



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Efecto Sinérgico Antimicrobiano de la Terapia Fotodinámica  
y el quitosano en las biopelículas Adheridas al Titanio  
de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*  
y *Pseudomonas aeruginosa*:  
un Estudio *in vitro*

**D. Brian Davis Cotrina Veizaga**

2022





D. Fabio Camacho Alonso, Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Efecto sinérgico antimicrobiano de la terapia fotodinámica y el quitosano en las biopelículas adheridas al titanio de Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa: un estudio in vitro", realizada por D. Brian Davis Cotrina Veizaga, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 21 de Septiembre de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, deseo agradecer a todas las personas que de una forma u otra permitieron la realización de este trabajo de investigación, en especial a mi director, Fabio Camacho que, con su paciencia y su filosofía de vida tan característica, me ha servido de ejemplo para poder crecer tanto a nivel académico como personal.

A mis padres, Zenón Cotrina y Jhanneth Veizaga, por su infinito cariño, paciencia, comprensión y apoyo desde siempre. Sin duda estos últimos años nos han puesto a prueba, pero bien es sabido que, Dios pone sus peores batallas a sus mejores guerreros. Esto es un logro tanto mío como vuestro. Mil gracias por todo.

De igual manera a mi hermano menor, Kevin Cotrina que, si bien es el menor, siempre ha cuidado de mí, como si de un hermano mayor se tratase. Gracias Bro, te quiero mil.

No puede faltar una persona muy especial para mí, Marta. La universidad me ha brindado grandes momentos, pero sin duda mi momento favorito fue el conocerte. Gracias por tu amor y apoyo incondicional.

Y finalmente, a mis grandes amigos. Para mí, la segunda familia que elegí. Gracias por todos los buenos momentos que vivimos juntos, y lo más importante, por brindarme vuestra amistad.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**aPDT:** Terapia fotodinámica antimicrobiana

**BEC:** Consenso de mejor evidencia

**BOP:** Sangrado al sondaje

***C. albicans:*** Cándida Albicans

**CFU:** Colony forming units

**DM:** Desbridamiento mecánico

**DP:** Profundidad al Sondaje

***E. Coli:*** *Escherichia coli*

**Er,Cr:YSGG-:** Erblio, cromo-dopado: itrio-escandio-galio-granate

**Er:YAG-:** Erblio-dopado: itrio-aluminio-granate

**FESEM:** Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

**GBR:** Regeneración ósea guiada

**IL-1 $\beta$ :** Interleuquina uno beta

**mg:** Miligramos

**ml:** Mililitros

**NaOCl:** Hipoclorito de sodio

***P. Aeruginosa:*** *Pseudomonas aeruginosa*

**PDT:** Photodynamic therapy

**PBS:** Solución salina tamponada con fosfato

**PEG:** Polietilenglicol

**PICF:** Líquido crevicular periimplantario

**PS:** Fotosensibilizador

**ROI:** Regiones de interés

***S. Aureus:*** *Staphylococcus aureus,*

**SEM:** Microscopio electrónico de barrido

**TFD:** Terapia fotodinámica

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**Tto:** Tratamiento

**UFC:** Unidad Formadora de Colonias

## RESUMEN

**Introducción:** Hasta la fecha, no se han publicado estudios sobre el uso combinado de la terapia fotodinámica (TFD) y el quitosano contra la periimplantitis. **Objetivo:** Evaluar el posible efecto antimicrobiano sinérgico de TFD y quitosano en las biopelículas adherentes al titanio de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. **Materiales y Métodos:** Un total de 60 discos de titanio fueron incluidos en este estudio. Los discos fueron aleatorizados en tres contaminaciones bacterianas (n = 20 discos por bacteria). Después de ser cultivados (incubados durante 48 horas) fueron aleatorizados nuevamente en cuatro modalidades de desinfección diferentes (n = 5 discos por tratamiento): control (sin tratamiento), TFD, quitosano 3 mg / ml y TFD + quitosano 3 mg / ml. Después de los tratamientos, se midió la unidad formadora de colonias (UFC) para determinar los efectos antimicrobianos, y se utilizó microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM) para estudiar la morfología celular y la adherencia al titanio. **Resultados:** Para todas las bacterias evaluadas y todas las variables estudiadas el orden de mayor a menor efectividad antimicrobiana fue: TFD + quitosano 3 mg/ml>quitosano 3 mg/ml>TFD>control. Aunque, todos los métodos de desinfección fueron significativamente efectivos en comparación con el control, el tratamiento combinado de TFD + quitosano 3 mg / ml tuvo el mayor efecto antimicrobiano contra las tres bacterias estudiadas. **Conclusiones:** La combinación de TFD y quitosano tiene un efecto antimicrobiano sinérgico contra la bacteria *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, todo estrechamente relacionado con la periimplantitis.

## SUMMARY

**Background:** To date, no studies on the combined use of photodynamic therapy (PDT) and chitosan against peri-implantitis have been published. **Purpose:** To evaluate the possible synergistic antimicrobial effect of PDT and chitosan on the titanium-adherent biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. **Materials and Methods:** A total of 60 titanium discs were included in this study. The discs were randomized into three bacterial contaminations (n=20 discs per bacterium). After being cultured (incubated for 48 hours) they were randomized again into four different disinfection modalities (n=5 discs per treatment): control (without treatment), PDT, chitosan 3 mg/ml, and PDT + chitosan 3 mg/ml. After the treatments, the colony forming units (CFU) were measured to determine antimicrobial effects, and field emission scanning electron microscopy (FESEM) was used to study cell morphology and titanium adherence. **Results:** For all the evaluated bacteria and all the variables studied the order from highest to lowest antimicrobial effectiveness was: PDT + chitosan 3 mg/ml>chitosan 3 mg/ml>PDT>control. Although, all disinfection methods were significantly effective when compared to control, the combined treatment of PDT + chitosan 3 mg/ml had the greatest antimicrobial effect against the three studied bacteria. **Conclusions:** The combination of PDT and chitosan has a synergistic antimicrobial effect against the bacteria *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*, all closely related to peri-implantitis.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 DEFINICIÓN Y PATOGÉNESIS.....	4
1.1.1 Mucositis.....	4
1.1.2 Periimplantitis.....	6
1.2 ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA.....	7
1.3 INDICADORES DE RIESGO Y PREVENCIÓN.....	9
1.3.1 Edad de los pacientes.....	10
1.3.2 Género.....	10
1.3.3 Localización del implante.....	11
1.3.4 Presencia e historia de periodontitis.....	11
1.3.5 Diabetes mellitus.....	12
1.3.6 Consumo de tabaco.....	13
1.3.7 Control de placa y mantenimiento.....	13
1.3.8 Presencia de mucosa queratinizada.....	14
1.4 TRATAMIENTO.....	15



1.4.1	Tratamiento Mucositis.....	15
1.4.2	Tratamiento Periimplantitis.....	17
1.4.2.1	Tto. No quirúrgico.....	17
1.4.2.1.1	Métodos mecánicos.....	17
1.4.2.1.2	Farmacológicos.....	18
1.4.2.1.3	Antisépticos.....	18
1.4.2.1.4	Terapia láser.....	19
1.4.2.1.5	Terapia Fotodinámica.....	20
1.4.2.2	Tto. Quirúrgico.....	22
1.4.2.2.1	Resectivo.....	22
1.4.2.2.2	Regenerativo.....	24
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	25
2.1.	JUSTIFICACIÓN.....	25
2.2.	OBJETIVOS.....	30
3.	METODOLOGÍA.....	31
3.1	DISCOS DE TITANIO.....	32

3.2 FORMACIÓN DE PELÍCULAS BACTERIANAS.....	33
3.3 TRATAMIENTOS.....	34
3.4 RECUENTO BACTERIANO VIABLE.....	36
3.5 EVALUACIÓN DE EMISIÓN DE CAMPO POR .....	37
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (FESEM)	
PARA EL ESTUDIO DE MORFOLOGÍA CELULAR	
3.6 EVALUACIÓN FESEM PARA EL ESTUDIO DE.....	39
ADHERENCIA CELULAR AL TITANIO	
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1 RECUENTO BACTERIANO VIABLE.....	42
4.2 EVALUACIÓN FESEM PARA EL ESTUDIO.....	44
DE MORFOLOGÍA CELULAR	
4.3 EVALUACIÓN FESEM PARA EL ESTUDIO.....	46
DE ADHERENCIA CELULAR AL TITANIO	
5. DISCUSIÓN.....	49
6. CONCLUSIONES.....	56

7. BIBLIOGRAFÍA.....	58
8. ANEXOS.....	80

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos se ha tratado de reponer la ausencia de dientes por implantes, los cuales consistían en réplicas anatómicas hechas de marfil, hueso, metales y piedras preciosas. La historia de los implantes actuales comienza a finales de la década de 1970, cuando Branemark introdujo implantes roscados fabricados con titanio puro (99,7%). La elección del titanio se debía a su alta resistencia a la corrosión, gracias a la presencia de una película pasiva, tenaz e inerte de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) que cubría la superficie metálica. Branemark observó que esta capa lograba un contacto directo entre el hueso y el implante siempre que se aplicara una técnica quirúrgica cuidadosa durante la colocación del implante en el hueso alveolar, en combinación con un adecuado diseño de este. Una vez colocado el implante, se desarrollaban una serie de evidencias histológicas que Branemark describió con el término de “osteointegración”, las cuales reflejan la fijación biológica y mecánica del implante en el hueso (Alghamdi y Jansen, 2020).

Desde la introducción del concepto de la osteointegración los implantes dentales han ido evolucionando desde un invento experimental hasta un tratamiento exitoso y predecible para reemplazar los dientes ausentes (Elani y cols., 2018).

La pérdida de un diente o dientes es un suceso trágico, pero no poco común. Cuando esto ocurre, desencadena una cascada de eventos que dan lugar a la pérdida tanto de tejidos blandos como duros. Después de la extracción o pérdida del diente, el hueso alveolar y el tejido blando, predeciblemente, se atrofian tanto en altura como en anchura. Las áreas edéntulas ya no tienen la presión vertical sobre el hueso y tejidos blandos, y como resultado el hueso sufre atrofia y reabsorción, contribuyendo a la disminución de la altura y grosor del hueso alveolar a lo largo del tiempo (Liaw y cols., 2015).

La pérdida dentaria también tiene repercusiones funcionales dado el significativo papel que cumplen los dientes durante la masticación, el habla e incluso al sonreír. Así pues, decimos que los dientes son un importante órgano asociado con la calidad de vida (Clark y Levin, 2019). A diferencia de otras opciones de tratamiento rehabilitadoras, los implantes dentales preservan dichos tejidos al restaurar el estrés

normal sobre el hueso, mejorando de esta forma tanto el aspecto estético como la función del diente ausente. Y es por ello, por lo que han ganado popularidad frente a otras modalidades de tratamiento (Elani y cols., 2018; Liaw y cols., 2015).

La revisión sistemática y metanálisis realizada por Howe y cols., muestra una supervivencia a largo plazo (10 años) de los implantes del 96,4% (Howe y cols., 2019). Vemos así que, a pesar de ser un tratamiento con un índice de éxito bastante elevado, incluso en las mejores manos, a veces, aparecen complicaciones en el tratamiento con implantes dentales (Liaw y cols., 2015). Dichas complicaciones pueden aparecer en diferentes momentos de la colocación del implante, diferenciando entre fallos tempranos o tardíos, los cuales no llevan necesariamente al fracaso del implante (Romanos y cols., 2019).

Dichas complicaciones pueden estar relacionadas con una sobrecarga biomecánica, con una infección o inflamación, o con otras causas (Dreyer y cols., 2018).

La sobrecarga biomecánica puede deberse a una mala angulación o posición del implante, a un inadecuado soporte posterior, a un hueso circundante inadecuado, o a hábitos parafuncionales como el bruxismo. Las manifestaciones de la sobrecarga pueden ser la movilidad del implante ocasionada por un fallo del cemento que sujeta la prótesis al pilar, por un aflojamiento del tornillo de la prótesis o pilar, o por un fallo en la osteointegración del implante. Otra manifestación generada por la sobrecarga es la aparición de fracturas, las cuales pueden afectar al propio implante, al tornillo del pilar, o al tornillo de la prótesis (Dreyer y cols., 2018; Schwarz y cols., 2018).

Respecto a la infección o inflamación, se ha de tener en cuenta que una buena higiene dental es importante para la conservación del implante. No hacerlo puede dar lugar a la acumulación de microbios e infección alrededor del implante. En estos casos, los pacientes presentan enrojecimiento, induración e inflamación dolorosa de la encía circundante al implante. Cuando ocurre una infección, con frecuencia causa erosión y reabsorción de los huesos que rodean el implante. Radiográficamente, esta complicación aparece como una radiolucidez alrededor del implante. Es importante trasladar este hallazgo al profesional de referencia porque la intervención temprana

a menudo puede salvar el implante. El tratamiento depende del grado y extensión de la infección (Liaw y cols., 2015; Schwarz y cols., 2018).

Para el tratamiento de la enfermedad periimplantaria están disponibles varios enfoques conservadores y quirúrgicos. Las formas leves y moderadas de afección periimplantaria se pueden tratar de manera efectiva utilizando métodos conservadores. Estos incluyen la utilización de diferentes ablaciones manuales, sistemas apoyados por láser, así como la terapia fotodinámica, que pueden extenderse con antibióticos locales o sistémicos. En los casos con enfermedad periimplantaria avanzada, las terapias quirúrgicas son más efectivas que los enfoques conservadores. Dependiendo de la configuración de los defectos, la cirugía resectiva se puede llevar a cabo para la eliminación de lesiones periimplantarias, mientras que las terapias regenerativas pueden ser aplicables para el relleno de defectos (Smeets y cols., 2014). Las complicaciones biológicas que afectan a los implantes osteointegrados son un tema de gran interés en la odontología actual. Tales complicaciones se refieren principalmente a condiciones inflamatorias asociadas con un desafío bacteriano. Dos variedades clínicas pueden distinguirse: la mucositis periimplantaria y la periimplantitis.

### **1.1 DEFINICIÓN Y PATOGÉNESIS**

Guardando similitud con lo que sucede alrededor de un diente con patología periodontal, es decir, la gingivitis y la periodontitis, existen dos formas clínicas análogas cuando la patología sucede alrededor de implantes dentales, reciben el nombre de Mucositis y Periimplantitis (Renvert y cols., 2018; Koldslund y cols., 2010; Passoni y cols., 2014; Ferreira y cols., 2015).

#### **1.1.1. Mucositis**

En las últimas décadas, debido a la gran cantidad de implantes dentales colocados, el diagnóstico y tratamiento de las condiciones clínicas que afecta a los implantes ha ganado gran peso en la práctica clínica, por lo que tanto signos clínicos de inflamación como infección periimplantaria no deben pasar desapercibidos. Es por ello por lo que, si bien no se consigue una definición con criterios estandarizados por todos los autores, todos ellos coinciden en definir a

la mucositis periimplantaria como una enfermedad que incluye la inflamación de los tejidos blandos que rodean un implante dental, sin pérdida ósea adicional después de la remodelación ósea inicial que puede ocurrir durante la curación tras la colocación del implante (Khammissa y cols., 2012).

Es debido a la falta de estandarización de los criterios clínicos que definen a la mucositis, por lo que encontramos en la bibliografía una gran cantidad de artículos con diferentes parámetros para diagnosticarla. Entre ellos, encontramos quienes la diagnostican debido a la presencia de sangrado al sondaje (BOP) con ausencia de pérdida ósea alrededor de la plataforma del implante (Koldslund y cols., 2010; Passoni y cols., 2014; Ferreira y cols., 2015; Tenenbaum y cols., 2017); también encontramos autores que además de un BOP positivo y ausencia de pérdida ósea, incluyen una profundidad de sondaje (DP) <4mm (Wahlström y cols., 2010) e incluso >5mm (Swierkot y cols., 2012); e incluso hay autores que también toman en cuenta la ausencia o presencia de supuración como criterio para diagnosticar la mucositis (Rokn y cols., 2017; Máximo y cols., 2008).

A modo de aunar el conocimiento que se tenía sobre la mucositis, en 2018, Renvert y cols., propusieron los siguientes criterios para el diagnóstico de mucositis (Renvert y cols., 2018):

1. Inspección visual que demuestra la presencia de signos periimplantarios de inflamación: rojo en lugar de rosa, tejidos hinchados en lugar de sin hinchazón, blandos en lugar de consistencia de tejido firme.
2. Presencia de sangrado profuso (línea o gota) y / o supuración en el sondaje.
3. Un aumento en las profundidades de sondeo en comparación con la línea de base.
4. Ausencia de pérdida ósea más allá de los cambios en el nivel óseo crestral como resultado de la remodelación inicial.



Actualmente no se han encontrado características o marcadores que caractericen la conversión de mucositis a periimplantitis. Pero en analogía a lo que ocurre con la gingivitis y la periodontitis, se cree que la mucositis precede a la periimplantitis (Jepsen y cols., 2015).

En diversos estudios se ha encontrado la estrecha relación existente entre la presencia de placa alrededor del implante con el desarrollo de inflamación, edema o enrojecimiento de los tejidos blandos periimplantarios (Schou y cols., 2002; Schwarz y cols., 2014).

### **1.1.2. Periimplantitis**

La definición que encontramos en la literatura para la periimplantitis es la de una lesión inflamatoria de la mucosa que rodea un implante endóseo que cursa con pérdida progresiva del hueso periimplantario de soporte (Schwarz y cols., 2018). Cabe hacer diferenciación respecto a la pérdida de hueso marginal que se produce debido a la remodelación ósea que se da después de la colocación del implante y su carga protésica, la cual se cuantifica entre 0,5 mm y 2 mm (Lindquist y cols., 1996; Cochran y cols., 2009). Por consiguiente, cualquier evidencia radiográfica de pérdida ósea adicional podría sugerir enfermedad periimplantaria (Renvert y cols., 2018).

Del mismo modo que en la mucositis, Renvert y cols., en 2018, propusieron una serie de criterios clínicos que ayudarían a diagnosticar la periimplantitis (Renvert y cols., 2018):

1. Evidencia de cambios inflamatorios visuales (edema y/o inflamación) en los tejidos blandos periimplantarios combinados con sangrado en el sondaje y / o supuración.
2. Aumento de las profundidades de la bolsa de sondaje en comparación con las mediciones obtenidas en la colocación de la supraestructura.
3. Pérdida ósea progresiva en relación con la evaluación radiográfica del nivel óseo a 1 año después de la entrega de la reconstrucción protésica implantosoportada.

