

## MUCOSITIS IN VITRO SOBRE IMPLANTES DE ZIRCONIO

### IN VITRO MUCOSITIS ON ZIRCONIUM IMPLANTS

Marianela SPINA; Teresa BUTLER; Sergio LAZO; Gabriel LAZO; Ezequiel ESCUDERO; Ester FRISO; Roxana BASAL; Nicolás BENTIVENGA; Emilio AMARO; Fernando PAZOS; Gabriel ALFARO; Marcela IVANOV; Diana CUCCHETTI; Diego MERLO; Cristina VISCOVIK

Asignatura de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de La Plata

#### RESUMEN

El objetivo fue observar por Microscopía Electrónica de Barrido la presencia de mucositis de la biopelícula *in vitro*, adherida a los implantes de zirconio. Se usaron dos cepas desecadas (*Streptococcus oralis*, y *Actinomyces naeslundii*), que fueron activadas en caldo nutritivo, incubadas a 37 °C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente se repicó 1ml de cada una de las siembras, en un tubo de ensayo con el mismo medio y en igualdad de condiciones. Luego, se colocó 1 mililitro de la mezcla (*biofilm*), en una cápsula de Petri con Agar Mitis Salivarius, y un implante de zirconio sobre la siembra. La operación se repitió en un número total de 10 cápsulas de Petri y diez implantes de zirconio. Las observaciones realizadas por Microscopía Electrónica de Barrido dieron números significativos de unidades formadoras de colonias adheridas a los implantes, para los *Streptococcus oralis* y los *Actinomyces naeslundii*. La estructura de la biopelícula observada sobre los diferentes implantes de zirconio fue similar, mostrando en todos los casos una verdadera asociación bacteriana entre ambas especies utilizadas. Se infiere que la biopelícula desarrollada sobre los implantes de zirconio *in vitro* es similar a la formada *in vivo*.

Palabras Claves: zirconio, mucositis, biofilm

#### ABSTRACT

The objective of this work was to observe by Scanning Electron Microscopy the presence of mucositis of the biofilm *in vitro*, attached to the zirconium implants. Two dried strains (*Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii*), which were activated in nutrient broth, incubated at 37 °C for 48 hours under anaerobic conditions were used. Subsequently, 1ml of each one of the sowings was chirped in a test tube with the same medium and under equal conditions. Then, 1 milliliter of the mixture (*biofilm*) was placed in a Petri dish with Mitis Salivarius Agar, and 1 zirconium implant was placed on the seeding. The operation was repeated in a total number of 10 Petri dishes and ten zirconium implants. The observations made by Scanning Electron Microscopy gave significant numbers of colonies forming units adhered to the implants, for *Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii*. The structure of the biofilm observed on the different zirconium implants was similar, showing in all cases a true bacterial association between both species used. It is inferred that the biofilm developed on zirconium implants *in vitro* is like that formed "in vivo".

Keywords: zirconium, mucositis, biofilm

#### INTRODUCCIÓN

La biopelícula oral está considerada como sistema complejo conformada por una matriz de polisacáridos, y actúa como agente etiológico de las enfermedades bucales más frecuentes. Las mismas, están relacionadas con la formación de una biopelícula y diferentes asociaciones bacterianas. Dichas agregaciones en algunos casos se producen por competencia de los nutrientes, en otros casos, por mensajes de señales químicas

("quórum sensing"), que envían unas bacterias a otras, de la misma o diferente especie (1). Entre los colonizadores iniciales de la periodontitis y la periimplantitis, se encuentran las especies de *Actinomyces*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Streptococcus* y *Veillonella*. Los colonizadores secundarios como las fusobacterias, se coagregan a alguno de los colonizadores iniciales haciendo de puente para la aparición de otras especies bacterianas de alto potencial patógeno tales como el *Aggregatibacter*

Recibido 12 de diciembre de 2016 - Aceptado 11 de diciembre de 2018

\* Correspondencia al autor: e-mail: dikybutler@yahoo.com.ar. Asignatura de Histología y Embriología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de La Plata calle 50 (e/1 y 115) 1900 - La Plata. Teresa Butler dirección: calle 7 N° 3194 1897 M. B. Gonnet. Celular: (0221) 155239310

*actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. (2, 3)

