

ARTICULO ORIGINAL



Un estudio comparativo de las propiedades microestructurales y antibacterianas de los implantes con texturados láser y SLA.

Ronald Motzfeld¹, Cristian Covarrubias^{2*}, Leyla Gómez³, Fabiola Bastias², Miguel Maureira²

1. Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile.
2. Laboratory of Nanobiomaterials, Research Institute of Dental Sciences, Faculty of Dentistry, Independence, University of Chile, Santiago, Chile.
3. Laboratory of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Dentistry, University of Chile, Santiago, Chile.

* Corresponding author: Cristian Covarrubias | Address: Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago, Chile. | Phone: +56 2 29781719; fax: +56 2 29781754 | E-mail: ccovarrubias@odontologia.uchile.cl

Work received on 31/07/2020

Revised work 28/01/2021

Approved for publication on 06/03/2021

ABSTRACTO

Objetivo: Comparar las propiedades estructurales y antibacterianas de un implante dental comercial tratado con láser (No-Itis®) con las de un implante tradicional con arenado y grabado con ácido (SLA). **Materiales y métodos:** La topografía de la superficie y la composición elemental de las superficies del implante se analizaron mediante una microscopía electrónica de barrido (SEM) aparejada a espectrometría de rayos X dispersiva (EDX). Las propiedades antibacterianas de los implantes se probaron contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. También se analizaron la capacidad de adsorción de proteínas y la bioactividad en el fluido corporal simulado (SBF) de las superficies del implante. **Resultados:** El implante tratado con láser presenta una topografía constituida por concavidades lisas y uniformes de ~ 30 µm de diámetro, libre de alteraciones inducidas por el láser y elementos e impureza. La superficie texturizada con láser demostró reducir significativamente ($p= 0,0132$) hasta alrededor de un 61% el crecimiento bacteriano en comparación con el implante SLA, que se encontró asociado a una adhesión reducida de proteínas en la superficie láser. No se detectaron depósitos minerales relacionados con la apatita en las superficies incubadas con SBF. **Conclusión:** La superficie lisa diseñada con láser exhibe un efecto antimicrobiano que disminuye el crecimiento de biopelícula bacteriana en su superficie, lo que podría contribuir a reducir el riesgo de periimplantitis

PALABRAS CLAVE

Implantes texturizados con láser; Periimplantitis; Superficies antimicrobianas

Int. J. Inter. Dent Vol. 14(3); 222-225, 2021.

INTRODUCCION

El éxito de la rehabilitación oral con implantes dentales de titanio depende en gran medida del grado de oseointegración en la interfaz metal-hueso, así como del tratamiento de las infecciones periimplantarias. A este respecto, se han utilizado varias técnicas de modificación de la superficie de los implantes de titanio como estrategia para mejorar las propiedades de oseointegración y prevenir infecciones. La periimplantitis es la enfermedad inflamatoria caracterizada por la infección bacteriana y el proceso destructivo que afecta a los tejidos blandos y duros alrededor de los implantes oseointegrados, lo que lleva a la pérdida del hueso de soporte (1,2). Para reducir la formación de biopelículas en la superficie del implante, se han explorado recubrimientos antibacterianos cargados con antibióticos (3), clorhexidina (4) o nanopartículas de plata (5). Otro enfoque consiste en el diseño de implantes de titanio con diferentes texturas superficiales y topografías. La reducción de la rugosidad y la energía libre superficial en los implantes ha mostrado una correlación positiva con la inhibición de la adhesión bacteriana (6). Por lo tanto, se estudian y utilizan diferentes técnicas para fabricar implantes dentales de titanio con textura controlada que incluyen superficies lisas-maquinadas, arenadas, grabadas con ácido y pulverizadas con plasma. El láser funde y modifica la textura de los implantes de titanio, produciendo superficies extremadamente puras, ordenadas y uniformes (7,8). El texturizado con láser reemplaza un proceso aleatorio (p.ej.: arenado, grabado) por uno digital. Los pulsos de luz láser permiten estructurar la superficie de un implante de titanio con un patrón preciso y repetible y permite tanto a los diseñadores de productos como a los fabricantes diseñar y cumplir con las especificaciones de rugosidad más exigentes. Actualmente, se están introduciendo en el mercado implantes dentales con superficies láser manipuladas por robot (9). Se han propuesto superficies diseñadas con láser para mejorar las propiedades mecánicas, químicas y biológicas de los implantes dentales. Las topografías de superficie pueden promover la unión y diferenciación celular, mejorando así las propiedades de oseointegración (10). Además, se han propuesto superficies más lisas producidas por el tratamiento con láser para reducir la formación de biopelículas y en consecuencia, disminuir el riesgo de periimplantitis (11). Sin embargo, existe poca evidencia sobre las propiedades antimicrobianas de los implantes texturizados con láser contra patógenos periimplantarios, así como estudios comparativos con superficies irregulares producidas mediante tratamientos de superficie convencionales.