4. En ausencia de radiografías iniciales y profundidades de sondaje, la evidencia radiográfica del nivel óseo  $\geq 3$  mm y / o profundidades de sondaje  $\geq 6$  mm junto con sangrado profuso representa periimplantitis.

## 1.2 ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

Actualmente no se han encontrado características o marcadores que caractericen la conversión de mucositis a periimplantitis. Pero en analogía a lo que ocurre con la gingivitis y la periodontitis, se estima que la mucositis precede a la periimplantitis (Jepsen y cols., 2015).

En diversos estudios se ha demostrado la estrecha relación existente entre la presencia de placa alrededor del implante con el desarrollo de inflamación, edema o enrojecimiento de los tejidos blandos periimplantarios (Schou y cols., 2002; Schwarz y cols., 2014).

Clínicamente, la conversión de mucositis a periimplantitis se evaluó en un estudio observacional retrospectivo que incluyó a 80 pacientes que inicialmente sufrían de mucositis periimplantaria (Costa y cols., 2012). Durante 5 años, la incidencia de periimplantitis fue menor en los sujetos inscritos en un programa de mantenimiento regular que entre los pacientes sin atención de mantenimiento regular. En todo el grupo de pacientes, la conversión de mucositis a periimplantitis se correlacionó con el incremento de las puntuaciones de BOP y PD. Además, la falta de terapia de mantenimiento regular, así como la presencia de periodontitis se identificaron como factores de riesgo que condicionaban la aparición de periimplantitis (Costa y cols., 2012).

En similitud a lo que representa la presencia de periodontitis en la aparición de periimplantitis, Zitzmann y cols., en 2006 cuantificaron la incidencia del desarrollo de periimplantitis en pacientes con antecedentes de periodontitis casi seis veces mayor que en pacientes sin antecedentes de enfermedad periodontal (Zitzmann y cols., 2006).

Debido a los diferentes diseños de estudios y tamaños de población con distintos perfiles de riesgo y estadísticos, los informes que hablan sobre la prevalencia de mucositis y periimplantitis muestran resultados muy variados, encontrando rangos de entre el 5% y el 63,4% de prevalencia según los estudios (Atieh y cols., 2012; Zitzmann y cols., 2008; Charyeva y cols., 2012).

La revisión sistemática y metaanálisis realizada por Lee y cols., en 2017, mostró resultados de prevalencias medias ponderadas de periimplantitis basadas en implantes del 9,25% y en pacientes del 19,83%. Respecto a la mucositis periimplantaria, mostró prevalencias ponderadas basada en implantes del 29,48% y en pacientes del 46,83% (Lee y cols., 2017).

A nivel microbiológico, Casado y cols., en 2011, aislaron bacterias periodontopatógenas comunes tanto en lugares de implantes sanos, como en implantes afectados por enfermedad periimplantaria, no encontrando diferencias significativas entre la distribución de las especies detectadas según el estado clínico del implante (es decir, salud periimplantaria, mucositis periimplantaria o periimplantitis) (Casado y cols., 2011). Sin embargo, en comparación únicamente con los sitios de implantes con salud periimplantaria, la periimplantitis se asoció con recuentos más altos de 19 especies bacterianas entre las que encontramos: *Prevotella intermedia*, *Staphylococcus aureus*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas Aeruginosa* (Persson y cols., 2016). Por otra parte, estudios observacionales han indicado que la periimplantitis se relacionó con mayor frecuencia con patógenos oportunistas como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Mombelli y cols., 2011), organismos fúngicos como *Candida albicans*, *Rhadorula laryngis* y *Candida boidinii* (Albertini y cols., 2015) y virus como el de Epstein-Barr o el citomegalovirus humano (Jankovic y cols., 2011), entendiéndose por tanto que la periimplantitis se trata de una infección bastante compleja y heterogénea (Rakic y cols., 2016).

A nivel inmunohistoquímico, encontramos revisiones sistemáticas que se centran en la correlación que puede haber entre varias citoquinas y quimiocinas medidas en el líquido crevicular periimplantario (PICF) y la condición clínica del implante (Salud periimplantaria, mucositis y periimplantitis) (Faot y cols.,

2015; Duarte y cols., 2015). La mayoría de los estudios incluidos se centraron en la evaluación de la interleuquina uno beta (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), debido a que TNF- $\alpha$  es una proteína de señalización celular que se relaciona con las condiciones de inflamación y la IL-1 $\beta$  se relaciona con un papel importante en la defensa del organismo frente a patógenos como virus o bacterias y en la regulación del daño al tejido (Faot y cols., 2015; Duarte y cols., 2015). El metaanálisis realizado por Faot y cols., en 2015, encontró que la liberación de IL-1 $\beta$  aumentó significativamente en los tejidos periimplantarios con mucositis y periimplantitis, en comparación con los tejidos periimplantarios de implantes sanos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-1 $\beta$  entre los tejidos periimplantarios con mucositis y periimplantitis. Los sitios de periimplantitis también se asociaron con un aumento significativo en los niveles de TNF- $\alpha$  respecto a los sitios sanos. Respecto a citoquinas relacionadas con la osteoclastogénesis (IL-4, IL-10), no se encontraron diferencias significativas entre los zonas evaluados con mucositis o periimplantitis y los sitios evaluados con salud periimplantaria (Faot y cols., 2015). Con los resultados obtenidos, Duarte y cols., en 2015, concluyeron que la evaluación de las citoquinas proinflamatorias (principalmente IL-1 $\beta$ ) en el PICF podría tener un valor beneficioso para diferenciar entre la salud y la enfermedad periimplantarias, pero inadecuada e insuficiente para determinar la aparición de la periimplantitis respecto a la mucositis (Duarte y cols., 2015).

### 1.3 INDICADORES DE RIESGO Y PREVENCIÓN

En la última década se han propuesto una gran cantidad de factores de riesgo potenciales para el desarrollo de la periimplantitis, entre los que encontramos la edad de los pacientes, el género del paciente, la presencia e historia de periodontitis, control deficiente de la placa y falta de mantenimiento, el tabaco, la diabetes mellitus, la presencia de mucosa queratinizada, localización del implante, macro y micromorfología del implante, la osteoporosis, causas iatrogénicas y sobrecarga oclusal (Dreyer y cols., 2018). En adelante desarrollaremos más acerca de algunos de ellos.

### 1.3.1 Edad de los pacientes

El metaanálisis realizado por Dreyer y cols., no confirmó la edad de los pacientes como factor de riesgo de periimplantitis. Aunque el nivel de evidencia se estima alto debido a la cantidad de datos recopilados en varios estudios incluidos (un estudio de cohorte prospectivo, un estudio de casos y controles y 6 estudios transversales), los resultados presentados pueden estar sesgados y deben examinarse críticamente. Esto se debe a que la mayoría de los estudios dicotomizaron la edad del paciente a diferentes valores umbral o ni siquiera especificaron la categorización aplicada (Dreyer y cols., 2018).

Sin embargo, y en contraste con los resultados de Dreyer y cols., un estudio de cohorte retrospectivo publicado recientemente por Poli y cols., indicó que la edad de los pacientes  $\geq 65$  años se asocia significativamente con la periimplantitis, ya que los pacientes de edad avanzada a menudo tienen enfermedades sistémicas crónicas (Poli y cols., 2016).

### 1.3.2 Género

Respecto a la influencia del género en el desarrollo de periimplantitis, los resultados son diversos y deben tomarse con cautela, aunque parece denotarse cierta predisposición del género masculino a desarrollar formas avanzadas de periimplantitis (Dreyer y cols., 2018). Ferreira y cols., encontraron que los hombres tenían un mayor riesgo de periimplantitis (Ferreira y cols., 2006). Sin embargo, Koldslund y cols., no encontraron una asociación estadísticamente significativa para la periimplantitis moderada, pero cuando focalizaron sus cálculos a una forma más grave de periimplantitis observaron una susceptibilidad significativamente mayor en pacientes de género masculino (Koldslund y cols., 2011). En contraste, en un estudio sobre población española se encontró porcentajes del 24% de periimplantitis en el género femenino respecto al 15% del género masculino en pacientes con implantes que hayan sido colocados en un tiempo mayor o igual a 5 años (Rodrigo y cols., 2018).

### **1.3.3 Localización del implante**

Los resultados obtenidos tras múltiples análisis de regresión han demostrado que la probabilidad de padecer periimplantitis era aproximadamente 4-5 veces mayor en implantes colocados en la zona anteroinferior, con prótesis fija completa y ausencia de acceso interproximal, lo cual dificulta la higiene (Rodrigo y cols., 2018). Estos resultados se encuentran en acuerdo con investigaciones realizadas con anterioridad, aunque los resultados deben interpretarse con precaución debido al limitado número de pacientes incluidos en los estudios (Dalago y cols., 2017; Serino y Strom, 2009; Rodrigo y cols., 2018).

### **1.3.4 Presencia e historia de periodontitis**

Se debe prestar atención a los dientes restantes con periodontitis como una fuente potencial de infección ya que puede influir en la colonización de tejidos periimplantarios con patógenos periodontales (Karbach y cols., 2009).

Rocuzzo y cols., siguieron a 101 pacientes que recibieron implantes dentales después de haber sido categorizados como periodontalmente no comprometidos, moderadamente comprometidos y severamente comprometidos. Obtuvieron resultados que diferían lo suficiente entre los grupos como para denotar que a mayor riesgo periodontal del paciente, mayores son los resultados de presencia de periimplantitis y pérdida ósea (Rocuzzo y cols., 2010; Rocuzzo y cols., 2012).

Varios estudios transversales informaron sobre la prevalencia de periimplantitis y analizaron las asociaciones con antecedentes de periodontitis o periodontitis actual. En un estudio que incluyó a 216 pacientes evaluados de 9 a 14 años después de la terapia con implantes, Roos-Jansåker y cols., informaron que los implantes colocados en pacientes con antecedentes de periodontitis tenían probabilidades significativamente más altas de periimplantitis en comparación con los implantes en pacientes sanos (Roos-Jansaker y cols., 2006). Por su parte Koldslund y cols., encontraron hallazgos similares después de

examinar a 109 pacientes con 1 a 16 años de seguimiento (Koldsland y cols., 2011).

### 1.3.5 Diabetes mellitus

La federación internacional de diabetes estima que 415 millones de adultos (20-79 años) (8,8% de la población mundial) sufrieron de diabetes mellitus o diabetes tipo 2 en 2015. Este número aumentará drásticamente a 642 millones de adultos (10,4% de la población mundial) para 2040. Del mismo modo, el número de adultos que se estima que tienen intolerancia a la glucosa (prediabetes) aumentará de 318 millones (6,7%) en 2015 a 481 millones (7,8%) en 2040 (Ogurtsova y cols., 2017). En el medio oral, un estado hiperglucémico desencadena un aumento de la inflamación, el estrés oxidativo, la apoptosis y la función polimorfonuclear alterada. Las respuestas desreguladas e hiperinflamatorias que fluctúan con el control glucémico son procesos clave que influyen en los cambios clínicos que también se observan dentro de los tejidos periodontales. Estos procesos inmunológicos apoyaron los hallazgos clínicos por los cuales los niveles medios significativamente más altos de productos finales glicosilados avanzados en pacientes hiperglucémicos se asociaron con un aumento del índice de placa, sangrado en el sondaje, profundidades de sondaje, pérdida ósea marginal y de estabilidad del implante en comparación con los pacientes sanos (Fu y Wang, 2020).

La revisión sistemática realizada por Monje y cols., sugiere que la diabetes mellitus/hiperglucemia se asocia con un mayor riesgo de periimplantitis, independientemente del tabaquismo, pero no con la mucositis periimplantaria (Monje y cols., 2017). Sin embargo, en la revisión sistemática realizada por Dreyer y cols., no todos los estudios incluidos encontraron una influencia negativa de la diabetes respecto al éxito del implante, lo cual se explicó debido a que no todos los estudios diferenciaban entre diabetes controlada y no controlada o no diferenciaban entre diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 (Dreyer y cols., 2018). Los resultados encontrados por Fu y Wang, se encontraban en la misma línea, no observando resultados concluyentes respecto

a la asociación de la diabetes como marcador de riesgo para periimplantitis (Fu y Wang, 2020).

### **1.3.6 Consumo de tabaco**

Fumar cigarrillos aumenta el riesgo de desarrollar varias afecciones sistémicas, como cáncer, enfermedades cardiovasculares y pulmonares. A nivel oral también es perjudicial para la salud bucodental, ya que aumenta la incidencia y la gravedad del cáncer oral y las enfermedades periodontales (Ramôa y cols., 2017).

En contraste, no hay evidencia concluyente de que el tabaquismo constituya un factor de riesgo/indicador de periimplantitis (Schwarz y cols., 2018) ya que en estudios como el de Aguirre-Zorzano y cols., donde se examinaron a 239 individuos portadores de implantes después de un tiempo medio de seguimiento de aproximadamente 5 años, encontraron una prevalencia general de periimplantitis del 15% pero con la particularidad de que el grupo de los fumadores no estaban en mayor riesgo (Aguirre-Zorzano y cols., 2015). Sin embargo, estudios como el de Romandini y cols., determinan el consumo de tabaco como indicador de riesgo de periimplantitis por delante incluso de la presencia de periodontitis (Romandini y cols., 2021). En su misma línea Rokaya y cols., identificaron al tabaco como indicador de riesgo de periimplantitis (Rokaya y cols., 2020).

Las razones de los hallazgos contradictorios y la aparente asociación débil entre el tabaquismo y la periimplantitis actualmente no se entienden, pero pueden estar relacionadas con las diferencias en la categorización de fumadores y no fumadores, así como el hecho de confundir el tabaquismo con otras variables de fondo, como la falta de higiene o la historia de periodontitis, por ejemplo (Schwarz y cols., 2018).

### **1.3.7 Control de placa y mantenimiento**



La falta de terapia de mantenimiento regular se asocia frecuentemente con la pérdida de unión clínica de los dientes, en pacientes con enfermedad periodontal. Es por ello que las medidas de control de placa autoejecutadas y administradas profesionalmente son de gran importancia en la prevención de las enfermedades periodontales (Dreyer y cols., 2018; Karbach y cols., 2009).

Poli y cols., observaron que el riesgo de desarrollar periimplantitis fue mayor en aquellos pacientes que no asistían de forma regular a sus revisiones periódicas de mantenimiento (Poli y cols., 2016). En la misma línea, el análisis realizado por Costa y cols., mostraron que, durante un período de 5 años, la incidencia de periimplantitis fue menor en los pacientes que asistieron a terapia de mantenimiento (18%) en comparación con los individuos sin terapia de mantenimiento de apoyo (44%) (Costa y cols., 2012). Ferreira y cols., observaron que el control deficiente de la placa fue el predictor estadístico más fuerte para la periimplantitis (Ferreira y cols., 2006).

En 2017, en las actas del taller mundial sobre la clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias, se concluyó que existe evidencia significativa de que el control deficiente de la placa y la falta de terapia de mantenimiento regular constituyen factores de riesgo/indicadores para la periimplantitis (Schwarz y cols., 2018).

### **1.3.8 Presencia de mucosa queratinizada**

El papel del tejido queratinizado, tanto en relación con la dentición natural como con los implantes dentales, es un tema controvertido y la necesidad absoluta aún no se conoce. Este tipo de tejido tiende a ser más resistente a la abrasión y más resistente cuando se considera su susceptibilidad a la recesión gingival. En muchos casos, su presencia resulta en una disminución de las profundidades de sondaje y una menor acumulación de placa, lo que limita la penetración bacteriana en el espacio periimplantario. Los beneficios adicionales incluyen una capacidad de limpieza más fácil y una mayor comodidad para el paciente. Alternativamente, hay varios estudios que confirman el éxito del implante en regiones con poco o ningún tejido queratinizado. Por lo tanto, se

puede concluir que es preferible un implante con tejido queratinizado sano. Aquellos que no lo tienen no están garantizados para verse comprometidos, pero es más probable y se requiere una atención domiciliaria aún más diligente. (Hussain y cols., 2020)

### **1.4 TRATAMIENTO**

Las enfermedades periimplantarias comparten características clínicas y etiologías similares a las enfermedades periodontales; por lo tanto, se han adoptado enfoques de tratamiento similares para manejarlos (Rokaya y cols., 2020).

El tratamiento de las infecciones periimplantarias comprende enfoques conservadores (no quirúrgicos) y quirúrgicos, dependiendo de la gravedad de la enfermedad periimplantaria (mucositis, periimplantitis moderada o grave). El tratamiento no quirúrgico podría ser suficiente en estadios iniciales de enfermedad periimplantaria, pero conforme aumente la severidad del defecto originado puede ser necesario un enfoque gradual con una terapia no quirúrgica seguida de un tratamiento quirúrgico e incluso valorando la regeneración de los defectos (Smeets y cols., 2014).

Una estrategia de gestión adecuada debe tener en cuenta los factores locales y sistémicos (Ephros y cols., 2020; Rokaya y cols., 2020; Smeets y cols., 2014). Se recomienda la terapia de apoyo y mantenimiento a largo plazo para las enfermedades periimplantarias. Sus principales objetivos son el control de infecciones, prevenir la progresión de la enfermedad y restaurar el hueso perdido. Este protocolo subraya el seguimiento rutinario del paciente con evaluación periódica de la placa y el cálculo, BOP, PD y evaluación radiológica de la pérdida ósea. Estos parámetros indican la gravedad y la extensión de la enfermedad (Rokaya y cols., 2020).

#### **1.4.1 Tratamiento Mucositis**

En presencia de mucositis periimplantaria, los métodos no quirúrgicos son apropiados y suficientes para resolver la patología. Estos incluyen la limpieza mecánica de implantes con titanio o curetas de plástico, ultrasonidos o pulido de aire. Además, la terapia fotodinámica, así como la medicación antiséptica local (clorhexidiguconato, peróxido de hidrógeno, percarbonato de sodio, povidona-yodo) pueden apoyar la terapia antimicrobiana (Smeets y cols., 2014; Pfitzner y cols., 2004).

