bacteriana mediante qPCR asociada a PMA**

El estudio se ha centrado en la respuesta de las bacterias *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* dentro de la biopelícula a los tratamientos antisépticos.

En primer lugar, las muestras se introdujeron en un tubo de plástico estéril con 1 mL de PBS igualmente estéril, y se sometieron a vorteadado hasta completar la disgregación de la biopelícula. A continuación, y previo a la extracción del ADN, 250 µL de cada uno de las biopelículas, tanto control como tratados, fueron sometidos a la acción del agente Propidio de Monoazida (PMA) como se describe en Sánchez y cols. (2014), tras lo cual se procedió a la extracción del ADN bacteriano. Para ello, se empleó el kit de extracción “MoLYsis Complete5 (MolzYM GmgH & CoKG)”, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue resuspendido en 100 µL de agua estéril y almacenado a -20°C hasta su análisis.

Con el objetivo de evaluar el efecto de los colutorios sobre la vitalidad de las bacterias *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, entro de la biopelícula generada en las dos superficies de implante, se realizó 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 ha llevado 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.

Las secuencias de los cebadores o primers [sintetizados por Life Technologies Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y sondas [sintetizados por Life Technologies Invitrogen y Roche (Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania)], dirigidas en todos los casos al gen 16S *rARN*, se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Secuencias de los cebadores y sondas usados para la detección y cuantificación del ADN genómico de las bacterias involucradas en el desarrollo de la biopelícula. Tanto los cebadores como las sondas, en todos los casos, se han dirigido al gen 16S *rARN*.**

Bacteria	Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Referencia
<i>Pg</i>			
<b>Avance</b>	GCGCTCAACGTTTCAGCC	67	(Boutaga y cols. 2003)
<b>Reverso</b>	CACGAATTCCGCCTGC		
<b>Sonda</b>	6FAM-CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA		
<i>Aa</i>			
<b>Avance</b>	GAACCTTAC CTACTCTTGACATCCGAA	80	(Boutaga y cols. 2005)
<b>Reverso</b>	TGCAGCACCTGTCTCAAAGC		
<b>Sonda</b>	6FAM-AGAACTCAGAGATGGGTTTGTGCCTTAGGG-TAMRA		
<i>Fn</i>			
<b>Avance</b>	GGATTTATTGGGCGTAAAGC	162	(Boutaga y cols. 2005)
<b>Reverso</b>	GGCATTCTACAAATATCTACGAA		
<b>Sonda</b>	6FAM-CTCTACACTTGTAGTTCCG-TAMRA		

pb = pares de bases; Clave especies: *Pg* (*P. gingivalis*), *Aa* (*A. actinomycetemcomitans*), *Fn* (*F. nucleatum*).

---

La reacción se ha realizado en un volumen final de 20  $\mu$ l, que contiene: 10  $\mu$ l de 2x *master mixture* (LC 480 Probes Master; Roche), la concentración óptima de cebadores y sonda (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 350, 350 de sonda), y 5  $\mu$ l de ADN de las muestras de biopelícula. Las muestras fueron sometidas a un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 10 min, seguidos de 45 ciclos a 95°C por 15 seg 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, Inglaterra, 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, un mL de cada una de las seis especies utilizada en el estudio, a una concentración de  $10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro (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 se incluyeron en cada experimento. Las curvas estándar se han construido enfrentando los valores de Cq generados en la qPCR frente al log de UFC/mL. La correlación entre los valores de Cq y UFC/mL fueron automáticamente generados por el Software® 1.5 LC480 (Roche).

Todos los ensayos han cumplido con la premisa de presentar un rango lineal de detección establecido por una pendiente de 3,3-3,6 ciclos/log,  $r^2 > 0,997$  y rango de

---

eficiencia de 1,9-2,0. Los valores por debajo del rango de detección han podido ser detectados pero no se han cuantificado.

### **5.9 Análisis estadístico**

Los datos se han calculado como UFC/mL. Para cada bacteria, se ha realizado un modelo lineal general con tres variables independientes (material, agitación y colutorio), un modelo de regresión lineal solo para el material y un modelo de regresión lineal con el material ajustado por la agitación y el colutorio. Los resultados se han considerado estadísticamente significativos a  $p < 0,05$ . Se ha utilizado el software SPSS® Statistics 19.0 (IBM SPSS Statistics 21.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) para todos los análisis de datos.

---

## 6. Resultados

### **6.1 Respuesta de la especie bacteriana *A. actinomycetemcomitans***

Se ha estudiado la respuesta de *A. actinomycetemcomitans* incorporada en una biopelícula multi-especie a tres variables concretas, tanto de forma independiente como asociadas:

- 1-Material de implante sobre el que se origina la biopelícula
- 2-Tratamiento mecánico de agitación
- 3-Tratamiento químico en forma de agentes antimicrobianos formulados como colutorios.

La respuesta se ha expresado como número de unidades formadoras de colonia viables en la biopelícula (UFC/mL).

Estudiando el efecto del material de implante, independientemente del efecto derivado de los tratamientos mecánico y químico aplicados, se puede afirmar que para *A. actinomycetemcomitans*, con un número de muestras N=72 (nº de muestras estudiadas), cuando se compararon las biopelículas formadas sobre titanio y zirconio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de bacterias viables ( $p=0,832$ ) (Figura 6).

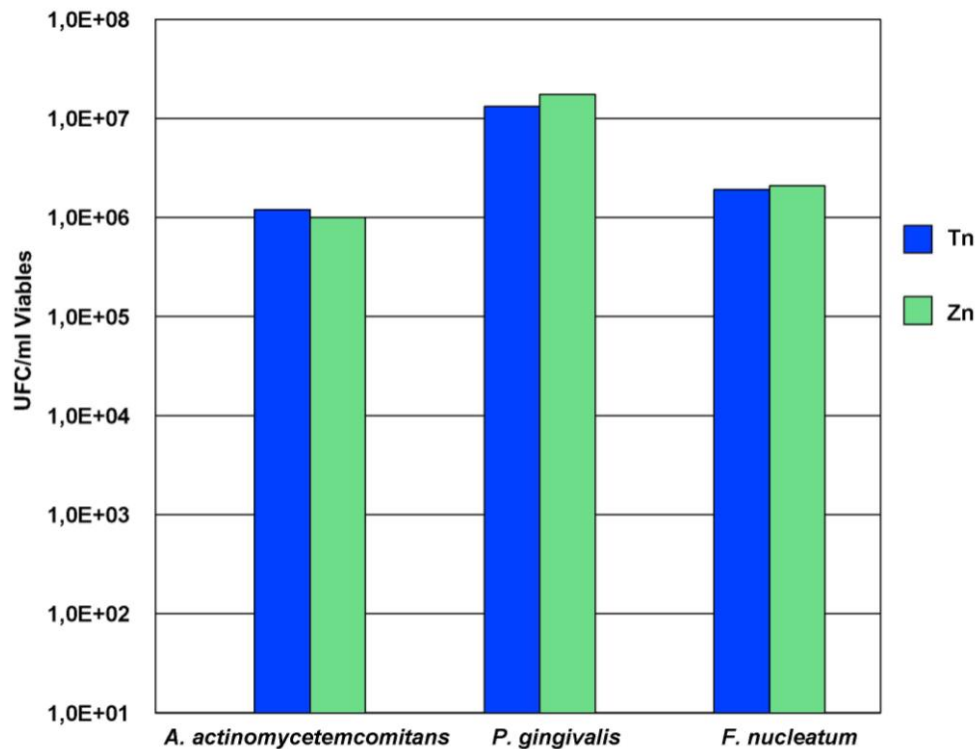


Figura 6. Número de unidades formadoras de colonias viables de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* (UFC/mL), en biopelículas multi-especie generadas en dos tipos de materiales, titanio (Tn) y zirconio (Zn), con independencia del efecto derivado de los tratamientos químicos o mecánicos. N=72 en todos los casos.

Cuando se estudió el efecto del tratamiento mecánico (agitación), independientemente del efecto derivado del tratamiento químico y del material implantario, con un valor de N=72, se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de bacterias viables de *A. actinomycetemcomitans* en una biopelícula no sometida a agitación frente a una sujeta a agitación constante durante 1 minuto ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).

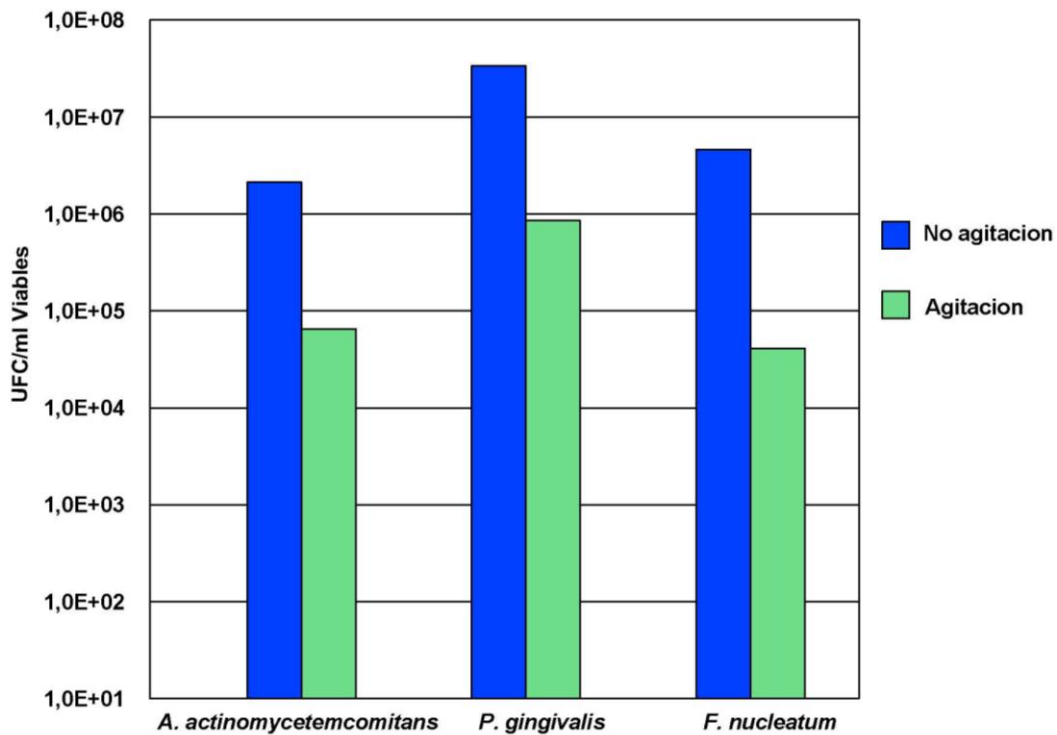


Figura 7. Número de unidades formadoras de colonias viables de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* (UFC/mL), en biopelículas multi-especie sometidas a una agitación constante de 90 rpm o en ausencia de ella, con independencia del efecto derivado de los tratamientos químicos o del material utilizado. N=72 en todos los casos.