En los últimos años, con la utilización de diferentes materiales de elaboración de los implantes dentarios (titanio, zirconio, polieter-etercetona), ciertas bacterias pueden cambiar su fenotipo, o bien inducir a las agregaciones bacterianas, a través de los deslizamientos sobre los diferentes sustratos ("glidding") (1,4). Estas asociaciones bacterianas son muy frecuentes en la periimplantitis, cuya primera manifestación clínica es la mucositis. En este estadio es habitual la presencia de *Streptococos* y *Actinomyces*, que se asocian frecuentemente formando una especie de marlo de choclo denominado "corn on the cobs", constituyendo una verdadera malla o biopelícula en la cual podrán quedar atrapadas otras bacterias patógenas, tal como la *Porphyromonas gingivalis*, que dará paso a una respuesta inflamatoria, evolucionando luego, hacia una periimplantitis con producción de pus, y destrucción de las fibras del tejido periodontal (4, 5, 6). Las formas cocoideas y *Actinomyces* se adhieren con frecuencia a diferentes implantes de titanio, favorecidas por la estructura química y física, pudiendo ser causa de mucositis. Sin embargo, aún no se ha reportado la presencia de *Actinomycosis* sobre los implantes de zirconio. Tal como se expresó en algunos trabajos científicos Lin *et-al* (7), el mencionado material, podría reunir excelentes propiedades químicas, físicas, microbiológicas y de adaptación a los tejidos periimplantarios, para ser utilizado en la elaboración de implantes dentarios para humanos.

El objetivo de este trabajo fue observar por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) la presencia de la biopelícula de mucositis "in vitro", adherida a los implantes de zirconio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

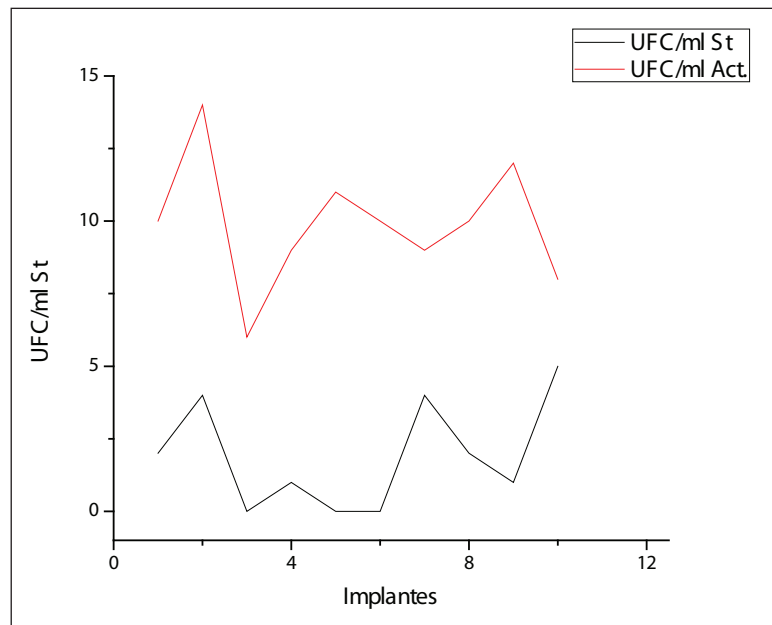
El diseño metodológico aplicado fue de tipo experimental transversal. Para este trabajo se utilizaron 10 implantes de zirconio, elaborados a rosca y de igual medida y pertenecientes al mismo lote. Para el análisis microbiológico se activaron dos cepas bacterianas del biofilm oral (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*). Cada una de las muestras fue colocada en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de caldo nutritivo cada una. Fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Luego, se extrajo 1 mililitro (ml) de la cepa de *Streptococcus oralis* activada, y 1 ml de la siembra con *Actinomyces naeslundii* y fueron

mezcladas en otro tubo de ensayo estéril, con caldo nutritivo, siendo incubadas en igualdad de condiciones que el caso anterior para obtener una biopelícula a partir de este repique. Luego se procedió a la siembra de la biopelícula, para lo cual se prepararon 10 cápsulas de Petri con Agar Mitis Salivarius, inoculando en cada una de ellas 1 mililitro (ml) de la suspensión que contenía ambas cepas activadas. Posteriormente se realizó una siembra por diseminación sobre el agar, con espátula de Drygalsky. Sobre dicha superficie se colocó un implante de zirconio en cada una de las placas. Las mismas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas, en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente los implantes fueron retirados de las cápsulas de Petri con una pinza estéril, y sometidos a secado a través de punto crítico. A continuación, se orificaron los mismos con el material orgánico, para ser observados en un Microscopio Electrónico de Barrido modelo Quantum 200. Para el conteo de las UFC/ml de cada uno de los implantes, se utilizó el sistema EZEIMAGE. Los datos obtenidos, fueron cargados en el programa Excel y analizados por la prueba de varianza, considerando como significativo  $p < 0.05$ .