Dado que se ha observado la estrecha relación entre la presencia de placa alrededor de los tejidos periimplantarios y la aparición de la mucositis periimplantaria (Schou y cols., 2002; Schwarz y cols., 2014), el tratamiento de esta debe de pasar por el control de placa, mantenimiento de la higiene de los implantes y tejidos periimplantarios y la descontaminación de estos (Rokaya y cols., 2020; Smeets y cols., 2014)

De este modo, se evaluaron las formas de control de la placa realizada por el paciente (la eliminación mecánica de la placa mediante cepillos de dientes manuales o eléctricos, el control químico de la placa mediante la administración coadyuvante de antimicrobianos y el uso de pastas dentales que contuviesen triclosán) y las formas de control de placa en las que intervino el profesional odontológico (Salvi y Ramseier, 2015). Aunque no siempre se obtuvo la resolución completa después de las medidas administradas por el paciente, en algunos estudios se ha evidenciado una reducción de los signos clínicos de la inflamación (Salvi y Ramseier, 2015). Por su parte, la intervención profesional que consiste principalmente en instrucciones de higiene bucal, desbridamiento mecánico aplicando una variedad de diferentes instrumentos manuales o motorizados y / o herramientas de pulido, ha revelado una reducción en los signos clínicos de inflamación, mientras que la resolución de BOP a nivel de paciente no suele lograrse (Salvi y Ramseier, 2015).

Finalmente, se ha demostrado que la resolución de la mucositis periimplantaria es posible. Sin embargo, los datos actuales también indican que la resolución de la inflamación no se consigue en todos los pacientes. La mucositis periimplantaria experimental, por su parte, se puede revertir significativamente mediante la eliminación de la placa administrada

profesionalmente y la reinstauración de las prácticas de higiene oral realizadas durante 3 semanas (Salvi y cols, 2012).

### **1.4.2 Tratamiento Perimplantitis**

Dado que la periimplantitis es una lesión inflamatoria de la mucosa que rodea un implante endoóseo y que cursa con una pérdida progresiva del hueso periimplantario de soporte (Schwarz y cols., 2018), el tratamiento se basa en la eliminación y descontaminación de aquellos factores que están provocando el avance de la lesión inflamatoria, con su consecuente pérdida ósea progresiva (Schwarz y cols., 2018; Smeets y cols., 2014; Roccuzzo y cols. 2018). Para ello se plantean tratamientos no quirúrgicos que podrían ser suficiente en estadios iniciales de periimplantitis, pero conforme aumenta la severidad del defecto originado, puede ser necesario un enfoque gradual con una terapia no quirúrgica seguida de un tratamiento quirúrgico e incluso valorando la regeneración de los defectos (Smeets y cols., 2014).

Cabe destacar que, el tratamiento de la periimplantitis seguido de atención de apoyo regular (revisiones y controles periódicos) dio lugar a una alta supervivencia a nivel de paciente e implante a medio y largo plazo, ya que se encontraron resultados favorables, con mejorías clínicas y niveles óseos periimplantarios estables en la mayoría de los pacientes (Roccuzzo y cols. 2018).

#### **1.4.2.1 Tto no quirúrgico**

##### **1.4.2.1.1 Métodos mecánicos**

El desbridamiento mecánico reduce la inflamación mediante la eliminación de la placa microbiana en la superficie del implante. Los instrumentos mecánicos para la eliminación de placa incluyen curetas de plástico, ultrasónidos con punta de metal, curetas de metal, sistemas abrasivos de aire y cepillos metálicos de titanio (Rokaya y cols., 2020).

Toma y cols., observaron que los métodos mecánicos son efectivos para reducir la puntuación BOP, el índice de placa y la DP, sin embargo, la resolución de la periimplantitis no se observó en la gran

mayoría de los casos, obteniendo un éxito bajo. Concluyeron, por tanto, que el desbridamiento mecánico por sí solo no es un tratamiento efectivo para la periimplantitis, y se sugiere que debe combinarse con otros tipos de agentes descontaminantes o incluso con cirugía. (Toma y cols., 2019; Rokaya y cols., 2020). Cabe resaltar el apunte de que, respecto a dispositivos abrasivo de aire, cepillo de titanio y curetas de plástico como métodos mecánicos, el dispositivo de pulido de aire y el cepillo de titanio eran más eficientes que las curetas plásticas (Toma y cols., 2019).

El desbridamiento mecánico por sí solo puede no eliminar completamente la placa porque los instrumentos no pueden acceder entre la microestructura del implante (Rokaya y cols., 2020).

### **1.4.2.1.2 Farmacológico**

Los antibióticos se usan como complemento de la terapia mecánica porque actúan contra la infección, ya sea inhibiendo o matando el agente infeccioso. En la periimplantitis se administran los antibióticos tanto de forma local (la minociclina, la doxiciclina, la gentamicina y la cefazolina), como sistémica (clindamicina, amoxicilina + metronidazol, tetraciclina, ciprofloxacina) (Rokaya y cols., 2020; Leonhard y cols., 2003; Carcuac y cols., 2017).

La terapia antibiótica sistémica aumenta la defensa del huésped para eliminar la infección al combatir los patógenos subgingivales que permanecen después de la terapia mecánica. La combinación de antibióticos (locales y sistémicos) puede ser beneficiosa en las infecciones periimplantarias. Además, la profilaxis antibiótica sistémica reduce el riesgo de infección postoperatoria (Carcuac y cols., 2017).

### **1.4.2.1.3 Antisépticos**

Varios métodos químicos han sido estudiados para evaluar su uso en la desinfección de la superficie de implantes, como el ácido

etildiaminotetraacético (EDTA), peróxido de hidrógeno y el quitosano (Chitosan) entre otros (Wohlfahrt y cols., 2017; Bürgers y cols., 2012; Rokaya y cols., 2020).

En los últimos años, la aplicación tópica de quitosano (como sustituto de los antibióticos locales) se ha utilizado con éxito en el tratamiento de la periimplantitis (Yoon y cols., 2020; Koldslund y cols., 2020; Li y cols., 2019; Larsen y cols., 2017; Zeza y cols., 2017; Wohlfahrt y cols., 2019; Wohlfahrt y cols., 2017). El quitosano es un polisacárido lineal natural compuesto de D-glucosamina ligada a  $\beta$  (1-4) y N-acetil-D-glucosamina. Es derivado de la quitina, el segundo biopolímero natural más abundante. Parece que el mecanismo antimicrobiano del quitosano, mediante el cual facilita la pérdida de componentes intracelulares y su lisis, se debe a que el quitosano cargado positivamente se une a la membrana bacteriana provocando un cambio en la permeabilidad de la membrana (Peña y cols., 2013).

#### **1.4.2.1.4 Terapia láser**

La terapia láser tiene poder bactericida, es por ello que la terapia láser de CO<sub>2</sub>, Diodo-, Er:YAG- (erbio-dopado: itrio-aluminio-granate) y Er,Cr:YSGG- (erbio, cromo-dopado: itrio-escandio-galio-granate) está asociada con el tratamiento de enfermedades periodontales e periimplantarias.

Yamamoto y cols., observaron que Er:YAG y Er,Cr:YAG con una longitud de onda de 2940 nanómetros puede reducir las biopelículas hasta en un 90%, pero a diferencia de la mayoría de las terapias mecánicas. Sin embargo, se debe garantizar una absorción y reverberaciones mínimas con el propósito de proteger el implante y el tejido, ya que no se pueden volver a inducir las compatibilidades biológicas y las propiedades estimuladoras celulares en las zonas tratadas (Yamamoto y cols., 2013). Por su parte, la terapia laser de CO<sub>2</sub> con longitud de onda de 308 nanómetros condujo principal y eficientemente a

resultados satisfactorios en un espectro de bacterias anaeróbicas (Deppe y cols., 2007)

Cuando se comprobó la eficacia del tratamiento láser con Er:YAG respecto al tratamiento mecánico con curetas de plástico en la periimplantitis, los tratamientos con un láser Er:YAG condujeron a resultados significativamente mejores en términos de sangrado en la periimplantitis. Sin embargo, ambos métodos no mostraron diferencias significativas en los cambios de PD, el nivel de unión clínica, el índice de placa y las recesiones gingivales, aunque en ambos grupos mejoraron estos parámetros (Schwarz y cols., 2005)

### **1.4.2.1.5 Terapia fotodinámica**

A lo largo de los últimos años, los láseres de diodo de baja intensidad junto con a fotosensibilizadores, se han utilizado para activar agentes fotosensibilizantes tópicos (es decir, la terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT)) para reducir o eliminar las bacterias periodontopatógenas como complemento del desbridamiento mecánico en pacientes con periodontitis (Cheng y cols., 2016; Pfitzner y cols., 2004). Del mismo modo, se han estudiado los efectos descontaminantes alrededor de zonas afectadas por periimplantitis (de Fátima Balderrama y cols., 2020; Poli y cols., 2020; Ahmed y cols., 2020; Ohba y cols., 2020). Se atribuye el descubrimiento de los efectos de la terapia fotodinámica a Oskar Raab cuando de forma accidental "observó que los protozoos de *Paramecium* spp. teñidos con naranja acridina murieron al exponerse a la luz brillante" (Rabb, 1900). Sin embargo, no fue hasta 2 años después cuando se propuso por primera vez el término "Terapia Fotodinámica (TFD)" por John Toth en 1981, quien observó el "efecto químico fotodinámico" (Dougherty y Marcus, 1992).

Los principios de aPDT implican el uso de un tinte sensible a la luz no tóxico llamado "fotosensibilizador" (PS) combinado con luz visible inofensiva (baja energía) de la longitud de onda apropiada para

que coincida con el espectro de absorción del PS (Dai y cols., 2012). Este procedimiento estimula el tinte para formar radicales libres y oxígeno singlete que actuarán como agentes tóxicos para la bacteria / célula (Fabio y cols., 2016; Camacho-Alonso y cols., 2017; Camacho-Alonso y cols., 2017). La vida útil del oxígeno singlete es de nanosegundos lo que apenas permite ninguna interacción con otras moléculas en las regiones circundantes. Esta molécula excitada puede volver al estado fundamental o convertirse en un estado triplete (la vida útil es de micro a milisegundos) que puede producir fosforescencia mientras regresa al estado fundamental, o puede reaccionar en los fotoprocesos de Tipo I y Tipo II. Para mayor claridad, el Tipo I implica la liberación de radicales libres como el superóxido, el hidroxilo y los radicales derivados de lípidos, y el Tipo II produce oxígeno singlete de estado excitado que oxida lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, causando citotoxicidad (Rahman y cols., 2022).

Los resultados encontrados en la literatura parecen apoyar el uso adyuvante de la TFD en el tratamiento de enfermedades periimplantarias (Rahman y cols., 2022). Para proporcionar un punto de vista desde el más alto nivel de evidencia, un metanálisis en red de ensayos controlados aleatorizados de TFD como terapia adyuvante para la periimplantitis concluyó definitivamente a favor de la TFD adyuvante en comparación con otras intervenciones, como el desbridamiento mecánico solo o el desbridamiento mecánico combinado con la administración local de fármacos (Sivaramakrishnan y Sridharan, 2018). Sin embargo, una preocupación es la toxicidad de los PS, y la otra es la irradiación dañina (de láseres) a los ojos del paciente y el personal clínico involucrado durante el procedimiento, incluso cuando la TFD se usa cumpliendo con los estándares de seguridad (Rahman y cols., 2022; Pfitzner y cols., 2004).



### **1.4.2.2 Tto quirurgico**

Si el tratamiento no quirúrgico para la periimplantitis falla o si la enfermedad periimplantaria se encuentra en la etapa moderada o grave, se puede considerar la terapia quirúrgica. La corrección quirúrgica de la EP y el recontorno óseo con control de la placa es importante en la enfermedad periimplantaria activa (Rokaya y cols., 2020).

Los procedimientos quirúrgicos (desbridamiento con colgajo abierto) aumentan la eficacia del tratamiento mecánico de la periimplantitis (Hallström y cols., 2017). Se recomienda la terapia de intervención quirúrgica para tratar la periimplantitis para un resultado más favorable (Machtei, 2014; Hallström y cols., 2017). El tratamiento quirúrgico incluye colgajo de acceso y desbridamiento, colgajo de acceso y recontorno óseo o cirugía resectiva, y enfoques regenerativos que utilizan injertos óseos con o sin membrana (Machtei, 2014).

Carcuac y cols., encontraron que el tratamiento quirúrgico de la periimplantitis es efectivo y que los resultados de la terapia se ven afectados por las características de la superficie del implante (Carcuac y cols., 2017).

#### **1.4.2.2.1 Resectivo**

La terapia quirúrgica resectiva para la periimplantitis es una opción de terapia recomendable. La osteotomía y la osteoplastia combinada con la implantoplastia representan una terapia eficaz para reducir o incluso detener la progresión de la periimplantitis (Smeets y cols., 2014).

En analogía con la periodontitis, la cirugía resectiva ha demostrado ser eficaz en la reducción de las profundidades de sondaje y los signos clínicos de inflamación (Rokaya y cols., 2020). Sin embargo, aun cuando la combinación de osteotomía y la osteoplastia combinada con la implantoplastia fueron efectivos en el tratamiento de la

periimplantitis, deben de tenerse en cuenta las limitaciones de su uso en el área estética, ya que se produce con frecuencia un aumento de la recesión gingival (Smeets y cols., 2014, Rokaya y cols., 2020).

Respecto a la implantoplastia, la técnica consiste en el alisado de la superficie del implante que se encuentra infectado y/o expuesto. Con esto se pretende descontaminar y alisar la superficie del implante de manera que se disminuya la adherencia de placa (Ramel y cols., 2016). Estudios como el de Hussain y cols., demostraron que superficies expuestas rugosas de implantes, son más susceptibles a la periimplantitis que superficies pulidas (Hussain y cols., 2020). Frecuentemente, su uso está combinado con cirugía de acceso (Rokaya y cols., 2020). Además, en el estudio realizado por Ramel y cols., observaron que la implantoplastia realizada con la combinación de las fresas de diamante a alta velocidad, seguida de la fresa de Arkansas para pulir la superficie presentaron el mejor alisado respecto a los otros métodos evaluados en su estudio (Ramel y cols., 2016).

La desventaja de la implantoplastia son los restos metálicos de los implantes que a menudo permanecen en los tejidos periimplantarios, los cuales pueden causar efectos adversos, ya que generalmente son citotóxicos y genotóxicos (Rokaya y cols., 2020). Además, en el estudio realizado por Chan y cols., determinaron que la implantoplastia realizada en implantes de diámetro inferior a 3,75mm debilitaba la resistencia a la flexión del implante, comprometiendo, por tanto, la carga capaz de soportar la rehabilitación protésica del mismo (Chang y cols., 2013). En contraste, en implantes de mayor diámetro no se encontraban diferencias estadísticamente significativas respecto a cambios en la resistencia a la flexión (Chang y cols., 2013). Por lo tanto, la implantoplastia debe hacerse con precaución en implantes estrechos e implantes individuales sometidos a más carga oclusal (Rokaya y cols., 2020).

#### 1.4.2.2.2 Regenerativo

El tratamiento quirúrgico regenerativo se centra en la descontaminación del defecto óseo periimplantario generado y su posterior relleno con materiales como xenoinjertos, aloinjertos, autoinjertos óseos e incluso la combinación de ellos. Se han descrito técnicas en las que además se utilizan métodos barrera (membranas reabsorbibles o no reabsorbibles) para proteger la regeneración (Hussain y cols., 2020; Rokaya y cols., 2020; Hanif y cols., 2017; Smeets y cols., 2014).

Desde el punto de vista funcional, estético y de supervivencia a largo plazo, se aspira a la regeneración completa y la re-osteointegración (Smeets y cols., 2014). En modelos animales ha sido posible regenerar defectos inducidos experimentalmente utilizando diversos materiales de injerto y/o membranas reabsorbibles siguiendo los principios de regeneración ósea guiada (GBR) (Smeets y cols., 2014).

Aunque se ha observado que la terapia regenerativa tiene unos resultados favorables, la evidencia ha demostrado que el enfoque regenerativo para el tratamiento de un defecto periimplantario sigue siendo impredecible. Existen una serie de condicionantes que podrían contraindicar el tratamiento quirúrgico (resectivo o regenerativo) de la periimplantitis, como lo son una pérdida ósea igual o superior al 50% de la longitud del implante, presencia de movilidad en el implante o una posición inadecuada de colocación del implante afectado. (Decker y cols., 2015; Hanif y cols., 2017). En casos severos de periimplantitis que cursan con movilidad, lo cual conlleva o bien una pérdida ósea superior al 60% o fallos en la osteointegración, se recomienda la explantación del implante dental (Decker y cols 2015).

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

### 2.1 JUSTIFICACIÓN

La aparición de los implantes dentales ha cambiado el paradigma del tratamiento dental para la rehabilitación estética y funcional de los dientes perdidos. Además, el aumento de la esperanza de vida ha aumentado el riesgo de pérdida dental, por lo que este tratamiento quirúrgico-protésico se ha convertido en uno de los más utilizados en las clínicas dentales, hasta tal punto que se estima que el 19% de la población mundial mayor de 45 años se ha sometido a algún tipo de tratamiento con implantes dentales (Al-Nasser y cols., 2020; Yao y cols., 2016). Aunque sigue siendo un tratamiento predecible con una buena tasa de éxito a corto, medio y largo plazo (Frisch y cols., 2020), el número de implantes afectados por enfermedades periimplantarias también ha aumentado en la práctica clínica. Las enfermedades periimplantarias se definen como reacciones inflamatorias patológicas en el tejido blando y duro que rodea un implante dental osteointegrado, y se clasifican en mucositis y periimplantitis (Lindhe y cols., 2008). La mucositis se diagnostica clínicamente por la aparición de inflamación en la mucosa periimplantaria, sin signos de pérdida ósea (Lindhe y cols., 2008; Derks y cols., 2015; Lee y cols., 2017). Mientras que en la periimplantitis se producen cambios a nivel de la unión ósea crestal, con sangrado al sondaje, con o sin profundización concomitante de los alvéolos periimplantarios, movilidad y presencia de pus (Lang y cols., 2011). Según los estudios, la prevalencia de periimplantitis es del 11,3-47,2% después de la terapia con implantes (Koldslund y cols., 2010).

Existen un gran número de factores que pueden estar relacionados con la aparición de la periimplantitis, como los relacionados con el propio implante dental y la funcionalidad de su prótesis (superficie del implante dental, perfil de emergencia de la prótesis, sobrecarga oclusal, uso de prótesis cementadas y ubicación del implante) (Albouy y cols., 2011; Katafuchi y cols., 2018; Canullo y cols., 2015; Quaranta y cols., 2017; Koldslund y cols., 2011); y factores dependientes del paciente (edad, sexo, hábitos tóxicos como el consumo de tabaco y alcohol, higiene bucal, grosor de la mucosa biotipo, tratamiento previo para la periodontitis y presencia de enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus)(Koldslund y cols., 2011; Twito y cols., 2014; Galindo-Moreno y cols., 2005; Ferreira y cols., 2006; Canullo y cols., 2017; Sousa y cols., 2016; Monje y cols., 2016). La presencia de una comunidad microbiana

organizada, espacial y funcionalmente, dentro de una biopelícula sobre la superficie del implante es fundamental para el desarrollo de enfermedades periimplantarias (Quirynen y cols., 2003). La formación de una biopelícula bacteriana unida a la superficie de titanio del implante dental es un proceso complejo que comienza al mismo tiempo que el implante se expone a la cavidad oral (Poli y cols., 2017).