En el caso del tratamiento químico, cuando se estudió su efecto con independencia del tratamiento mecánico y del material utilizado, con un valor de N=72 (Figura 8) se observaron diferencias estadísticamente significativas para el valor de UFC/mL viables ( $p=0,001$ ) al estudiar el efecto químico de los tres agentes antimicrobianos sobre esta bacteria tras la exposición durante 1 minuto frente al control en PBS. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas cuando se compararon entre sí los efectos de los diferentes principios activos ( $p=1,000$  en todos los casos).

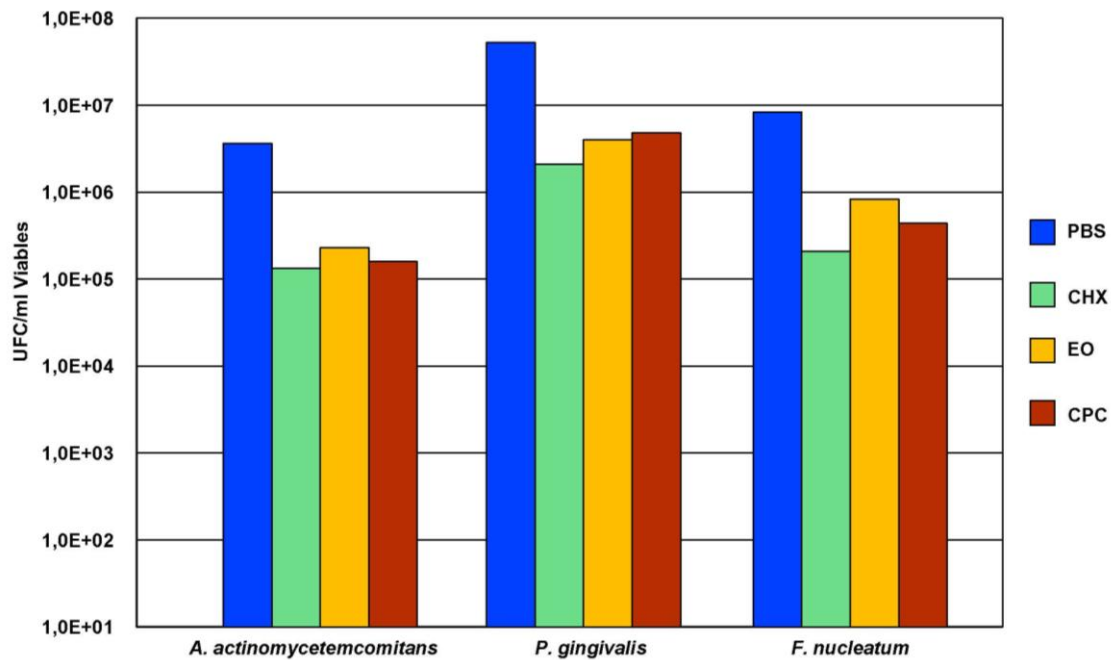


Figura 8. Número de unidades formadoras de colonias viables de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* (UFC/mL), en biopelículas multi-especie tras la exposición por inmersión durante 1 min en buffer fosfato salino (PBS) como control y en tres tipos de agentes antibacterianos: Clorhexidina y Cloruro de cetilpiridinio (CHX), aceites esenciales (EO) y cloruro de cetilperidinio (CPC), con independencia del efecto derivado del material y del tratamiento mecánico. N=72 en todos los casos.

La Tabla 4 muestra los valores medios obtenidos para la bacteria *A. actinomycetemcomitans*, expresados UFC/mL, en biopelículas multi-especie generadas en dos tipos de materiales, titanio y zirconio, sometidas a una agitación constante de 90 rpm o en ausencia de ella, tras la exposición por inmersión durante 1 min en buffer fosfato salino (PBS) como control y en tres tipos de agentes antibacterianos: Clorhexidina y Cloruro de cetilpiridinio (CHX) aceites esenciales (EO) y cloruro de cetilperidinio (CPC).

Tabla 4. Número de unidades formadoras de colonias viables por mililitro de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, en biopelículas multi-especie generadas en dos tipos de materiales, titanio y zirconio, sometidas a una agitación constante de 90 rpm o en ausencia de ella, tras la exposición por inmersión durante 1 min en buffer fosfato salino (PBS) como control y en tres tipos de agentes antibacterianos: Clorhexidina y Cloruro de cetilpiridinio (CHX) aceites esenciales (EO) y cloruro de cetilperidinio (CPC). N=9 en cada caso.

Material			Media	Error tipo	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Titanio	No	PBS	7,2E+06	1219223,414	4802002,617	9626886,272
		EO	4,4E+05	1219223,414	-1968886,272	2855997,383
		CPC	5,6E+05	1219223,414	-1848108,494	2976775,161
		CHX	3,4E+05	1219223,414	-2071441,828	2753441,828
	SI	PBS	1,6E+05	1219223,414	-2250486,272	2574397,383
		EO	1,4E+05	1219223,414	-2276552,939	2548330,717
		CPC	4,7E+04	1219223,414	-2365086,272	2459797,383
		CHX	2,0E+04	1219223,414	-2392408,494	2432475,161
Zirconio	No	PBS	7,2E+06	1219223,414	4737669,283	9562552,939
		EO	2,5E+05	1219223,414	-2160886,272	2663997,383
		CPC	1,7E+05	1219223,414	-2243375,161	2581508,494
		CHX	2,1E+05	1219223,414	-2207086,272	2617797,383
	Si	PBS	4,2E+04	1219223,414	-2370497,383	2454386,272
		EO	3,3E+04	1219223,414	-2379741,828	2445141,828
		CPC	2,2E+04	1219223,414	-2390019,606	2434864,050
		CHX	1,9E+04	1219223,414	-2393724,050	2431159,606

Si se dirige el estudio hacia los materiales de las dos superficies implantarias (titanio y zirconio) y de manera independiente se estudia el efecto de cada una de las dos variables de tratamiento (mecánico y químico) se hacen las siguientes observaciones:

- Respecto al efecto del tratamiento mecánico por agitación en la vitalidad de *A. actinomycetemcomitans* en las biopelículas, independientemente del tratamiento químico, se observaron diferencias significativas cuando se comparó el valor de

---

UFC/mL viables sin aplicar agitación frente a la aplicación de la misma tanto en el titanio ( $p=0,019$ ) como en el zirconio ( $p=0,028$ ).

Al comparar el valor de UFC/mL viables de *A. actinomycetemcomitans* de las biopelículas formadas en los dos materiales, titanio *versus* zirconio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas sin agitación ( $p=0,820$ ) o agitando durante 1 minuto ( $p=0,942$ ).

- Respecto al efecto del tratamiento químico en la vitalidad de *A. actinomycetemcomitans*, independientemente del tratamiento mecánico, se observaron diferencias significativas tanto en el titanio como en el zirconio (Tabla 5;  $p<0,005$  en todos los casos) al comparar el número de bacterias viables del control con el resultado obtenido tras el tratamiento con EO, CPC o CHX/CPC. No se observaron diferencias significativas al comparar el efecto de los tres principios activos entre sí ( $p=1,000$ ).

Cuando se comparó el valor de UFC/mL de *A. actinomycetemcomitans* en las biopelículas formadas en los dos materiales (titanio y zirconio) para cada uno de los tratamientos químicos aplicados (PBS, EO, CPC o CHX/CPC) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos ( $p>0,05$  en todas las ocasiones).

Tabla 5. Diferencia de medias al comparar el efecto del tratamiento químico en la vitalidad de *A. actinomycescomitans* incluida en las biopelículas de titanio y zirconio, independientemente del tratamiento mecánico, con un valor de N=72 (nº de muestras estudiadas). Unidad de medida: unidades formadoras de colonia por mililitro.

Material			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>	
						Límite inferior	Límite superior
Titanio	PBS	EO	3398477,778*	1219,223	0,037	131,104	6665,851
		CPC	3382355,556*	1219,223	0,038	114,982	6649,729
		CHX	3507683,333*	1219,223	0,028	240,310	6775,057
	EO	PBS	-3398477,778*	1219,223	0,037	(6665,851)	(131,104)
		CPC	(16,122)	1219,223	1,000	(3283,496)	3251,251
		CHX	109,206	1219,223	1,000	(3158,168)	3376,579
	CPC	PBS	-3382355,556*	1219,223	0,038	(6649,729)	(114,982)
		EO	16,122	1219,223	1,000	(3251,251)	3283,496
		CHX	125,328	1219,223	1,000	(3142,046)	3392,701
	CHX	PBS	-3507683,333*	1219,223	0,028	(6775,057)	(240,310)
		EO	(109,206)	1219,223	1,000	(3376,579)	3158,168
		CPC	(125,328)	1219,223	1,000	(3392,701)	3142,046
Zirconio	PBS	EO	3453900,000*	1219,223	0,032	186,526	6721,274
		CPC	3500283,333*	1219,223	0,029	232,910	6767,657
		CHX	3483991,111*	1219,223	0,030	216,618	6751,365
	EO	PBS	-3453900,000*	1219,223	0,032	(6721,274)	(186,526)
		CPC	46,383	1219,223	1,000	(3220,990)	3313,757
		CHX	30,091	1219,223	1,000	(3237,282)	3297,465
	CPC	PBS	-3500283,333*	1219,223	0,029	(6767,657)	(232,910)
		EO	(46,383)	1219,223	1,000	(3313,757)	3220,990
		CHX	(16,292)	1219,223	1,000	(3283,666)	3251,081
	CHX	PBS	-3483991,111*	1219,223	0,030	(6751,365)	(216,618)
		EO	(30,091)	1219,223	1,000	(3297,465)	3237,282
		CPC	16,292	1219,223	1,000	(3251,081)	3283,666
<b>Basadas en las medias marginales estimadas.</b>							
<b>*. La diferencia de medias es significativa al nivel</b>							
<b>b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.</b>							
<b>Variable dependiente: <i>A. actinomycescomitans</i> (UFC/mL)</b>							

- Respecto al efecto de los tratamientos mecánico y químico en la vitalidad de *A. actinomycescomitans* en las biopelículas, independientemente del material utilizado, observando el efecto conjunto de ambos tratamientos en cuanto al valor de UFC/mL viables de *A. actinomycescomitans*, se vio que cuando se compara el valor obtenido al tratar las biopelículas sumergidas en PBS control frente a los tres colutorios utilizados (EO, CPC, y CHX) aparecen diferencias significativas sin agitar

---

en los tres casos (Tabla 6;  $p=0,000$ ). En cambio no se observan diferencias significativas si son sometidos a agitación (Tabla 6;  $p=1,000$ ). No se observaron diferencias cuando se comparan los efectos derivados de los tres colutorios con efecto antimicrobiano entre sí, ya sea con o sin agitación (Tabla 6;  $p=1,000$ ). En el caso de comparar el efecto de cada tratamiento químico, con o sin agitación, solo se observan diferencias cuando las biopelículas son agitadas 1 minuto inmersos en la solución de PBS ( $p=0,000$ ). En cambio, esas diferencias significativas no se observan al comparar los valores obtenidos con o sin agitación de las biopelículas durante 1 minuto sumergidos tanto en EO, CPC o CHX ( $p>0,05$  en todos los casos).

