



Evaluación de la eficacia de Subsalicilato de Bismuto para la descontaminación de superficies de titanio colonizadas con biopelículas de *Staphylococcus aureus*. Estudio piloto.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**ESPECIALISTA EN PRÓTESIS BUCAL E
IMPLANTOLOGÍA**

P R E S E N T A:

MONSERRAT DEL CONSUELO RUIZ CARDONA

TUTOR: Dra. ARGELIA ALMAGUER FLORES

VoBo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Evaluación de la eficacia del Subsalicilato de Bismuto para la descontaminación de superficies de Titanio colonizadas con biopelículas de *Staphylococcus aureus*. Estudio piloto.

Monserrat del Consuelo Ruíz Cardona¹, Argelia Almaguer Flores²

Resumen.

Objetivo: El subsalicilato de bismuto (SSB) ha sido utilizado como agente terapéutico de infecciones gastrointestinales debido a su capacidad antibacteriana. Por otra parte, se ha reportado un incremento de la peri-implantitis asociada a la presencia de bacterias como *Staphylococcus aureus*. El propósito de este estudio piloto fue analizar el potencial del SSB como agente descontaminante de superficies de titanio colonizadas con *S. aureus*.

Materiales y métodos: Discos de titanio tratados con grabado ácido (Ti-SLA) fueron incubados durante 24 h con una suspensión de *S. aureus* (ATCC 25923). El protocolo de descontaminación consistió en lavados con SSB (20mg/mL), utilizando como control positivo clorhexidina (0.2%), y ddH₂O como control negativo. Posteriormente, las superficies volvieron a ser incubadas durante 24h para permitir el crecimiento de las células bacterianas remanentes. Después de la incubación, las muestras fueron procesadas para ser observadas con microscopía electrónica de barrido (SEM) y determinar el porcentaje de colonización bacteriana a partir de las micrografías obtenidas utilizando el software AxioVision. **Resultados:** La observación cualitativa de las microfotografías obtenidas con el SEM reveló que las superficies Ti-SLA lavadas con SSB presentaban porcentaje de colonización bacteriana (0.18%), comparándolas con las muestras lavadas con clorhexidina (24.28%) y ddH₂O (42.33%). **Conclusiones:** El protocolo de descontaminación con SSB, presentó un mejor efecto antibacteriano contra *S. aureus* comparado con el protocolo más utilizado actualmente que es la clorhexidina. Al ser este un estudio piloto, se requieren más estudios para evaluar con mayor profundidad el efecto del SSB como agente descontaminante en implantes dentales.

Abstract.

Objective: Bismuth subsalicylate (BSS) has been used as a therapeutic agent in gastrointestinal disorders due to its capacity to inhibit bacterial growth. On the other hand, it has been reported that the prevalence of peri-implantitis associated with bacteria like *Staphylococcus aureus* has increased. The aim of the present study was to analyze the potential of BSS to decontaminate titanium (Ti) implant surfaces colonized with *S. aureus*.

Materials and methods: Sandblasted acid-etched Ti disks surfaces (Ti-SLA) were incubated for 24h with a suspension of *S. aureus* (ATCC 25923). The decontaminating protocol consisted in washes with a solution of BSS (20mg/mL), using chlorhexidine (0.2%) as positive control, and ddH₂O as negative control. After washing, Ti-SLA disks were incubated again during 24h to allow the growth of the remained bacterial cells on the washed surfaces. After incubation, samples were prepared to be observed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and the percentage of bacterial colonization was estimated using AxioVision software. **Results:** The qualitative observation of the SEM micrographs revealed that the Ti-SLA surfaces washed with BSS exhibited reduced levels of bacteria (0.18%), compared with the surfaces washed with chlorhexidine (24.28%) and ddH₂O

(42.33%) washed surfaces. **Conclusions:** The decontaminating protocol with Bismuth subsalicylate seems to have a better antibacterial effect by reducing the colonization of *S. aureus* than the currently used decontaminating protocol with chlorhexidine. More studies are required to quantitatively evaluate the antibacterial effect of the BSS washing protocol on Ti implant surfaces.

Palabras clave: Peri-implantitis, Subsalicilato de bismuto, Titanio, *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Peri-implantitis, Bismuth subsalicylate, Titanium, *Staphylococcus aureus*.

