

## **ESTRUCTURA DEL BIOFILM SOBRE TRES SUSTRATOS DIFERENTES (TITANIO, ZIRCONIO Y PEEK)**

**STRUCTURE OF THE BIOFILM ON THREE DIFFERENT  
SUBSTRATES (TITANIUM, ZIRCONIUM AND PEEK)**

Facultad de Odontología – UNLP (Calle 50 e/ 1 y 115) La Plata (1900)

“Sin conflicto de interés”

*Butler T; Lazo S; Lazo G; Basal R; Friso E; Escudero E; Amaro E;  
Pazos F; Bentivenga N; Merlo D; Cucchetti D; Ivanov M;  
De Landaburu F; Tau F; Spina M; Viscovik C.*



### **RESUMEN**

Este trabajo tiene como objetivo estudiar la estructura espacial del biofilm generado en cada uno de los materiales seleccionados (Titanio, Zirconio y PEEK), y viabilidad de los microorganismos en el mismo. Para ello se utilizó un total de 9 implantes dentarios (Nº9) de tres materiales diferentes (titanio, zirconio y PEEK). Para el análisis cada uno fue colocado en un tubo de ensayo con 0,1 ml de una suspensión bacteriana formada por tres cepas de biopelícula oral, y 9,9 ml de agar sangre al 5%. Todas las muestras fueron incubadas a 37°C durante 48 horas, en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente fueron preparados para su observación al MEB, y se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml), a través del sistema EZEIMAGE, con el test de varianza. La media obtenida del conteo de colonias en cada uno de los implantes de diferentes sustratos fue de: en 7 UFC/ml para los implantes de titanio, de 12 UFC/ml para los implantes de zirconio y de 2 UFC/ml para los implantes de PEEK. De los resultados obtenidos se infiere que el PEEK sería el material más adecuado para la elaboración de implantes dentales, teniendo en cuenta sus propiedades biológicas y microbiológicas.

**Palabras clave:** biofilm-sustrato-PEEK

### **ABSTRACT**

The objective of this work is to study the spatial structure of the biofilm generated in each of the selected materials (Titanium, Zirconium and PEEK), and the viability of the microorganisms in it. For this, a total of 9 dental implants (Nº9) of three different materials (titanium, zirconium and PEEK) were used. For the analysis each was placed in a test tube with 0.1 ml of a bacterial suspension formed by three strains of oral biofilm, and 9.9 ml of 5% blood agar. All samples were incubated at 37 °C for 48 hours under anaerobic conditions. Later, they were prepared for observation of the MEB, and the Colony Forming Units per milliliter (UFC / ml) was counted, through the EZEIMAGE system, with the variance test. The mean obtained from the colony count in each of the implants of different substrates was: in 7 CFU / ml for titanium implants, 12 CFU / ml for zirconium implants and 2 CFU / ml for implants PEEK. From the results obtained, it is inferred that PEEK would be the most suitable material for dental implants, taking into account its biological and microbiological properties.