La formación de biopelículas en la superficie rugosa de los implantes dentales se puede dividir en cuatro etapas: interacción superficial reversible inicial, adhesión irreversible a la superficie, división celular y producción de la matriz extracelular generando microcolonias, y finalmente maduración de la biopelícula (Heindl y cols., 2014). En la interacción inicial de las bacterias, a medida que pasan de la vida planctónica a formar biopelículas, es esencial una buena unión para hacerse irreversible. Esto dependerá del tipo de bacteria y de la superficie de adhesión. En cuanto al tipo de bacteria, la adhesión puede diferir entre las bacterias Grampositivas y Gramnegativas, ya que las negativas a menudo usan apéndices (flagelos y fimbrias) como mecanismo de contacto, mientras que las positivas, que son menos móviles, utilizan proteínas de superficie como sitio de enlace (Jamal y cols., 2018). En cuanto al tipo de superficie, la velocidad de adhesión bacteriana dependerá de la rugosidad y las interacciones electrostáticas de la superficie. En el caso de los implantes dentales, la rugosidad superficial del titanio tratado favorece la unión irreversible de las bacterias. Cuanto más hidrofóbica y no polar sea la superficie, menos repulsión bacteriana causará (Kostakioti y cols., 2013). En las siguientes tres etapas (unión irreversible, división celular y maduración de la biopelícula) la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares y la producción de una matriz extracelular son esenciales. Esta matriz ocupa aproximadamente el 90% de la biomasa, siendo el 10% restante ocupado por bacterias, y consiste principalmente de agua, apéndices y sustancias poliméricas extracelulares (Flemming y cols., 2010). El agua es el elemento más abundante en la matriz, ocupando hasta el 97% de ella. Apéndices de proteínas como fimbrias, flagelos y pilis, además de intervenir en la comunicación intercelular y la motilidad bacteriana, tienen funciones mecanosensoriales durante la fijación a la superficie de titanio (Wei y cols., 2013). Finalmente, las sustancias poliméricas extracelulares son un conjunto de biomoléculas localizadas extracelularmente, entre las que es posible diferenciar: exopolisacáridos (como el lipopolisacárido de endotoxina), proteínas (estructurales y enzimáticas), ADN

extracelular (a partir de células lisadas y también sintetizado activamente por biopelículas) y lípidos (Shaw y cols., 2004). Se ha informado de que el lipopolisacárido se adhiere fuerte y tenazmente a los implantes dentales de titanio, donde induce la producción de varias citoquinas inflamatorias y quimiotácticas, que son la principal causa de inflamación periimplantaria y resorción ósea (Bi y cols., 2001; Nouneh y cols., 2001; Morra y cols., 2015).

Los primeros estudios sobre la microbiota asociada con la periimplantitis apuntaron a muchas similitudes entre las bacterias asociadas con esta enfermedad y las tradicionalmente asociadas con la gingivitis o periodontitis crónica. Sin embargo, a menudo algunos microorganismos, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Parvimonas micra*, *Pseudomonas* spp., o *Candida* spp., que no se sabe que sean comunes en pacientes con periodontitis, se han detectado en la cavidad periimplantaria (Belibasakis y cols., 2014). En este sentido, la periimplantitis se considera actualmente como una infección anaeróbica polimicrobiana con un mayor número de bacterias gramnegativas anaeróbicas (Charalampakis y cols., 2012). *Staphylococcus aureus* es una bacteria anaeróbica, facultativa, grampositiva, no esporulante con una alta afinidad por las superficies de titanio debido a que su rugosidad, carga eléctrica y dureza influyen en la unión bacteriana y lipopolisacárida (Ferreira y cols., 2016). Por esta razón, *S. aureus* es actualmente uno de los patógenos más comunes involucrados en la falla temprana del implante dental y se considera como un patógeno putativo en el inicio de la periimplantitis (Persson y cols., 2014). *Escherichia coli* es una bacteria fimbriada gramnegativa facultativa anaeróbica cuya motilidad depende de los flagelos peritrichous, se considera como un patógeno oportunista cada vez más asociado a fallos de implantes relacionados con la periimplantitis (Wang y cols., 2020). *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gramnegativa aeróbica facultativa (aunque puede crecer en condiciones anaeróbicas utilizando nitrato) gramnegativa, unipolar que, al ser un patógeno oportunista, se asocia frecuentemente con periimplantitis (Persson y cols., 2014). Además, este microorganismo tiene la capacidad de crecer en ambientes adversos y, debido a las características de su membrana celular (con propiedades de impermeabilidad excepcionales), es resistente a un gran número de antibióticos,

incluidas cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos (Livermore y cols., 2002).

El método más utilizado para tratar la periimplantitis es el desbridamiento mecánico mediante cepillos de pulido, tratamientos abrasivos accionados por aire, escaladores manuales (con curetas de metal y plástico) y ultrasónicos; en combinación con antisépticos y/o terapia antibiótica local y sistémica (Karring y cols., 2005). Sin embargo, debido a la complejidad macroscópica y en su mayoría microscópica de la superficie del implante (rugosa y microporosa), no se ha demostrado que ninguno de estos métodos elimine o al menos inactive estos patógenos periimplantarios (Renvert y cols., 2006).

En la última década, la terapia fotodinámica (TFD) ha demostrado ser un tratamiento eficaz contra la periimplantitis, fundamentalmente por su capacidad para acceder y penetrar en la superficie irregular del implante (De Fátima Balderrama y cols., 2020; Poli y cols., 2020; Ahmed y cols., 2020; Ohba y cols., 2020). La inactivación fotodinámica de los microorganismos se basa en la administración tópica o sistémica de un fotosensibilizador (PS) seguido de irradiación en dosis bajas con luz visible de una longitud de onda adecuada, mediante la cual el PS pasa de su estado fundamental a un estado excitado. En presencia de oxígeno local en las células, el PS activado puede reaccionar con moléculas cercanas a través de la transferencia de electrones o transferencia de hidrógeno, lo que lleva a la producción de radicales libres (mecanismo Tipo 1) o a través de la transferencia de energía u oxígeno (mecanismo Tipo II), lo que lleva a la producción de oxígeno singlete (Fabio y cols., 2016; Camacho-Alonso y cols., 2017; Camacho-Alonso y cols., 2017).

Además, en los últimos años, la aplicación tópica de quitosano (como sustituto de los antibióticos) se ha utilizado con éxito en el tratamiento de la periimplantitis (Yoon y cols., 2020; Koldslund y cols., 2020; Li y cols., 2019; Larsen y cols., 2017; Zeza y cols., 2017; Wohlfahrt y cols., 2019; Wohlfahrt y cols., 2017). El quitosano es un polisacárido lineal natural compuesto de D-glucosamina ligada a  $\beta(1-4)$  y N-acetil-D-glucosamina. Es derivado de la quitina, el segundo biopolímero natural más abundante. Parece que el mecanismo antimicrobiano del quitosano, mediante el cual facilita la pérdida de componentes intracelulares y su lisis, se debe a que el quitosano cargado positivamente se une a la membrana bacteriana provocando un cambio en la



permeabilidad de la membrana (Peña y cols., 2013). Sin embargo, hasta la fecha, el posible efecto sinérgico de la TFD y el quitosano sobre las bacterias patógenas asociadas a la periimplantitis no está claro.

## 2.2 OBJETIVOS

El objetivo general del presente estudio fue evaluar mediante un estudio *in vitro* el posible efecto sinérgico antimicrobiano de la terapia fotodinámica y el quitosano en las biopelículas adheridas al titanio de *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa*.

Este puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos que permiten sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea el presente estudio.

### Objetivos específicos

1. Estudiar y comparar mediante el recuento de UFC/disco, la efectividad antibacteriana de la TFD, el quitosano, y el tratamiento combinado de TFD + quitosano sobre las biopelículas de *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa* adheridas a superficies de titanio, y compararlas con un grupo control sin tratamiento.

2. Evaluar y comparar mediante el porcentaje de morfología celular anormal, el efecto de lisis celular de la TFD, el quitosano, y el tratamiento combinado de TFD + quitosano sobre *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa*, y compararlas con un grupo control sin tratamiento.

3. Analizar y comparar la presencia o ausencia residual de bacterias en superficies de titanio con biopelículas de *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa* tratadas con TFD, el quitosano, y el tratamiento combinado de TFD + quitosano, y compararlas con un grupo control sin tratamiento.

## 3.METODOLOGÍA.

### 3. METODOLOGÍA.

#### 3.1 DISCOS DE TITANIO

Todo el estudio se desarrolló de acuerdo con las recomendaciones de la Lista de verificación para la presentación de informes *de estudios in vitro* (CRIS) (Krithikadatta y cols., 2014). No se requirió la aprobación ética para este estudio *in vitro*. Para calcular un tamaño de muestra representativo, se requirió una potencia del 80% (nivel alfa del 5%). Los experimentos se realizaron sobre un total de 60 discos de titanio, de 6 mm de diámetro y 2 mm de espesor, con el mismo acabado superficial Nanoblast plus® (Galimplant S.L., Sarria, España) de implantes dentales Galimplant® (Galimplant S.L., Sarria, España) (Figura 1). La superficie de este titanio de grado V se trata con una explosión de óxido de aluminio de granulometría diferente y posterior grabado de triple ácido, lo que le da una nanorugosidad media (Ra) de 1,7 µm. Los discos se limpiaron ultrasónicamente en acetona, se enjuagaron en agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

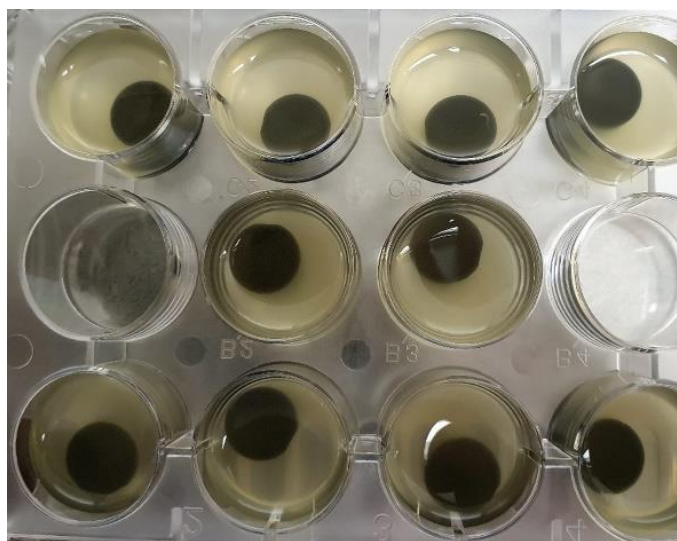


**Figura 1:** Discos de titanio, de 6 mm de diámetro y 2 mm de espesor, con el mismo acabado superficial Nanoblast plus® (Galimplant S.L., Sarria, España) de los implantes dentales Galimplant® (Galimplant S.L., Sarria, España)

La aleatorización se realizó utilizando un servicio en línea (www.randomization.com). Los 60 discos se asignaron al azar en 3 grupos (n=20 por grupo), dependiendo de la bacteria con la que se iban a contaminar: grupo 1 (*Staphylococcus aureus*), grupo 2 (*Escherichia coli*) y grupo 3 (*Pseudomonas aeruginosa*). Finalmente, los 20 discos de cada grupo se asignaron al azar en 4 subgrupos de tratamiento (n = 5 por subgrupo): tratamiento 1 (control), tratamiento 2 (TFD), tratamiento 3 (quitosano) y tratamiento 4 (TFD + quitosano).

### 3.2 FORMACIÓN DE PELÍCULAS BACTERIANAS

Para cada uno de los tres grupos de formación de biopelículas bacterianas en discos de titanio que involucran *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (CECT 434), y *P. aeruginosa* (ATCC 19582) - los microorganismos fueron preparados en Caldo de Soja Tripticasa (TSB) (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) a una concentración de  $10^8$  unts formadores de colonias (UFC)/ml. Luego, se dispensaron 10  $\mu$ l de la suspensión bacteriana en placas estériles de cultivo de tejido de poliestireno de 12 pocillos (Nunclon™ Delta Surface, Roskilde, Dinamarca) que contenían 1,5 ml de TSB por pozo, y se colocó un disco en cada pozo. Los cultivos bacterianos se cultivaron durante 48 horas a 37 °C con agitación continua (90 rpm) en atmósfera húmeda. Se agregó Fresh medium (1 ml/pocillo) después de las primeras 24 horas de incubación (Figura 2).



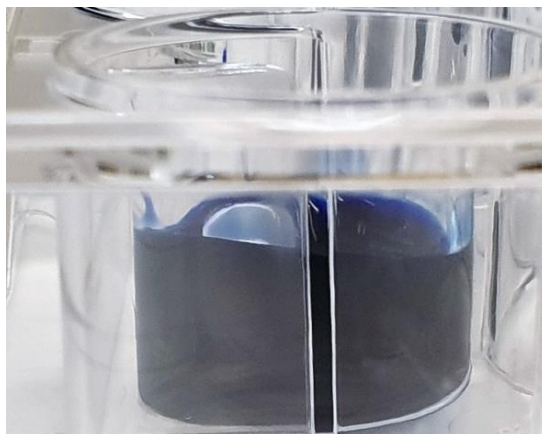
**Figura 2:** Discos cultivados en suspensión bacteriana a 37 °C durante 48 horas.

### 3.3 TRATAMIENTOS

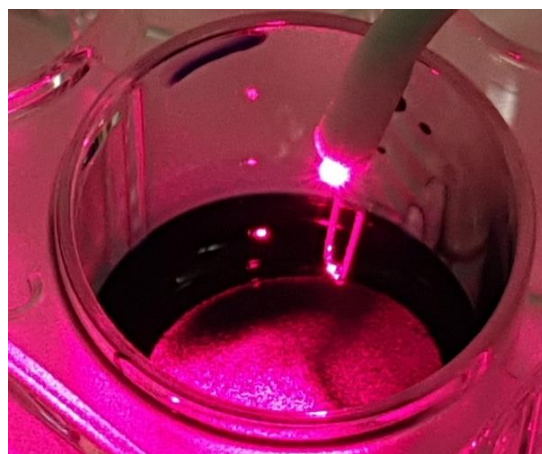
Los veinte discos de cada grupo (contaminados con *S. aureus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*) se asignaron al azar en 4 subgrupos de tratamiento (n = 5 por subgrupo): tratamiento 1 (control), tratamiento 2 (TFD), tratamiento 3 (quitosano) y tratamiento 4 (TFD + quitosano).

Tratamiento 1 (control), los discos permanecieron sin tratar. Antes de recibir tratamientos 2, 3 o 4, las células bacterianas planctónicas o poco adherentes se eliminaron enjuagando suavemente los discos tres veces con 2 ml de solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS). Luego se colocaron en nuevas placas estériles de 12 pocillos.

Tratamiento 2 (TFD), esto se realizó con una configuración para TFD (Helbo® Photodynamic Systems GmbH & KG, Walldorf, Alemania), que incluye un láser de diodo de mano (Helbo® Theralite Laser 3D Pocket Probe; Helbo® Photodynamic Systems GmbH & KG, Walldorf, Alemania) con una longitud de onda de 660 nm y una densidad de polvo de 100 mW. Para el tratamiento, los discos se cubrieron con 300 µl (volumen mínimo para cubrir completamente cada uno de los discos de 6 mm de diámetro, 2 mm de espesor) de solución de azul de metileno, el colorante cloruro de fenotiazina, cloruro de 3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazina-5-ium (Helbo® Blue Photosensitizer; Helbo® Photodynamic Systems GmbH & KG, Walldorf, Alemania); a una concentración de 0,01% (masa por volumen) (Figura 3). Esto se dejó *in situ* durante 3 minutos. Posteriormente, los discos se expusieron a la luz láser durante 60 segundos en modo sin contacto a través de una pieza de mano de zoom focalizada perpendicular a la superficie del disco (la punta de la pieza de mano se mantuvo a una distancia de aproximadamente 3 cm de la superficie del disco), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 4).



**Figura 3:** Disco a tratar con TFD, previamente cubierto con solución de azul de metileno.



**Figura 4:** Disco tratado con TFD expuesto a luz láser durante 60 segundos.

Para el tratamiento 3 (quitosano), los discos se cubrieron con 300  $\mu$ l de quitosano (baja viscosidad, bajo peso molecular) (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) disuelto en agua acidificada con ácido acético al 1% (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España), a una concentración de 3 mg/ml (según lo propuesto por Fabio y cols., Camacho-Alonso y cols. y Shrestha y Kishen) (Fabio y cols., 2016; Camacho-Alonso y cols., 2017; Sherstha y cols., 2012), para la evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica contra *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosas* y *Candida albicans*). Esto se dejó *in situ* durante 3 minutos.

Para estudiar el efecto sinérgico de TFD + quitosano (tratamiento 4: TFD + quitosano), los discos se cubrieron con 300  $\mu$ l de solución de azul de metileno (Helbo<sup>®</sup> Blue Photosensitizer; Helbo<sup>®</sup> Photodynamic Systems GmbH & KG, Walldorf,

Alemania) a una concentración de 0,01%, y 300 µl de quitosano (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) disuelto en agua acidificada con ácido acético al 1% (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España), a una concentración de 3 mg/ml. Esto se dejó *in situ* durante 3 minutos. Posteriormente, los discos fueron expuestos a la luz láser durante 60 segundos, como en el tratamiento 2.

### 3.4 RECUENTO BACTERIANO VIABLE

Después de los tratamientos, los discos se enjuagaron con 1,5 ml de PBS y se transfirieron a tubos de 50 ml (un disco/tubo) que contenían 2 ml de PBS como medio de recuperación. Para permitir la desagregación de biopelículas, cada tubo se sometió a agitación vorticial durante 15 segundos (Figura 5), posteriormente, se agitó sónicamente durante 30 segundos a una frecuencia de 50 Hz con el polvo de 150 W (Braun Labsonic®, Braun Biotech International, Boston, EE. UU.) (Figura 6), y luego se volvió a agitar vorticialmente durante 15 segundos, como describe Gianelly y cols. (Gianelly y cols., 2017). Luego, se procesaron 500 µl de suspensiones bacterianas generadas para el estudio de morfología celular. El resto de la suspensión se utilizó para un recuento celular viable después de 24 horas de incubación a 37 °C mediante diluciones de 10 veces en agar de soja tripticasa (TSA) (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) por triplicado. Los resultados se expresaron como número de UFC/disco.