¹ Egresada del programa de Especialización en Prótesis Bucal e Implantología, DEPEI, Facultad de Odontología, UNAM.

² Profesor Titular "A" de Tiempo Completo, Laboratorio de Biointerfases, DEPEI, Facultad de Odontología, UNAM.

Introducción.

El uso de medicamentos a base de metales se remonta a la antigüedad. Se tienen registros que compuestos a base de oro, se utilizaron en China y Medio Oriente hace 3500 años con la creencia de que los metales preciosos tenían valor medicinal, y más adelante el bicloruro de mercurio se utilizó como diurético durante el Renacimiento¹.

De manera más reciente, a principios del siglo XX, Paul Ehrlich, quien acuñó el término "quimioterapia", desarrolló el compuesto llamado Salvarsan, hecho a base de arsénico como tratamiento para la sífilis².

Una selección y manipulación cuidadosa de los metales nos lleva a un buen uso de sus propiedades químicas. De manera que al predecir y controlar la farmacodinamia y la farmacocinética de los diversos compuestos, nos proveen una oportunidad para desarrollar medicamentos a base de metales aprovechando sus mecanismos de acción³.

El bismuto es un metal pesado, considerado como el menos tóxico para el ser humano⁴, es encontrado en iguales proporciones que la plata en la corteza

terrestre, y ocupa el lugar 73 en abundancia. México es el segundo productor de bismuto a nivel mundial después de China⁵.

El primer uso médico documentado del bismuto fue en 1733, como ungüento para infecciones y como analgésico de dolor espasmódico en estómago e intestino^{6,7}. Para el siglo XX diversas preparaciones a base de Bismuto se usaron como tratamiento para una gran variedad de desórdenes incluyendo heridas de guerra, gastroenteritis, y *cholera infantum*, enfermedad en niños caracterizada por dolor estomacal, diarrea y vómito⁷. Una de estas preparaciones, que se sigue usando en la actualidad, es el Subsalicilato de Bismuto (SSB), componente principal del Pepto-Bismol™, desarrollado en 1901, utilizado para tratar gastritis y dispepsia⁸.

El SSB es una sal de bismuto trivalente y ácido salicílico altamente insoluble. Cada molécula contiene 58% de bismuto y 42% de salicilato por peso⁸. Se ha probado que reduce la secreción ácida, aumenta la producción de prostaglandinas de protección e inhibe el

crecimiento de *Campylobacter pylori*, exhibiendo así su capacidad antimicrobiana⁹. Otro estudio *in vitro* ha demostrado que el SSB es un antibacteriano que funciona contra diversos microorganismos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*)¹⁰.

Dentro del ámbito odontológico, se ha utilizado como aditivo radiopaco en resinas y cementos endodónticos, así como elemento hemostático post-quirúrgico¹¹.

Por otra parte, se sabe que un gran número de infecciones humanas son causadas por bacterias. Estas pueden incluir caries dental, enfermedad periodontal, enfermedades músculo-esqueléticas, y peri-implantitis, entre otras¹². Las bacterias causantes de este tipo de infecciones forman unas estructuras complejas llamadas biopelículas¹³.

Las biopelículas están constituidas por micro-colonias formadas de células bacterianas distribuidas en una matriz, de exopolisacáridos, proteínas, sales y material celular en solución acuosa adheridas a una superficie sólida^{13,14}. Esta forma de crecimiento bacteriano provee a las bacterias de protección contra especies competidoras o sustancias potencialmente tóxicas en su medio ambiente como antisépticos y antibióticos¹⁵.

En el caso de infecciones como la peri-implantitis, la formación de la biopelícula comienza con la adhesión de las bacterias a la superficie del implante, seguida de una fase de retraso en el crecimiento bacteriano, en donde ocurre un cambio de expresión genética. Posteriormente existe un periodo de crecimiento rápido en donde las bacterias producen la matriz de exopolisacáridos hasta llegar a un

estadio estacionario en donde la biopelícula alcanza cierto equilibrio¹⁶.

La formación de la biopelícula en los implantes es influenciada por las propiedades de la superficie a colonizar, incluyendo composición química y rugosidad, entre otros¹⁷.