**Keywords:** biofilm-substrate-PEEK

# I

## INTRODUCCIÓN

Se conoce que las enfermedades periimplantarias tienen origen infeccioso de tipo bacteriano, y son de naturaleza inflamatoria. Las bacterias involucradas en dicha patología provienen de la biopelícula adherida a los implantes o bien a los tejidos blandos que rodean a dichos dispositivos.(1). Numerosos estudios reportan que la relación entre la pérdida de hueso alveolar que rodea los implantes, es causada por diversas enzimas que eliminan las bacterias de la biopelícula oral. Los microorganismos de cavidad bucal, interactúan entre ellos y se atraen al sitio de acción a través de interacciones químicas o señales denominadas quórum sensing, agregado a los elementos ambientales (temperatura, humedad, sustrato de los implantes, factores físico-químicos de los biomateriales, etc), generando de esta forma, un mayor potencial de virulencia. Algunos trabajos científicos indican que si bien muchos de los biomateriales con los que son confeccionados los implantes, poseen la propiedad de biocompatibilidad con los tejidos circundantes a las piezas dentarias. Se reporta que además de actuar como elemento de defensa el proceso inflamatorio, la implantación de un biomaterial conduce también a la generación de una serie de respuestas en el organismo, propias de mecanismos de defensa habituales.(2) Por ello es importante considerar las interacciones y riesgos asociados a la introducción de partículas u organismos extraños en el organismo, de manera que el diseño y aplicación de los biomateriales, requiere un estudio completo de sus propiedades físico-químicas y microbiológicas. Si bien hasta hace poco tiempo se señalaba que los materiales biocompatibles no causaban daño sobre los tejidos aplicados, algunos dispositivos metálicos o poliméricos se están diseñando con materiales más sensibles frente a condiciones biológicas o microbiológicas locales. Aunque no hay evidencia de la existencia de un número limitado de patógenos se han desarrollado algunos modelos de biofilm in vitro empleando diversas tecnologías con una o dos especies bacterianas y, con frecuencia, con evaluaciones a corto plazo (24 horas o menos), que no pueden describir la dinámica de maduración y la secuencia de eventos que ocurren en el desarrollo de un biofilm periimplantario en estado estacionario (2); (3); (4). Sin embargo, no hay prácticamente modelos de biofilm in vitro validados donde se reproduzca la dinámica y la secuencia de colonización bacteriana del biofilm subgingival periimplantario, donde puedan ser comparados los procesos de formación y desarrollo de estos biofilms orales sobre diferentes superficies (5)



# O

**OBJETIVOS** - Estudiar la estructura espacial del biofilm generado en cada uno de los materiales seleccionados (titanio, zirconio y PEEK), y viabilidad de los microorganismos en el mismo.

# M

## MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño metodológico utilizado ha sido experimental, de tipo transversal, in vitro. Los criterios de inclusión considerados fueron: utilizar implantes de titanio, zirconio y polieter-etercetona (PEEK). El diseño de los mismos ha sido con roscas y de medidas similares. La muestra estuvo representada por un total de nueve implantes (Nº9): 3 de titanio, 3 de zirconio y 3 de PEEK, estériles. Cada uno de los implantes fue inmerso en un frasco con 4 mililitros (ml) solución fisiológica, la cual contenía 1 ml de suspensión bacteriana (ver ítem 3.1), durante 12 horas. Posteriormente, cada uno de los implantes fue colocado en una placa de Petri con agar MitisSalivarius, las que fueron incubados a 37°C durante 48 horas, en condiciones de anaerobiosis en jarra de vacío. Transcurrido el tiempo estipulado, se realizó la lectura del desarrollo de las Unidades formadoras de Colonias por ml (UFC/ml), aplicando la siguiente fórmula. Nº de colonias x la dilución realizada. Luego, cada implante fue retirado de la placa de petri y sometido a punto crítico para su observación al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

### **Obtención de la suspensión bacteriana de cepas desecadas y siembras.**

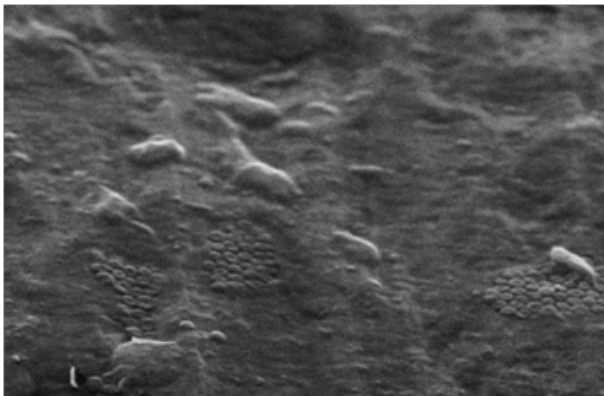
Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 3 cepas bacterianas de cavidad oral desecadas: Streptococcus mutans, Actinomyces odontolyticus y Capnocytophaga sp. Las mismas fueron activadas en 1 ml de caldo de cultivo nutritivo, incubadas a 37°C durante 48 horas. De cada una de ellas se extrajo 0,1 ml y fue colocada en un tubo de ensayo con 9,8 ml de caldo de cultivo en condiciones de anaerobiosis, para obtener la suspensión bacteriana de la biopelícula oral, incubada en las mismas condiciones que el caso anterior. Posteriormente, se seleccionaron tres (números Nº 1, 2 y 3) tubos de ensayo estériles, cada uno de los cuales contenía 9,9 mililitros con agar sangre al 5%. En cada tubo, se trasvasó 0,1 ml de la suspensión bacteriana. En el tubo número 1, se colocó 1 implante de titanio estéril, en el Nº 2, un implante de zirconio estéril y en el nº 3 un implante de PEEK estéril. Todos fueron incubados a 37°C en condiciones de anaerobiosis (ver ítem 3) durante 48 horas.

