



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**INFLUENCIA DE LA QUÍMICA SUPERFICIAL EN LA
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS SOBRE SUPERFICIES
PARA IMPLANTES DENTALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ARIEL IGNACIO LECHUGA BERNAL

TUTORA: DRA. ARGELIA ALMAGUER FLORES

ASESORAS: DRA. SANDRA ELIZABETH RODIL POSADA
DRA. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres.- sabiendo que jamás habrá una forma de agradecer su apoyo, sacrificio y comprensión, solo deseo que entiendan, que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos. **Socorro**... gracias por los buenos consejos, amor y sobre todo por ser mí gran ejemplo en la vida. **Ignacio**... gracias por estar siempre presente y apoyarme en mis proyectos.

UNAM.- A esta gran Universidad por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de la gran familia de profesionistas de sangre azul y piel dorada. A todos y cada uno de **mis pacientes** que depositaron su confianza en mi.

Argelia.- Como tu alumno, amigo y compañero de trabajo, siempre estaré agradecido por todo lo que me enseñaste no solo en el ámbito profesional si no también por mostrarme tú íntegra y maravillosa calidad humana. Me acompañaste a lo largo de este camino y me guiaste hasta el final.

Laurie Ann.-Gracias por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio y orientarme para conseguir una de las grandes metas en mi vida.

Gema.- Llegaste cuando menos te esperaba, no fue ni temprano ni tarde, si no justo a tiempo cuando más te necesitaba. Eres mi soporte, mi escucha, mi amiga y compañera. Tu apoyo en los momentos difíciles fueron fundamentales para lograrlo. Gracias por ser como eres.

Laboratorio de Genética Molecular.- **Adri, Gaby, Valentina, Nadia, Oscar e Isra**... Aprendí mucho a su lado y les agradezco permitirme conocerlos y trabajar a su lado. **Paty**...Te agradezco especialmente por haberme enseñado todo lo que debía saber del laboratorio, admiro tu disciplina, esfuerzo y empeño. Sin ti no lo habría logrado.

Mis Amigos.- **Rebeca, Nacho, Oscar, Richard, y Víctor...** por demostrarme día con día que no estoy solo y que los momentos buenos de la vida se deben disfrutar; y que debemos afrontar los problemas con responsabilidad e inteligencia.

Ivanchis... por ser una gran orientación y ayudarme a quitar las cosas que me nublan la vista. Por tu apoyo y motivación sin igual. "Todos flotan".

Mis Hermanos.- **Cristian, Adolfo y Omar...** Hace muchos años empezamos un camino juntos y pronto nos acercamos juntos a las metas, estuvieron conmigo siempre y espero que este trabajo les guste y los llene de orgullo, así como yo me enorgullezco de ustedes.

Agradezco a **Dios** por lo afortunado y rico que me ha vuelto con los amigos, conocidos y profesores, que ha puesto en mi camino y me han dado un poco de sí para ser mejor persona y profesionalista cada día.

CONTENIDO

. RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	
A. ANTECEDENTES	2
ADHESION BACTERIANA	2
BIOPELICULAS	7
PERI-IMPLANTITIS	9
MATERIALES UTILIZADOS PARA IMPLANTES	14
SUPERFICIES DE CARBONO AMORFO	15
B. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	16
C. OBJETIVOS	17
D. HIPÓTESIS	18
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
A. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	18
FORMACIÓN INICIAL DE LA BIOPELÍCULA SOBRE LAS SUPERFICIES EXPERIMENTALES	19
TÉCNICA DE CHECKERBOARD PARA HIBRIDACIONES DNA-DNA	21
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO SEM	25
B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	25
III. RESULTADOS	26
IV. DISCUSIÓN	29
V. CONCLUSIONES	32
VI. TABLAS Y FIGURAS	33
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMEN

El uso de implantes, es cada vez más común en el ámbito odontológico. Actualmente, se han realizados modificaciones superficiales de estos aditamentos con el fin de mejorar la oseointegración. Sin embargo, se desconoce si estas modificaciones favorecen también la adhesión bacteriana, facilitando así la aparición de procesos infecciosos como la peri-implantitis. La adhesión bacteriana, que es el primer paso para la formación de las biopelículas, depende de factores como la rugosidad, hidrofiliidad y la química superficial entre otros. El objetivo principal de este trabajo de investigación fue analizar la formación inicial de biopelículas utilizando nueve especies bacterianas representativas de la placa dentobacteriana subgingival normal, sobre sustratos con películas delgadas de Titanio (Ti) y Carbono amorfo (a-C) con diferentes rugosidades así como en superficies de Acero inoxidable de grado médico 316L (SS). En los resultados podemos observar que un mayor número de bacterias se adhirió a las superficies rugosas que a las superficies lisas. La adhesión bacteriana en las películas de a-C comparada con la adhesión bacteriana encontrada en el SS 316L fue menor. Sin embargo, comparandolo con la superficie de Ti, las propiedades del a-C favorecieron más la adhesión bacteriana. En cuanto a la proporción de cada una de las especies en las biopelículas formadas sobre las diferentes superficies, también pudimos observar diferencias de acuerdo con los diferentes tipos de superficies. Estos resultados soprotran la noción de que la adhesión bacteriana, que es el primer paso en la formación de las biopelículas, es afectada de manera importante, tanto por la composición química, como por la topografía (rugosidad) de las superficies. Nuestros resultados dan pie a la investigación a cerca del mejoramiento y desarrollo de nuevos biomateriales con el fin de obtener mayores beneficios en el área de la implantología. Así como para entender las diferencias observadas en la formación secuencial de una biopelícula entre los diferentes materiales que fueron utilizados.

B. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El uso de implantes, es cada vez más común en el ámbito odontológico; a pesar de los resultados satisfactorios, los tejidos que soportan los implantes oseointegrados son susceptibles a patologías que pueden llevar a la pérdida del implante. Se desconoce si las modificaciones que se han realizado en estos implantes para mejorar la oseointegración, favorecen también la adhesión

bacteriana, facilitando así la aparición de procesos infecciosos como la peri-implantitis. Estudios previos sugieren que la adhesión bacteriana, que es el primer paso para la formación de las biopelículas, depende de factores como la rugosidad, hidrofiliidad y la química superficial entre otros. Debido a esto, en este estudio se propone evaluar el papel de la química y la rugosidad superficial en la formación inicial de biopelículas *in vitro* sobre superficies con diferente composición química superficial.

I. INTRODUCCIÓN

A. ANTECEDENTES

i. ADHESIÓN BACTERIANA

En la boca se encuentran varios tipos de superficies, incluyendo epitelio queratinizado y no-queratinizado, el de los dientes, y la superficie de las mismas bacterias (Gibbons, 1989).

La renovación constante de las superficies debida a la descamación previene la acumulación de grandes masas de microorganismos. Los dientes tienen superficies duras, sin desprendimientos que permiten desarrollar extensos depósitos bacterianos (Listgarten, 1999).

Las bacterias poseen un sistema altamente desarrollado de reconocimiento que es capaz de identificar e interactuar con las macromoléculas específicas en superficies de los tejidos del huésped. A esta afinidad de las bacterias por un tejido o superficie en particular se le llama Tropismo bacteriano el cual esta mediado por receptores específicos (Gibbons, 1989). La capacidad de adherirse a las superficies es una propiedad general de casi todas las bacterias. La adhesión es el primer evento necesario para colonizar ambientes donde existen superficies expuestas a fluidos como la boca. La unión se requiere para evitar que los organismos sean removidos de los tejidos por los líquidos bucales. Las bacterias deben adherirse para poder persistir y tener oportunidad de desarrollarse (Gibbons, 1996).

El mecanismo más conocido de adhesión bacteriana involucra la formación de enlaces mediados por proteínas fibrilares denominadas pilis o fimbrias, indistintamente; un pilus se constituye básicamente por una secuencia ordenada de subunidades proteicas de pilina que forman una estructura cilíndrica (Dalton and March, 1998). Los pilis son largos, flexibles y se extienden hacia el exterior de la superficie bacteriana para interactuar con la célula hospedadora; aunque frecuentemente se encuentran distribuidos en todo el perímetro microbiano, algunas especies solo los presentan en una o más zonas específicas (Hacker et al., 1997). La punta de los pilis median la adherencia bacteriana uniéndose a ciertas moléculas ubicadas sobre las superficies de las células de los tejidos; por lo general, estos receptores de las adhesinas fimbriales corresponden a carbohidratos, glicoproteínas o glicolípidos, cuya función primaria es mantener a las células de los tejidos, aunque también se acepta que fungen como receptores hormonales y/o que representan señales asociadas a los mecanismos de traducción de dichas células. La unión de los pilis a su célula blanco es tan específica, que los receptores presentes en los tejidos del hospedador determinan el tipo de bacterias que colonizan la zona implicada. En algunos casos la unión específica entre el carbohidrato superficial de la célula hospedadora y el extremo distal del pilus depende de otras proteínas localizadas precisamente en la punta de la fimbria; no obstante numerosas reacciones de adhesión se basan en la participación directa de la pilina (Deitsch et al., 1997). La secreción, el ensamble y el anclaje de cada pilus bacteriano representan un proceso complejo que requiere de la presencia de numerosas proteínas auxiliares.

Se han detectado cuatro sistemas de secreción proteica en las bacterias Gram negativas conocidos como I, II, III y IV, los cuales emplean una energía proveniente de la hidrólisis del ATP (Dalton and March, 1998, Henderson et al., 1998, Meccas and Strauss, 1996). La secreción de proteínas de las bacterias Gram positivas es aparentemente menos compleja. Una secuencia señal parece ser suficiente, aunque las moléculas encargadas de anclarse deben presentar diversas secuencias repetidas y a continuación un grupo carboxi-terminal, un hexapeptido, una extensión hidrofóbica de aproximadamente 20 aminoácidos y una cola cargada positivamente (Dunny and Leonard, 1997).

Algunas bacterias poseen proteínas superficiales cuya estructura y proceso de ensamble difieren de los observados en los pilis, aunque también funcionan eficazmente como determinantes de adherencia. Dichas sustancias reciben genéricamente el nombre de adhesinas no fimbriales y su participación suele ser independiente de la ausencia o presencia del pili. Una buena parte de ellas reconocen como receptores a ciertas proteínas superficiales en los tejidos blanco, en lugar de unirse a carbohidratos (Edwards and Puente, 1998).

Adhesión de la bacteria al diente.

La formación de la placa dental es el resultado de una serie de procesos complejos que involucran una variedad de bacterias y componentes de la cavidad bucal del hospedero. Estos procesos comprenden en primer lugar la formación de la película adquirida sobre la superficie del diente (Gibbons et al., 1988, Gibbons et al., 1991, Kolenbrander et al., 1999). Se ha demostrado que esta placa, produce

una diversidad de sustancias irritantes, tales como ácidos, endotoxinas y antígenos que con el tiempo, inevitablemente disolverían el diente y destruirían sus tejidos de soporte (Dzink et al., 1987). La placa dental se clasifica según su localización en supragingival y subgingival y por su potencial patógeno en cariogénica y periodontopatogénica (Loesche, 1976).

Cuando el diente erupciona, el esmalte es cubierto por una película delgada llamada película adquirida, la cual mide menos de 1 μm de espesor y está formada por la absorción selectiva de componentes de fluidos orales, tales como: los componentes de la saliva, fluido crevicular y productos de la bacteria contribuyen a la formación de la película (Gibbons, 1989). Esta película altera la carga y la energía libre de la superficie, que a su vez aumenta la eficacia de la adhesión bacteriana. Algunas bacterias, poseen sustancias poliméricas extracelulares y fimbrias, que les permiten adherirse rápidamente al contacto. Otras bacterias requieren una exposición más prolongada para unirse firmemente. Esto implica crecimiento celular activo de las bacterias antes inactivas y la síntesis de nuevos componentes de la membrana exterior. Los mecanismos que intervienen en la formación de la película sobre el esmalte incluyen fuerzas electroestáticas, tipo Van Der Waals e hidrófobas. Es por ello que en la superficie de la hidroxiapatita que posee grupos fosfatos con carga negativa, interactúa con proteínas y glucoproteínas salivales del fluido crevicular con carga positiva (Leknes et al., 1997).