El término peri-implantitis se introdujo en 1980 y se definió como un "proceso inflamatorio y destructivo que afecta los tejidos blandos y duros alrededor de implantes osteointegrados, que lleva a la formación de una bolsa peri-implantar y pérdida de hueso de soporte"¹⁸. Aunque el rol de las bacterias como agente etiológico de la peri-implantitis fue debatido al principio de la era de implantología dental, los análisis microscópicos hechos a diferentes implantes, dejó claro su papel clave en este tipo de infecciones¹⁹.

La microbiota asociada con tejidos peri-implantares sanos, está dominada por bacilos y cocos facultativos Gram positivos, encontrando también bajas proporciones de anaerobios Gram negativos²⁰.

Estudios han identificado grandes proporciones de bacterias anaerobias Gram negativas alrededor de implantes con signos clínicos evidentes de peri-implantitis, sobretodo gran prevalencia de patógenos asociados a periodontitis, incluyendo bacterias del complejo rojo y naranja²¹. Así mismo, se ha reportado la asociación entre la presencia de *Staphylococcus aureus*, bacilos entéricos y *Candida albicans* en peri-implantitis^{21,22}.

Respecto a *S. aureus*, se sabe que este microorganismo elabora leucotoxinas en contra de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, además de producir otras enzimas como la colagenasa, fibrolisina, coagulasa, elastasa, lipasa, nucleasa,

gelatinasa, y una variedad de otras proteinasas²². Además existe evidencia que sugiere que *S. aureus*, puede ser un importante patógeno iniciador de algunos casos de peri-implantitis^{22, 23}.

Desde que se reconoció la relación entre las bacterias y la peri-implantitis, se han propuesto y experimentado diferentes estrategias antimicrobianas²⁴.

Cuando una peri-implantitis es diagnosticada, el tratamiento depende de los requerimientos estéticos del implante y la cantidad de hueso perdido. Si la pérdida ósea está en estadios iniciales, el tratamiento será similar al de una mucositis, el cual implica remoción de la biopelícula con instrumentos de plástico, seguido de pulido de las superficies con copas de hule y pasta, hilo dental y cepillos interdentaes²⁵.

En actualidad no hay un protocolo universal para el tratamiento de la peri-implantitis.^{26,27} Uno de los protocolos más utilizados para la eliminación de la biopelícula adherida en las superficies de implantes, consiste en la irrigación con clorhexidina al 0.2% de manera intrasulcular.²⁸

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto del subsalicilato de bismuto (SSB) como agente descontaminante de superficies de titanio, colonizadas con biopelículas de *Staphylococcus aureus*.

Método.

Estudio piloto experimental.

Superficies de titanio.

En este estudio se utilizaron nueve discos de titanio fabricados y tratados en el Instituto Straumann AG (Basel, Switzerland) que nos fueron enviados listos para ser usados.

Los métodos que se utilizaron para producir los discos de titanio con grabado ácido/arenado (Ti-SLA) han sido reportados previamente²⁹.

Cultivo bacteriano.

La cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), se creció en agar enriquecido HK (agar soya Trypticase, suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina) y fue incubada a 35° C durante 24 horas. Esta cepa fue propagada y transferida hasta obtener cultivos puros, los cuales se usaron en los experimentos de formación de biopelículas sobre superficies de Ti-SLA.

Efecto antibacteriano del SSB.

Todas las superficies de Ti-SLA fueron esterilizadas en autoclave durante 20 minutos antes de ser utilizadas en los ensayos biológicos. Las superficies se colocaron individualmente en placas de 12 pozos donde se les adicionó una suspensión ajustada de 10⁶ cel/mL de *S. aureus* y fueron incubadas durante 24 horas a 35° C bajo condiciones aeróbicas en un shaker orbital a 100 rpm (Figuras 1-3). Pasado el tiempo de incubación, todas las superficies fueron lavadas dos veces con una solución buffer de PBS y fueron transferidas a pozos estériles para realizar irrigaciones descontaminantes.

Se realizaron dos irrigaciones de manera indirecta y una de manera directa sobre las superficies de Ti con una solución de SSB (20mg/ml) utilizando 1 mL en cada irrigación.