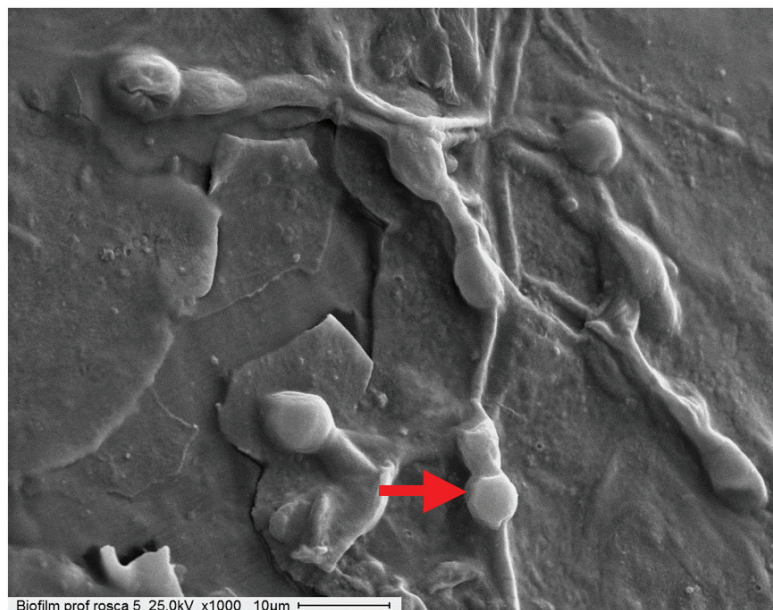
## RESULTADOS OBTENIDOS

Fueron registradas las medias de las UFC/ml de los *Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*, a partir de la biopelícula adherida en cada uno de los implantes. El resultado final fue estadísticamente significativo, siendo  $p < 0,005$  para los *Streptococcus oralis*, e igual resultado para la adhesión de las UFC/ml del *Actinomyces naeslundii* presentes en cada implante de zirconio (Fig1). En cuanto a la estructura del modelo reproducido in vitro de la biopelícula desarrollada sobre los diez implantes de zirconio, fue similar, resultando una relación de 1/8 en relación a la asociación entre ambas especies bacterianas.

Como puede observarse en la Fig. 2 las flechas negras muestran el mayor y menor número de UFC/ml de *Actinomyces* observadas sobre los implantes de zirconio, mientras que las flechas moradas señalan la mayor y menor cantidad de UFC/ml cuantificadas de *Actinomyces spp.* Sobre los implantes estudiados. De acuerdo a los resultados obtenidos se indica que no hubo una marcada diferencia entre las UFC/ml de *Streptococos* orales observadas en los diez implantes de zirconio, ni mayores variaciones de UFC/ml de *Actinomyces spp.* Entre los implantes del material antes mencionado. Sin embargo, se registra un importante incremento en el número de UFC/ml de *Actinomyces*



**Figura 1.** El gráfico lineal muestra las UC/MI de *Streptococcus* orales y de *Actinomyces* Spp. Obtenidos a partir de la biopelícula "in vitro", observados por MEB en los diez implantes de zirconio analizados



**Figura 2.** Microfotografía obtenida por Microscopía Electrónica de Barrido de biofilm desarrollado sobre un implante de zirconio. La flecha roja continua indica formas cocoides adheridas a bacterias filamentosas, inmersas en material de arrastre. Magnificación 1000 X.

spp. con respecto a las UFC/ml de *Streptococcus* orales cuantificadas. Al procesar los datos numéricos de las UFC/ml entre las dos especies bacterianas la prueba de varianza arrojó un número estadísticamente significativo siendo  $p < ,05$ .

### DISCUSIÓN

Tal como refiere Cássia Miereles Rodríguez (5), el zirconio tiene una baja predisposición a la adherencia de

las diferentes especies bacterianas, debido a las características físico-químicas que presenta dicho material.

En coincidencia con Fernández (8) y Linet-al (7); se observó que luego de la colocación de un implante de zirconio, las bacterias inmediatamente colonizan el espacio peri-implantario, actuando como las especies dominantes los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*.