La unión de la bacteria al diente por consiguiente esta dada mediante interacciones entre adhesinas bacterianas y macromoléculas que comprenden la

película adquirida. Es fácil prever cómo las adhesinas que reconocen cryptitopos proporcionarían una ventaja selectiva fuerte para cualquier bacteria que colonice una superficie mucosa o del diente. Las secreciones que bañan estas superficies contienen los componentes que se relacionan estructuralmente con éstos en las mucosa; y otras células del cuerpo (Gibbons, 1989).

Un aspecto que juega un papel preponderante en el crecimiento y posterior maduración de la placa dental, es el fenómeno de coagregación entre células microbianas, en el cual la adherencia de nuevos microorganismos se realiza sobre la primera capa de estos ya unidos a la superficie del diente (Kolenbrander and Andersen, 1986). Estas interacciones suceden específicamente a través de proteínas de tipo lectinas y menos específicas resultantes de las fuerzas hidrófobas, electrostáticas y de Van Der Waals (Mergenhagen et al., 1987). No existe ninguna interacción entre la superficie sólida y el microorganismo hasta una distancia de 50 μm (Kolenbrander et al., 1995).

Placa dentobacteriana

La formación de la placa dentobacteriana involucra la interacción entre las bacterias colonizadoras primarias y la película adquirida del esmalte.

La colonización primaria se debe a cocos Gram positivos aerobios y anaerobios facultativos. La placa a las 24 horas se compone sobre todo de miembros del género *Streptococcus*, de los cuales *S.sanguis* es el más destacado. En la fase siguiente se encuentran bacilos Gram positivos, que inicialmente están en números muy bajos, aumentan gradualmente y terminan por superar a los

Streptococcus. Las superficies receptoras de cocos y bacilos Gram positivos permiten la posterior adherencia de microorganismos Gram negativos y que tienen menor capacidad para adherirse a la película directamente (Gibbons and Nygaard, 1970, Kolenbrander et al., 1999, Cook et al., 1998)

Los colonizadores secundarios se unen a las bacterias inicialmente adheridas a través de interacciones moleculares específicas. El resultado de esta evolución es un complejo dispositivo de especies bacterianas interrelacionadas (Kolenbrander et al., 1999). Finalmente, los llamados colonizadores tardíos, son las especies que colonizan la placa dentobacteriana ya formada. A este tipo de colonizadores pertenecen las bacterias periodontales consideradas más patógenas como *Tannerella forsythia* (antes llamada *Bacteroides forsythus*), *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*.

ii. BIOPELÍCULAS

La placa dental es una biopelícula que se define como una comunidad microbiana diversa que se encuentra en la superficie dental embebida en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival (Costerton et al., 1999).

La siguiente lista resume las características básicas de las biopelículas:

1. Adhesión
2. Heterogeneidad
3. Diferentes microambientes (pH, tensión de O₂, concentración de iones como carbono (C) y nitrógeno (N))

4. Sistema circulatorio primitivo
5. Resistencia a las defensas del hospedero y agentes antimicrobianos
6. Quórum sensing (la forma en la que las bacterias se comunican unas con otras)

La matriz de exopolisacáridos producida por los mismos microorganismos, ayuda a la adhesión de éstos a la superficie. Además, como los microorganismos quedan atrapados dentro de ella, comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos.

La heterogeneidad de las biopelículas las hace organizaciones únicas que pueden estar formadas por bacterias, hongos y protozoarios. Esto a su vez favorece el desarrollo de microambientes de pH, tensión de O₂, y concentración de iones como carbono (C) y nitrógeno (N) (Costerton et al., 1994).

Las biopelículas poseen un sistema de canales que les permite trasportar nutrientes y desechos. Otra de las características de las biopelículas es la resistencia a las defensas del hospedero y agentes antimicrobianos. Mientras que los microorganismos en estado plantónico (cuando no están organizados en biopelículas), son susceptibles a estos agentes de control, los microorganismos dentro de una biopelícula se encuentran protegidos por la matriz de exopolisacáridos causando que los anticuerpos, las células del sistema inmune y los antimicrobianos no tengan acceso a ellos. Adicionalmente los microorganismos dentro de una biopelícula se encuentran en un estado metabólico reducido, es decir su metabolismo se encuentra en un nivel muy bajo (no se reproducen) por lo

que no hay tanta demanda de nutrientes y los antibióticos no funcionan adecuadamente (Stewart and Costerton, 2001).

Finalmente, las bacterias dentro de una biopelícula se comunican unas con otras, a esta forma de comunicación se le ha denominado Quorum sensing. Este fenómeno involucra la regulación y expresión de genes específicos a través de moléculas de señalización que median la comunicación intercelular. Esta característica es dependiente de la densidad celular, es decir, en biopelículas muy altamente pobladas, se induce la expresión de genes de resistencia que proveen protección y supervivencia. De igual manera los microorganismos pueden producir sustancias para estimular la propagación de colonias e inhibir el crecimiento de otras, dejando a los microorganismos más patógenos en una posición favorable dentro de la biopelícula (Costerton et al., 1987).

La cavidad bucal es complicada ya que contiene superficies de tejido blando, que están potencialmente disponibles como sustratos para el desarrollo de biopelículas. Las cuales proporcionan generalmente las interfaces que inician y perpetúan el asalto infeccioso en el tejido del anfitrión (Socransky, 1970).

iii. PERI-IMPLANTITIS

Con la irrupción de la implantología en la práctica de la odontología, la oseointegración, se ha convertido en un método para la rehabilitación de pacientes desdentados total o parcialmente. A pesar de los resultados satisfactorios, los tejidos que soportan los implantes oseointegrados son susceptibles a patologías que pueden llevar a la pérdida del implante (Albrektsson et al., 1988, Hultin et al., 2000).