De igual manera, se realizaron los mismos lavados utilizando una solución de clorhexidina (0.2%) (control positivo) y agua bidestilada estéril (ddH₂O) (control negativo). Después de realizar las irrigaciones las superficies se volvieron a incubar en condiciones aeróbicas durante 24 horas.

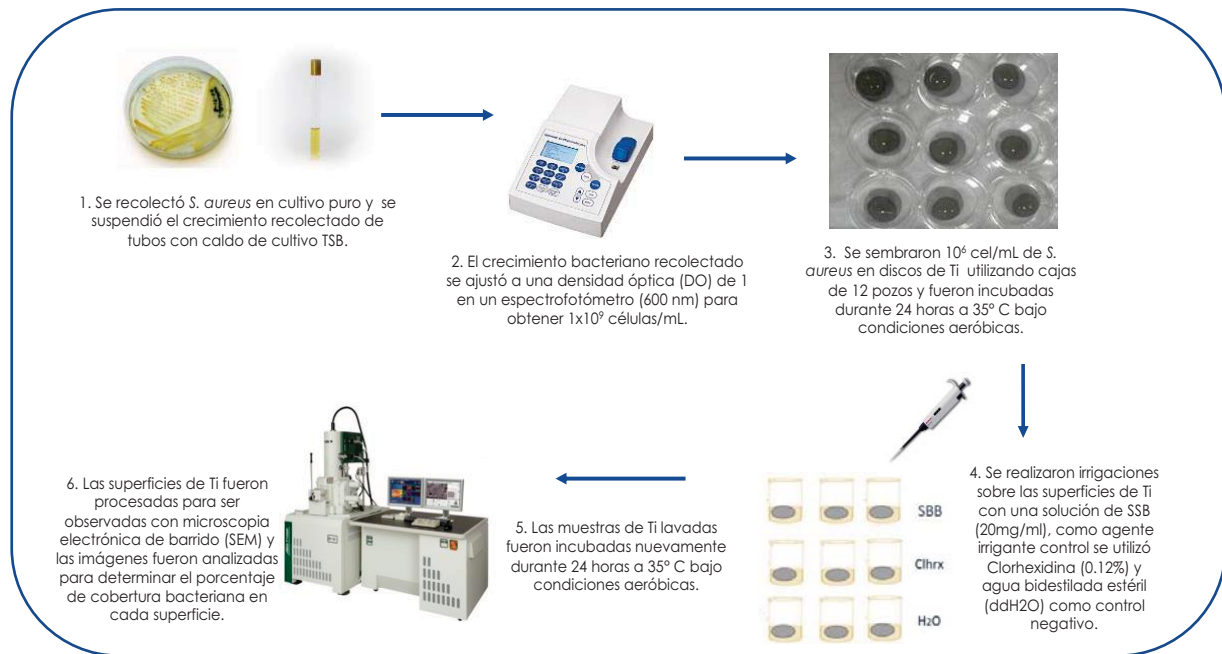


Figura 1. Secuencia metodológica del estudio.

Análisis por SEM.

Con el objeto de observar cualitativamente el efecto antibacteriano de la irrigación con SSB, las superficies de Ti fueron procesadas para ser observadas con microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).

Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2% por 24 horas a temperatura ambiente. Después fueron lavadas tres veces con un buffer de fosfato (pH 7.4) y deshidratadas con etanol en porcentajes seriados de 20, 40, 60, 80 y 100%. Posteriormente, las muestras fueron desecadas y cubiertas con oro (Au) para ser observadas usando un microscopio electrónico de barrido marca Cambridge - Leica Stereoscan 440 a 20kV.

La observación cualitativa de la biopelícula de *S. aureus* adherida a la superficie se realizó a través de la obtención de imágenes de electrones retro-dispersados (BSE). Las mismas imágenes fueron utilizadas para determinar el porcentaje de colonización bacteriana en cada superficie con el programa de análisis de imagen AxioVision.