**Tabla 6. Diferencia de medias al comparar el efecto conjunto de los tratamientos, mecánico y químico, en la vitalidad de *A. actinomycetemcomitans* incluida en las biopelículas, independientemente del material implantario, con un valor de N=72 (nº de muestras estudiadas). Unidad de medida: unidades formadoras de colonia por mililitro.**

Agitación			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>	
						Límite inferior	Límite superior
<b>No</b>	PBS	EO	6834722,222*	1219,223	0,000	3567,349	10102,096
		CPC	6815577,778*	1219,223	0,000	3548,204	10082,951
		CHX	6909100,000*	1219,223	0,000	3641,726	10176,474
	EO	PBS	-6834722,222*	1219,223	0,000	(10102,096)	(3567,349)
		CPC	(19,144)	1219,223	1,000	(3286,518)	3248,229
		CHX	74,378	1219,223	1,000	(3192,996)	3341,751
	CPC	PBS	-6815577,778*	1219,223	0,000	(10082,951)	(3548,204)
		EO	19,144	1219,223	1,000	(3248,229)	3286,518
		CHX	93,522	1219,223	1,000	(3173,851)	3360,896
	CHX	PBS	-6909100,000*	1219,223	0,000	(10176,474)	(3641,726)
		EO	(74,378)	1219,223	1,000	(3341,751)	3192,996
		CPC	(93,522)	1219,223	1,000	(3360,896)	3173,851
<b>Si</b>	PBS	EO	17,656	1219,223	1,000	(3249,718)	3285,029
		CPC	67,061	1219,223	1,000	(3200,312)	3334,435
		CHX	82,574	1219,223	1,000	(3184,799)	3349,948
	EO	PBS	(17,656)	1219,223	1,000	(3285,029)	3249,718
		CPC	49,406	1219,223	1,000	(3217,968)	3316,779
		CHX	64,919	1219,223	1,000	(3202,455)	3332,292
	CPC	PBS	(67,061)	1219,223	1,000	(3334,435)	3200,312
		EO	(49,406)	1219,223	1,000	(3316,779)	3217,968
		CHX	15,513	1219,223	1,000	(3251,860)	3282,887
	CHX	PBS	(82,574)	1219,223	1,000	(3349,948)	3184,799
		EO	(64,919)	1219,223	1,000	(3332,292)	3202,455
		CPC	(15,513)	1219,223	1,000	(3282,887)	3251,860
<b>Basadas en las medias marginales estimadas.</b>							
<b>*. La diferencia de medias es significativa al nivel</b>							
<b>b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.</b>							
<b>Variable dependiente: <i>A. actinomycetemcomitans</i> (UFC/mL)</b>							

Llevando a cabo el estudio del efecto de las tres variables presentadas: el material de implante dental (titanio o zirconio) y las dos variables de tratamiento (mecánico y químico), se observó lo siguiente:

- En las biopelículas generadas tanto en titanio como en zirconio, al comparar el valor de UFC/mL viables de *A. actinomycetemcomitans* no

---

sometidos a agitación con los sometidos a agitación cuando se encuentran expuestos por inmersión durante 1 minuto en la solución control PBS, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,000$ , respectivamente). Sin embargo, en la misma situación pero con las biopelículas expuestas a las tres soluciones con efecto antimicrobiano (EO, CPC y CHX), no se encuentran diferencias significativas ( $p>0,05$ ).

- En las biopelículas generadas tanto en titanio como en zirconio, al comparar el valor de UFC/mL viables de *A. actinomycetemcomitans* no sometidos a agitación, se encontraron diferencias significativas del efecto del PBS frente a las soluciones con efecto antimicrobiano (Tabla 7;  $p=0,001$  en todos los casos), sin observarse diferencias de los tres colutorios entre si (Tabla 7;  $p=1,000$ ). En cambio, cuando las biopelículas fueron sometidas a agitación, ni en titanio ni en zirconio se encontraron diferencias significativas en el valor de UFC/mL de *A. actinomycetemcomitans* al comparar el efecto del PBS frente a las soluciones con efecto antimicrobiano (Tabla 7;  $p=0,001$  en todos los casos), ni de los tres colutorios entre si (Tabla 7;  $p=1,000$ ).

Tabla 7. Diferencia de medias al comparar el efecto conjunto de las tres variables presentadas, como son el material de implante dental, titanio o zirconio, y las dos variables de tratamiento mecánico y químico, en la vitalidad de *A. actinomycetemcomitans* incluida en las biopelículas, con un valor de N=72 (nº de muestras estudiadas). Unidad de medida: unidades formadoras de colonia por mililitro.

Material				Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>	
							Límite inferior	Límite superior
Titanio	No	PBS	EO	6770888,889*	1724,242	0,001	2150,125	11391,653
			CPC	6650111,111*	1724,242	0,001	2029,347	11270,875
			CHX	6873444,444*	1724,242	0,001	2252,681	11494,208
		EO	PBS	-6770888,889*	1724,242	0,001	(11391,653)	(2150,125)
			CPC	(120,778)	1724,242	1,000	(4741,542)	4499,986
			CHX	102,556	1724,242	1,000	(4518,208)	4723,319
		CPC	PBS	-6650111,111*	1724,242	0,001	(11270,875)	(2029,347)
			EO	120,778	1724,242	1,000	(4499,986)	4741,542
			CHX	223,333	1724,242	1,000	(4397,431)	4844,097
		CHX	PBS	-6873444,444*	1724,242	0,001	(11494,208)	(2252,681)
			EO	(102,556)	1724,242	1,000	(4723,319)	4518,208
			CPC	(223,333)	1724,242	1,000	(4844,097)	4397,431
	Si	PBS	EO	26,067	1724,242	1,000	(4594,697)	4646,831
			CPC	114,600	1724,242	1,000	(4506,164)	4735,364
			CHX	141,922	1724,242	1,000	(4478,842)	4762,686
		EO	PBS	(26,067)	1724,242	1,000	(4646,831)	4594,697
			CPC	88,533	1724,242	1,000	(4532,231)	4709,297
			CHX	115,856	1724,242	1,000	(4504,908)	4736,619
		CPC	PBS	(114,600)	1724,242	1,000	(4735,364)	4506,164
			EO	(88,533)	1724,242	1,000	(4709,297)	4532,231
			CHX	27,322	1724,242	1,000	(4593,442)	4648,086
		CHX	PBS	(141,922)	1724,242	1,000	(4762,686)	4478,842
			EO	(115,856)	1724,242	1,000	(4736,619)	4504,908
			CPC	(27,322)	1724,242	1,000	(4648,086)	4593,442
Zirconio	No	PBS	EO	6898555,556*	1724,242	0,001	2277,792	11519,319
			CPC	6981044,444*	1724,242	0,001	2360,281	11601,808
			CHX	6944755,556*	1724,242	0,001	2323,992	11565,519
		EO	PBS	-6898555,556*	1724,242	0,001	(11519,319)	(2277,792)
			CPC	82,489	1724,242	1,000	(4538,275)	4703,253
			CHX	46,200	1724,242	1,000	(4574,564)	4666,964
		CPC	PBS	-6981044,444*	1724,242	0,001	(11601,808)	(2360,281)
			EO	(82,489)	1724,242	1,000	(4703,253)	4538,275
			CHX	(36,289)	1724,242	1,000	(4657,053)	4584,475
		CHX	PBS	-6944755,556*	1724,242	0,001	(11565,519)	(2323,992)
			EO	(46,200)	1724,242	1,000	(4666,964)	4574,564
			CPC	36,289	1724,242	1,000	(4584,475)	4657,053
	Si	PBS	EO	9,244	1724,242	1,000	(4611,519)	4630,008
			CPC	19,522	1724,242	1,000	(4601,242)	4640,286
			CHX	23,227	1724,242	1,000	(4597,537)	4643,991
		EO	PBS	(9,244)	1724,242	1,000	(4630,008)	4611,519
			CPC	10,278	1724,242	1,000	(4610,486)	4631,042
			CHX	13,982	1724,242	1,000	(4606,782)	4634,746
	CPC	PBS	(19,522)	1724,242	1,000	(4640,286)	4601,242	

		EO	(10,278)	1724,242	1,000	(4631,042)	4610,486
		CHX	3,704	1724,242	1,000	(4617,059)	4624,468
	CHX	PBS	(23,227)	1724,242	1,000	(4643,991)	4597,537
		EO	(13,982)	1724,242	1,000	(4634,746)	4606,782
		CPC	(3,704)	1724,242	1,000	(4624,468)	4617,059
<b>Basadas en las medias marginales estimadas.</b>							
<b>*. La diferencia de medias es significativa al nivel</b>							
<b>b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.</b>							
<b>Variable dependiente: <i>A. actinomycetemcomitans</i> (UFC/mL)</b>							

Cuando se comparó el valor de UFC/mL viables de *A. actinomycetemcomitans* entre las biopelículas de titanio *versus* zirconio no sometidas a agitación, tras el tratamiento químico con PBS, EO, CPC o CHX/CPC, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Igualmente no se observaron diferencias cuando las biopelículas de ambos materiales sumergidos en la solución correspondiente (PBS, EO, CPC o CHX/CPC), se agitaron durante 1 minuto ( $p > 0,05$ ).