Los resultados de este trabajo son similares a los obtenidos "in vitro" por Egawa *et al* (9) y do Nascimento *et al*

(10), quienes reportan la presencia de *Streptococcus orales* y *Actinomyces* adheridos sobre implantes de zirconio.

La discrepancia o "gap" entre los diferentes materiales de elaboración de implantes dentales, se estima que varía entre 1-10 y 49 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). Sin embargo, en todos los casos, hubo colonización bacteriana (9, 10).

Estudios "in vitro" sobre la respuesta de la formación de la biopelícula sobre zirconio indican que no hubo diferencia significativa en la maduración del biofilm, pero sí varió la estructura tridimensional de los mismos, observando un cambio fenotípico de los *Streptococcus orales* (10, 12).

Cualquiera sea la estructura de estas biopelículas, todos pueden predisponer al fracaso de los implantes,

o inducir a los tejidos subyacentes al mismo, a una respuesta inflamatorio o infecciosa como la mucositis o periimplantitis.

### CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos se infiere que la biopelícula observada es similar a la presente en los casos de mucositis "in vivo". Lo cual indica, que, si bien el zirconio presenta muy buenas propiedades físicas y químicas como posible material de elaboración de implantes dentarios, habría que reformular el análisis sobre la posible y frecuente adhesión microbiana sobre el sustrato antes mencionado, para prevenir ciertos cuadros inflamatorios o infecciosos tales como la mucositis en los tejidos periimplantarios.

### BIBLIOGRAFÍA

- Butler T, Lorenzo de Mele M. (2009) Formación de la biopelícula. *Tesis Doctoral*. Cap. 1, pp-11-19.
- Radha ASD, Dymoc D, Younes C, O'Sullivan D (2012) Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *Journal of Dentistry* 40:146-153.
- Shibili JA, Melo L, Ferrari DS, Figueredo LC, Feres M (2008). Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and disease implants. *Clin oral Implants Res* 19: 975-982
- Lee A, Wang HL. (2009) Biofilm related to dental implants. *Implant Dent* 19: 387-393.
- Cássia Meireles Rodrigues R (2014) Estudio de diferentes genes antibacterianos en biofilms sobre distintas superficies de implantes dentales. *Tesina de Máster Universitaria*. Universidad Complutense.
- Lindhe J, Karring L (2009) *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 4ª edic, Editorial Medica Panamericana.
- Lin HY, Liu Y, Wismeijer D, Crilegaard W, Deng DM (2013) Effects of oral implant surface roughness on bacterial formation and treatment efficacy. *Int J Maxillofac Implants* 28:1226-1231.
- Fernandez EU (2013) Formación de biofilms bacterianos sobre distintas superficies de implantes. *Trabajo de Máster en Ciencias Odontológicas*. Universidad Complutense de Madrid.
- Egawa M, Miura T, Kato T, Saito A, Yoshinari M. (2013) In vitro adherence of periodontopathic bacteria to zirconia and titanium surfaces. *Dental Material Journal* 32(1): 101-106.
- Ribeiro RF (2013). Bacterial adhesion on titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin Oral Implants Res* 00:1-7
- Salvi GE, Cosgarea R, Sculean A (2017) Prevalence and mechanisms of peri-implant diseases. *J Dent Res* 96:31-37.
- Gahlert M, Roehling S, Sprenger CM, Kniha H, Milz S, Bormann K (2012) In vivo performance of zirconia and titanium implants: a histomorphometric study in mini pig maxillae. *Clin Oral Impl Res* 23: 281-86.
- Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE (2018) Mucositis periimplantaria. *J Periodontol* 89: S257-S266.
- Brakel RV, Cune MS, Winkelhoff AJV, Putter C, Verhoeven JW, van der Reijden W (2011). Early bacterial colonization and soft tissue health around zirconia and titanium abutments, an *in vivo* study in man. *Clin Oral Implant Research* 22: 574-77
- Clever K, Schlegel KA, Kniha H, Conrads G, Rink L, Modabber A, Hölzle F, Kniha K (2018) Experimental peri-implant mucositis around titanium and zirconia implants natural tooth: part 1 – host-derived immunological parameters. *Int J Oral Maxillofac Surg* (en prensa).
- Schwarz F, John G, Hegewald A, Becker J (2015) Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis at zirconia implants: a prospective case series. *J Clin Periodontol* 42: 783-788.