El porcentaje de colonización bacteriana fue estimado a partir de microfotografías de SEM, en las microfotografías de magnificación 1000 X y 5000 X midiendo el área ocupada por las bacterias y comparando con el área total observada utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Colonización bacteriana (\%)} = \frac{(\text{Área bacterias} * 100)}{(\text{Área total})}$$

SSB

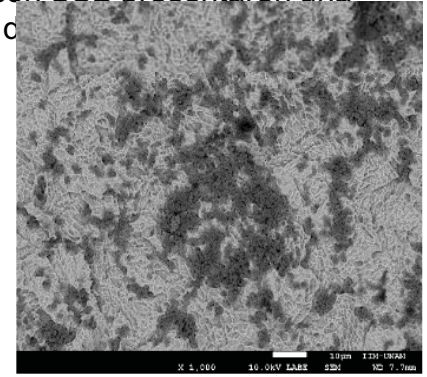
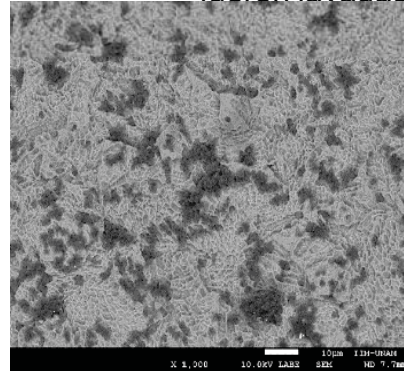
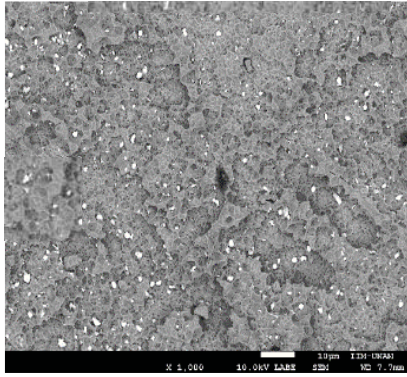
Clorhexidina

ddH₂O

fueron lavadas con SSB presentaron una

l c

1000X



5000X

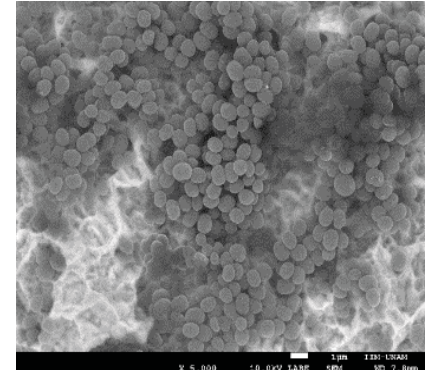
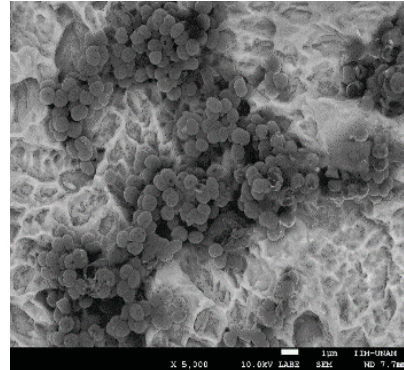
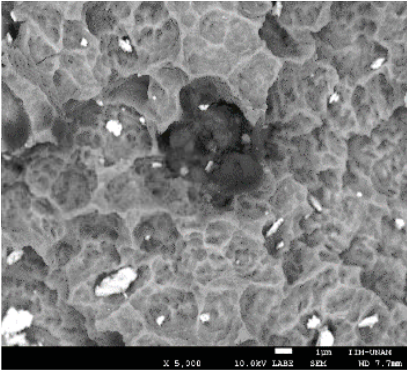


Figura 2. Microfotografías obtenidas por SEM con las cuáles se determinó el porcentaje de colonización bacteriana, magnificación 1000 X y 5000 X.

Análisis estadístico.

El porcentaje de bacterias adheridas sobre las superficies lavadas con los diferentes irrigantes, fue determinado utilizando seis zonas diferentes del área total de cada micrografía.

El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de ANOVA y las diferencias significativas se determinaron utilizando la modificación de Bonferroni.

Resultados.

La observación cualitativa de las microfotografías obtenidas con el SEM reveló que las muestras de Ti-SLA que

en su superficie, comparándolas con las muestras lavadas con clorhexidina y más aún con las muestras lavadas con ddH₂O (**Figura 2**).