Al utilizar un modelo de regresión lineal múltiple para determinar el efecto del material ajustando por agitación y colutorio aplicado, no se observaron diferencias significativas para el material ( $p = 0,843$ ) y sí para la agitación ( $p = 0,003$ ) y los colutorios aplicados ( $p = 0,000$ ).

---

## **6.2 Respuesta de la especie bacteriana *P. gingivalis***

Se ha estudiado la respuesta de la bacteria *P. gingivalis* incorporada en una biopelícula multi-especie a tres variables concretas, tanto de forma independiente como asociadas:

1. Material de implante sobre el que se origina la biopelícula.
2. Tratamiento mecánico de agitación.
3. Tratamiento químico en forma de agentes antimicrobianos formulados como colutorios.

La respuesta se ha expresado como número de unidades formadoras de colonias viables en la biopelícula (UFC/mL).

Estudiando el efecto del material de implante, independientemente del efecto derivado de los tratamientos mecánico y químico aplicados, se puede afirmar que para la bacteria *P. gingivalis*, con un número de muestras  $N=72$  ( $n^{\circ}$  de muestras estudiadas), cuando se compararon las biopelículas de los materiales titanio y zirconio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de bacterias viables ( $p=0,200$ ) (Figura 6).

Cuando se estudió el efecto del tratamiento mecánico (agitación), independientemente del efecto derivado del tratamiento químico y del material implantario, con un valor de  $N=72$ , se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,000$ ) al comparar el número de bacterias viables de *P. gingivalis* en una biopelícula no sometida a agitación frente a una sí sujeta a agitación contante durante 1 minuto (Figura 7).

En el caso del tratamiento químico, cuando se estudió su efecto con independencia

---

del tratamiento mecánico y del material utilizado, con un valor de N=72 se observaron diferencias estadísticamente significativas para el valor de UFC/mL viables al estudiar el efecto químico de los agentes antimicrobianos sobre esta bacteria tras la exposición a EO durante 1 minuto frente al control en PBS. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas cuando se compararon entre sí los efectos de los diferentes principios activos (Tabla 8; p=1,000 en todos los casos) (Figura 8).

La Tabla 8 muestra los valores medios obtenidos para la bacteria *P. gingivalis*, expresados como unidades formadoras de colonias viables por mililitro, en biopelículas multi-especie generadas en dos tipos de materiales, titanio y zirconio, sometidas a una agitación constante de 90 rpm o en ausencia de ella, tras la exposición por inmersión durante 1 min en buffer fosfato salino (PBS) como control y en tres tipos de agentes antibacterianos: Clorhexidina y Cloruro de cetilpiridinio (CHX) aceites esenciales (EO) y cloruro de cetilperidinio (CPC).

Tabla 8. Número de unidades formadoras de colonias viables por mililitro de *Porphyromonas gingivalis*, en biopelículas multi-especie generadas en dos tipos de materiales, titanio y zirconio, sometidas a una agitación constante de 90 rpm o en ausencia de ella, tras la exposición por inmersión durante 1 min en buffer fosfato salino (PBS) como control y en tres tipos de agentes antibacterianos: Clorhexidina y Cloruro de cetilpiridinio (CHX) aceites esenciales (EO) y cloruro de cetilperidinio (CPC). N=9 en cada caso.

Material			Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Titanio	No	PBS	8,7E+07	8849507,868	69600847,858	104621374,364
		EO	8,9E+06	8849507,868	-8589152,142	26431374,364
		CPC	1,3E+07	8849507,868	-4368041,031	30652485,475
		CHX	3,2E+06	8849507,868	-14283596,586	20736929,920
	Si	PBS	3,1E+06	8849507,868	-14365818,809	20654707,697
		EO	1,0E+06	8849507,868	-16484707,697	18535818,809
		CPC	5,9E+05	8849507,868	-16925152,142	18095374,364
		CHX	1,5E+05	8849507,868	-17362485,475	17658041,031
Zirconio	No	PBS	1,4E+08	8849507,868	117600847,858	152621374,364
		EO	1,1E+07	8849507,868	-6754707,697	28265818,809
		CPC	9,6E+06	8849507,868	-7896041,031	27124485,475
		CHX	5,7E+06	8849507,868	-11807707,697	23212818,809
	Si	PBS	1,1E+06	8849507,868	-16379152,142	18641374,364
		EO	3,1E+05	8849507,868	-17195707,697	17824818,809
		CPC	1,7E+05	8849507,868	-17337496,586	17683029,920
		CHX	1,2E+05	8849507,868	-17392329,920	17628196,586

Si se dirige el estudio hacia los materiales de las dos superficies implantarias (titanio y zirconio) y de manera independiente se estudia el efecto de cada una de las dos variables de tratamiento (mecánico y químico) se hacen las siguientes observaciones:

- Respecto al efecto del tratamiento mecánico por agitación en la vitalidad de la bacteria *P. gingivalis* en las biopelículas, independientemente del tratamiento químico, se observaron diferencias significativas cuando se comparó el valor de UFC/mL viables sin aplicar agitación frente a la aplicación de la misma tanto en

---

titanio ( $p=0,000$ ), como en zirconio ( $p=0,000$ ). Al comparar el valor de UFC/mL viables de *P. gingivalis* de las biopelículas formadas en los dos materiales, titanio *versus* zirconio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de bacterias viables sin agitar o agitando durante 1 minuto ( $p=0,053$  y  $p=0,900$ , respectivamente).

- Respecto al efecto del tratamiento químico en la vitalidad de la bacteria *P. gingivalis*, independientemente del tratamiento mecánico, se observaron diferencias significativas tanto en titanio como en zirconio (Tabla 9;  $p=0,000$   $p<0,005$  en todos los casos) al comparar el número de bacterias viables del control con los resultados obtenidos tras el tratamiento con EO, CPC o CXH. No se observaron diferencias significativas al comparar el efecto de los tres principios activos entre sí (Tabla 9;  $p=1,00$  en todos los casos). Cuando se comparó el valor de UFC/mL de *P. gingivalis* en las biopelículas formadas en los dos materiales (titanio *versus* zirconio) para cada uno de los tratamientos químicos aplicados, se encontraron únicamente diferencias significativas cuando se expusieron a PBS ( $p=0,010$ ). No se detectaron diferencias cuando se expusieron a EO, CPC o CHX/CPC ( $p>0,05$  en todas las ocasiones).

**Tabla 9. Diferencia de medias al comparar el efecto del tratamiento químico en la vitalidad de *P. gingivalis* incluida en los biopelículas de titanio y zirconio, independientemente del tratamiento mecánico, con un valor de N=72 (nº de muestras estudiadas). Unidad de medida: unidades formadoras de colonia por mililitro.**

Material			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>	
						Límite inferior	Límite superior
<b>Titanio</b>	PBS	EO	40154444,444*	8849,508	0,000	16438,818	63870,071
		CPC	38264111,111*	8849,508	0,000	14548,484	61979,738
		CHX	43440555,556*	8849,508	0,000	19724,929	67156,182
	EO	PBS	-40154444,444*	8849,508	0,000	(63870,071)	(16438,818)
		CPC	(1890,333)	8849,508	1,000	(25605,960)	21825,294
		CHX	3286,111	8849,508	1,000	(20429,516)	27001,738
	CPC	PBS	-38264111,111*	8849,508	0,000	(61979,738)	(14548,484)
		EO	1890,333	8849,508	1,000	(21825,294)	25605,960
		CHX	5176,444	8849,508	1,000	(18539,182)	28892,071
	CHX	PBS	-43440555,556*	8849,508	0,000	(67156,182)	(19724,929)
		EO	(3286,111)	8849,508	1,000	(27001,738)	20429,516
		CPC	(5176,444)	8849,508	1,000	(28892,071)	18539,182
<b>Zirconio</b>	PBS	EO	62586055,556*	8849,508	0,000	38870,429	86301,682
		CPC	627616,667*	8849,508	0,000	39511,990	86943,244
		CHX	65210866,667*	8849,508	0,000	41495,240	88926,494
	EO	PBS	-62586055,556*	8849,508	0,000	(86301,682)	(38870,429)
		CPC	641,561	8849,508	1,000	(23074,066)	24357,188
		CHX	2624,811	8849,508	1,000	(21090,816)	26340,438
	CPC	PBS	-63227616,667*	8849,508	0,000	(86943,244)	(39511,990)
		EO	(641,561)	8849,508	1,000	(24357,188)	23074,066
		CHX	1983,250	8849,508	1,000	(21732,377)	25698,877
	CHX	PBS	-65210866,667*	8849,508	0,000	(88926,494)	(41495,240)
		EO	(2624,811)	8849,508	1,000	(26340,438)	21090,816
		CPC	(1983,250)	8849,508	1,000	(25698,877)	21732,377
<b>Basadas en las medias marginales estimadas.</b>							
<b>*. La diferencia de medias es significativa al nivel</b>							
<b>b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.</b>							
<b>Variable dependiente: <i>P. gingivalis</i> (UFC/mL)</b>							

- Si se observa el efecto conjunto de los tratamientos mecánico y químico en la vitalidad de la bacteria *P. gingivalis* en las biopelículas (en cuanto al valor de UFC/mL viables de *P. gingivalis*), independientemente del material utilizado, podemos comprobar que cuando las biopelículas no fueron sometidas a agitación y se comparó el valor obtenido al tratarlas por inmersión durante 1 minuto con PBS como control frente a los tres colutorios utilizados (EO, CPC y CHX/CPC) se observaron diferencias significativas en los tres casos (Tabla 10; p=0,000). Sin

---

embargo, no se observaron diferencias cuando se compararon los efectos derivados de los tres colutorios con efecto antibacteriano entre sí (Tabla 10;  $p=1,000$ ). Cuando las biopelículas sí fueron sometidas a agitación no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los análisis (Tabla 10;  $p>0,05$  en todos los casos).

Al estudiar el efecto de cada tratamiento químico sometido o no a agitación, sólo se observaron diferencias cuando se compararon los valores de UFC/mL de *P. gingivalis* entre las biopelículas no sometidas a agitación sumergidas en PBS ( $p=0,000$ ). Sin embargo, esas diferencias significativas no se observaron al comparar los valores obtenidos al someter o no a agitación durante 1 minuto las biopelículas sumergidas en EO, CPC o CHX ( $p>0,05$  en todos los casos).