En este trabajo, las propiedades estructurales, de composición y antibacterianas de un implante comercial tratado con láser se comparan sistemáticamente con las de un implante arenado y grabado con ácido (SLA). Las propiedades antibacterianas se evalúan contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, una bacteria periimplantaria representativa (12)

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo actual corresponde a un enfoque cuantitativo, cualitativo y estudio experimental comparativo in vitro.

Caracterización superficial de implantes dentales.

Se estudiaron Implantes dentales monofásicos (Ihde Dental AG, Suiza) fabricados con aleación de titanio grado 5 (Ti6Al4V-ELI). Se compararon implantes con texturización láser (No-Itis®) (láser) y tradicionales con doble arenado / grabado ácido (SLA). Los implantes dentales tenían una espira de implante endoósea de 3,2 / 3,7 mm y una longitud endoósea de 15 mm.

La topografía de la superficie de los implantes se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio JEOL JSM-IT300LV. Se adquirieron imágenes SEM representativas a 30, 120, 350 y 800 X de aumento con un voltaje de aceleración de 20 kV. El mapeo de la composición de resolución atómica en las superficies del implante se realizó mediante espectrometría de rayos X de dispersión de energía (EDX) (Aztec EDS, Oxford Instruments) acoplada al microscopio SEM. Se analizaron las superficies de un total de cinco implantes de cada tipo, y se presentan imágenes SEM representativas de los mismos.

Actividad antibacterial

El crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b(ATCC® 43718™) se evaluó en las superficies del implante. Cada implante esterilizado se colocó verticalmente en tubos con 990 µL de infusión fresca de Brain Heart (BHI) y 10 µL del inóculo (ajustado al estándar 2 de McFarland), y se incubó durante 48 horas en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 ° C. Después del período de incubación, los implantes se retiraron del medio de crecimiento y se sumergieron en una solución salina Tween 80 al 1% para eliminar las bacterias adherentes. Las diluciones tomadas de las suspensiones bacterianas se sembraron en placas de agar BHI y se incubaron durante 48 h. a 37°C. Después de eso, se contaron las colonias y se calcularon las unidades formadoras de colonias por superficie de implante (CFU/mm²).

El biofilm bacteriano formado en la superficie de cada implante se examinó mediante microscopía SEM. Después del período de incubación, las bacterias adherentes se fijaron sumergiendo los implantes en glutaraldehído al 2,5%, luego se deshidrataron en una serie de etanol, se secaron en CO₂ supercrítico (Tousimis, Autosamdry-815) y se recubrieron con oro antes de las imágenes SEM.

Adsorción de proteínas

La capacidad de adsorción de proteínas de las superficies de los implantes dentales se determinó utilizando albúmina de suero bovino (Merck) como proteína modelo.