El porcentaje de colonización bacteriana estimado a partir de las micrografías de SEM usando la magnificación 1000 X y 5000 X reveló que las muestras que fueron descontaminadas con SSB exhibieron un porcentaje significativamente menor de bacterias presentes (0.18% y 5.11%, respectivamente) comparadas con las muestras que fueron descontaminadas con clorhexidina (24.28% y 47.12%,

respectivamente) y con agua bidestilada (42.33% y 75.88%, respectivamente) (Tabla 1).

1000X	SSB	Chx	ddH ₂ O
Área total de la micrografía (µm ²)	10724.23	10724.23	10671.964
Área total ocupada por bacterias (µm ²)	19.18	2603.15	4517.92
Colonización bacteriana (%)	0.19 ± 0.7	24.3 ± 1.7	42.3 ± 5.8
% Inhibición	99.8 ± 2.1 *, **	75.7 ± 7.6	57.7 ± 10.1

5000X	SSB	Chx	ddH ₂ O
Área total de la micrografía (µm ²)	420.38	420.91	419.91
Área total ocupada por bacterias (µm ²)	21.49	198.33	318.64
Colonización bacteriana (%)	5.1 ± 1.1	47.1 ± 2.3	75.9 ± 7.3
% Inhibición	94.9 ± 3.8 *, **	52.9 ± 5.7	24.1 ± 12.6

Tabla 1. Porcentaje de colonización bacteriana determinado con las imágenes de SEM utilizando magnificación de 1000X y 5000X.
* SSB vs. CHX p < 0.05, ** SSB vs. ddH₂O p < 0.01

Discusión

En este estudio piloto, nos enfocamos en analizar el potencial del subsalicilato de bismuto (SSB) como tratamiento antiséptico, para tratar la peri-implantitis. En la práctica clínica, después del diagnóstico de peri-implantitis, es importante ofrecer a los pacientes una terapia individualizada que puede incluir: desbridamiento mecánico, uso de antisépticos, terapia con antibióticos, y/o cirugía³⁰.

A pesar de la cantidad de avances en el área de la implantología oral, los estudios referentes a la efectividad de los agentes utilizados en la fase de descontaminación de los implantes dentales, son limitados. Numerosos

estudios mencionan que se ha logrado una supervivencia muy alta de implantes dentales afectados con peri-implantitis, cuando son tratados con antibióticos sistémicos, además de la utilización de colutorios con clorhexidina, junto con el debridamiento mecánico^{30,31,32}.

Respecto a el uso de diferentes protocolos de descontaminación utilizando diferentes agentes antisépticos como; solución salina estéril^{33,34}, clorhexidina³⁵, ácido cítrico³⁶, peróxido de hidrógeno y láser CO₂³⁷, hasta la fecha, no se ha demostrado que un protocolo sea mejor que otro de manera significativa.

Los únicos reportes publicados sobre la efectividad de agentes descontaminantes de superficies de implantes han estado enfocados en la clorhexidina como agente antiséptico. Hasta ahora, no existen estudios disponibles que reporten el uso y eficacia del SSB como agente descontaminante de superficies de implantes con peri-implantitis, por lo que es difícil comparar los resultados obtenidos en este estudio piloto con lo reportado en la literatura. Sin embargo, ya que en este estudio piloto utilizamos la clorhexidina como agente descontaminante control (control positivo), utilizaremos los estudios reportados con este agente, para poner en perspectiva los resultados obtenidos con el SSB, el cual mostró una mayor efectividad que la clorhexidina en los experimentos realizados en este estudio piloto.

Un estudio *in vitro* reportó los resultados de un protocolo de desinfección utilizando clorhexidina al 0.05% sobre biopelículas de *S. aureus* cultivadas sobre placas de acrílico. Los resultados mostraron que la viabilidad bacteriana se redujo al 5.3%³⁸. A su vez, otro estudio reportó disminución de el número de unidades

formadoras de colonias del 10% al realizar protocolos de desinfección con clorhexidina al 0.2% a discos de titanio de diferentes rugosidades contaminados con *S. aureus*³⁹. Estos resultados confirman nuestros hallazgos de que la clorhexidina es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de *S. aureus*. Más aún, nosotros observamos una mayor inhibición bacteriana en las superficies descontaminadas con SSB que con las superficies tratadas con clorhexidina, lo que podría indicar el potencial del SSB como agente descontaminante.