**Figura 5:** Tubo se sometido a agitación vorticial durante 15 segundos



**Figura 6:** Tubo agitado sónicamente durante 30 segundos a una frecuencia de 50 Hz con el polvo de 150 W (Braun Labsonic<sup>®</sup>, Braun Biotech International, Boston, EE. UU.)

### **3.5 EVALUACIÓN DE EMISIÓN DE CAMPO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (FESEM) PARA EL ESTUDIO DE MORFOLOGÍA CELULAR**

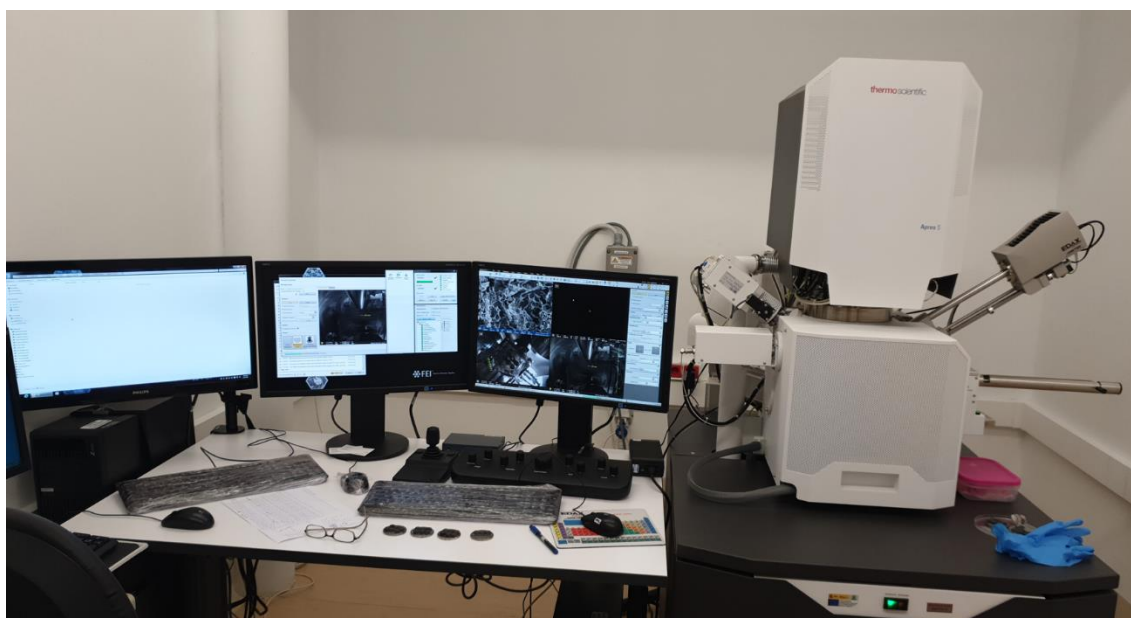
Para el estudio de la morfología celular se procesaron las suspensiones bacterianas generadas a 500  $\mu$ l alícuotas. Teniendo en cuenta que la suspensión bacteriana para el recuento celular viable se obtuvo después de la eliminación de la bacteria de cada uno de los 5 discos que recibieron el mismo tratamiento, la evaluación FESEM se realizó sobre un total de 12 muestras (una para cada grupo bacteriano y para cada subgrupo de tratamiento: 3 bacterias estudiadas x 4 tipos de tratamiento = 12).

Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos para obtener un pellet. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS (pH=7,2), se fijaron con tetróxido de osmio al 1% (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) durante 2 horas, y se lavaron en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M con sacarosa (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España). Luego, las muestras se deshidrataron por inmersión



## METODOLOGÍA

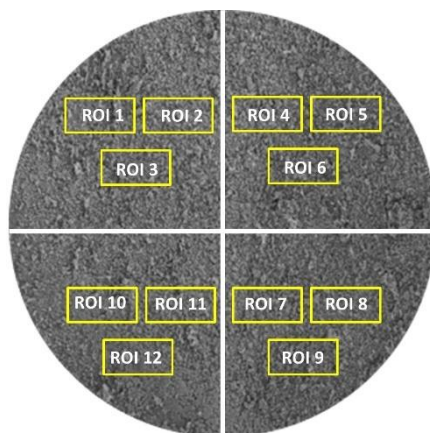
en soluciones de acetonitrilo (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) de concentraciones crecientes (50%, 70%, 80%, 90% y 100% dos veces durante 20 minutos), y se secaron en puntos críticos sobre filtros de membrana isopora de 0,2  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore Ltd, Darmstadt, Alemania) utilizando un Leica EM CPD030 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania). Finalmente, las muestras repartidas sobre el filtro de membrana isopora de 6 mm de diámetro fueron pulverizadas con platino con una capa delgada (5,0 nm) utilizando un Leica ACE600 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania), y observadas por FESEM (ApreoS Lovac IML Thermofisher, Massachusetts, EE.UU.), con una tensión seleccionada de 5 kV (Figura 7).



**Figura 7:** Microscopio FESEM (ApreoS Lovac IML Thermofisher, Massachusetts, EE.UU.)

Cada filtro de membrana isopora de 6 mm de diámetro se dividió en 4 cuadrantes, y se seleccionaron 3 regiones de interés (ROI) para cada cuadrante ( $n = 12$  ROI / muestra) (Figura 8). El ROI (24,4  $\mu\text{m}$  x 8,5  $\mu\text{m}$ ) se observó posteriormente a 10.000X para determinar si la morfología de las células era predominantemente normal o anormal. Siguiendo la descripción morfológica propuesta por Cheng y cols. las bacterias de *S. aureus* se consideraban morfológicamente normales cuando aparecían en forma de coco o redonda con una superficie brillante sin ninguna lisis celular aparente (Cheng y cols., 2016). *E. coli* y *P. aeruginosas* se consideraban morfológicamente normales cuando aparecían en forma de bacilo o en forma de barilla,

con una superficie brillante y sin lisis celular aparente. La morfología se consideraba anormal cuando las células aparecían rugosas, encogidas y lisadas.



**Figura 8:** ROI en cada filtro de membrana isopora (6 mm de diámetro) para la evaluación FESEM de la morfología celular.

### 3.6 EVALUACIÓN FESEM PARA EL ESTUDIO DE ADHERENCIA AL CELULAR TITANIO

La influencia de los diferentes tratamientos en la adherencia celular al titanio se estudió después de que los 60 discos habían sido agitados vorticial y sónicamente. Los discos siguieron el mismo procesamiento para la evaluación FESEM que los 500  $\mu$ l de suspensiones viables generadas para el estudio de la morfología celular. Se lavaron dos veces con PBS (pH=7,2), se fijaron con tetróxido de osmio al 1% (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) durante 2 horas, y se lavaron en tampón de cacodilato de sodio de 0,1 M con sacarosa (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España). Luego, las muestras se deshidrataron por inmersión en soluciones de acetonitrilo (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) de concentraciones crecientes (50%, 70%, 80%, 90% y 100%) dos veces durante 20 minutos, antes de la limpieza de puntos críticos sobre placas metálicas utilizando una Leica EM CPD030 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania). Finalmente, se pulverizaron con platino con una capa de 5,0 nm utilizando un Leica ACE600 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania), y se observaron utilizando un FESEM (ApreoS Lovac IML Thermofisher). Massachusetts, USA), con una tensión seleccionada de 5 kV.

Cada disco de 6 mm de diámetro se dividió en 4 cuadrantes, y se seleccionaron 3 regiones de interés (ROI) para cada cuadrante ( $n = 12$  ROI / muestra) (lo mismo que en los filtros de membrana) (3 bacterias estudiadas x 4 tipos de tratamiento x 5 discos = 60). Cada uno de los ROI fue de  $24,4 \mu\text{m} \times 8,5 \mu\text{m}$  y todos se observaron posteriormente a  $10.000 \times$  para determinar la ausencia o presencia de bacterias adheridas a la superficie de titanio.

Todas las muestras fueron examinadas por un observador entrenado cegado a las condiciones experimentales.

### 3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA). Se realizó un estudio descriptivo de cada variable. Las asociaciones entre diferentes variables cualitativas se analizaron mediante la prueba de chi cuadrado de Pearson. ANOVA y a las pruebas de Tukey se aplicaron a las variables cuantitativas, determinando en cada caso si las varianzas eran homogéneas. Las diferencias se consideraron significativas si el valor de probabilidad era  $p \leq 0,05$  y altamente significativas si  $p \leq 0,01$ .

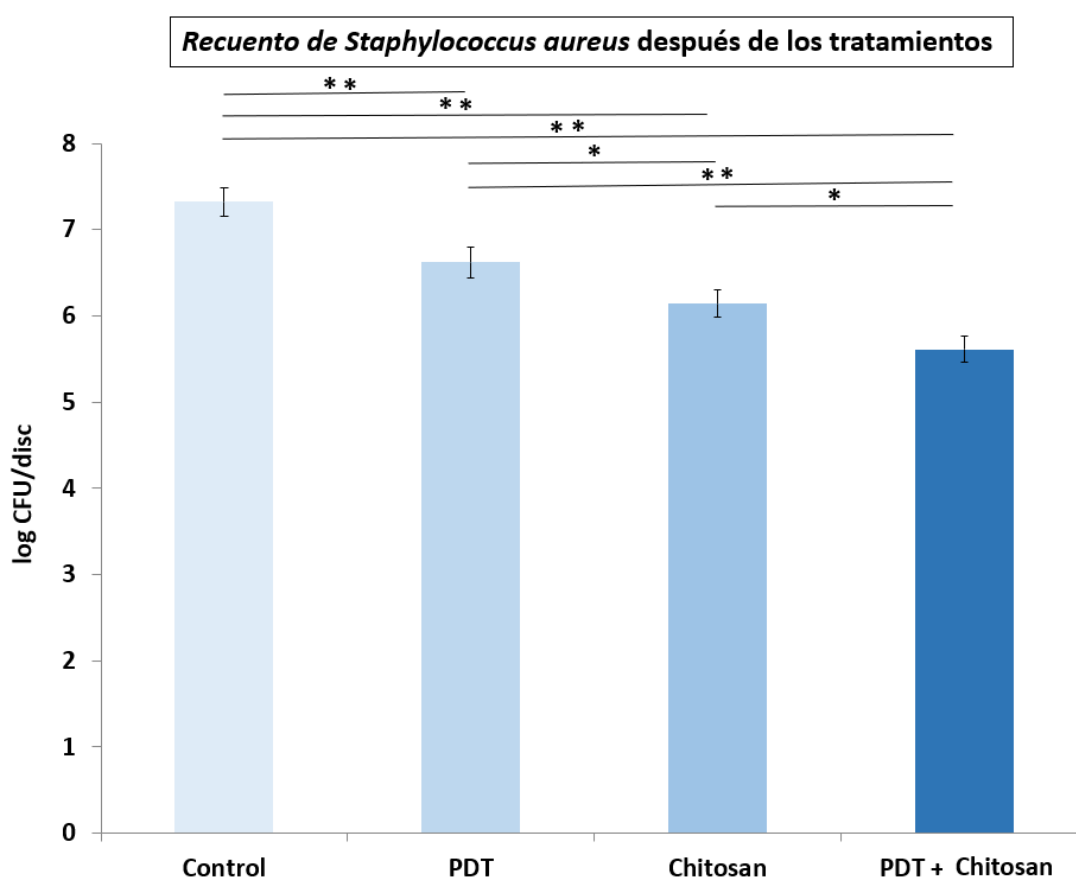
## 4. RESULTADOS.

#### 4. RESULTADOS.

##### 4.1 RECUENTO BACTERIANO VIABLE

En las tres bacterias estudiadas, el orden de menor a mayor UFC/disco fueron las siguientes: TFD + quitosano < quitosano < TFD < control.

Para *S. aureus*, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos y el control ( $p \leq 0,01$ ). El quitosano mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto a TFD, mientras que el tratamiento más efectivo (TFD + quitosano) mostró diferencias muy significativas con respecto a TFD ( $p \leq 0,01$ ) y diferencias significativas en comparación con el quitosano ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 9).

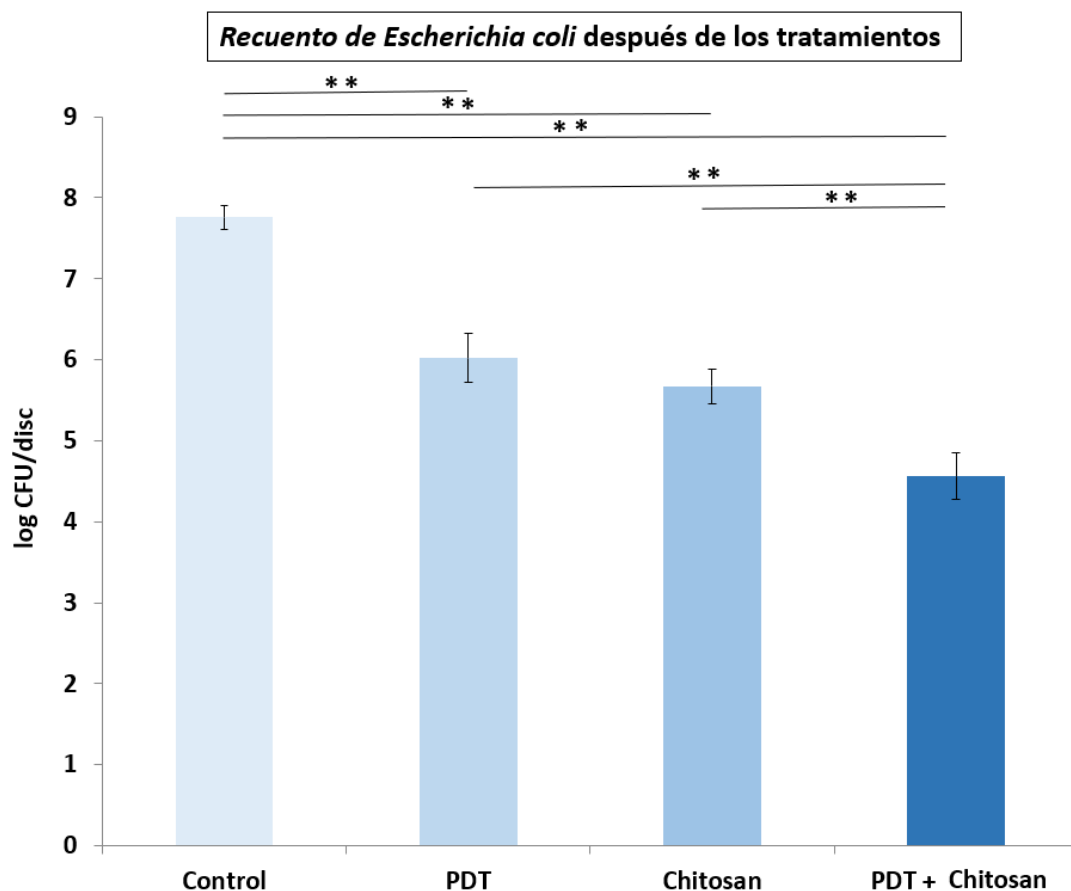


**Figura 9:** Viabilidad residual de *S. aureus* después de los diferentes tratamientos evaluados como UFC/disco (prueba de Tukey) (diferencia significativa: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

Para *E. coli*, se observaron diferencias muy significativas para los tres tratamientos con respecto al control ( $p \leq 0,01$ ). El tratamiento más efectivo (TFD +

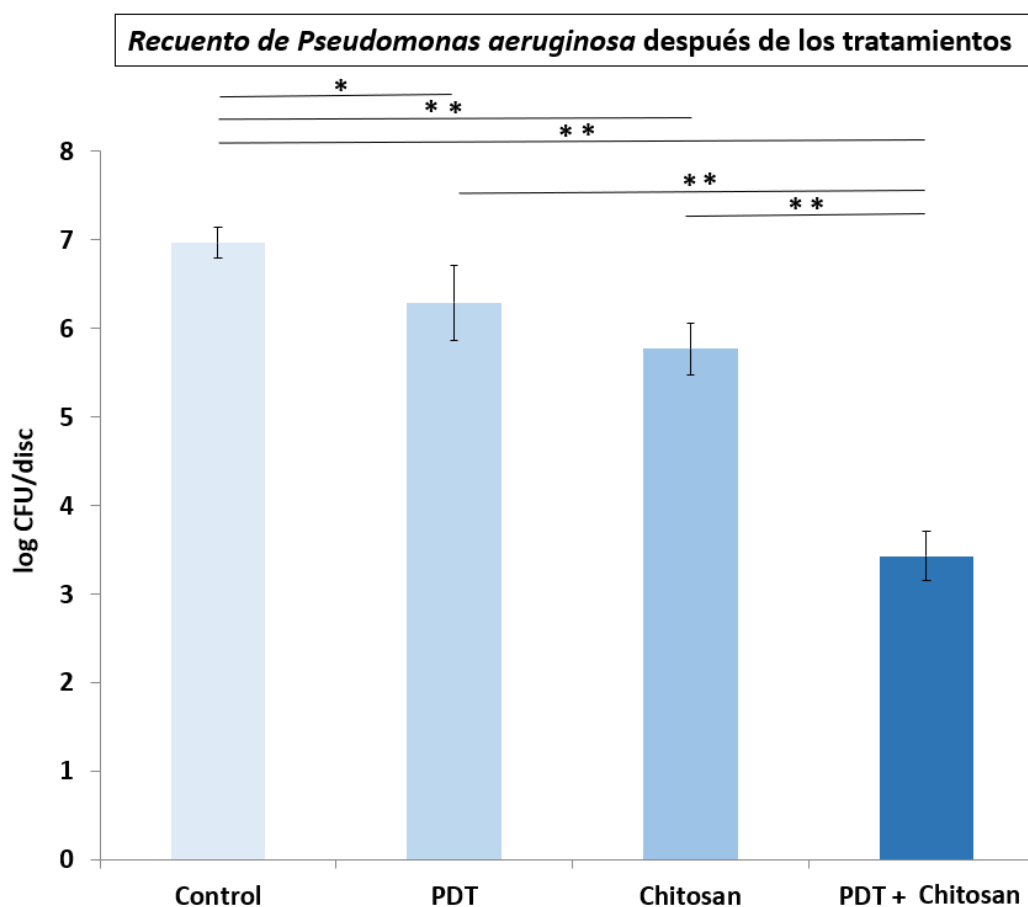
## RESULTADOS

quitosano) mostró diferencias muy significativas respecto a TFD y quitosano ( $p \leq 0,01$ , respectivamente) (Figura 10).