Se han realizado gran número de investigaciones de microflora asociada a los dientes, encontrando que el riesgo de periodontitis se incrementa con la presencia de *Poryphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Agragatibacter actinomycetemcomitans*. Además se ha descubierto que la microflora en periodonto sano y enfermo muestra diferencias. Se pueden encontrar pequeños números de microorganismos y de tipos morfológicos en el surco gingival; aun cuando sea un surco sano. Los sitios enfermos, desarrollan una microflora compleja con gran proporción de microorganismos anaerobios Gram negativos. La microflora tanto de los dientes como en los implantes puede ser identificada en las biopelículas (Mombelli et al., 1995).

Se denomina enfermedad periimplantaria a los cambios patológicos de tipo inflamatorio de los tejidos que rodean un implante sometido a carga (Jovanovic, 1993). En su etiología se han descrito las infecciones bacterianas (Lang et al., 1997) y la sobre carga oclusal, a de más de la posible combinación de estos factores. Dentro de este concepto se describen dos entidades:

Mucositis: cuadro clínico que se caracteriza por la aparición de cambios inflamatorios limitados a la mucosa periimplantar que, con el tratamiento adecuado es un proceso reversible.

Periimplantitis: cuadro clínico en el que, junto a la reacción inflamatoria periimplantaria coexiste una pérdida de soporte óseo del implante evidenciado clínica y radiológicamente (Jovanovic, 1993).

En 1992 Lindhe describe que lesiones en los tejidos blandos alrededor de los implantes son potencialmente más peligrosas que con respecto a los dientes ya que tienden a extenderse apicalmente con mayor facilidad hacia el tejido óseo periimplantario (Lindhe et al., 1992). Los signos y síntomas que se pueden presentar en estos casos son:

- Enrojecimiento de la mucosa periimplantaria.
- Secreción purulenta.
- Sangrado al sondeo.
- Aumento de profundidad de bolsa periimplantaria.
- Dolor a la percusión y al apretar los dientes.
- Pérdida radiológica de la altura ósea periimplantaria.
- Movilidad progresiva del implante (en casos avanzados).

Los tejidos periimplantarios juegan un papel importante de barrera biológica ante algunos de los posibles agentes causales de la enfermedad periimplantaria (Atassi, 2002).

Se ha mostrado que el surco alrededor del implante es rápidamente colonizado por flora nativa de la cavidad oral. Las enfermedades periodontales, lengua, saliva y mucosa bucal, actúan como reservorios de patógenos que potencialmente afectan la zona circundante del implante (Mombelli, 1993). La microbiota de los dientes remanentes determina directamente la composición de la microbiota alrededor del implante. (Jovanovic, 1993).

El diseño del implante es un factor importante en la aparición y desarrollo de la periimplantitis. Las rugosidades de la superficie de un implante facilitan la adhesión de la placa bacteriana cuando esta queda expuesta al medio bucal. Los implantes tratados con ácidos, los rociados con plasma spray de titanio y los recubiertos por hidroxapatita son nichos perfectos para la colonización bacteriana. Además con el aumento de la porosidad de la superficie de los implantes hay una mayor dificultad de higienización y de mantenimiento de la salud periodontal.

El fracaso de los implantes puede ocurrir en dos fases; la primera fase o la pérdida prematura del implante que se producirá cuando este aun no haya llegado a osteointegrarse a consecuencia de diversos factores de riesgo tales como pobre estabilidad primaria, contaminación bacteriana, enfermedades sistémicas, tabaquismo, mala técnica quirúrgica, mala calidad ósea, etc.

La segunda fase o etapa en la que puede producirse la pérdida del implante que es cuando este ya está osteointegrado y en función. El fracaso de los implantes después del proceso de osteointegración está principalmente motivado por la infección bacteriana. La flora bacteriana en la cavidad oral antes de la colocación de implantes osteointegrados va a determinar la composición de la nueva microbiota que se va a formar alrededor de los mismos (Isidor, 1996, Lang et al., 1997).

Los microorganismos más relacionados con el fallo de integración de un implante por este mecanismo son. Espiroquetas y formas móviles como anaerobias Gramnegativas. (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*,

Agregatibacter actinomycetemcomitans, Tanerella forsythia, Treponema denticola, Prevotella nigrescens, Peptoestreptococcus micros y Fusobacterium nucleatum).

Esta colonización no implica el desarrollo de una periimplantitis con pérdida rápida de altura ósea, por lo que se sugiere que además de la presencia de estos gérmenes periodontopatógenos es necesaria la existencia de otros factores locales, sistémicos y genéticos para que estos produzcan la infección activa prolongada. Entre estos factores destacan la diabetes mal controlada el tratamiento crónico con corticoesteroides, la radio y quimioterapia, el tabaquismo y la sobrecarga mecánica del implante (Leonhardt et al., 1993).

Los pacientes con inadecuada técnica de higiene oral, presentan mayor reabsorción ósea alrededor de los implantes. Como consecuencia del acumulo de placa bacteriana tanto las bacterias como sus productos atraviesan la barrera mucosa que tiene función de sellado. A partir de este momento, se inicia el proceso inflamatorio que cursa con la destrucción del colágeno y el hueso alveolar. Los mecanismos de destrucción ósea se caracterizan por la inflamación y la actividad osteoclástica que va a provocar la reabsorción del hueso que se encuentra en contacto íntimo con el implante. Cuando un implante pierde oseointegración la superficie de titanio queda expuesta a la cavidad bucal (Quirynen and Listgarten, 1990) .