**Tabla 10. Diferencia de medias al comparar el efecto conjunto de los tratamientos, mecánico y químico, en la vitalidad de *P. gingivalis* incluida en las biopelículas, independientemente del material implantario, con un valor de N=72 (nº de muestras estudiadas). Unidad de medida: unidades formadoras de colonia por mililitro.**

Agitación			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>	
						Límite inferior	Límite superior
<b>No</b>	PBS	EO	16341594,444*	2928,087	0,000	8494,669	24188,520
		CPC	15690827,778*	2928,087	0,000	7843,902	23537,753
		CHX	16443238,889*	2928,087	0,000	8596,313	24290,165
	EO	PBS	-16341594,444*	2928,087	0,000	(24188,520)	(8494,669)
		CPC	(650,767)	2928,087	1,000	(8497,692)	7196,159
		CHX	101,644	2928,087	1000	(7745,281)	7948,570
	CPC	PBS	-15690827,778*	2928,087	0,000	(23537,753)	(7843,902)
		EO	650,767	2928,087	1,000	(7196,159)	8497,692
		CHX	752,411	2928,087	1,000	(7094,515)	8599,337
	CHX	PBS	-16443238,889*	2928,087	0,000	(24290,165)	(8596,313)
		EO	(101,644)	2928,087	1,000	(7948,570)	7745,281
		CPC	(752,411)	2928,087	1,000	(8599,337)	7094,515
<b>Si</b>	PBS	EO	111,128	2928,087	1,000	(7735,798)	7958,053
		CPC	135,152	2928,087	1,000	(7711,774)	7982,077
		CHX	131,061	2928,087	1,000	(7715,865)	7977,987
	EO	PBS	(111,128)	2928,087	1,000	(7958,053)	7735,798
		CPC	24,024	2928,087	1,000	(7822,902)	7870,950
		CHX	19,933	2928,087	1,000	(7826,992)	7866,859
	CPC	PBS	(135,152)	2928,087	1,000	(7982,077)	7711,774
		EO	(24,024)	2928,087	1,000	(7870,950)	7822,902
		CHX	(4,091)	2928,087	1,000	(7851,016)	7842,835
	CHX	PBS	(131,061)	2928,087	1,000	(7977,987)	7715,865
		EO	(19,933)	2928,087	1,000	(7866,859)	7826,992
		CPC	4,091	2928,087	1,000	(7842,835)	7851,016
<b>Basadas en las medias marginales estimadas.</b>							
<b>*. La diferencia de medias es significativa al nivel</b>							
<b>b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.</b>							
<b>Variable dependiente: : <i>P. gingivalis</i> (CFU/mL)</b>							

Llevando a cabo el estudio del efecto de las tres variables presentadas: el material de implante dental (titanio o zirconio) y las dos variables de tratamiento (mecánico y químico), se observaron diferencias significativas ( $p=0,000$ ) en titanio y zirconio cuando se comparó el valor de UFC/mL viables no sometidas a agitación con las sometidas a agitación cuando se encuentran sumergidas en solución control PBS. No se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) cuando las

---

biopelículas fueron expuestas a las tres soluciones con efecto antimicrobiano (EO, CPC y CHX/CPC). Cuando comparó el efecto PBS frente a las soluciones con efecto antimicrobiano se encontraron diferencias significativas en las biopelículas sometidas a agitación (Tabla 11;  $p=0,001$  en todos los casos), mientras que no se encontraron en las biopelículas no sometidas a agitación (Tabla 11;  $p=0,001$  en todos los casos). Tampoco se observaron diferencias entre los tres colutorios (Tabla 11;  $p=1,000$ ).

**Tabla 11. Diferencia de medias al comparar el efecto conjunto de las tres variables presentadas, como son el material de implante dental, titanio o zirconio, y las dos variables de tratamiento mecánico y químico, en la vitalidad de *P. gingivalis* incluida en las biopelículas, con un valor de N=72 (nº de muestras estudiadas). Unidad de medida: unidades formadoras de colonia por mililitro.**

Material				Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>	
							Límite inferior	Límite superior
<b>Titanio</b>	No	PBS	EO	78190000,000*	12515,094	0,000	44651,039	111728,961
			CPC	73968888,889*	12515,094	0,000	40429,928	107507,850
			CHX	83884444,444*	12515,094	0,000	50345,483	117423,406
		EO	PBS	-78190000,000*	12515,094	0,000	(111728,961)	(44651,039)
			CPC	(4221,111)	12515,094	1,000	(37760,072)	29317,850
			CHX	5694,444	12515,094	1,000	(27844,517)	39233,406
		CPC	PBS	-73968888,889*	12515,094	0,000	(107507,850)	(40429,928)
			EO	4221,111	12515,094	1,000	(29317,850)	37760,072
			CHX	9915,556	12515,094	1,000	(23623,406)	43454,517
		CHX	PBS	-83884444,444*	12515,094	0,000	(117423,406)	(50345,483)
			EO	(5694,444)	12515,094	1,000	(39233,406)	27844,517
			CPC	(9915,556)	12515,094	1,000	(43454,517)	23623,406
	Si	PBS	EO	2118,889	12515,094	1,000	(31420,072)	35657,850
			CPC	2559,333	12515,094	1,000	(30979,628)	36098,294
			CHX	2996,667	12515,094	1,000	(30542,294)	36535,628
		EO	PBS	(2118,889)	12515,094	1,000	(35657,850)	31420,072
			CPC	440,444	12515,094	1,000	(33098,517)	33979,406
			CHX	877,778	12515,094	1,000	(32661,183)	34416,739
		CPC	PBS	(2559,333)	12515,094	1,000	(36098,294)	30979,628
			EO	(440,444)	12515,094	1,000	(33979,406)	33098,517
			CHX	437,333	12515,094	1,000	(33101,628)	33976,294
		CHX	PBS	(2996,667)	12515,094	1,000	(36535,628)	30542,294
			EO	(877,778)	12515,094	1,000	(34416,739)	32661,183
			CPC	(437,333)	12515,094	1,000	(33976,294)	33101,628
<b>Zirco- nio</b>	No	PBS	EO	124355555,556*	12515,094	0,000	90816,594	157894,517
			CPC	125496888,889*	12515,094	0,000	91957,928	159035,850
			CHX	129408555,556*	12515,094	0,000	95869,594	162947,517
		EO	PBS	-124355555,556*	12515,094	0,000	(157894,517)	(90816,594)
			CPC	1141,333	12515,094	1,000	(32397,628)	34680,294
			CHX	5053,000	12515,094	1,000	(28485,961)	38591,961
		CPC	PBS	-125496888,889*	12515,094	0,000	(159035,850)	(91957,928)
			EO	(1141,333)	12515,094	1,000	(34680,294)	32397,628
			CHX	3911,667	12515,094	1,000	(29627,294)	37450,628
		CHX	PBS	-129408555,556*	12515,094	0,000	(162947,517)	(95869,594)
			EO	(5053,000)	12515,094	1,000	(38591,961)	28485,961
			CPC	(3911,667)	12515,094	1,000	(37450,628)	29627,294
	Si	PBS	EO	816,556	12515,094	1,000	(32722,406)	34355,517
			CPC	958,344	12515,094	1,000	(32580,617)	34497,306
			CHX	1013,178	12515,094	1,000	(32525,783)	34552,139
		EO	PBS	(816,556)	12515,094	1,000	(34355,517)	32722,406
			CPC	141,789	12515,094	1,000	(33397,172)	33680,750
			CHX	196,622	12515,094	1,000	(33342,339)	33735,583
		CPC	PBS	(958,344)	12515,094	1,000	(34497,306)	32580,617

		EO	(141,789)	12515,094	1,000	(33680,750)	33397,172
		CHX	54,833	12515,094	1,000	(33484,128)	33593,794
	CHX	PBS	(1013,178)	12515,094	1,000	(34552,139)	32525,783
		EO	(196,622)	12515,094	1,000	(33735,583)	33342,339
		CPC	(54,833)	12515,094	1,000	(33593,794)	33484,128
<b>Basadas en las medias marginales estimadas.</b>							
<b>*. La diferencia de medias es significativa al nivel</b>							
<b>b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.</b>							
<b>Variable dependiente: : <i>P. gingivalis</i> (UFC/mL)</b>							

Cuando se comparó el valor de UFC/mL viables de *P. gingivalis* entre las biopelículas de titanio *versus* zirconio tras el tratamiento químico sin agitación se encontraron diferencias significativas en las sumergidas en PBS ( $p=0,000$ ), no encontrándose estas diferencias para EO, CPC o CHX ( $p>0,05$ ). No se observaron diferencias cuando las biopelículas de ambos materiales sumergidos en la solución correspondiente (PBS, EO, CPC o CHX/CPC), se agitaron durante 1 minuto ( $p>0,05$ ).

Si utilizamos un modelo de regresión lineal múltiple para determinar el efecto del material ajustando por agitación y colutorio aplicado, no observamos diferencias significativas para el material ( $p=0,360$ ) y si para la agitación ( $p=0,000$ ) y los colutorios aplicados ( $p=0,000$ ).

---

### **6.3 Respuesta de la especie bacteriana *F. nucleatum***

Se ha estudiado la respuesta de *F. nucleatum* incorporada en una biopelícula multi-especie a tres variables concretas, tanto de forma independiente como asociadas:

1. Material de implante sobre el que se origina la biopelícula.
2. Tratamiento mecánico de agitación.
3. Tratamiento químico en forma de agentes antimicrobianos formulados como colutorios.

La respuesta se ha expresado como número de unidades formadoras de colonias viables en la biopelícula (UFC/mL).

Estudiando el efecto del material de implante, independientemente del efecto derivado de los tratamientos mecánico y químico aplicados, se puede afirmar que, para *F. nucleatum* con un número de muestras N=72 (nº de muestras estudiadas), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de bacterias viables ( $p=0,921$ ) cuando se compararon las biopelículas formadas sobre los dos materiales de implantes dentales, titanio y zirconio (Figura 6).

Cuando se estudió el efecto del tratamiento mecánico (agitación), independientemente del efecto derivado del tratamiento químico y del material de la superficie implantaria utilizada, con un valor de N=72, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,004$ ) al comparar el número de bacterias viables de *F. nucleatum* en una biopelícula no sometida a agitación frente a una sí sometida a agitación constante durante 1 minuto (Figura 7).