**Figura 10:** Viabilidad residual de *E. coli* después de los diferentes tratamientos evaluados como UFC/disco (test de Tukey) (diferencia significativa: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

En el caso de *P. aeruginosa*, las diferencias con respecto al control fueron muy significativas para la terapia combinada de TFD + quitosano y quitosano como único tratamiento ( $p \leq 0,01$ ), y significativas entre TFD y el control ( $p \leq 0,05$ ). El tratamiento más efectivo fue TFD + quitosano, que mostró diferencias muy significativas respecto a TFD y quitosano ( $p \leq 0,01$ , respectivamente) (Figura 11).



**Figura 11:** Viabilidad residual de *P. aeruginosa* después de los diferentes tratamientos evaluados como UFC/disco (test de Tukey) (diferencia significativa: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

#### 4.2 EVALUACIÓN FESEM PARA EL ESTUDIO DE MORFOLOGÍA CELULAR

Para las tres bacterias estudiadas, el orden de mayor a menor porcentaje de ROI con morfología anormal predominante (rugosa, encogida y lisada), fueron las siguientes: TFD + quitosano > quitosano > TFD > control (Tabla 1 y Figura 12).

Para *S. aureus*, se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto para el TFD (Figura 12A) como para los tratamientos con quitosano con respecto al control ( $p \leq 0,05$ ) y hubo diferencias muy significativas entre TFD + quitosano y control. Además, el tratamiento más efectivo (TFD + quitosano) mostró diferencias significativas con respecto a TFD ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS

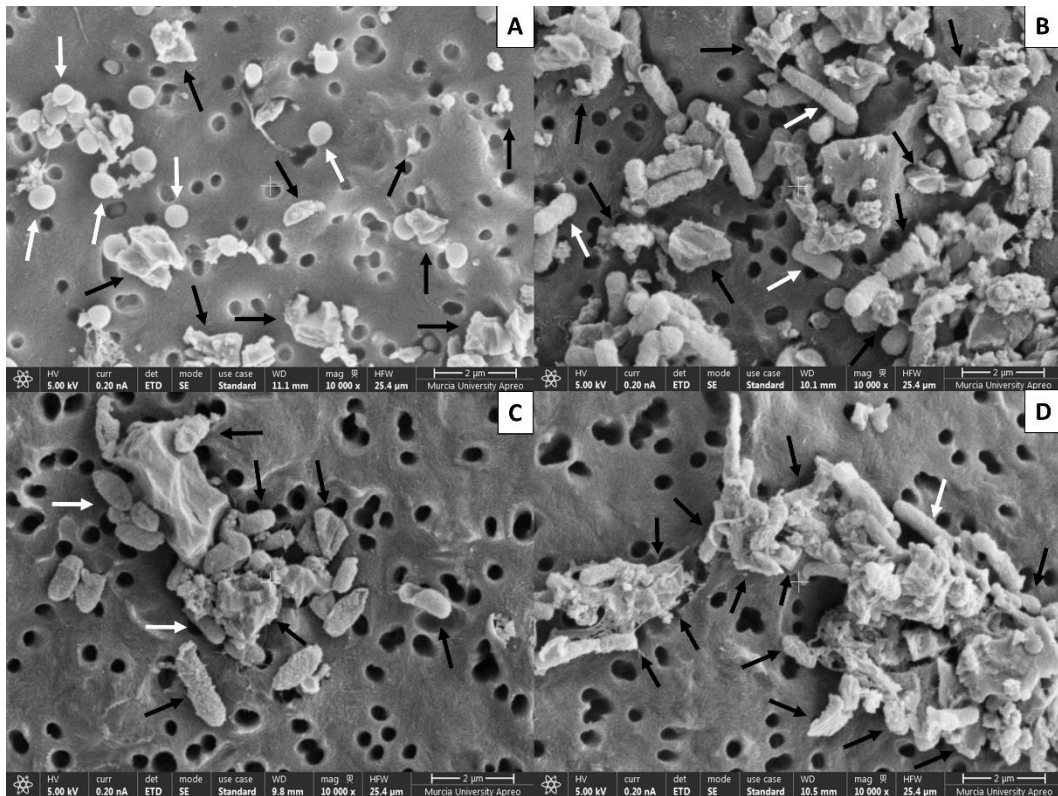
Del mismo modo, en el caso de *E. coli*, se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto para el tratamiento con TFD (Figura 12B) como para el quitosano con respecto al control ( $p \leq 0,05$ ) y diferencias muy significativas entre TFD + quitosano y el control. Además, el tratamiento más efectivo (TFD + quitosano) mostró diferencias significativas con respecto a TFD ( $p \leq 0,05$ ).

Por último, para *P. aeruginosa*, las diferencias entre TFD y control fueron estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) y muy significativas ( $p \leq 0,01$ , respectivamente) entre TFD + quitosano (Figura 12D) y quitosano únicamente (Figura 12C), de nuevo en comparación con el control. En este grupo, el tratamiento más efectivo (TFD + quitosano) mostró diferencias significativas en comparación con TFD y quitosano ( $p \leq 0,05$ , respectivamente).

<i>Staphylococcus aureus</i>	n	Morfología predominante Normal: n (%) Anormal: n (%)	
<b>Tratamientos</b>			
Control	12	12 (100)	0 (0) <sup>#,§,†</sup>
TFD	12	6 (50)	6 (50) <sup>*,†</sup>
Quitosano	12	4 (33.33)	8 (66.67) <sup>*</sup>
TFD + Quitosano	12	2 (16.67)	10 (83.33) <sup>*,#</sup>
<i>Escherichia coli</i>	n	Morfología predominante Normal: n (%) Anormal: n (%)	
<b>Tratamientos</b>			
Control	12	12 (100)	0 (0) <sup>#,§,†</sup>
TFD	12	5 (41.67)	7 (58.33) <sup>*,†</sup>
Quitosano	12	4 (33.33)	8 (66.67) <sup>*</sup>
TFD + Quitosano	12	1 (8.33)	11 (91.67) <sup>*,#</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n	Morfología predominante Normal: n (%) Anormal: n (%)	
<b>Tratamientos</b>			
Control	12	12 (100)	0 (0) <sup>#,§,†</sup>
TFD	12	6 (50)	6 (50) <sup>*,†</sup>
Quitosano	12	3 (25)	9 (75) <sup>*,†</sup>
TFD + Quitosano	12	0 (0)	12 (100) <sup>*,#,§</sup>
* Diferencia significativa en comparación con el grupo Control; # Diferencia significativa en comparación con el grupo TFD; § Diferencia significativa en comparación con el grupo Quitosano; † Diferencia significativa en comparación con el grupo TFD + Quitosano.			

**Tabla 1:** Evaluación FESEM para el estudio de morfología celular (Pearson  $\chi^2$  test).





**Figura 12:** Evaluación FESEM para el estudio de morfología celular en filtros de membrana isopora de 6 mm de diámetro (las flechas blancas muestran ejemplos de morfología normal y las flechas negras muestran ejemplos de morfología anormal). **A:** *S. aureus* tratado con TFD (morfología predominantemente anormal). **B:** *E. coli* tratada con TFD (morfología predominantemente anormal). **C:** *P. aeruginosa* tratada con quitosano (morfología predominantemente anormal). **D:** *P. aeruginosa* tratada con TFD + quitosano (morfología predominantemente anormal).

### 4.3 EVALUACIÓN FESEM PARA EL ESTUDIO DE ADHERENCIA CELULAR AL TITANIO

Para las 3 bacterias estudiadas, el orden del mayor al menor porcentaje de ROI de superficie de titanio sin bacterias unidas fue el siguiente: TFD + quitosano > quitosano > TFD > control (Tabla 2 y Figura 13).

En el caso de *S. aureus*, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control que para los tratamientos TFD y quitosano ( $p \leq 0,05$ ) y diferencias muy significativas entre TFD + quitosano (Figura 13A) y el control ( $p \leq 0,01$ ). Además, el tratamiento más efectivo (TFD + quitosano) mostró diferencias significativas con respecto a TFD ( $p \leq 0,05$ ).

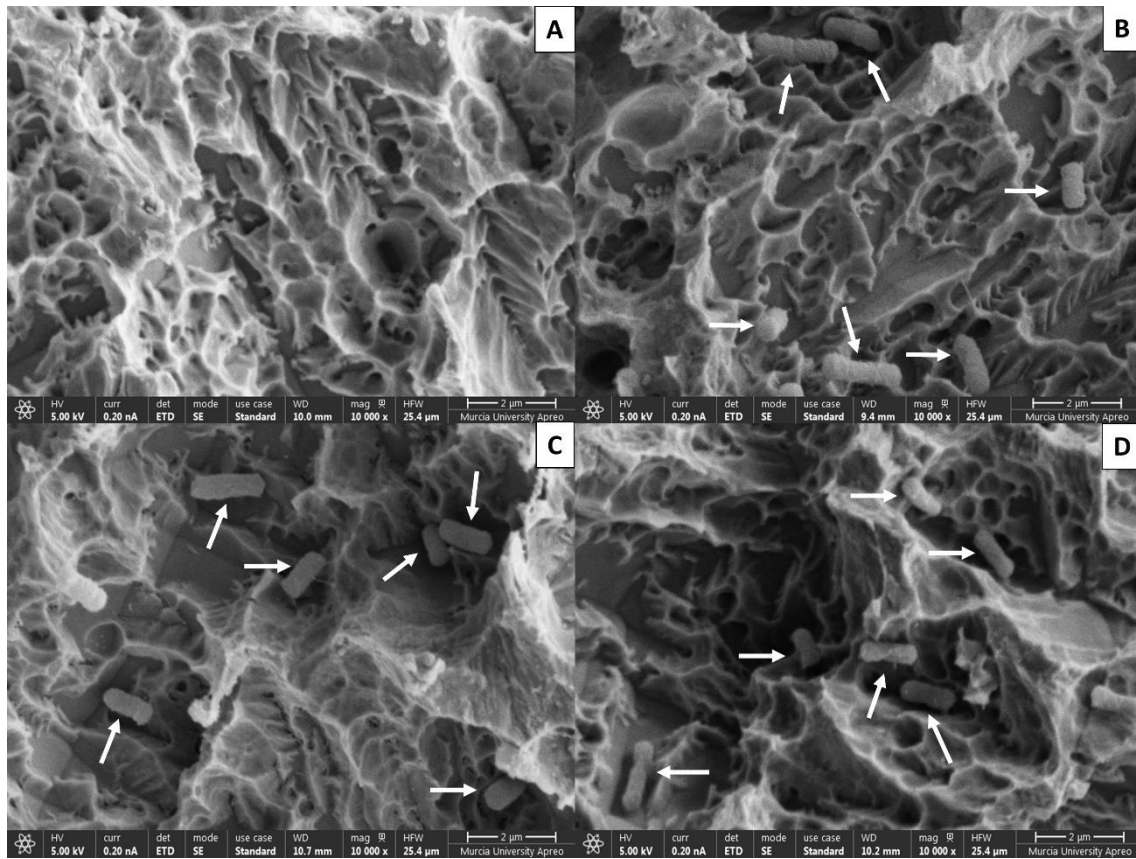
## RESULTADOS

Del mismo modo, para *E. coli*, se observaron diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos TFD (Figura 13B) y quitosano (Figura 13C) con respecto al control ( $p \leq 0,05$ ) y diferencias muy significativas entre TFD + quitosano y el control ( $p \leq 0,01$ ). El tratamiento más efectivo con TFD + quitosano mostró diferencias significativas con respecto a TFD ( $p \leq 0,05$ ).

Por último, para *P. aeruginosa*, hubo diferencias estadísticamente significativas entre TFD (Figura 13D) y el control ( $p \leq 0,05$ ), y diferencias muy significativas entre TFD + quitosano y quitosano solo respecto al control ( $p \leq 0,01$ , respectivamente). En este grupo, el tratamiento más efectivo fue TFD + quitosano, que, además, mostró diferencias significativas con respecto a TFD ( $p \leq 0,05$ ).

<i>Staphylococcus aureus</i>	n	Adherencia celular al titanio	
		Presencia: n (%)	Ausencia: n (%)
<b>Tratamientos</b>			
Control	60	12 (20)	48 (80) <sup>#,§,†</sup>
TFD	60	3 (5)	57 (95) <sup>*,†</sup>
Chitosan	60	1 (1.67)	59 (98.33) <sup>*</sup>
TFD + Chitosan	60	0 (0)	60 (100) <sup>*,#</sup>
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
	n	Adherencia celular al titanio	
		Presencia: n (%)	Ausencia: n (%)
<b>Tratamientos</b>			
Control	60	15 (25)	45 (75) <sup>#,§,†</sup>
TFD	60	5 (8.33)	55 (91.67) <sup>*,†</sup>
Chitosan	60	3 (5)	57 (95) <sup>*</sup>
TFD + Chitosan	60	0 (0)	60 (100) <sup>*,#</sup>
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>			
	n	Adherencia celular al titanio	
		Presencia: n (%)	Ausencia: n (%)
<b>Tratamientos</b>			
Control	60	14 (23.33)	46 (76.67) <sup>#,§,†</sup>
TFD	60	4 (6.67)	56 (93.33) <sup>*,†</sup>
Quitosano	60	1 (1.67)	59 (98.33) <sup>*</sup>
TFD + Quitosano	60	0 (0)	60 (100) <sup>*,#</sup>
* Diferencia significativa en comparación con el grupo Control; # Diferencia significativa en comparación con el grupo TFD; § Diferencia significativa en comparación con el grupo Quitosano; † Diferencia significativa en comparación con el grupo TFD + Quitosano.			

**Tabla 2:** Evaluación FESEM para el estudio de adherencia celular al titanio (Pearson  $\chi^2$  test).



**Figura 13:** Evaluación FESEM de la adherencia celular al titanio (flechas blancas para mostrar la presencia de bacterias). **A:** Disco de titanio cultivado con *S. aureus* y tratado con TDF + quitosano (ausencia de bacterias). **B:** Disco de titanio cultivado con *E. coli* y tratado con TFD. **C:** Disco de titanio cultivado con *E. coli* y tratado con quitosano. **D:** Disco de titanio cultivado con *P. aeruginosa* y tratada con TFD.

## 5. DISCUSIÓN.

## 5. DISCUSION.

En cuanto a la superficie de titanio del implante dental, se sabe que el éxito en su osteointegración en los maxilares depende de una serie de características: rugosidad superficial, energía libre superficial, humectabilidad y composición del sustrato, que influyen directa o indirectamente en la proliferación y diferenciación de las células óseas. La superficie rugosa del implante permite la diferenciación de los osteoblastos, pero también facilita la adhesión y colonización de las bacterias orales responsables de la aparición de la periimplantitis (Ferraris y cols., 2016; Cordeiro y cols., 2017). Entre los procesos de desinfección para esta superficie ya tenemos procedimientos mecánicos (cepillos de pulido, sistema de polvo abrasivo al aire y curetas manuales y ultrasónicas), procedimientos químicos con antisépticos (hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, ácido cítrico, clorhexidina y triclosán a diferentes concentraciones) a través de su toxicidad no selectiva que impide el crecimiento de microorganismos y el uso de antibióticos sistémicos o locales (amoxicilina, clindamicina, espiramicina, metronidazol, minociclina y tetraciclina) (Karring y cols., 2005). No obstante, ninguna de ellas ha sido considerada plenamente satisfactoria. En este sentido, la TFD y los sustitutos antibióticos como el quitosano han surgido recientemente como opciones prometedoras para el tratamiento antibacteriano y para reducir la adherencia al lipopolisacárido y, por lo tanto, al titanio celular (Giannelli y cols., 2017; Yoon y cols., 2020). El objetivo del presente estudio *in vitro* fue evaluar el posible efecto antimicrobiano sinérgico de TFD y quitosano sobre las biopelículas adheridas al titanio de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Considerando todas las variables estudiadas (recuento bacteriano viable, morfología celular y adherencia al titanio celular), los resultados del estudio mostraron que para las tres bacterias evaluadas el orden de mejor a peor tratamiento fue: TFD + quitosano, quitosano, TFD y control (sin tratamiento). Para todas las bacterias estudiadas, la TFD indujo un menor recuento de células viables, un mayor porcentaje de células con morfología anormal y un mayor porcentaje de bacterias no adheridas a la superficie de titanio que el grupo de control, con diferencias estadísticamente significativas.

## DISCUSIÓN

En primer lugar, en lo que respecta a *S. aureus*, Widodo y cols., evaluó la eficacia de diferentes métodos (enjuague con PBS o grupo control, enjuague con 0,2%, TFD con digluconato de clorhexidina, uso de bolitas de algodón, cepillos de titanio o cepillo de titanio y TFD) para la descontaminación de superficies de disco de titanio previamente infectadas con *S. aureus*. Aunque el tratamiento más efectivo fue el cepillo de titanio y la TFD, los autores observaron mejores resultados (menor recuento de células viables y mayor ausencia de bacterias adheridas a la superficie de titanio con SEM) (con diferencias estadísticamente significativas) en relación con el grupo control en discos tratados con TFD (Widodo y cols., 2016). También, en relación con el tratamiento de *S. aureus*, Cai y cols. evaluó la eficacia de desinfección de la aplicación combinada de antisépticos con TFD en la biopelícula formada en discos de titanio. Los tratamientos estudiados fueron PBS o grupo control, 0,2% de diclorhexidina dicluconato, 3% de peróxido de hidrógeno, TFD, 0,2% de clorhexidina TFD y 3% de peróxido de hidrógeno + TFD. Se midió la UFC para determinar los efectos antimicrobianos, y la estructura de la biopelícula se evaluó mediante SEM. Aunque los tratamientos más efectivos fueron la combinación de clorhexidina al 0,2% o peróxido de hidrógeno al 3% con TFD, estos autores también lograron mejores resultados (recuento de células viables y mayor ausencia de bacterias adheridas a la superficie del titanio según lo visto por SEM), con diferencias estadísticamente significativas en discos tratados con TFD en relación con el grupo control (Cai y cols., 2019). De forma similar, Gianelli y cols., en 2017, investigaron la eficacia de la TFD contra biofilm de *S. aureus* y lipopolisacáridos adheridos a discos de titanio con óxido de titanio moderadamente rugoso, y también logró mejores resultados (menor recuento de células viables y mayor ausencia de bacterias adheridas a la superficie de titanio según lo visto por SEM) (con diferencias estadísticamente significativas) en discos tratados con TFD en relación con el grupo de control (Gianelli y cols., 2017). Sin embargo, en 2017, Rismanchian y cols. en otro estudio *in vitro* en 90 discos de titanio, compararon la terapia con láser blando, TFD, 0,12% NaOCl, 0,2% clorhexidina, 3% peróxido de hidrógeno con un grupo control sin tratamiento, y no encontraron diferencias estadísticamente significativas en el recuento celular viable en UFC al comparar TFD con el grupo control (Rismanchian y cols., 2017). Finalmente, en 2020, Debb y cols., realizaron un estudio *in vivo* en 45 pacientes con periimplantitis, que fueron

## DISCUSIÓN

aleatorizados en tres tipos de tratamientos: TFD + desbridamiento mecánico (DM), antibióticos sistémicos + DM y DM solo. Este estudio sugirió que la TFD como complemento de la DM es tan eficaz como la terapia antibiótica adyuvante (Debb y cols., 2020).