Para aumentar la durabilidad de un implante es necesario evitar o minimizar la reabsorción ósea así como mejorar también su fijación .Visto desde un enfoque tecnológico es posible mejorar esa fijación actuando a nivel de la rugosidad de la superficie implante y alterando su composición química (Esposito et al., 1998).

iv. MATERIALES UTILIZADOS PARA IMPLANTES

Acero Inoxidable (SS 316L)

El acero inoxidable es una aleación de hierro y carbono que contiene por definición un mínimo de 10.5% de cromo. Algunos otros tipos de SS contienen además otros elementos aleantes. Los principales son Níquel y Molibdeno. El acero inoxidable es un tipo de acero resistente a la corrosión, el cromo que contiene posee gran afinidad por el oxígeno y reacciona con el formato de una capa pasivadora que evita la corrosión del hierro contenido en la aleación. Los grados más utilizados, referidos generalmente como grados austeníticos estándares son 1.4401 (SS 316) este contienen entre un 17%-18% de cromo y un 8%-11% de níquel. La versión de este mismo grado con bajo contenido de carbono es 1.4404 (SS 316L). Debido a su bajo contenido de C no presenta corrosión intergranular (Adell et al., 1981). Aun así su corrosión en tejidos vitales es 100 veces mayor a la del Titanio (Schroeder, 1987).

Titanio (Ti)

Las aleaciones de cobalto y Ti son las más utilizadas como biomateriales.

El titanio ha sido utilizado en el tratamiento de fracturas en la ortopedia por más de 20 años (Hermann and Buser, 1996).

Entre los biomateriales el Ti es el más ampliamente utilizado para implantes dentales. Ello es debido a que sus propiedades mecánicas son más parecidas a las del hueso que las de otros materiales, (acero inoxidable y aleaciones de Co-Cr) y su capacidad para formar óxidos finos pasivantes que lo protegen de la

corrosión y favorecen su oseointegración (Geesink et al., 1988). El titanio es inerte, la cubierta de oxido al contacto con los tejidos es insoluble, por lo cual no se liberan iones que pudieran reaccionar con las moléculas orgánicas.

Posee buenas propiedades mecánicas su fuerza de tensión es muy semejante al acero inoxidable utilizado en las prótesis quirúrgicas que reciben carga. Es mucho mas fuerte que la dentina o cualquier cortical ósea permitiendo a los implantes soportar cargas pesadas (Adell et al., 1981) (Hermann and Buser, 1996).

Varios estudios han determinado que las características superficiales de los implantes (rugosidad, composición química) son determinantes para favorecer la formación de un área mayor de contacto hueso-implante acelerando los tiempos de tratamiento (Pilliar, 1983).

v. CARBONO AMORFO (a-C)

Otras modificaciones superficiales que se han realizado son la colocación de películas de carbono amorfo (a-C) las cuales han mostrado tener excelentes propiedades biológicas (Rodil et al., 2003).

A pesar de la composición simple de los materiales a base de carbono como el diamante, grafito, furelleno, nanotubos y carbono tipo diamante, estos presentan destacadas diferencias en sus propiedades, como resultado de la capacidad del carbono de hibridizar en forma tetrahedral (sp^3), trigonal(sp^2), o lineal (sp^1).El carbono amorfo es una importante mezcla de las coordinaciones sp^2 y sp^3 (Rodil et al., 2006).

Las películas de carbono amorfo tienen una única combinación de propiedades como alta dureza, alta resistencia a la abrasión, inercia química, bajo coeficiente de expansión térmica, bajo coeficiente de fricción, alta conductividad térmica, aislante térmico comparable al teflón, permitiendo que esta estructura tenga un potencial muy alto de aplicación en diversas áreas a nivel industrial. Al contar con hibridaciones simultáneas de tipo sp^2 y sp^3 , le dan a la estructura características propias del diamante (sp^3) y el grafito (sp^2) (Robertson, 2002).

Las aplicaciones de las películas de a-C han suscitado un gran interés en la investigación, especialmente para entender las propiedades estructurales y superficiales del material y lograr el control de las mismas en función de los parámetros de síntesis y depósito. A diferencia de las películas de diamante producidas a alta temperatura las películas de carbono amorfo pueden ser sintetizadas a baja temperatura y suelen tener una superficie lisa (Robertson, 2002).

Además las películas de a-C son fáciles de depositar, los recubrimientos pueden ser uniformes y modifican solo las características superficiales del material dejando intactas sus propiedades mecánicas (Rodil et al., 2003).

C. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son los siguientes:

Objetivo General

- Realizar la formación *in vitro* de biopelículas dentales utilizando nueve especies bacterianas representativas de la placa dentobacteriana subgingival, sobre sustratos con diferente química superficial y rugosidad.

Objetivos Específicos

- Analizar y comparar la formación inicial de biopelículas sobre superficies rugosas de Acero inoxidable de grado médico 316L y sustratos con películas delgadas de Titanio y Carbono amorfo.

- Analizar la formación inicial de biopelículas sobre superficies lisas con películas delgadas de Titanio y Carbono amorfo.

D. HIPÓTESIS

H1: Habrá diferencias en la formación de biopelículas dentales en las distintas superficies de acuerdo a su composición química.

H2: Habrá diferencias en la formación de biopelículas dentales en las distintas superficies de acuerdo a su rugosidad.

H0: No habrá diferencias en la formación de las biopelículas dentales en las distintas superficies, no importando su rugosidad o composición química.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente proyecto de investigación comprende la realización de un estudio transversal en donde se evalúo la formación inicial *in vitro* de biopelículas sobre superficies con diferente química superficial y microtopografía; carbono amorfo (a-C), titanio (Ti) y acero inoxidable de grado médico AISI 316L (SS), sobre sustratos lisos (Ra 0.02 μm) y rugosos (Ra 2 μm). Cada una de las superficies fue probada por triplicado.

i. Preparación de las muestras.

Todos los sustratos con las películas experimentales fueron preparados en el laboratorio de Materia Condensada y Criogenia del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Las superficies experimentales están descritas en la **Tabla 1**. Las superficies rugosas con películas de a-C y Ti se depositaron sobre discos de acero

inoxidable de grado médico AISI 316L (SS) de 15 mm de diámetro. Los sustratos fueron arenados (sandblasting) para obtener una superficie con una rugosidad promedio (Ra) de aproximadamente 2 μm , la cual no fue significativamente modificada por la deposición de las películas. Las superficies lisas con películas de a-C y Ti se depositaron sobre sustratos cuadrados de silicio de 10 x 10 mm con una rugosidad promedio de 0.02 μm , la cual no fue significativamente modificada por la deposición de las películas (**Figuras 1 y 2**).