Se pusieron en contacto 1,5 mL de solución tamponada (pH 7,4, K₂HPO₄ / KH₂PO₄ 100 mM) que contenía 0,4 mg / mL de proteína con cada implante colocado verticalmente en una placa de cultivo celular de 24 pocillos. Después de 6 h de incubación a 37 ° C, los implantes se retiraron de la solución de proteína y se lavó con tampón fosfato para eliminar las proteínas no adherentes. Luego, las proteínas adheridas se extrajeron de las superficies del implante incubando con 1.5 mL de solución de dodecilsulfato de sodio al 2% durante 12 h. a 37 ° C. La concentración de proteína extraída se midió utilizando el colorimétrico Micro Bicinchoninic Acid Assay Kit (Thermo Scientific)

Ensayo de bioactividad de la superficie

La capacidad de la superficie del implante para formar apatita similar al hueso en fluido corporal simulado acelular (SBF) se evaluó de acuerdo con ISO / FDIS 23317: 2007 (E). La solución de SBF de Kokubo pH 7,4 se preparó con la composición iónica y el procedimiento descrito en otra parte (13). Las muestras de implantes se sumergieron individualmente en 50 mL de SBF en botellas de polietileno a 36,5 ° C en un baño termostático de agua con agitación. Después de 28 días de incubación, los implantes se retiraron del SBF, se sumergieron en agua destilada durante 3 min y se secaron a 60 ° C. La apatita mineralizada en las superficies del implante se analizó mediante mediciones de composición SEM y EDX.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de recuento de unidades formadoras de colonias se llevó a cabo utilizando GraphPad prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Se realizó un análisis unidireccional de variación con comparaciones múltiples post hoc (prueba de Tukey) con un mínimo de n = 5 (nivel de significancia, P < 0.05).

RESULTADOS

Fig. 1 presenta las imágenes SEM de las superficies de los implantes dentales adquiridas con diferentes aumentos. El implante tratado con láser presenta una topografía constituida por concavidades uniformes y circulares de ~ 30 µm de diámetro y ~ 2 µm de ancho de borde, que se distribuyen regularmente en toda la superficie del implante. La zona interior y exterior de las concavidades presenta una textura lisa y libre de porosidad u otras alteraciones inducidas por láser. Por el contrario, el implante SLA presenta una superficie desorganizada, rugosa e irregular. El análisis elemental EDX (Fig. 2) confirmó la presencia de Ti, Al, V y O como componentes principales de las superficies oxidadas del implante de Ti6Al4V. C, Ca y P se detectaron como componentes minoritarios o traza de las superficies.

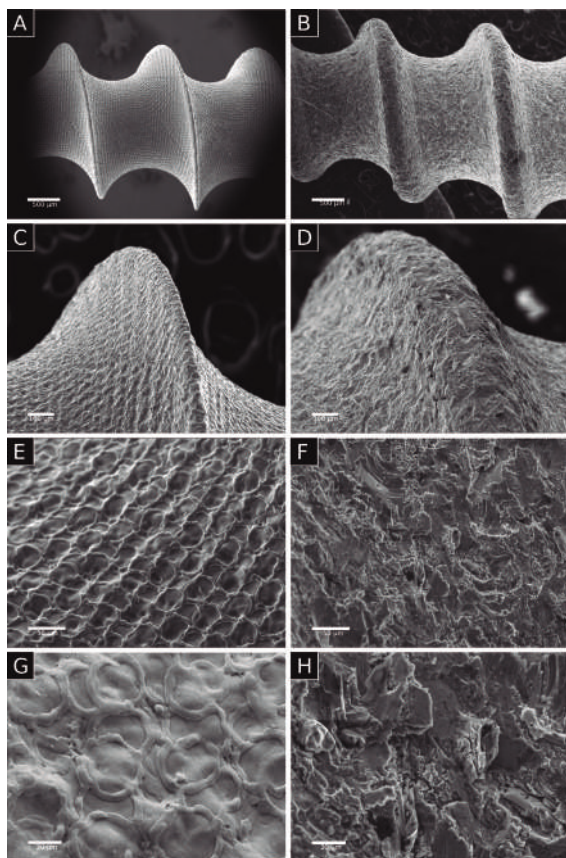


Figura 1. Imágenes SEM de superficies de implantes dentales de titanio de láser (A, C) y SLA (B, D) a 30X de aumento y láser (E, G) y SLA (F, H) a 800X de aumento.