En el caso del tratamiento químico, cuando se estudió su efecto con independencia del tratamiento mecánico y del material, con un valor de N=72 se observaron diferencias estadísticamente significativas para el valor de UFC/mL viables (Tabla

---

12;  $p=0,001$ ) al estudiar el efecto químico de los agentes antimicrobianos sobre esta bacteria tras la exposición durante 1 minuto a EO, CPC y CHX/CPC, frente al control en PBS. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas cuando se compararon entre sí los efectos de los diferentes principios activos (Tabla 12;  $p=1,000$  en todos los casos) (Figura 8).

La Tabla 12 muestra los valores medios obtenidos para *F. nucleatum*, expresados como unidades formadoras de colonias viables por mililitro, en biopelículas multi-especie generadas en dos tipos de materiales, titanio y zirconio, sometidas a una agitación constante de 90 rpm o en ausencia de ella, tras la exposición por inmersión durante 1 min en tampón fosfato salino (PBS) como control y en tres tipos de agentes antibacterianos: Clorhexidina y Cloruro de cetilpiridinio (CHX) aceites esenciales (EO) y cloruro de cetilperidinio (CPC).

Tabla 12. Número de unidades formadoras de colonias viables por mililitro de *Fusobacterium nucleatum*, en biopelículas multi-especie generadas en dos tipos de materiales, titanio y zirconio, sometidas a una agitación constante de 90 rpm o en ausencia de ella, tras la exposición por inmersión durante 1 min en buffer fosfato salino (PBS) como control y en tres tipos de agentes antibacterianos: Clorhexidina y Cloruro de cetilpiridinio (CHX) aceites esenciales (EO) y cloruro de cetilperidinio (CPC). N=9 en cada caso.

Material			Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Titanio	No	PBS	1,6E+07	2928087,489	10234056,418	21821499,137
		EO	1,4E+05	2928087,489	-5655165,804	5932276,915
		CPC	5,7E+05	2928087,489	-5227432,471	6360010,249
		CHX	3,9E+04	2928087,489	-5754376,915	5833065,804
	Si	PBS	2,0E+05	2928087,489	-5595943,582	5991499,137
		EO	3,9E+04	2928087,489	-5754765,804	5832676,915
		CPC	9,8E+03	2928087,489	-5783932,471	5803510,249
		CHX	1,8E+04	2928087,489	-5775388,026	5812054,693
Zirconio	No	PBS	1,7E+07	2928087,489	11128500,863	22715943,582
		EO	1,3E+05	2928087,489	-5665465,804	5921976,915
		CPC	1,0E+06	2928087,489	-4791665,804	6795776,915
		CHX	2,4E+04	2928087,489	-5769543,582	5817899,137
	Si	PBS	8,9E+04	2928087,489	-5705065,804	5882376,915
		EO	2,5E+04	2928087,489	-5768499,137	5818943,582
		CPC	6,3E+03	2928087,489	-5787380,249	5800062,471
		CHX	6,0E+03	2928087,489	-5787743,582	5799699,137

Si se dirige el estudio hacia los dos materiales de implante dental, titanio y zirconio, y de manera independiente se estudia el efecto de cada una de las dos variables de tratamientos (mecánico y químico) se hacen las siguientes observaciones:

- Respecto al efecto del tratamiento mecánico por agitación en la vitalidad de *F. nucleatum* en las biopelículas, independientemente del tratamiento químico, se observaron diferencias significativas cuando se comparó el valor de UFC/mL viables sin aplicar agitación frente a la aplicación de la misma tanto en el titanio ( $p=0,048$ ), como en el zirconio ( $p=0,032$ ). Al comparar el valor de UFC/mL viables de *F. nucleatum* de las biopelículas formadas en los dos materiales, titanio versus

---

zirconio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas sin agitación ( $p=0,875$ ) o agitando durante 1 minuto ( $p=0,987$ ).

- Respecto al efecto del tratamiento químico en la vitalidad de *F. nucleatum*, independientemente del tratamiento mecánico, se observaron diferencias significativas en titanio al comparar el valor de UFC/mL viables del control con el resultado obtenido tras el tratamiento con EO y CHX. No se encontraron diferencias al comparar el control con CPC (Tabla 13;  $p<0,05$  en los dos casos). También se observaron diferencias significativas en el zirconio cuando se comparó el valor de UFC/mL del control frente al resultado obtenido tras el tratamiento con EO, CPC y CHX/CPC (Tabla 13;  $p<0,005$  en todos los casos). No se observaron diferencias significativas cuando se comparó el efecto de los tres principios activos entre sí tanto en titanio como zirconio (Tabla 13;  $p=1,00$  en todos los casos). Cuando se comparó el valor de UFC/mL viables de *F. nucleatum* en titanio *versus* zirconio, para cada uno de los tratamientos químicos aplicados (PBS, EO, CPC o CHX/CPC), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$  en todas las ocasiones).

**Tabla 13. Diferencia de medias al comparar el efecto del tratamiento químico en la vitalidad de *F. nucleatum* incluida en las biopelículas de titanio y zirconio, independientemente del tratamiento mecánico, con un valor de N=72 (nº de muestras estudiadas). Unidad de medida: unidades formadoras de colonia por mililitro.**

Material			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>	
						Límite inferior	Límite superior
Titanio	PBS	EO	8024022,222*	2928,087	0,042	177,097	15870,948
		CPC	7824,739	2928,087	0,051	(22,187)	15671,665
		CHX	8083938,889*	2928,087	0,040	237,013	15930,865
	EO	PBS	-8024022,222*	2928,087	0,042	(15870,948)	(177,097)
		CPC	(199,283)	2928,087	0,000	(8046,209)	7647,642
		CHX	59,917	2928,087	1,000	(7787,009)	7906,842
	CPC	PBS	(7824,739)	2928,087	0,051	(15671,665)	22,187
		EO	199,283	2928,087	1,000	(7647,642)	8046,209
		CHX	259,200	2928,087	1,000	(7587,726)	8106,126
	CHX	PBS	-8083938,889*	2928,087	0,040	(15930,865)	(237,013)
		EO	(59,917)	2928,087	1,000	(7906,842)	7787,009
		CPC	(259,200)	2928,087	1,000	(8106,126)	7587,726
Zirconio	PBS	EO	8428700,000*	2928,087	0,028	581,774	16275,626
		CPC	8001240,556*	2928,087	0,043	154,315	15848,166
		CHX	8490361,111*	2928,087	0,026	643,435	16337,287
	EO	PBS	-8428700,000*	2928,087	0,028	(16275,626)	(581,774)
		CPC	(427,459)	2928,087	1,000	(8274,385)	7419,466
		CHX	61,661	2928,087	1,000	(7785,265)	7908,587
	CPC	PBS	-8001240,556*	2928,087	0,043	(15848,166)	(154,315)
		EO	427,459	2928,087	1,000	(7419,466)	8274,385
		CHX	489,121	2928,087	1,000	(7357,805)	8336,046
	CHX	PBS	-8490361,111*	2928,087	0,026	(16337,287)	(643,435)
		EO	(61,661)	2928,087	1,000	(7908,587)	7785,265
		CPC	(489,121)	2928,087	1,000	(8336,046)	7357,805
<b>Basadas en las medias marginales estimadas.</b>							
<b>*. La diferencia de medias es significativa al nivel</b>							
<b>b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.</b>							
<b>Variable dependiente: <i>F. nucleatum</i> (UFC/mL)</b>							

- Respecto al efecto conjunto de los tratamientos mecánico y químico en la vitalidad de la bacteria *F. nucleatum* en cuanto al valor de UFC/mL viables en las biopelículas, independientemente de la superficie implantaria utilizada se observó que cuando las biopelículas no fueron sometidas a agitación y se comparó el valor obtenido al tratarlas por inmersión durante 1 minuto con PBS como control frente

---

a los tres colutorios utilizados (EO, CPC y CHX/CPC) se observaron diferencias significativas en los tres casos (Tabla 14;  $p=0,000$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas cuando se sometieron a agitación (Tabla 14;  $p=0,000$ ), ni cuando se compararon los efectos derivados de los tres colutorios entre sí, ya fuera con o sin agitación (Tabla 14;  $p=0,000$ ). Al comparar el efecto de cada tratamiento químico sometido o no a agitación, independientemente del material; Sólo se observaron diferencias cuando se compararon los valores de UFC/mL de *F. nucleatum* entre las biopelículas no sometidas a agitación con las biopelículas agitadas en la solución de PBS ( $p=0,000$ ). No se observaron diferencias al comparar los valores obtenidos de las biopelículas sumergidas en EO, CPC o CHX/CPC, ya fuera con o sin agitación ( $p>0,05$  en todos los casos).

**Tabla 14. Diferencia de medias al comparar el efecto conjunto de los tratamientos, mecánico y químico, en la vitalidad de *F. nucleatum* incluida en los biopelículas, independientemente del material implantario, con un valor de N=72 (nº de muestras estudiadas). Unidad de medida: unidades formadoras de colonia por mililitro.**

Agitación			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>	
No						Límite inferior	Límite superior
No	PBS	EO	16341594,444*	2928,087	0,000	8494,669	24188,520
		CPC	15690827,778*	2928,087	0,000	7843,902	23537,753
		CHX	16443238,889*	2928,087	0,000	8596,313	24290,165
	EO	PBS	-16341594,444*	2928,087	0,000	(24188,520)	(8494,669)
		CPC	(650,767)	2928,087	1,000	(8497,692)	7196,159
		CHX	101,644	2928,087	1,000	(7745,281)	7948,570
	CPC	PBS	-15690827,778*	2928,087	0,000	(23537,753)	(7843,902)
		EO	650,767	2928,087	1,000	(7196,159)	8497,692
		CHX	752,411	2928,087	1,000	(7094,515)	8599,337
	CHX	PBS	-16443238,889*	2928,087	0,000	(24290,165)	(8596,313)
		EO	(101,644)	2928,087	1,000	(7948,570)	7745,281
		CPC	(752,411)	2928,087	1,000	(8599,337)	7094,515
Si	PBS	EO	111,128	2928,087	1,000	(7735,798)	7958,053
		CPC	135,152	2928,087	1,000	(7711,774)	7982,077
		CHX	131,061	2928,087	1,000	(7715,865)	7977,987
	EO	PBS	(111,128)	2928,087	1,000	(7958,053)	7735,798
		CPC	24,024	2928,087	1,000	(7822,902)	7870,950
		CHX	19,933	2928,087	1,000	(7826,992)	7866,859
	CPC	PBS	(135,152)	2928,087	1,000	(7982,077)	7711,774
		EO	(24,024)	2928,087	1,000	(7870,950)	7822,902
		CHX	(4,091)	2928,087	1,000	(7851,016)	7842,835
	CHX	PBS	(131,061)	2928,087	1,000	(7977,987)	7715,865
		EO	(19,933)	2928,087	1,000	(7866,859)	7826,992
		CPC	4,091	2928,087	1,000	(7842,835)	7851,016
<b>Basadas en las medias marginales estimadas.</b>							
<b>*. La diferencia de medias es significativa al nivel</b>							
<b>b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.</b>							
<b>Variable dependiente: <i>F. nucleatum</i> (UFC/mL)</b>							

Al llevar a cabo el estudio del efecto de las tres variables presentadas (el material de implante dental, titanio o zirconio, y las dos variables de tratamiento mecánico y químico) se observaron diferencias significativas ( $p=0,000$ ) en las biopelículas generadas tanto en titanio como en zirconio, cuando se comparó el valor de UFC/mL viables de *F. nucleatum* no sometidas a agitación frente a la agitación con las sometidas a agitación, cuando se encuentran sumergidos en solución control

---

PBS. Cuando compararon de forma independiente se observaron diferencias significativas en las de biopelículas no sometidas a agitación (Tabla 15;  $p=0,001$  en todos los casos), mientras que no se observaron en las sometidas a la misma (Tabla 15;  $p=0,001$  en todos los casos). No se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) cuando las biopelículas fueron expuestas a las tres soluciones con efecto antimicrobiano (EO, CPC y CHX/CPC), ya fuera con o sin agitación ( $p>0,05$ ).