Otro estudio realizado *in vitro* utilizando bacterias anaeróbicas, reportó el efecto de un protocolo de descontaminación utilizando clorhexidina al 0.2% sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* cultivadas sobre discos de titanio de diferentes rugosidades. Sus resultados mostraron que la clorhexidina fue capaz de inhibir en un 55% y 23.4% respectivamente⁴⁰. En este estudio encontramos que hubo una mejor inhibición del crecimiento bacteriano cuando se utilizó una solución SSB que con la clorhexidina, lo que nos hace pensar que este compuesto podría ser más efectivo que la clorhexidina para descontaminar la superficie de un implante que presente peri-implantitis.

Conclusiones.

En este estudio piloto, el protocolo de descontaminación usando subsalicilato de bismuto presentó un mejor efecto para reducir la colonización de *S. aureus* en las superficies de titanio comparado con la clorhexidina, que actualmente es el agente descontaminante más utilizado por los clínicos durante el tratamiento de peri-implantitis.

El subsalicilato de bismuto promete ser un agente efectivo como coadyuvante en la terapia antiséptica, debido a sus propiedades bactericidas, facilidad de manejo, y costo accesible.

Más estudios se requieren para evaluar de manera cuantitativa el efecto antibacteriano del subsalicilato de bismuto sobre superficies de titanio.

Agradecimientos.

Las autoras agradecen a Omar Novelo del Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, por su asistencia técnica para obtener las imágenes del SEM. A Gina Prado Prone por su apoyo para el análisis de las micrografías del SEM y también se agradece al Institut Straumann AG, Basel, Switzerland, por proporcionar los discos de Ti-SLA.

Este proyecto fue financiado por el proyecto UNAM-PAPIIT # IT201121 y aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología CIE/0305/02/2019.

Referencias.

1. Gaynor D, Griffith DM. The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: Beyond platinum. *Dalt Trans.* 2012;41(43):13239–57.
2. Mjos KD, Orvig C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev.* 2014;114(8):4540–63.
3. Barry NPE, Sadler PJ. Exploration of the medical periodic table: Towards new targets. *Chem Commun.* 2013;49(45):5106–31.
4. Ge R, Chen Z, Zhou Q. The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infections: An update. *Metallomics.* 2012;4(3):239–43.

5. Kirk-Othmer. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Fourth Edition. Hanford Tech Libr. 2010;10(September):372–7430.
6. Bierer DW. Bismuth subsalicylate: History, chemistry, and safety. *Rev Infect Dis.* 1990;12(FEBRUARY):S3–8.
7. Beatrix Bialek FT. Medical Use of Bismuth: the Two Sides of the Coin. *J Clin Toxicol.* 2011;s3(01).
8. Feldman S, Chen SL, Pickering LK, Cleary TG, Ericsson CD, Hulse M. Salicylate absorption from a bismuth subsalicylate preparation. *Clin Pharmacol Ther.* 1981;29(6):788–92.
9. Vogt K, Warrelmann M, Hahn H. The Minimum Inhibitory Concentrations of Various Bismuth Salts against *Campylobacter pylori*. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1989;271(3):304–10.
10. Vega-Jiménez AL, Berea-Montes E, Almaguer-Flores A. Susceptibility of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. epidermidis* to Different Bismuth Compounds. *MRS Proceedings.* Cambridge University Press; 2012;1487:imrc12–s4b-o026.
11. Mora LTA, Trujillo FJJ, Mora SJS. Eficacia y seguridad de la aplicación de subgalato y subsalicilato de bismuto como agentes hemostáticos después de la extracción quirúrgica de terceros molares. *Rev ADM.* 2003;60(3):90-94.
12. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002;28(1):12–55.
13. J C. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;437(437):7–11.
14. Anwar H, van Biesen T, Dasgupta M, Lam K, Costerton JW. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1824–1826.
15. Ashby MJ, Neale JE, Knott SJ, Critchley IA. Effect of anti-biotics on non-growing cells of biofilms of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 443–452.
16. Sharma V, Kumar A, Bhayana G, Dahiya A, Duggal N, Juneja A, et al. Peri-Implantitis In Dental Implants: An Updated Review. *J Oral Heal Community Dent.* 2015;9(2):81–4.
17. Binon P, Weir D, Watanabe L, Walker L. Implant component compatibility. En: Laney WR, Tolman DE (eds). *Tissue integration in oral orthopedic and maxillofacial reconstruction.* Chicago: Quintessence 1992; p. 218-226.
18. Mombelli A, van Oosten MAC, Schürch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol.* 1987;2(4):145–51.
19. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(SUPPL. 8):286–91.
20. Alcoforado GA, Rams TE, Feik D, Slots J. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. *J Parodontol* 1991; 10: 11–18.
21. Leonhardt A, Renvert S, Dahle'n G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res* 1999; 10: 339– 345.
22. Rams TE, Feik D, Slots J. Staphylococci in human periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 1990;5(1):29–32.
23. Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 2002;28(1):177–89.
24. Heydenrijk K, Meijer HJA, Van der Reijden WA, Raghoobar GM, Vissink A, Stegenga B. Microbiota around root-form

endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:829-38.

25. Zablotsky NH, Diedrich DL, Meffert RM. Detoxification of endotoxin-contaminated titanium and hydroxyapatite-coated surfaces utilizing various chemotherapeutic and mechanical modalities. *Implant Dent* 1992;1:154-158

26. Heo SJ, Kim HJ, Joo JY, Lee J, Kim SJ, Choi J. Simplified nonsurgical treatment of peri-implantitis using chlorhexidine and minocycline hydrochloride. *J Periodontal Implant Sci*. 2018;48(5):326–33.

27. de Waal YCM, Raghoobar GM, Meijer HJA, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Implant decontamination with 2% chlorhexidine during surgical peri-implantitis treatment: A randomized, double-blind, controlled trial. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(9):1015–23.

28. Claffey N, Clarke E, Polyzois I, Renvert S. Surgical treatment of peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 2008;35(SUPPL. 8):316–32.

29. Heitz-Mayfield LJA (1), Lang NP (2). Antimicrobial treatment of peri-implant diseases. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* [Internet]. [cited 2021 Sep 19];19:128–39.

30. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11 Suppl 1:146–55.

31. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE, Mombelli A, Faddy M, Lang NP. Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(2):205–10.

32. Canullo L. Identification of *Staphylococcus aureus* at the internal and external implant surfaces in individuals with peri-implant disease: A cross-sectional

study. *Identification of Staphylococcus aureus at the internal and external implant surfaces in individuals w.* 2016;(March):7–13.

33. Jovanovic SA. The management of peri-implant breakdown around functioning osseointegrated dental implants. *J Periodontol* 1993;64:1176

34. Shibli, J. A., Martins, M. C., Nociti, F. H. Jr., Garcia, V. G. & Marcantonio, E. Jr. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration. A preliminary histologic study in dogs. *J Periodontology* 2003: 74 , 338-345

35. Wetzel, A. C., Vlassis, J., Caffesse, R. G., Hammerle, C. H. F. & Lang, N. P. Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clinical Oral Implant Research* 1999: 10 , 111–119.

36. Schou, S., Holmstrup, P., Jorgensen, T., Skovgaard, L. T., Stoltze, K., Hjorting-Hansen, E. & Wenzel, A. Implant surface pre-preparation in the surgical treatment of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE membrane in cynomolgus monkeys. *Clinical Oral Implant Research* 2003 :14 , 412–422

37. Persson, L. G., Mouhyi, J., Berglundh, T., Sennerby, L. & Lindhe, J. Carbon dioxide laser and hydrogen peroxide conditioning in the treatment of peri-implantitis: an experimental study in the dog. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2004:6 , 230–238.

38. Wang H, Ren D. Controlling *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus* biofilms with direct current and chlorhexidine. *AMB Express*. 2017;7

39. Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, Jiang S, Ge H, et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface. *Photodiagnosis and Photodynamic*

Therapy efficacy. International Journal of
Oral and Maxillofacial Implants

40. Lin HY , Liu Y, Wismeijer D, Crielaard
W, Deng DM. Effects of oral implant surface
roughness on bacterial biofilm formation and
treatment