### Observación por MEB

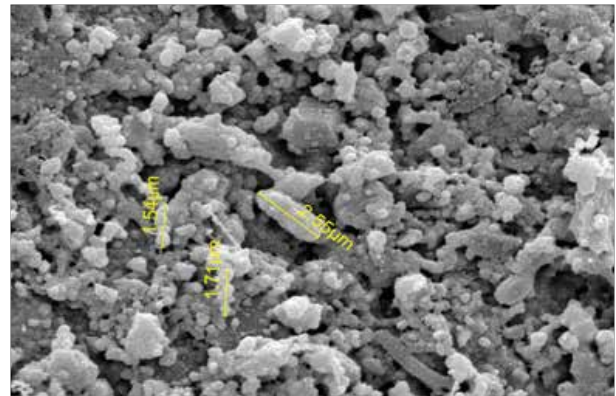
Los cultivos fueron observados macroscópicamente a las 24 y 48 horas. Posteriormente, las muestras se procesaron para su visualización por MEB. (ver ítem 3.1). Las mismas fueron observadas en un microscopio electrónico marca Philips, modelo Quantum 200. Para ello, se utilizó el programa EZEIMAGE, con alto vacío, por la presencia de materia orgánica.

### Análisis estadístico de las UFC/ml.

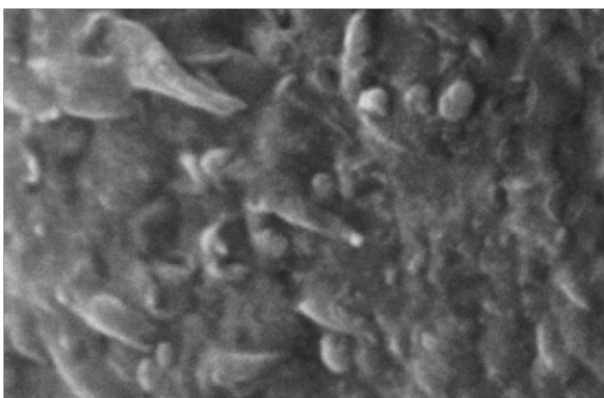
Para ello, cada una de las placas con suspensión bacteriana e implantes fue observada por MEB. Se seleccionaron tres sectores de los implantes (coronario, cervical y radicular), para realizar la observación y el conteo de colonias por mililitro (UFC/ml). Se tomó como punto de referencia las zonas radiculares para definir la adhesión del biofilm bucal, debido a que es la zona más indicada para la adhesión periimplantaria.



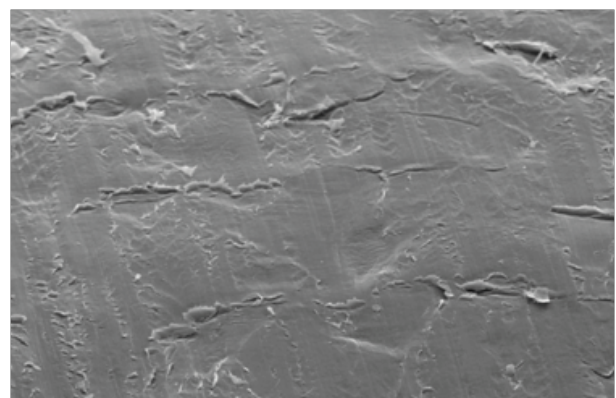
**FIG 1** Micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido. La flecha negra continua muestra escasas formas bacilares sobre una matriz de exopolisacáridos, sobre la cual se apoyan agrupaciones de pequeñas formas coccoideas. Magnificación 15.000 x