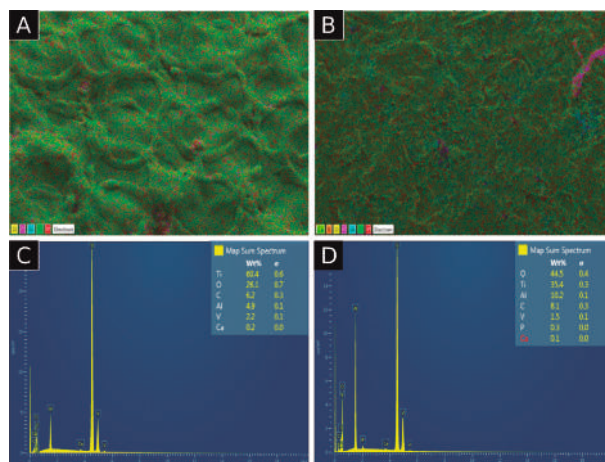


Figura 2. Análisis composicional EDX de las superficies de los implantes dentales. Mapas de distribución elemental EDX en las superficies de los implantes Láser (A) y SLA (B). Espectros EDX que muestran los valores porcentuales en peso de los elementos presentes en las superficies de los implantes Láser (C) y SLA (D).

La supervivencia de la biopelícula de *A. actinomycetemcomitans* cultivada por área de la superficie del implante se muestra en la Fig. 3. Los resultados muestran que con las bacterias la supervivencia se reduce significativamente (p = 0,0132) hasta alrededor del 61% en la superficie del implante tratada con láser en comparación con la superficie SLA tradicional. Las imágenes SEM (Fig. 4) confirman una cantidad sustancialmente menor de biofilm bacteriano desarrollada en el implante láser. Sobre el implante SLA se pueden observar abundantes microcolonias ancladas a la superficie y aparentemente incrustadas en su matriz de exopolisacáridos (14) (flechas blancas, fig. 4h)

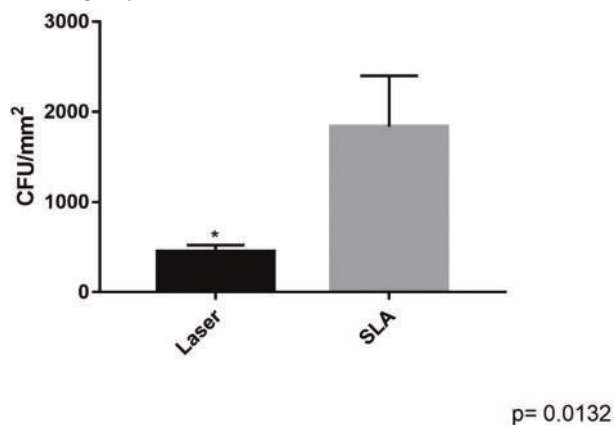


Figura 3. Supervivencia del biofilm de *A. actinomycetemcomitans* que creció por área de la superficie del implante después de 48 horas de incubación usando un estándar de 2 McFarland. Cada valor es la media ± de (n = 5). * indica p < 0,05.