Cuando se comparó el valor de UFC/mL viables de *F. nucleatum* entre las biopelículas de titanio *versus* zirconio que no se sometieron a agitación, tras el tratamiento químico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para PBS, EO, CPC o CHX/CPC ( $p>0,05$ ). Asimismo, no se observaron diferencias cuando las biopelículas de ambos materiales sumergidos en la solución correspondiente (PBS, EO, CPC o CHX/CPC) se agitaron durante 1 minuto ( $p>0,05$ ).

Tabla 15. Diferencia de medias al comparar el efecto conjunto de las tres variables presentadas, como son el material de implante dental, titanio o zirconio, y las dos variables de tratamiento mecánico y químico, en la vitalidad de *F. nucleatum* incluida en las biopelículas, con un valor de N=72 (nº de muestras estudiadas). Unidad de medida: unidades formadoras de colonia por mililitro.

Material			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>b</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>b</sup>		
						Límite inferior	Límite superior	
Titanio	No	PBS	EO	15889222,222*	4140,941	0,001	4791,994	26986,451
			CPC	15461488,889*	4140,941	0,002	4364,260	26558,718
			CHX	15988433,333*	4140,941	0,001	4891,205	27085,662
		EO	PBS	-15889222,222*	4140,941	0,001	(26986,451)	(4791,994)
			CPC	(427,733)	4140,941	1,000	(11524,962)	10669,495
			CHX	99,211	4140,941	1,000	(10998,018)	11196,440
		CPC	PBS	-15461488,889*	4140,941	0,002	(26558,718)	(4364,260)
			EO	427,733	4140,941	1,000	(10669,495)	11524,962
			CHX	526,944	4140,941	1,000	(10570,284)	11624,173
		CHX	PBS	-15988433,333*	4140,941	0,001	(27085,662)	(4891,205)
			EO	(99,211)	4140,941	1,000	(11196,440)	10998,018
			CPC	(526,944)	4140,941	1,000	(11624,173)	10570,284
	Si	PBS	EO	158,822	4140,941	1,000	(10938,406)	11256,051
			CPC	187,989	4140,941	1,000	(10909,240)	11285,218
			CHX	179,444	4140,941	1,000	(10917,784)	11276,673
		EO	PBS	(158,822)	4140,941	1,000	(11256,051)	10938,406
			CPC	29,167	4140,941	1,000	(11068,062)	11126,395
			CHX	20,622	4140,941	1,000	(11076,606)	11117,851
		CPC	PBS	(187,989)	4140,941	1,000	(11285,218)	10909,240
			EO	(29,167)	4140,941	1,000	(11126,395)	11068,062
			CHX	(8,544)	4140,941	1,000	(11105,773)	11088,684
		CHX	PBS	(179,444)	4140,941	1,000	(11276,673)	10917,784
			EO	(20,622)	4140,941	1,000	(11117,851)	11076,606
			CPC	8,544	4140,941	1,000	(11088,684)	11105,773
Zirconio	No	PBS	EO	16793966,667*	4140,941	0,001	5696,738	27891,195
			CPC	15920166,667*	4140,941	0,001	4822,938	27017,395
			CHX	16898044,444*	4140,941	0,000	5800,816	27995,273
		EO	PBS	-16793966,667*	4140,941	0,001	(27891,195)	(5696,738)
			CPC	(873,800)	4140,941	1,000	(11971,029)	10223,429
			CHX	104,078	4140,941	1,000	(10993,151)	11201,306
		CPC	PBS	-15920166,667*	4140,941	0,001	(27017,395)	(4822,938)
			EO	873,800	4140,941	1,000	(10223,429)	11971,029
			CHX	977,878	4140,941	1,000	(10119,351)	12075,106
		CHX	PBS	-16898044,444*	4140,941	0,000	(27995,273)	(5800,816)
			EO	(104,078)	4140,941	1,000	(11201,306)	10993,151
			CPC	(977,878)	4140,941	1,000	(12075,106)	10119,351
	Si	PBS	EO	63,433	4140,941	1,000	(11033,795)	11160,662
			CPC	82,314	4140,941	1,000	(11014,914)	11179,543
			CHX	82,678	4140,941	1,000	(11014,551)	11179,906
		EO	PBS	(63,433)	4140,941	1,000	(11160,662)	11033,795
			CPC	18,881	4140,941	1,000	(11078,348)	11116,110
			CHX	19,244	4140,941	1,000	(11077,984)	11116,473

		CPC	PBS	(82,314)	4140,941	1,000	(11179,543)	11014,914
			EO	(18,881)	4140,941	1,000	(11116,110)	11078,348
			CHX	363	4140,941	1,000	(11096,865)	11097,592
		CHX	PBS	(82,678)	4140,941	1000	(11179,906)	11014,551
			EO	(19,244)	4140,941	1,000	(11116,473)	11077,984
			CPC	(363)	4140,941	1,000	(11097,592)	11096,865
<b>Basadas en las medias marginales estimadas.</b>								
<b>*. La diferencia de medias es significativa al nivel.</b>								
<b>b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.</b>								
<b>Variable dependiente: <i>F. nucleatum</i> (UFC/mL).</b>								

Al utilizar un modelo de regresión lineal múltiple para determinar el efecto del material ajustando por agitación y colutorio aplicado, no se observaron diferencias significativas para el material ( $p=0,926$ ) y sí para la agitación ( $p=0,007$ ) y los colutorios aplicados ( $p=0,001$ ).

---

## 7. Discusión

Los resultados de este estudio han mostrado que las especies bacterianas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, incluidas en una biopelícula multi-especies, responden de manera similar frente a los tratamientos antisépticos, independientemente de las posibles diferencias tanto de espesor, disposición de la matriz de polisacárido extracelular, como de organización celular bacteriana en la biopelícula, derivadas de las diferentes características de la superficie del material del implante. No se observaron diferencias significativas en el número de bacterias viables de las tres bacterias seleccionadas (UFC/mL viables) sobre las dos superficies de implantes cuando se comparó cada uno de los tratamientos antimicrobianos aplicados (CHX/CPC, EO y CPC) ya sea con o sin agitación. Asimismo, ambas biopelículas respondieron de forma similar al tratamiento mecánico, a pesar de la exposición a las soluciones antimicrobianas.

En primer lugar, los resultados del presente estudio apoyan las hipótesis descritas anteriormente por nuestro grupo de investigación, además de por otros autores (Sánchez y cols. 2014, Schmidlin y cols. 2013, Rimondini y cols. 2002, Oliveira y cols. 2013) que postulan que la colonización bacteriana es similar en el tiempo y en número de bacterias en diferentes materiales en estudio (en el caso del presente estudio, titanio y zirconio), basado en el recuento de UFC/mL de cada especie bacteriana. Sí se observaron divergencias en sus estructuras tridimensionales. En nuestro estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, y *F. nucleatum* si se comparaba el número de bacterias viables en las biopelículas formadas tanto en titanio como en zirconio. Zhao y colaboradores (Zhao y cols. 2014) observaron recientemente la ausencia de

---

diferencias significativas en la formación de biopelículas en las superficies de titanio, aleación de titanio-zirconio y óxido de zirconio, aunque sí encontraron una tendencia de este último a acumular más bacterias.

Previamente a la comparación del comportamiento de las bacterias en la biopelícula en ambas superficies de implante, se ha comprobado que las bacterias seleccionadas respondieron a los agentes antimicrobianos utilizados en el estudio, independientemente del efecto derivado del tratamiento mecánico y del material del implante. Se puede confirmar que la exposición a los agentes antimicrobianos basados en CHX/CPC, EO y CPC causan una reducción significativa en la viabilidad de las bacterias cuando se comparan con el grupo control (Pedrazzi y cols. 2014).

Tomando como referencia el material del implante y comparando susceptibilidad bacteriana a los agentes antisépticos (UFC/mL viables) en las biopelículas de las superficies de implantes de titanio frente a las superficies de zirconio, ya sea con o sin agitación constante, al comparar el número de bacterias viables para cada especie bacteriana, en ninguno de los casos (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, y *F. nucleatum*) se observaron diferencias significativas. Se pudo observar que los colutorios utilizados a base de clorhexidina fueron más eficaces, aunque en este caso tampoco se encontraron diferencias entre las tres especies bacterianas estudiadas al comparar el efecto en el número de bacterias viables de los diferentes antisépticos.

Estos resultados están de acuerdo con estudios anteriores *in vitro*. La acción antimicrobiana en la biopelícula peri-implantaria fue demostrada por Baffone y cols. (Baffone y cols. 2011). Según estos autores, los antisépticos basados en clorhexidina al 0,2%, aceites esenciales, fluoruro de estaño y hexetidina asociado

---

con metilparabeno, fueron eficaces en la reducción de la biopelícula peri-implantaria *in vitro*. Como ocurre en el presente estudio, la clorhexidina fue el agente más efectivo reduciendo bajo condiciones experimentales la biopelícula. También Erriu y cols. (2013) observaron el efecto antimicrobiano para *A. actinomycetemcomitans*, con colutorios con base de aceites esenciales y clorhexidina al 0,12%, siendo igualmente el antiséptico con clorhexidina el agente más eficaz. Pan y cols. (2010) describieron que, en un modelo dinámico de biopelícula oral, los aceites esenciales y la clorhexidina mostraban actividad antimicrobiana equivalente y fueron más eficaces que el CPC.