**FIG 3** Micrografía observada por Microscopía Electrónica de Barrido de un implante de zirconio. La flecha negra punteada señala formas bacilares sobre una matriz orgánica muy desorganizada. Magnificación 15.000 X En las Fig. 2 y 3 se observa una gran variedad de bacterias, con formas con abundantes formas coccoideas y bacilares, adheridas sobre la superficie de los implantes de zirconio. Magnificación 10.000x



**FIG 2** Micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido. La imagen indica la presencia de una verdadera matriz madura desarrollada sobre un implante de titanio, con abundantes formas bacterianas.



**FIG 4** Micrografía observada por Microscopía Electrónica de Barrido de un implante de PEEK. Ausencia de desarrollo bacteriano, si bien se distingue una superficie cubierta por una delgada matriz de exopolisacáridos. Magnificación 10.000x

# R

## RESULTADOS

Se utilizó la prueba de varianza en relación a las UFC/ml adheridas a los implantes de los diferentes materiales. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Tal como señala la Fig 1-el desarrollo bacteriano sobre la superficie del implante fue escasa, con alto predominio de una espesa matriz de exopolisacáridos. La Media (M) de las UFC/ml de bacterias adheridas obtenida a las 48 horas para los implantes de zirconio fue de: 12 UFC/ml, para los implantes de titanio de 7UFC/ml. Y para los de PEEK fue de 2 UFC/ml

# D

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se infiere los materiales analizados (titanio, zirconio y PEEK) actúa directamente sobre la adherencia de la biopelícula y el desarrollo bacteriano. Dicha propiedad física determina el grado de adhesión de la microbiota oral, que se ubica preferentemente en la profundidad de las roscas y en las grietas superficiales de los materiales. En todos los casos se ha observado el desarrollo de una matriz rica en exopolisacáridos, debido a la rugosidad de los diferentes sustratos, tal como menciona Busscher HJ;2010. Otros investigadores reportan abundante presencia de cocos Gram Positivos adheridos sobre la superficie de los implantes de titanio y zirconio (11). Sin embargo, tal como se ha mencionado en el ítem 1, es escasa la bibliografía sobre análisis microbiológicos en los implantes de PEEK. En consecuencia, sería el polietileno-éter-cetona el material más adecuado para evitar los posibles procesos periimplantarios, debido a la escasa adhesión de las bacterias y a sus propiedades físicas y biológicas.

## Bibliografía

- 1-Lang, N.P. y Berglundh, T. (2011). Periimplant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 38 Suppl 11: 178-181
- 2-Buergers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, et al. (2010) In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2: 156-164
- 3-Lee A. y Wang H-L.(2010). Biofilm Related to Dental Implants. *Implant Dentistry*; volume 19, number 5
- 4-Afya S. D. A-R, Dymock D., Younes C., O'Sullivan D. (2012). Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent* 40: 146-153.
- 5-Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. (2002) Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int. J Oral Maxillofac Implants* 17: 793-8.
- 6-Aas, J. A., Paster B. J., Stokes L. N, Olsen I., Dewhirst F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721-5732.
- 7-Berglundh, T., Persson, L., Klinge, B. (2002). 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* 29: Suppl 3, 197-212
- 8-Binon PP, Weir DJ, Marshall SJ.(1992) Surface analysis of an original Branemark implant and three related clones. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7: 168-175.
- 9-Busscher HJ, Rinastiti M., Siswomihardjo W., Van der Mei H.C (2010) Biofilm Formation on Dental Restorative and Implant Materials. *J Dent Res* 89 (7):657-665,
- 10-Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. (2005) Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *Int J Artif Organs* 28:1062-1068.
- 11-Do Nascimento C, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. (2013). Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 1-7 doi: 10.1111/clr.12093.
- 12-Ferreiro VP; Santos FSF; Sá MD, et al. Desenvolvimento e caracterizacao de compósitos poli (éter-eter cetona) (PEEK)/Hidroxiapatita (HA). *Revista eletrónica de Materiales e Processos*, V11Nº3; pag 148, 154; 2016