Las capacidades de adsorción de proteína de albúmina para las superficies de los implantes Láser y SLA fueron 390 ng / mm² y 540 ng / mm², respectivamente. La Fig.5 muestra imágenes SEM y mapeo composicional EDX de superficies del implante después de 28 días de inmersión en SBF. Aunque las texturas de los implantes parecen estar ligeramente modificadas, no se detectaron depósitos de apatita o minerales relacionados en las superficies. Los contenidos de Ca y P medidos por EDX no fueron significativos

DISCUSIÓN

La topografía, composición química y propiedades bioactivas de la superficie del implante texturizada con láser se analizó y comparó sistemáticamente con la de un implante SLA tradicional. Los resultados confirman que el implante Láser presenta una superficie muy regular y lisa según la información proporcionada por el fabricante, que contrasta con la superficie desorganizada y rugosa del implante SLA. El tratamiento con láser también demostró producir modificaciones topográficas de la superficie del implante sin alterar su composición química superficial. Los ensayos microbiológicos demostraron que el implante láser presenta

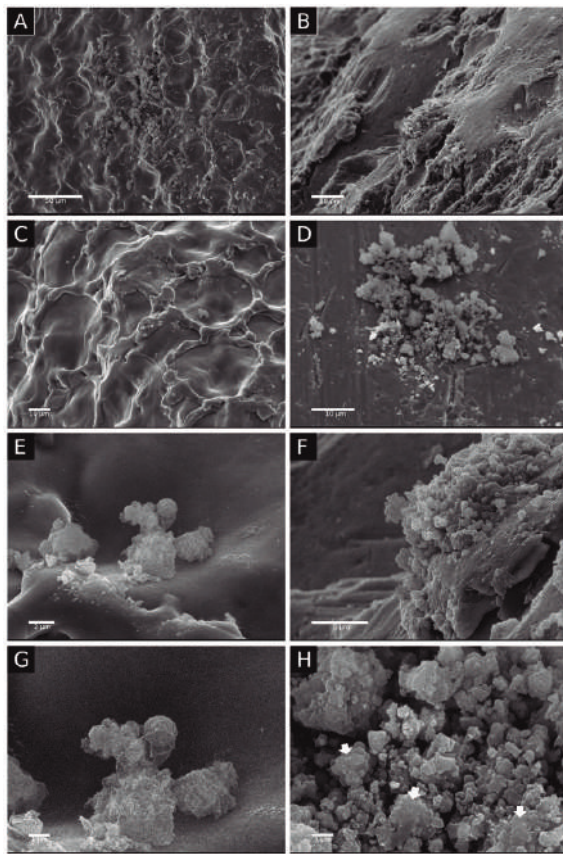


Figura 4. Imágenes SEM del biofilm de *A. actinomycetemcomitans* cultivada en superficie del implante láser a 500X (A), 1.000X (C), 6.000X (E) y 10.000X (F) de aumento y en la superficie del implante SLA a 1,500X (B), 2,000X (D), 5,000X (F), 10,000X (H) de aumento. Las flechas blancas en H muestran la morfología característica de las bacterias incrustadas en la matriz de exopolisacáridos.

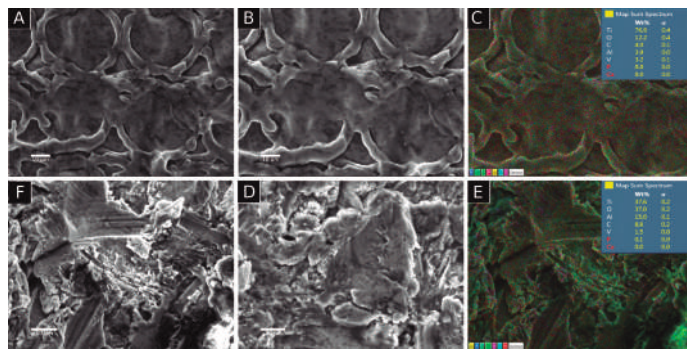


Figura 5. Imágenes SEM y mapeo de composición EDX de la superficie del implante láser (A - C) y la superficie del implante SLA (F - E) después de 28 días de incubación en SBF a 37° C. Las imágenes se tomaron a 1.100X y 1.400X de aumento.