Antes de colocar las películas, todos los sustratos fueron limpiados ultrasónicamente usando acetona por 30 min., seguidos por una limpieza ultrasónica con isopropanol por otros 30 min. y finalmente enjuagados dos veces con agua bi-destilada y se dejaron secar al aire.

Las películas de a-C fueron producidas por un cátodo hueco de corriente directa utilizando un sistema de magnetron sputtering en una cámara de alto vacío (presión base 1.3 x 10⁻⁴ Pa), el blanco utilizado fue un cátodo de grafito de 4 pulgadas de alta pureza. El depósito se llevó a cabo en las siguientes condiciones, se utilizaron 20 sccm de argón (pureza 99.999%), 4 Pa presión de depósito y 0.4 A de corriente directa por 10 min, dándonos un espesor aproximado de 150 nm.

Las películas de Ti fueron depositadas en un sistema de magnetron sputtering de corriente directa pulsada, utilizando un blanco de Ti de alta pureza y un plasma de argón a 0.2 A y 0.5 Pa.

ii. Formación inicial de biopelículas sobre las superficies experimentales.

Todos los ensayos de formación de biopelículas fueron realizados en el laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e

Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Especies bacterianas: Nueve cepas de bacterias bucales de referencia (**Tabla 2**) fueron utilizadas para la formación *in vitro* de las biopelículas. Todas las cepas se adquirieron como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las cepas se rehidrataron en caldo para *Mycoplasma* y fueron cultivadas en agar enriquecido HK (agar base para *Mycoplasma* Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA) suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab S.A. de C.V., México, D.F.), 0.3 µg/ml de menadione (vitamina K, Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, México), 5 µg/ml de hemina (Sigma) a 35°C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂.

Las superficies experimentales se esterilizaron por autoclave y se colocaron individualmente en placas de 12 pozos donde se les adicionará una suspensión de 10⁹ células/ml de cada especie bacteriana. Las placas con las especies bacterianas fueron incubadas durante 24 horas a 35°C bajo condiciones anaeróbicas.

Después de la incubación anaeróbica, cada muestra se lavo dos veces con caldo para *Mycoplasma*. Después de los lavados, 1 ml de caldo para *Mycoplasma* enriquecido se colocó en cada pozo y las muestras fueron sonicadas durante 5 períodos de 10 segundos cada uno, con el objetivo de despegar las bacterias adheridas sobre las superficies. Posteriormente, se realizaron 5 diluciones seriales del sobrenadante de cada una de las muestras sonicadas, en una atmósfera libre

de oxígeno y 100 μ l de cada dilución fueron sembrados por duplicado en placas de agar enriquecido HK. Después de 7 días de incubación anaeróbica se realizó el conteo visual de las unidades formadoras de colonias (UFCs) para determinar el porcentaje de crecimiento en cada una de las superficies que fueron analizadas.

Simultáneamente, las muestras fueron procesadas para determinar la proporción de cada especie dentro de las biopelículas utilizando la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (Socransky et al., 1994). Además, se procesaron muestras para ser observadas con microscopía electrónica de barrido, lo que permitió observar cualitativamente la formación de biopelículas en cada superficie.

iii. Técnica de checkerboard para hibridaciones DNA-DNA

El empleo de la técnica de “checkerboard” permitió determinar la proporción de cada especie dentro de las biopelículas en cada una de las muestras que fueron analizadas. Cada una de las superficies fue transferida a un pozo de una caja de cultivo estéril y se realizaron 3 lavados con PBS. Las superficies se transfirieron de nuevo a un pozo estéril con 1.5 ml de TE pH 7.5 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) y se sonicaron 5 veces en períodos de 10 segundos cada uno. Posteriormente se tomaron 150 μ l del sobrenadante y fueron transferidos a tubos individuales para microcentrifugación de 1.5 ml que contenían 100 μ l de NaOH (0.5 M, Sigma), las muestras fueron dispersadas. Los tubos se hirvieron durante 10 min. y el pH neutralizado con 800 μ l de acetato de amonio (5 M, Sigma). El DNA de cada muestra fue colocado en uno de los canales abiertos de un minislott-30, concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm y

fijado a la membrana mediante entrecruzamiento con luz ultravioleta seguido por incubación a 120° C durante 20 min. Dos canales de estándares microbiológicos fueron colocados en cada membrana. Dichos estándares consistieron de mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos puros de todas las cepas bacterianas que fueron analizadas.

Especies bacterianas para la elaboración de sondas de DNA

La lista de las 9 cepas bacterianas de referencia que fueron utilizadas en el presente estudio para la preparación de sondas de DNA se encuentran en la **tabla 2**. Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y cultivadas en agar enriquecido a 35° C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂.

Purificación de DNA bacteriano y preparación de sondas de DNA

El crecimiento bacteriano después de 3 a 7 días de cultivo fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5 ml que contenían 1 ml de buffer TE pH 7.6. Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación en buffer TE pH 7.6 a 3,500 rpm durante 10 min. Posteriormente, fueron resuspendidas mediante sonicación durante 15 seg. y lisadas a 37°c durante 1 hora ya sea con 10% SDS y proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma) para las especies Gram negativas, ó con una mezcla enzimática que contenía 15 mg/ml de lisozima (Sigma) y 5 mg/ml de achromopeptidasa (Sigma) en buffer TE (pH 8.0) para las especies Gram

positivas. El DNA se aisló y purificó utilizando una técnica estándar previamente descrita (Smith et al., 1989). La concentración de DNA fue determinada mediante mediciones espectrofotométricas de la absorbancia a 260 nm. La pureza de las preparaciones fue valorada mediante el cálculo de la relación entre las mediciones de las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Las sondas de DNA genómicas fueron preparadas para las 9 especies bacterianas (tabla 2) mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1 µg de DNA purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique) previamente descrita (Feinberg and Vogelstein, 1983).