En segundo lugar, en relación con *E. coli*, en el estudio publicado por Gianelli y cols., en 2017, en el que los autores investigaron la eficacia de la TFD frente a biofilms de *S. aureus* y lipopolisacáridos adheridos a discos de titanio, y que repitieron utilizando discos de titanio cultivados con *E. coli*, al igual que nosotros, también lograron mejores resultados (recuento de células viables y mayor ausencia de bacterias adheridas a la superficie de titanio con SEM) (con diferencias estadísticamente significativas) en discos tratados con TFD en relación con el grupo control (Gianelli y cols., 2017).

En tercer lugar, en relación con *P. aeruginosa*, en el mismo estudio mencionado anteriormente (Debb y cols., 2020) con un estudio *in vivo* y con tres tipos de tratamiento (TFD + desbridamiento mecánico, antibióticos sistémicos + DM y DM solo), TFD como complemento de DM fue el bactericida más efectivo, no solo para *S. aureus* sino que también para *P. aeruginosa*. En 2019, Alagl y cols., realizaron un estudio *in vitro* en el que cincuenta implantes dentales microtexturizados estaban contaminados con *Acinetobacter baumannii* (n=25) y con *P. aeruginosa* (n = 25), posteriormente divididos en seis grupos para los procedimientos de descontaminación que involucraron láser Er, Cr: YSGG (2780 nm), TFD (650 nm), TFD (808 nm), clorhexidina al 0.12% y un grupo de control sin descontaminación. Después de la descontaminación, se contaron las UFC y se prepararon los implantes para el análisis SEM. Los discos tratados con TFD 650 nm, como en nuestro estudio, mostraron un menor recuento celular viable y una mayor ausencia de bacterias adheridas a la superficie de titanio, según lo visto por SEM, con diferencias estadísticamente significativas, respecto a los discos del grupo control (Alagl y cols., 2019).

Para todas las bacterias estudiadas, el quitosano indujo un menor recuento de células viables, una mayor prevalencia de células con morfología anormal y una mayor ausencia de bacterias adheridas a la superficie de titanio que el grupo de control, con diferencias estadísticamente significativas. Además, también indujo un

menor recuento de células viables, un mayor porcentaje de prevalencia de células con morfología anormal y un mayor porcentaje de ausencia de bacterias adheridas a la superficie de titanio que el grupo tratado con TFD. Aunque en la literatura científica no existe ningún artículo con el que podamos comparar nuestros resultados sobre la bacteria *S. aureus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*; su eficacia en el tratamiento de la periimplantitis ha sido investigada en los últimos cinco años (Yoon y cols., 2020; Koldslund y cols., 2020; Li y cols., 2019; Larsen y cols., 2017; Zeza y cols., 2017; Wohlfahrt y cols., 2019). En 2020, Yoon y cols., evaluaron la eficacia del tratamiento de dos agentes de administración locales diferentes (quitosano-alginato minociclina y poiliacrilato-glicerina minociclina) en comparación con los implantes de control no tratados, en un estudio de periimplantitis inducido experimentalmente en perros beagle. Los autores concluyeron que el uso de quitosano-alginato minociclina como agente de administración local constituía un tratamiento eficaz para la periimplantitis (Yoon y cols., 2020). En 2020, Koldslund y cols. realizaron un estudio clínico prospectivo aleatorizado, en el que 44 sujetos fueron asignados al azar en grupos que recibieron tratamiento periimplantario de apoyo, ya sea mediante el uso de curetas de titanio o cepillos de quitosano. Sin embargo, después de 18 meses de seguimiento, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos, y el tratamiento con cepillos de quitosano tuvo una efectividad similar contra los periimplantitis que las curetas de titanio (Koldslund y cols., 2020). En 2017, Larsen y cols. publicaron un estudio en el que cuarenta y cinco implantes dentales fueron asignados a 3 grupos de tratamiento: láser Er:YAG, cepillo de quitosano y cureta de titanio, con los correspondientes controles positivos y negativos (Larsen y cols., 2017). El efecto antimicrobiano de los tratamientos contra *Porphyromonas gingivalis* se evaluó mediante hibridación ADN-ADN. Las 3 herramientas parecían tener un potencial similar para eliminar *P. gingivalis*, aunque ni el láser Er:YAG ni el quitosano alteraron la microestructura de la superficie del implante. Finalmente, Wohlfahrt y cols. publicaron un estudio multicéntrico de series de casos consecutivos, que incluyó un total de 63 implantes con periimplantitis leve que fueron tratados con un cepillo de quitosano unido a en una pieza de perforación dental oscilante. Después de un seguimiento de 6 meses; los autores concluyeron que un cepillo de quitosano oscilante es seguro de usar y



parece tener méritos en el tratamiento no quirúrgico de implantes dentales con periimplantitis leve (Wohlfahrt y cols., 2019).

Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio mostraron que para todas las bacterias evaluadas y en todas las variables estudiadas el tratamiento más efectivo fue TFD + quitosano. Aunque no existen publicaciones científicas previas con las que podamos comparar nuestros resultados sobre *S. aureus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*; se ha descrito el efecto sinérgico de ambos tratamientos contra hongos y otras bacterias (Fabio y cols., 2016; Camacho-Alonso y cols., 2017). En 2016, Fabio y cols., realizaron un estudio *in vivo* en treinta y cinco ratones inmunodeprimidos DBA/2 que fueron inoculados por vía oral con una suspensión de *Candida albicans*. Los animales fueron aleatorizados en siete grupos de tratamiento (n = 5 por grupo): control, nistatina, TFD, quitosano (1,5 mg / ml), quitosano (3 mg / ml), TFD + 1,5 mg / ml quitosano y TFD + 3 mg / ml quitosano. Aunque las diferencias entre ambos tratamientos no fueron estadísticamente significativas, los autores concluyeron que el tratamiento combinado de TFD + quitosano fue muy efectivo contra *C. albicans* (Fabio y cols., 2016). En 2017, Camacho-Alonso y cols., evaluaron el posible efecto potenciador del quitosano (3 mg/ml) sobre el fotosensibilizador de azul de metileno para el tratamiento de la TFD en conductos radiculares infectados experimentalmente con *Enterococcus faecalis* de dientes humanos extraídos *in vitro*. Se utilizaron ciento dos dientes extraídos de una sola raíz y, después de la contaminación, se aleatorizaron en seis grupos de tratamientos: NaOCL al 2,5%, TFD, quitosano (3 mg / ml), TFD + 3 mg / ml quitosano, control positivo y control negativo. El tratamiento con TFD + 3 mg / ml de quitosano condujo a la CFU / ml más baja y las imágenes SEM también mostraron que produjo el área más baja de contaminación (Camacho-Alonso y cols., 2017).

Este estudio estuvo sujeto a varias limitaciones. En particular, los resultados no se pueden comparar con ninguna investigación previa porque este es el primer estudio que evalúa el posible efecto antimicrobiano sinérgico de TFD y quitosano en las biopelículas adheridas al titanio de *S. aureus*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*. Además, este estudio tiene otras cuatro limitaciones importantes: el número de bacterias utilizadas (solo tres); en este estudio *in vitro* se ha utilizado un modelo de biopelícula estática en lugar de utilizar un modelo dinámico (boca artificial); los

## DISCUSIÓN

agentes antibacterianos más comunes (clorhexidina o peróxido de hidrógeno) no fueron utilizados; y finalmente, la falta de comparación con las terapias mecánicas. Cabe destacar, también, que son necesarios estudios *in vivo* para determinar el efecto sinérgico de la TFD y el quitosano contra la periimplantitis.

## 6. CONCLUSIONES.

## 6. CONCLUSIONES.

1. El estudio mediante el recuento de UFC/disco de la efectividad antibacteriana sobre biopelículas de *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa* adheridas a superficies de titanio, indicó que el orden de menor a mayor viabilidad bacteriana (en las tres bacterias estudiadas) se obtenía con TFD + quitosano < quitosano < TFD < control.

2. En las tres bacterias analizadas (*staphylococcus aureus*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa*), el orden de mayor a menor porcentaje de morfología celular anormal (indicando así un mayor efecto de lisis celular) se obtuvo con TFD + quitosano > quitosano > TFD > control.

3. El análisis de la efectividad para conseguir una mayor usencia residual de bacterias en superficies de titano con biopelículas de *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa*, indicó que el orden de mayor a menor efectividad se obtenía con TFD + quitosano > quitosano > TFD > control.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

Aguirre-Zorzano LA, Estefanía-Fresco R, Telletxea O, Bravo M. Prevalence of peri-implant inflammatory disease in patients with a history of periodontal disease who receive supportive periodontal therapy. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26:1338-1344.

Ahmed P, Bukhari IA, Albaijan R, Sheikh SA, Vohra F. The effectiveness of photodynamic and antibiotic gel therapy as an adjunct to mechanical debridement in the treatment of peri-implantitis among diabetic patients. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 32:102077.

Al-Nasser L, Lamster IB. Prevention and management of periodontal diseases and dental caries in the older adults. *Periodontol 2000.* 2020; 84:69-83.

Alagl AS, Madi M, Bedi S, Al Onaizan F, Al-Aql ZS. The Effect of Er,Cr:YSGG and Diode Laser Applications on Dental Implant Surfaces Contaminated with *Acinetobacter Baumannii* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Materials (Basel).* 2019; 12:2073.

Albertini M, Lopez-Cerero L, O'Sullivan MG, et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26:937–941.

Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Implant surface characteristics influence the outcome of treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2011; 38:58-64.

Alghamdi HS, Jansen JA. The development and future of dental implants. *Dent Mater J.* 2020; 39:167-172.

Atieh MA, Alsabeeha NHM, Faggion CM, Duncan WJ. La frecuencia de las enfermedades periimplantarias: una revisión sistemática y un metanálisis. *J Periodoncia.* 2012; 84:586–598.

Belibasakis GN. Microbiological and immune-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol.* 2014; 59:66-72.

Bi Y, Seabold JM, Kaar, et al. Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2001; 16:2082-2091.

Bianco LL, Montevecchi M, Ostanello M, Checchi V. Recognition and treatment of peri-implant mucositis: Do we have the right perception? A structured review. *Dent Med Probl.* 2021; 58:545-554.

Bürgers R, Witecy C, Hahnel S, Gosau M. El efecto de varios antisépticos tópicos para la periimplantitis sobre *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* y *Streptococcus sanguinis*. *Arco Oral Biol.* 2012; 57:940–947.

Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 25:382-388.

Camacho-Alonso F, Julián-Belmonte E, Chiva-García F, Martínez-Beneyto T. Bactericidal Efficacy of Photodynamic Therapy and Chitosan in Root Canals Experimentally Infected with *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. *Photomed Laser Surg.* 2017; 35:184-189.

Camacho-Alonso F, Salmerón-Lozano P, Martínez-Beneyto Y. Effects of photodynamic therapy, 2% chlorhexidine, triantibiotic mixture, propoli and ozone on root canals experimentally infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *Odontology.* 2017; 105:338-346.

Canullo L, Camacho-Alonso F, Tallarico M, Meloni SM, Khanari E, Penarrocha-Oltra D. Mucosa Thickness and Peri-implant Crestal Bone Stability: A Clinical and Histologic Prospective Cohort Trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2017; 32:675-681.

Canullo L, Schlee M, Wagner W, Covani U, Montegrotto Group for the Study of Peri-implant Disease. International Brainstorming Meeting on Etiologic and Risk Factors of Peri-implantitis, Montegrotto (Padua, Italy), August 2014. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015; 30:1093-1104.

Casado PL, Otazu IB, Balduino A, de Mello W, Barboza EP, Duarte ME. Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites. *Implant Dent.* 2011; 20:226-235.

Carcuac O, Derks J, Abrahamsson I, Wennström J L, Petzold M, Berglundh T. Tratamiento quirúrgico de la periimplantitis: resultados a 3 años de un ensayo clínico controlado aleatorizado. *J Clin Periodontol.* 2017; 44:1294–1303.



Chan H L, Oh W S, Ong H S, et al. Impacto de la implantoplastia en la resistencia del complejo implante-pilar. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013; 28:1530–1535.

Charalampakis G, Leonhardt Å, Rabe P, Dahlén G. Clinical and microbiological characteristics of peri-implanitis cases: a retrospective multicentre study. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23:1045-1054.

Charyeva O, Altynbekov K, Zhartybaev R, Sabdanaliev A. Long-term dental implant success and survival--a clinical study after an observation period up to 6 years. *Swed Dent J*. 2012; 36:1-6.

Cheng X, Tian Y, Zhao C, et al. Bactericidal Effect of Strong Acid Electrolyzed Water against Flow *Enterococcus faecalis* Biofilms. *J Endod*. 2016; 42:1120-1125.

Clark D, Levin L. In the dental implant era, why do we still bother saving teeth?. *Dent Traumatol*. 2019; 35:368-375.

Cochran DL, Nummikoski PV, Schoolfield JD, Jones AA, Oates TW. A prospective multicenter 5-year radiographic evaluation of crestal bone levels over time in 596 dental implants placed in 192 patients. *J Periodontol*. 2009; 80:725–733.

Cordeiro JM, Barão VAR. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017; 71:1201-1215.

Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LO, Ferreira SD, Silva GL, Costa JE. Enfermedad periimplantaria en sujetos con y sin mantenimiento preventivo: un seguimiento de 5 años. *J Clin Periodontol.* 2012; 39:173–181.

Dalago, H. R., Schuldt Filho, G., Rodrigues, M. A., Renvert, S. & Bianchini, M. A. Risk indicators for Peri-implantitis. A cross-sectional study with 916 implants. *Clinical Oral Implants Research.* 2017; 28, 144-150.

Deeb MA, Alsahhaf A, Mubarak SA, Alhamoudi N, Al-Aali KA, Abdujabbar T. Clinical and microbiological outcomes of photodynamia and systemic antimicrobial therapy in smokers with peri-implant inflammation. *Photodiagnosis and Photodyn Ther.* 2020; 29:101-587.

Decker AM, Sheridan R, Lin GH, Sutthiboonyapan P, Carroll W, Wang HL. A Prognosis System for Periimplant Diseases. *Implant Dent.* 2015; 24:416-421.

Deppe H, Horch H-H, Schrödl V, Haczek C, Miethke T. Efecto de la luz láser de excímero de 308 nm en bacterias asociadas a periimplantitis: una investigación in vitro. *Láseres Med Sci.* 2007; 22:223–227.

Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol.* 2015; 16:158-171.

de Fátima Balderrama Í, de Toledo Stuari V, Cardoso MV, et al. The influence of implant surface roughness on decontamination by antimicrobial photodynamic therapy and chemical agents: a preliminary study in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 17:102-105.

Dreyer H, Grischke J, Tiede C, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review. *J Periodont Res.* 2018; 53: 657- 681.

Duarte PM, Serrao CR, Miranda TS, et al. ¿Podrían usarse los niveles de citoquinas en el líquido crevicular periimplantario para distinguir entre implantes sanos e implantes con periimplantitis? Una revisión sistemática. *Clin Implant Oral Res.* 2015; 26:937–941.

Elani HW, Starr JR, Da Silva JD, Gallucci GO. Trends in Dental Implant Use in the U.S., 1999-2016, and Projections to 2026. *J Dent Res.* 2018; 97:1424-1430.

Ephros H, Kim S, DeFalco R. Periimplantitis: evaluación y manejo. *Dent Clin Norte Am.* 2020; 64:305–313.

Fabio Ca, Yolanda MB, Carmen GM, et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of *Candida albicans* in a murine model. *J Oral Pathol Med.* 2016; 45:627-633.

Faot F, Nascimento GG, Bielemann AM, Campao TD, Leite FR, Quirynen M. ¿Puede el líquido crevicular periimplantario ayudar en el diagnóstico de periimplantitis? Una revisión sistemática y metaanálisis. *J Periodoncia.* 2015; 86:631–645.

Ferraris S, Spriano S. Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 61:965-978.

Ferreira Ribeiro C, Cogo-Müller K, Franco GC, et al. Initial oral biofilmformation on titanium implants with different surface treatments: an in vivo study. *Arch Oral Biol.* 2016; 69:33-39.

Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant diseases in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol.* 2006; 33:929-935.

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8:623-633.

Frisch E, Wild V, Ratka-Krüger P, Vach K, Sennhenn-Kirchner S. Long-term results of implants and implant-supported prostheses under systematic supportive implant therapy: A prospective 25-year study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2020; 22:689-696.

Fu JH, Wang HL. Rompiendo la ola de periimplantitis. *Periodomonitoring.* 2020; 84:145-160.

Galindo-Moreno P, Fauri M, Avila-Ortiz G, Fernández-Barbero JE, Cabrera-León A, Sánchez-Fernández E. Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16:579-586.

Giannelli M, Landini G, Materassi F, et al. Effects of photodynamic laser and violet-blue led irradiation on *Staphylococcus aureus* biofilm and *Scherichia coli* lipopolysaccharide attached to moderately rough titanium surface: in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2017; 32:857-864.

Hallström H, Persson G R, Lindgren S, Renvert S. Desbridamiento con colgajo abierto de periimplantitis con o sin antibióticos sistémicos complementarios: un ensayo clínico aleatorizado. *J Clin Periodontol*. 2017; 44:1285–1293.

Hanif A, Qureshi S, Sheikh Z, Rashid H. Complicaciones en la odontología de implantes. *Eur J Dent*. 2017; 11:135–140.

Heindl JE, Wang Y, Heckel BC, Mohari B, Feirer N, Fuqua C. Mechanisms and regulation of surface interactions and biofilm formation in *Agrobacterium*. *Front Plant Sci*. 2014; 5:176.

Howe MS, Keys W, Richards D. Long-term (10-year) dental implant survival: A systematic review and sensitivity meta-analysis. *J Dent*. 2019; 84:9-21.

Hussain, R. A., Miloro, M., & Cohen, J. B. An Update on the Treatment of Periimplantitis. *Dental Clinics of North America*. 2020; 09:003.