En cambio, en un modelo de biopelícula, la utilización de colutorios dos veces al día demostró que los aceites esenciales fueron más eficaces que los colutorios con fluoruro de estaño, una combinación de CPC/CHX y otro tipo de formulación de CPC (Pan y cols. 2010). Está comprobado que la eficacia de CPC/CHX y los aceites esenciales y CPC como colutorios frente a mucositis peri-implantaria.

Gosau y cols. (2010) evaluaron la reducción de la biopelícula en muestras de titanio fijados a aparatos dentales y encontraron que las sustancias antimicrobianas, tales como hipoclorito de sodio, peróxido de hidrogeno al 3%, digluconato de clorhexidina al 0,2% y aceites esenciales, eran capaces de reducir la viabilidad de las bacterias en la biopelícula en la superficie del implante de titanio, en comparación con la solución salina como control. Sin embargo, el ácido cítrico al 40% y CPC al 0,05% no eran eficaces en la reducción de la biopelícula. Ciancio y cols. (1995) demostraron que los colutorios de aceites esenciales, utilizándolos dos veces al día, fueron eficaces en la reducción de la placa y sangrado marginal en

---

comparación con el placebo, en pacientes con implantes dentales en terapia de mantenimiento.

Por otro lado, se ha podido comprobar que las biopelículas de los dos materiales empleados en el estudio responden por igual a la agitación, sin diferencias significativas entre las biopelículas de titanio *versus* zirconio. Este resultado indica que las biopelículas presentan la misma capacidad de resistencia al tratamiento mecánico, en este caso, la agitación.

Mientras que ambos tratamientos, químico y mecánico, proporcionan una reducción significativa en la presencia de bacterias vivas en la biopelícula sobre las dos superficies de los implantes, la combinación de los dos tratamientos no produjo beneficios significativos en la reducción de la vitalidad bacteriana. Trejo y cols. (2006), en un modelo de enfermedad peri-implantaria inducida, valoraron la acción coadyuvante antibacteriana unida al tratamiento con un método mecánico, dando resultados parecidos con otro tratamiento no mecánico para bolsas de 3-4 mm. El tratamiento mecánico con clorhexidina como agente químico en forma de spray o gel no muestra beneficio añadido comparado con el tratamiento mecánico solo (Heitz y cols. 2010), aunque los dos tratamientos ayudan en la reducción de la placa peri-implantaria (Porrás y cols. 2002, Thone y cols. 201). Renvert y cols. (2008) confirman que el uso complementario de enjuagues bucales antibacterianos mejora los tratamientos mecánicos, sin embargo la aplicación de la clohexidina como coadyuvante tiene efectos limitados tanto clínicos como microbiológicos (Renvert y cols. 2008).

---

## 8. Conclusiones

1. Para las especies bacterianas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de bacterias viables cuando se compararon sus respuestas en las biopelículas formadas sobre titanio y zirconio rugosos en un modelo de biopelícula *in vitro*, tras la exposición a tres colutorios antiplaca, ya fuera con o sin agitación.
2. Las bacterias incluidas en las biopelículas de titanio y zirconio en el modelo *in vitro* descrito respondieron de igual forma al tratamiento mecánico, a pesar de la exposición a las soluciones antisépticas.
3. El colutorio que contenía como principio activo clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%, ha resultado ser más eficaz que los basados en cloruro de cetilpiridinio solo y en aceites esenciales sin alcohol, en la reducción del número de bacterias viables en el modelo *in vitro* utilizado, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto de los antisépticos detallados al comparar el número de las bacterias viables tras la exposición de las biopelículas para ninguna de las especies bacterianas estudiadas.

---

## 9. Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor, David Herrera, por darme la oportunidad de estudiar en esta Facultad. Especial agradecimiento a María del Carmen Sánchez, ya que sin su ayuda y dedicación no habría sido posible realizar este trabajo, y a todo el personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología: Arancha Llama-Palacios, María José Marín, Ana O'Connor, Itziar González y Elena Figuro.

---

## 10. Bibliografía

Al-Radha AS, Dymock D, Younes C, O'Sullivan D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent*, 2012;40:146-53.

Baffone W, Sorgente G, Campana R, Patrone V, Sisti D, Falcioni T. Comparative effect of chlorhexidine and some mouthrinses on bacterial biofilm formation on titanium surface. *Curr Microbiol*, 2011;62:445-51.

Berglundh, T., Persson, L. & Klinge, B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol*, 2002. 29 Suppl 3, 197-212.

Bravo-Pérez, M., Casals-Peidró, E., Cortés-Martínicorena, Fco. J., Llodra-Calvo, J.C. Encuesta de Salud Oral en España 2005. *RCOE* 11, 409-456.

Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res*, 2010;89:657-65.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol*, 2003.41:4950-4.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2005;45:191-9.

Ciancio SG, Lauciello F, Shibly O, Vitello M, Mather M. The effect of an antiseptic mouthrinse on implant maintenance: plaque and peri-implant gingival tissues. *J Periodontol*, 1995;66:962-5.

---

Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1996;1:926-32.

Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*, 2005;28:1062-8.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2002. 167-93

Erriu M, Pili FM, Tuveri E, Pigliacampo D, Scano A, Montaldo C, et al. Oil Essential Mouthwashes Antibacterial Activity against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: A Comparison between Antibiofilm and Antiplanktonic Effects. *Int J Dent*, 2013;2013:164267.

Felo A, Shibly O, Ciancio SG, Lauciello FR, Ho A. Effects of subgingival chlorhexidine irrigation on peri-implant maintenance. *Am J Dent*, 1997;10:107-10.

Figuro E, Graziani F, Sanz I, Herrera D, Sanz M. Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontol 2000*, 2014;66:255-73.

Furst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*, 2007;18:501-8.

Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Burgers R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res*, 2010;21:866-72.

Heitz-Mayfield LJ, Salvi GE, Botticelli D, Mombelli A, Faddy M, Lang NP. Anti-infective treatment of peri-implant mucositis: a randomised controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*, 2011;22:237-41.

---

Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol*, 2012;39:425-433.

Kolenbrander PE. Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. In: Newman HN, Weir ME, editor. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*: Bioline Press; 2000. p. 171-86.

Llodra-Calvo JC, Bravo-Pérez M, Cortes-Martínez FJ. Encuesta de Salud Oral en España 2000. *RCOE*, 2002; 7, 19-63.

Lang NP, Berglundh T. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*, 2011;38 Suppl 11:178-81.

Lee A, Wang HL. Biofilm related to dental implants. *Implant Dent*, 2010;19:387-393.

Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E Jr, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*, 1987;2:145-151.

Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier JJ, Jaffrezic N, Barsotti O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials--an in vitro study. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2004;39:199-205.

Do Nascimento C, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin Oral Implants Res*, 2013;00:1-7.

de Oliveira GR, Pozzer L, Cavalieri-Pereira L, de Moraes PH, Olate S, de Albergaria Barbosa JR. Bacterial adhesion and colonization differences

---

between zirconia and titanium implant abutments: an in vivo human study. *J Periodontal Implant Sci*, 2013;42:217-23.

Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent*, 2010;38 Suppl 1:S16-20.

Pedrazzi V, Escobar EC, Cortelli JR, Haas AN, Andrade AK, Pannuti CM, et al. Antimicrobial mouthrinse use as an adjunct method in peri-implant biofilm control. *Braz Oral Res*, 2014;28 Spec.

Porras R, Anderson GB, Caffesse R, Narendran S, Trejo PM. Clinical response to 2 different therapeutic regimens to treat peri-implant mucositis. *J Periodontol*, 2002;73:1118-25.

Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*, 2010;31:706-13.

Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res*, 2002;13:1-19.

Quirynen M, Herrera D, Teughels W, Sanz M. Implant therapy: 40 years of experience. *Periodontol 2000*, 2014;66:7-12.

Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res*, 2006;17:25-37.

Quirynen M, Van der Mei HC, Bollen CM, Van den Bossche LH, Doornbusch GI, van Steenberghe D, et al. The influence of surface-free energy on supra- and subgingival plaque microbiology. An in vivo study on implants. *J Periodontol*, 1994;65:162-7.

---

Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2002;17:793-8.

Renvert S, Roos-Jansaker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol*, 2008;35:305-15.

Sanchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, Leon R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res*, 2011;46:252-60

Sanchez MC, Llama-Palacios A, Fernandez E, Figuero E, Marin MJ, Leon R, et al. 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*, 2014;30:1161-71.

Schmidlin PR, Muller P, Attin T, Wieland M, Hofer D, Guggenheim B. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. *J Appl Oral Sci*, 2013;21:48-55.

Sheiham A, Netuveli GS. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol* 2000, 2002; 29, 104-121.

Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*, 2008;19:975-982.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 1998;25:134-144.

Tonetti MS, Chapple ILC, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary

---

prevention of periodontal and peri-implant diseases–Introduction to, and objectives of the 11<sup>th</sup> European workshop on periodontology consensus conference. *J Clin Periodontol*, 2015; 42. S1-S4

Tabanella G, Nowzari H, Slots J. Clinical and microbiological determinants of failing dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2009;11:24-36.

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, 2006;17 Suppl 2:68-81.

Thone-Muhling M, Swierkot K, Nonnenmacher C, Mutters R, Flores-de-Jacoby L, Mengel R. Comparison of two full-mouth approaches in the treatment of peri-implant mucositis: a pilot study. *Clin Oral Implants Res*, 2010;21:504-12.

Trejo PM, Bonaventura G, Weng D, Caffesse RG, Bragger U, Lang NP. Effect of mechanical and antiseptic therapy on peri-implant mucositis: an experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res*, 2006;17:294-304.

Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2010;25:63-74.

Whitehead KA, Colligon J, Verran J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005;41:129-38.

van Winkelhoff AJ, Goené RJ, Benschop C, Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 11, 2000; 511-520.

Zhao B, van der Mei HC, Subbiahdoss G, de Vries J, Rustema-Abbing M, Kuijjer R, et al. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. *Dent Mater*, 2014;30:716-27.

---

Zitzmann, N.U. & Berglundh, T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*, 2008. 35, 286-291.