una alta actividad antibacteriana contra una bacteria periimplantaria representativa en comparación con el implante SLA. El número reducido de bacterias que crecieron en la superficie del implante texturizado con láser se verificó mediante el recuento de bacterias viables y mediante observaciones SEM. La superficie más lisa del implante láser reduce significativamente la adhesión bacteriana y la formación de biofilm sobre el implante. La formación de biofilm en la superficie del implante depende en gran medida de la adsorción previa de moléculas de agua y proteínas (15), que promueven la colonización bacteriana. En el estudio actual, la superficie del implante

diseñada con láser mostró una menor capacidad de adsorción de proteínas en comparación con el SLA. Estos resultados indican que la menor energía libre proporcionada por la superficie lisa láser disminuye la unión de proteínas y en consecuencia, la formación de biofilm. Por el contrario, las irregularidades de la superficie rugosa del implante SLA promueven una mayor adsorción de proteínas, lo que facilita el establecimiento del biofilm. Aunque las superficies lisas del implante se han sugerido para resistir la colonización bacteriana (16), este efecto se ha verificado escasamente en implantes dentales comerciales fabricados con tecnología de texturizado láser. Uhlman et al. (17) detectaron con tinción violeta cristal una unión reducida de *Streptococcus mutans* en superficies de titanio microtexturizadas con láser. Zwahr et al. (18) utilizaron procesamiento láser para producir patrones jerárquicos en láminas de titanio, que pudieron reducir la adherencia de *Escherichia coli*. Ionescu et al. (19) estudiaron una superficie de titanio diseñada con láser formada regularmente por micro-fosas de 18 a 20 μm , que demostró reducir la formación de un inespecífico biofilm a partir de la saliva. Por lo tanto, la mayoría de los estudios informados sobre superficies láser no consideraron patógenos específicos periimplantarios como *Porphyromonas gingivalis* o *A. Actinomycetemcomitans*. Lasserre et al. (20) encontraron que estas bacterias presentan una frecuencia similar tanto en condiciones de periimplantitis como de periodontitis. Aunque la capacidad antimicrobiana de los implantes tratados con láser dependerá en gran medida de las características estructurales generadas en su superficie, las propiedades antibacterianas in vitro del implante Láser encontradas en el presente estudio podrían contribuir a reducir las probabilidades de infección.

Nuestro estudio también tuvo algunas limitaciones. La actividad antibacteriana de las superficies de los implantes se midió utilizando un modelo de biofilm de una sola bacteria, sin embargo, el microbioma periimplantario se ha caracterizado por 71 especies, 12 de las cuales están enriquecidos en sitios enfermos de periimplantitis (21). Por lo tanto, se podrían realizar más estudios utilizando modelos de biofilms multibacterianos. Además, la eficacia antibacteriana de la superficie del implante texturizada con láser debe confirmarse mediante pruebas en animales in vivo y ensayos clínicos.

Por otro lado, no se detectó mineralización de apatita similar a hueso en las superficies del implante utilizando el ensayo SBF acelular estándar. Por tanto, el análisis a micro y nanoescala de las propiedades de oseointegración del implante láser requerirían más experimentos biológicos in vitro e in vivo, incluidos ensayos de diferenciación celular y modelos animales.

CONCLUSIONES

El implante dental fabricado con tecnología de texturizado láser se constituye por topografía superficial regular y lisa. La suave superficie tratada con láser exhibe propiedades antibacterianas que disminuyen el crecimiento de biofilm bacteriano, que se encontró asociado con una capacidad de adsorción reducida de proteínas de adhesión bacteriana. Por lo tanto, el implante láser podría contribuir a disminuir el riesgo de infección dental periimplantaria.