Jamal M Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. 2018; 81:7-11.

Jankovic S, Aleksic Z, Dimitrijevic B, Lekovic V, Camargo P, Kenney B. Prevalencia de citomegalovirus humano y virus de Epstein-Barr en placa subgingival en periimplantitis, mucositis y sitios sanos. Un estudio piloto. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011; 40:271–276.

Jepsen S, Berglundh T, Genco R, et al. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis (Prevención primaria de la periimplantitis: manejo de la mucositis periimplantaria). *J Clin Periodontol.* 2015; 42:152–157.

Karring ES, Stravropoulos A, Ellegaard B, Karring T. Treatment of peri-implantitis by the Vector system. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16:288-293.

Karbach J, Callaway A, Kwon YD, d'Hoedt B, Al-Nawas B. Comparación de cinco parámetros como factores de riesgo para la perimucositis. *Int J Implantes de Maxilofac oral.* 2009; 24:491–496.

Katafuchi M, Weinstein BF, Leroux BG, Chen YW, Daubert DM. Restoration contour is a risk indicator for peri-implantitis: A cross-sectional radiographic analysis. *J Clin Periodontol.* 2018; 45:225-232.

Khammissa RA, Feller L, Meyerov R, Lemmer J. Mucositis periimplantaria y periimplantitis: características clínicas e histopatológicas y tratamiento. *SADJ.* 2012; 67:122-126.

Koldslund OC, Aass AM. Supportive treatment following peri-implantitis surgery: An RCT using titanium curettes or chitosan brushes. *J Clin Periodontol.* 2020; 47:1259-1267.

Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *J Periodontol.* 2010; 81:231-238.

Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. The association between selected risk indicators and severity of peri-implantitis using mixed model analyses. *J Clin Periodontol.* 2011; 38:285-292.

Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. The association between selected risk indicators and severity of peri-implantitis using mixed model analyses. *J Clin Periodontol.* 2011; 38:285-292.

Kostakioti M, Hadjifrangiskou, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; 3:10-306.

Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta M. CRIS Guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research. *J Conserv Dent.* 2014; 17:301-304.

Lang NP, Berglundh T, Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now. Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011; 11:178-181.

Larsen OI, Enersen M, Kristoffersen AK, et al. Antimicrobial Effects of Three Different Treatment Modalities on Dental Implant Surfaces. *J Oral Implantol.* 2017; 43:429-436.

Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and metaanalysis. *J Dent.* 2017; 62:1-12.

Leonhardt A, Dahlén G, Renvert S. Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. *J Periodontol.* 2003; 74:1415-1422.

Liaw K, Delfini RH, Abrahams JJ. Dental Implant Complications. *Semin Ultrasound CT MR.* 2015; 36:427-433.

Lindhe J, Meyle J, Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008; 35:282-285.

Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7:329–336.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002; 34:634-640.

Li W, Yang Y, Zhang H, et al. Improvements on biological and antimicrobial properties of titanium modified by AgNPs-loaded chitosan-heparin polyelectrolyte multilayers. *J Mater Sci Mater Med.* 2019; 30:52.

Maximo MB, de Mendonca AC, Alves JF, Cortelli SC, Peruzzo DC, Duarte PM. Peri-implant diseases may be associated with increased time loading and generalized periodontal bone loss: preliminary results. *J Oral Implantol.* 2008; 34:268–273.



Machtei E E. Alternativas de tratamiento para negociar la periimplantitis. *Adv Med.* 2014; 2014:487-903.

Mombelli A, Decaillet F. Las características de las biopelículas en la enfermedad periimplantaria. *J Clin Periodontol.* 2011; 38:203–213.

Monje A, Aranda L, Diaz KT, et al. Impact of Maintenance Therapy for the prevention of Peri-implant Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res.* 2016; 95:372-379.

Monje A, Catena A, Borgnakke WS. Asociación entre diabetes mellitus/hiperglucemia y enfermedades periimplantarias: Revisión sistemática y metanálisis. *J Clin Periodontol.* 2017; 44:636-648.

Morra M, Cassinelli C, Bollati D, Cascardo G, Bellanda M. Adherent endotoxin on dental implant surfaces: a reappraisal. *J Oral Implantol.* 2015; 41:10-16.

Nouneh RA, Wataha JC, Hanes PJ, Lockwood PE. Effect of lipopolysaccharide contamination on the attachment of osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy in vitro. *J Oral Implantol.* 2001; 27:174-179.

Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract* 2017; 128:40-50.

Ohba S, Sato M, Noda S, Yamamoto, Egahira K, Asahina I. Assessment of safety and efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for peri-implant disease. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 31:101-136.

Passoni BB, Dalago HR, Schuldt Filho G, et al. ¿El número de implantes tiene alguna relación con la enfermedad periimplantaria? *Revista de ciencia oral aplicada: revista FOB.* 2014; 22:403–408.

Peña A, Sánchez NS, Calahorra M. Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:527-549.

Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014; 16:783-793.

Persson GR, Renvert S. Grupo de bacterias asociadas a la periimplantitis. *J Periodontal Res.* 2016; 51:689–698.

Pfitzner, A., Sigusch, B.W., Albrecht, V. y Glockmann, E. Killing of Periodontopathogenic Bacteria by Photodynamic Therapy. *Revista de Periodoncia.* 2004; 75:1343-1349.

Poli PP, Beretta M, Grossi GB, Maiorana C. Risk indicators related to peri-implant disease: an observational retrospective cohort study. *J Periodontal Implant Sci.* 2016; 46:266-276.

Poli PP, Souza FÁ, Mandredini M, Majorana C, Beretta M. Regenerative Treatment of Peri-Implantitis Following Surface Decontamination With Titanium Brush and Antimicrobial Photodynamic Therapy: A Case Series Reentry. *J Oral Implantol.* 2020; 46:619-626.

Poli PP, Cicciu M, Beretta M, Miorana C. Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis: A Current Understanding of Their Diagnosis, Clinical Implications, and a Report of Treatment Using a Combined Therapy Approach. *J Oral Implantol.* 2017; 43:45-50.

Quaranta A, Lim ZW, Tang J, Perrotti V, Leichter J. The Impact of Residual Subgingival Cement on Biological Complications Around Dental Implants: A Systematic Review. *Implant Dent.* 2017; 26:465-474.

Quirynen M, Teughels W. Microbiologically compromised patients and impact on oral implants. *Periodontol 2000.* 2003; 33:119-128.

Rahman B, Acharya AB, Siddiqui R, Verron E, Badran Z. Terapia fotodinámica para enfermedades periimplantarias. *Antibióticos.* 2022; 11:918.

Rakic M, Grusovin MG, Canullo L. The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016 ;31:359-368.

Ramel C F, Lüssi A, Özcan M, Jung R E, Hämmerle C H, Thoma D S. Rugosidad superficial de los implantes dentales y tiempo de tratamiento mediante seis procedimientos de implantoplastia diferentes. *Clin Implant Oral Res.* 2016; 27:776–781.

Ramôa CP, Eissenberg T, Sahingur SE. Increasing popularity of waterpipe tobacco smoking and electronic cigarette use: Implications for oral healthcare. *J Periodontol Res.* 2017; 52:813-823.

Renvert S, Leesem J, Dahlén G, Lindahl C, Svensson M. Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2006; 33:362-369.

Renvert S, Persson GR, Pirih FQ, Camargo PM. Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol.* 2018; 45:278-285.

Rismanchian M, Nosouhian S, Shahabouee M, Davoudi A, Nourbakhskian F. Effect of conventional and contemporary disinfectant techniques on three peri-implantitis associated microbiotas. *Am J Dent.* 2017; 30:23-26.

Roccuzzo M, Bonino F, Aglietta M, Dalmaso P. Resultados a diez años de un estudio de cohorte prospectivo de tres brazos sobre implantes en pacientes con compromiso periodontal. Parte 2: resultados clínicos. *Clin Implant Oral Res.* 2012; 23:389–395.

Roccuzzo M, De Angelis N, Bonino L, Aglietta M. Resultados a diez años de un estudio de cohorte prospectivo de tres brazos sobre implantes en pacientes con compromiso periodontal. Parte 1: pérdida de implantes y pérdida ósea radiográfica. *Clin Implant Oral Res.* 2010; 21:490–496.

Roccuzzo M, Layton DM, Roccuzzo A, Heitz-Mayfield LJ. Resultados clínicos del tratamiento de la periimplantitis y la atención de apoyo: una revisión sistemática. *Clin Implant Oral Res.* 2018; 29:331-350.

Rodrigo D, Sanz-Sánchez I, Figuero E, et al. Prevalencia e indicadores de riesgo de enfermedades periimplantarias en España. *J Clin Periodontol.* 2018; 45:1510-1520.

Rokaya D, Srimaneepong V, Wisitrasameewon W, Humagain M, Thunyakitpisal P. Actualización de la periimplantitis: indicadores de riesgo, diagnóstico y tratamiento. *Eur J Dent.* 2020; 14:672-682.

Rokn A, Aslroosta H, Akbari S, Najafi H, Zayeri F, Hashemi K. Prevalence of peri-implantitis in patients not participating in well-designed supportive periodontal treatments: a cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2017; 28:314–319.

Romandini M, Lima C, Pedrinaci I, Araoz A, Soldini MC, Sanz M. Prevalence and risk/protective indicators of peri-implant diseases: A university-representative cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2021; 32:112-122.

Romanos GE, Delgado-Ruiz R, Sculean A. Concepts for prevention of complications in implant therapy. *Periodontol 2000.* 2019; 81:7-17.

Roos-Jansaker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Seguimiento de nueve a catorce años del tratamiento con implantes. Parte III: factores asociados a las lesiones periimplantarias. *J Clin Periodontol.* 2006; 33:296–301.

Salvi GE, Zitzmann NU. The effects of anti-infective preventive measures on the occurrence of biologic implant complications and implant loss: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014; 29:292-307.

Salvi GE, Ramseier CA. Efficacy of patient-administered mechanical and/or chemical plaque control protocols in the management of peri-implant mucositis. A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2015; 42:187-S201.

Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang H-L. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 2018; 45:246–256.

Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang H-L. Periimplantitis. *J Periodoncia*. 2018; 89:267-290.

Schwarz F, Mihatovic I, Golubovic V, Eick S, Iglhaut T, Becker J. Mucositis periimplantaria experimental en diferentes superficies de implantes. *J Clin Periodontol*. 2014; 41:513–520.

Schwarz F, Sculean A, Rothamel D, Schwenzer K, Georg T, Becker J. Evaluación clínica de un láser Er:YAG para el tratamiento no quirúrgico de la periimplantitis: un estudio piloto. *Clin Implant Oral Res*. 2005; 16:44–52.

Schou S, Holmstrup P, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Fiehn NE, Skovgaard LT. Sondeo alrededor de implantes y dientes con mucosa/encía periimplantaria sana o inflamada. Una comparación histológica en monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). *Clin Implant Oral Res*. 2002; 13:113–126.

Serino G, Ström C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:169-174.

Shaw T, Winston M, Rupp CJ, Klapper I, Stoodley P. Commonality of elastic relaxation times in biofilms. *Phys Rev Lett.* 2004; 93:098-102.

Shrestha A, Kishen A. Polymeric chitosan-conjugated photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2012; 88:577-583.

Sivaramakrishnan G., Sridharan K. Terapia fotodinámica para el tratamiento de enfermedades periimplantarias: un metanálisis en red de ensayos controlados aleatorios. *Fotodiagn Fotodyn Ther.* 2018; 21:1–9.

Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. Definición, etiología, prevención y tratamiento de la periimplantitis: una revisión. *Head Face Med.* 2014; 10:34.

Sousa V, Mardas N, Farias B, et al. A systematic review of implant outcomes in treated periodontitis patients. A systematic review of implant outcomes in treated periodontitis patients. *Clin Oral Implants Res.* 2016; 27:787-844.

Swierkot K, Lottholz P, Flores-de-Jacoby L, Mengel R. Mucositis, periimplantitis, éxito de los implantes y supervivencia de los implantes en pacientes con periodontitis agresiva generalizada tratada: resultados de 3 a 16 años de un estudio de cohorte prospectivo a largo plazo. *J Periodoncia.* 2012; 83:1213–1225.

Tenenbaum H, Bogen O, Severac F, Elkaim R, Davideau JL, Huck O. Long-term prospective cohort study on dental implants: clinical and microbiological parameters. *Clin Oral Implants Res.* 2017; 28:86–94.

Toma S, Brex M C, Lasserre J F. Evaluación clínica de tres modalidades quirúrgicas en el tratamiento de la periimplantitis: un ensayo clínico controlado aleatorizado. *J Clin Med.* 2019; 8:966.

Twito D, Sade P. The effect of cigarette smoking habits on the outcome of dental implant treatment. *PeerJ.* 2014; 2:546.

Wahlström M, Sagulin GB, Jansson LE. Seguimiento clínico de prótesis dentales fijas unilaterales sobre implantes maxilares. *Clin Implant Oral Res.* 2010; 21:1294–1300.

Wang X, Fan H, Zhang F, et al. Antibacterial Properties of Bilayer Biomimetic Nano-ZnO for Dental Implants. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020; 6:1880-1886.

Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:20983-21005.

Widodo A, Spratt D, Sousa V, Petrie A, Dono N. An in vitro study on disinfection of titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2016; 27:1227-1232.

Wohlfahrt JC, Aass AM, Koldslund OC. Treatment of peri-implant mucositis with a chitosan brush-A pilot randomized clinical trial. *Int J Dent Hyg.* 2019; 17:170-176.



Wohlfahrt JC, Evensen BJ, Zeza B, et al. A novel non-surgical method for mild peri-implantitis- a multicenter consecutive case series. *Int J Implant Dent.* 2017; 3:38.

Wohlfahrt JC, Lyngstadaas SP, Rønold HJ, et al. Porous titanium granules in the surgical treatment of peri-implant osseous defects: a randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2012; 27:401-410.

Yamamoto A, Tanabe T. Tratamiento de la periimplantitis alrededor de los implantes de superficie TiUnite utilizando microexplosiones láser Er:YAG. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2013; 33:21–30.

Yao JJ, Li M, Tang H, et al. What do patients expect from treatment with dental implants? Perceptions, expectations and misconceptions: A multicenter study. *Clin Oral Implant Res.* 2016; 28:261-271.

Yoon SW, Kim MJ, Paeing KW, et al. Efficacy of Local Minocycline Agents in Treating Peri-implantitis: An Experimental In Vivo Study in Beagle Dogs. *Pharmaceutics.* 2020; 12:10-16.

Zeza B, Wohlfahrt C, Piloni A. Chitosan bursh for professional removal of plaque in mild peri-implantitis. *Minerva Stomatol.* 2017; 66:163-168.

Zitzmann NU, Berglundh T. Definición y prevalencia de enfermedades periimplantarias. *J Clin Periodontol.* 2008; 35:286–291.

## BIBLIOGRAFÍA

Zitzmann NU, Walter C, Berglundh T. Ätiologie, Diagnostik und Therapie der Periimplantitis – eine Übersicht. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift. 2006; 61:642-649.

## 8. ANEXOS.

8. ANEXOS.

**DÑA. M<sup>a</sup> CONCEPCIÓN MARTÍNEZ-ESPARZA ALVARGONZÁLES,**  
**VICEDECANA DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN DE LA FACULTA DE**  
**MEDICINA DE LA UM**

**HACE CONSTAR QUE:**

***D. Brian Davis Cotrina Veizaga***

**Ha presentado al I Congreso Internacional de Investigación Biosanitaria para jóvenes investigadores la comunicación oral:**  
**EFFECTO SINÉRGICO ANTIMICROBIANO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA Y CHITOSANO EN LOS BIOFILIMAS**  
**ADHERIDOS AL TITANIO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI Y PSEUDOMONAS AERUGINOSA:**  
**UN ESTUDIO IN VITRO.**

Cotrina Veizaga BD, Salinas J, Sanchez Siles M, Pato Mourullo J, Ortega N, Camacho Alonso F

Firmado digitalmente por:  
M<sup>a</sup> Concepción Martínez-Esparza Alvar González  
Directora del CIRJI 2021

UNIVERSIDAD DE MURCIA

**I CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA PARA JOVENES INVESTIGADORES**

Código seguro de verificación: RUXFMhYi-6gR7ewd5-N92lLyIR-tpEiplYm

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

Documento acreditativo de comunicación oral, presentado en el I congreso internacional de investigación biosanitaria para jóvenes investigadores.

> *J Periodontol.* 2022 Jun;93(6):e104-e115. doi: 10.1002/JPER.21-0306. Epub 2021 Nov 12.

## Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and chitosan on the titanium-adherent biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*: An in vitro study

Fabio Camacho-Alonso <sup>1</sup>, Jesús Salinas <sup>2</sup>, Mariano Sánchez-Siles <sup>3</sup>, Jesús Pato-Mourelo <sup>4</sup>, Brian Davis Cotrina-Veizaga <sup>3</sup>, Nieves Ortega <sup>2</sup>

Affiliations + expand

PMID: 34541685 DOI: 10.1002/JPER.21-0306

### Abstract

**Background:** To date, no studies on the combined use of photodynamic therapy (PDT) and chitosan against peri-implantitis have been published. The aim of this study was to evaluate the possible synergistic antimicrobial effect of PDT and chitosan on the titanium-adherent biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

**Methods:** A total of 60 titanium discs were included in this study. The discs were randomized into three bacterial contaminations (n = 20 discs per bacterium). After being cultured (incubated for 48 hours) they were randomized again into four different disinfection modalities (n = 5 discs per treatment): control (without treatment), PDT, chitosan 3 mg/mL, and PDT + chitosan 3 mg/mL. After the treatments, the colony forming units (CFU) were measured to determine antimicrobial effects, and field emission scanning electron microscopy (FESEM) was used to study cell morphology and titanium adherence.

**Results:** For all the evaluated bacteria and all the variables studied the order from highest to lowest antimicrobial effectiveness was: PDT + chitosan 3 mg/mL > chitosan 3 mg/mL > PDT > control. Although, all disinfection methods were significantly effective when compared to control, the combined treatment of PDT + chitosan 3 mg/mL had the greatest antimicrobial effect against the three studied bacteria.

**Conclusions:** The combination of PDT and chitosan has a synergistic antimicrobial effect against the bacteria *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*, all closely related to peri-implantitis. However, further in vivo studies are needed because this study provides data based on an in vitro scenario that might not be extrapolated to patients with peri-implantitis.

**Keywords:** *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; chitosan; photochemotherapy.

© 2021 American Academy of Periodontology.

Publicación en pudmed del estudio realizado.