Hibridaciones DNA-DNA

Las membranas fueron prehibridizadas a 42°C durante 1 hora en solución de prehibridación que contiene 50% de formamida, 5x citrato salino estándar (SSC) (1x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0), 1% caseína, 5x solución Denhardt, 25mM fosfato de sodio (pH 6.5) y 0.5mg/ml de RNA de levadura (Roche). La membrana con el DNA fijado de las cepas aisladas fue colocada en un miniblottter-45 (immunetics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación a los canales de hibridación. Esto produjo un patrón de tablero de ajedrez (checkerboard) de 30 x 45. Las sondas de DNA fueron diluidas a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml en solución de hibridación (45% formamida, 5x SSC, 1x solución Denhardt, 20mM fosfato de sodio (pH 6.5), 0.2mg/ml de RNA de levadura, 10% sulfato de dextrano y 1% caseína), colocadas en canales de hibridación individuales del miniblottter-45 e hibridizadas una noche a 42° C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar

evaporación de las sondas de DNA. La concentración de cada sonda fue ajustada mediante pruebas preliminares de ensayo y error para que todas las sondas detectaran un rango de células entre 10^4 y 10^7 . Las membranas fueron lavadas dos veces a alta astringencia durante 20 min. Cada vez a 68° C en buffer de fosfato (0.1x SSC y 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación.

Enumeración de especies bacterianas

Las membranas fueron bloqueadas mediante su incubación durante 1 hora en buffer bloqueador que contenía 1% de caseína en buffer de maleato (100mM ácido maleico, 150mM NaCl, pH 7.5). Los híbridos fueron detectados incubando las membranas en una dilución de 1:50,000 de anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) utilizando la modificación previamente descrita (Engler-Blum et al., 1993). Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (CDP-Star, Roche) a 37° C durante 1 hora y las señales se detectaron mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35 min. Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (cdp-star, roche) a 37° C durante 1 hora y las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35 min. Las películas se revelaron siguiendo el procedimiento estándar y posteriormente fueron fotografiadas con cámara digital (Kodak Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.). Con ayuda de un sistema digital de fotodocumentación (Digidoc. Biorad) se enviaron a un programa (Quantity One.

Biorad), en el cual se detectaron y analizaron las señales obtenidas en los checkerboards.

iv. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

Con el objeto de observar cualitativamente la formación de biopelículas en cada superficie, muestras seleccionadas fueron incubadas y procesadas para ser observadas con microscopia electrónica de barrido. En breve, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2.0% por 24 h a temperatura ambiente. Después se lavaron tres veces con un buffer de fosfato (pH 7.4) y deshidratadas con etanol en porcentajes seriados de 20, 40, 60, 80 y 100%. Las muestras fueron desecadas y cubiertas con Oro, para posteriormente ser observadas usando un microscopio electrónico de barrido marca Cambridge – Leica, Stereoscan 440 a 20kV.

B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los análisis que determinen las diferencias en la cantidad de bacterias adheridas entre cada una de las superficies analizadas se llevaron a cabo mediante la prueba T de Student y las diferencias significativas se establecieron utilizando la modificación de Bonferroni de la prueba T de Student.

III. RESULTADOS

La **tabla 1** muestra las características de las superficies experimentales. Las superficies con películas de carbono amorfo rugoso con sandblasting (a-C r) mostraron una rugosidad promedio de 2.01 μm . Mientras que las superficies con películas de carbono amorfo sobre sustrato de silicio (a-C s) tuvieron un valor de 0.02 μm de rugosidad promedio. Así la superficie con película de titanio con sandblasting (Ti r) presento una rugosidad promedio de 1.83 μm . Mientras que las superficies con películas de Película de titanio sobre sustrato de silicio (Ti s) tuvieron un valor de 0.02 μm de rugosidad promedio. Por ultimo nuestro sustrato de acero inoxidable de grado médico 316L con sandblasting (SS) el cual tenia una rugosidad promedio de 1.89 μm .

La **figura 1**, muestra las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las superficies experimentales. Estas imágenes nos muestran claramente como las películas de Ti y a-C no afectan de manera importante la topografía del sustrato adosándose perfectamente a la superficie del sustrato.

En la **figura 2** se pueden observar las imágenes de microscopía de fuerza atómica de las superficies experimentales. En estas imágenes pudimos compara la rugosidad promedio de las superficies, nos muestra como la superficies rugosas tienden a tener una mayor área en la superficie que las lisas.

En cuanto a la formación inicial de biopelículas es decir, el número de bacterias que se adhirieron en cada una de las superficies, se encuentra representado en la **figura 3**. En general, un mayor número de bacterias se adhirió

a las superficies rugosas que a las superficies lisas. Podemos observar que un mayor número de bacterias se adhirió en las superficies rugosas de SS316L (40.4×10^5) y a-C (39.1×10^5), mientras que el menor número de bacterias se encontró en las superficies lisas de Ti (6.9×10^5). Las diferencias estadísticamente significativas se encontraron cuando comparamos las superficies SS & Ti-s ($p < 0.05$), Ti-r & Ti-s ($p < 0.01$), a-C-r & Ti-s ($p < 0.05$), a-C-r & Ti r ($p < 0.01$) y a-C-r & a-C-s ($p < 0.05$).

La proporción (%) de cada una de las especies bacterianas sobre las superficies experimentales se encuentra descrita en la **figura 4**. En las superficies rugosas de carbono amorfo (a-C r), las especies que se adhirieron en mayor proporción fueron; *Fusobacterium nucleatum ss nucleatum* (21.73 %), *Eikenella corrodens* (15.85 %) y *Porphyromonas gingivalis* (13.47 %). Mientras que la especie que se adhirió en menor proporción a esta superficie fue *Actinomyces israelii* (4.78 %). En las películas lisas de carbono amorfo (a-C s), las especies bacterianas que se adhirieron en mayor cantidad fueron; *E. corrodens* (31.09 %) y *P. gingivalis* (24.26 %). Mientras que la especie que se adhirió en menor cantidad en esta superficie fue *Campylobacter rectus* (0.69 %).