RELEVANCIA CLÍNICA

El estudio actual compara las propiedades estructurales y antibacterianas de un implante dental comercial tratado con láser (NoItis®) con las de un implante tradicional arenado y grabado con ácido (SLA). Los resultados demostraron que el implante tratado con láser tiene una superficie de titanio regular y lisa que reduce significativamente el crecimiento bacteriano en comparación con un implante SLA tradicional. Estos hallazgos sugieren que las propiedades antibacterianas que exhibe el implante dental con superficie lisa diseñada con láser podrían contribuir a reducir el riesgo de infección periimplantaria, que es una de las principales razones del fracaso de los implantes dentales.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2002;28:177-89.
2. Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(3):721-64.
3. Lingzhou Z, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;91(1):470-80.
4. Campbell AA, Song L, Li XS, Nelson BJ, Bottoni C, Brooks DE, et al. Development, characterization, and anti-microbial efficacy of hydroxyapatitechlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization. *J Biomed Mater Res*. 2000;53(4):400-7.
5. Massa MA, Covarrubias C, Bittner M, Fuentevilla IA, Capetillo P, Von Martens A, et al. Synthesis of new antibacterial composite coating for titanium based on highly ordered nanoporous silica and silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;45:146-53.
6. Wassmann T, Kreis S, Behr M, Buegers R. The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1): 32.
7. Semak VV, Dahotre NB. Laser Surface Texturing. In: Dahotre NB (eds) *Lasers in Surface Engineering*. Park: ASM International; 1998 p. 35-67.
8. Gaggi A, Schultes G, Muller WD, Karcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces. A comparative study. *Biomaterials* 2000;21(10):1067-73.
9. Dr. Ihde Dental AG. IHDEDENTAL [Internet]. [cited 2020 Apr 28]. p. 2020. Available from: <https://implant.com/en/#produkte>
10. Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, et al. Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6285620.
11. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solution able to reproduce *in vivo* surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res*. 1990;24(6):723-34.
12. Cortelli SC, Cortelli JR, Romeiro RL, Costa FO, Aquino DR, Orzechowski PR, et al. Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Arch Oral Biol*. 2013;58(1):67-74.
13. Seghal Kiran G, Priyadarshini S, Anitha K, Gnanamani E, Selvin J. Characterization of an exopolysaccharide from probiont *Enterobacter faecalis* MS12 and its effect on the disruption of *Candida albicans* biofilm. *RSC Adv*. 2015;5:71573-85.
14. Di Giulio M, Traini T, Sinjari B, Nostro A, Caputi S, Cellini L. Porphyromonas gingivalis biofilm formation in different titanium surfaces, an *in vitro* study. *Clin Oral Impl Res*. 2016;27(7):918-25.
15. Singh AV, Vyas V, Patil R, Sharma V, Scopelliti PE, Bongiorno G, et al. Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS ONE* 2011;6(9):e25029.
16. Grossner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Muller WD, Lange KP, Briedigkeit H, et al. Plaque formation on surface modified dental implants. An *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(6):543-51.
17. Uhlmann E, Schweitzer L, Kieburg H, Spielvogel A, Huth-Herms K. The effects of laser microtexturing of biomedical grade 5 ti-6al-4v dental implants (abutment) on biofilm formation. *Procedia CIRP* 2018;68:184-9.
18. Zwahr C, Helbig R, Werner C, Lasagni A. Fabrication of multifunctional titanium surfaces by producing hierarchical surface patterns using laser-based ablation methods. *Sci Rep*. 2019;9(1):6721.
19. Ionescu AC, Brambilla E, Azzola F, Ottobelli M, Pellegrini G, Francetti LA. Laser microtextured titanium implant surfaces reduce *in vitro* and *in situ* oral biofilm formation. *PLoS ONE*. 2018;13(9):e0202262.
20. Lasserre J, Breckx M, Toma S. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. *Materials*. 2018;11(10):1802.
21. Ghensi P, Manghi, P, Zolfo M, Armanini F, Pasolli E, Bolzan M, et al. Strong oral plaque microbiome signatures for dental implant diseases identified by strain-