En las superficies rugosas con película de titanio (Ti r), las especies bacterianas que se adhirieron en mayor cantidad fueron; *P. gingivalis* (16.07 %) y *F. nucleatum ss nucleatum* (15.98 %). Mientras que la especie bacteriana que se adhirió en menor cantidad fue *C. rectus* (3.94 %). De igual forma, en las superficies lisas con película de titanio (Ti s), las especies bacterianas que más se

adhirieron fueron, *Prevotella intermedia* (21.32 %) y *P. gingivalis* (21 %). Mientras que la especie que se adhirió en menor cantidad fue *E. corrodens* (3.76 %).

Finalmente, en la superficie de SS con sandblasting se adhirieron en mayor cantidad *P. gingivalis* (20.42 %) y *F. nucleatum ss nucleatum* (14.79 %). Mientras tanto la especie bacteriana que se adhirió en menor cantidad fue *C. rectus* (4.54 %).

Las diferencias estadísticamente significativas que encontramos comparando las diferentes proporciones de cada una de las especies bacterianas sobre cada una de las superficies experimentales fueron las siguientes: **a-C r & a-C s** con las cepas de: *Agregatibacter actinomycetemcomitans serotipe b* ($p < 0.05$), *Campylobacter rectus* ($p < 0.01$), *Eikenella corrodens* ($p < 0.01$), *F. nucleatum ss nucleatum* ($p < 0.01$) y *Peptostreptococcus micros* ($p < 0.05$). **a-C r & Ti r** con las cepas de: *A. israelii* ($p < 0.05$), *E. corrodens* ($p < 0.05$), *F. nucleatum ss nucleatum* ($p < 0.01$) y *P. intermedia* ($p < 0.05$). **a-C r & Ti s** con las cepas de: *A. israelii* ($p < 0.05$), *E. corrodens* ($p < 0.01$), *F. nucleatum ss nucleatum* ($p < 0.05$) y *P. Intermedia* ($p < 0.05$). **a-C r & SS** con las cepas de: *A. israelii* ($p < 0.01$), *F. nucleatum ss nucleatum* ($p < 0.01$) y *P. gingivalis* ($p < 0.05$). **a-C s & Ti r** con las cepas de: *A. actinomycetemcomitans serotipe b* ($p < 0.05$), *C. rectus* ($p < 0.01$), *E. corrodens* ($p < 0.001$), *F. nucleatum ss nucleatum* ($p < 0.05$), *P. micros* ($p < 0.01$) y *Streptococcus sanguinis* ($p < 0.05$). **a-C s & Ti s** con las cepas de: *A. israelii* ($p < 0.05$), *C. rectus* ($p < 0.05$), *E. corrodens* ($p < 0.001$), *P. intermedia* ($p < 0.05$) y *Streptococcus sanguinis* ($p < 0.05$). **a-C s & SS**: *A. actinomycetemcomitans serotipe b* ($p < 0.05$), *C. rectus* ($p < 0.01$), *E. corrodens* ($p < 0.001$), *F. nucleatum*

ss nucleatum ($p < 0.05$) y *P. micros* ($p < 0.05$). **Ti r & Ti s** con las cepas de: *C. rectus* ($p < 0.01$), *P. intermedia* ($p < 0.05$) y *Streptococcus sanguinis* ($p < 0.01$). **Ti s & SS** con las cepas de: *E. corrodens* ($p < 0.05$), *P. intermedia* ($p < 0.05$) y *Streptococcus sanguinis* ($p < 0.05$). Finalmente, **Ti r & SS** con: *P. intermedia* ($p < 0.05$).

La **figura 5** muestra las imágenes del SEM de la formación de biopelículas sobre las diferentes superficies a las 24 h de incubación. Podemos observar que en la biopelícula formada en las superficies rugosas tiene una mayor integración de los microorganismos adheridos, comparándolas con las superficies lisas. También podemos ver que la superficie de Ti-s se integraron muy poco los microorganismos (comparada con las de más superficies). A la superficie de a-C s, se adherieron una mayor cantidad de microorganismos que a la superficie de Ti s, pero comparada con las superficies rugosas, hubo una mucho menor integración de la biopelícula.

IV. DISCUSION

El propósito de este estudio fue examinar la influencia de la química superficial así como de la microtopografía en la formación inicial de biopelículas sobre películas de carbono amorfo (a-C) y titanio (Ti). Utilizamos nueve especies bacterianas representativas de la microbiota subgingival normal para evaluar la influencia de la deposición de las películas a-C y Ti en la formación de biopelículas dentales.

Las películas de a-C tienen un potencial uso en área de la implantología ya que algunos estudios reportan que los osteoblastos depositan mayores cantidades de calcio y fósforo en radios similares a los de la hidroxiapatita cuando están en presencia de estas películas, comparándolo con Acero inoxidable de grado médico (SS 316L) e incluso el titanio (Rodil et al., 2005, Rodil et al., 2006). En nuestro estudio podemos observar que la adhesión bacteriana en las películas de a-C comparada con la adhesión bacteriana encontrada en el SS 316L fue menor. Sin embargo, si lo comparamos con la superficie de Ti podemos ver que las propiedades del a-C favorecieron más la adhesión bacteriana. Esto apoya la noción de que la química superficial afecta directamente a la colonización de las bacterias (Groessner-Schreiber et al., 2004)

Nuestros resultados así como los de otros estudios previamente realizados sugieren que tanto la composición química de la superficie y la rugosidad, influyen en la adhesión bacteriana (Katsikogianni and Missirlis, 2004, Liu et al., 2008). En este estudio, pudimos observar una clara diferencia en el número de bacterias adheridas cuando comparamos las superficies rugosas y lisas, tanto en las superficies de a-C como en las de Ti. Esto puede deberse al hecho de que al haber una mayor área de superficie a la cual adherirse hay una mayor cantidad de microorganismos que colonicen esta superficie. Además, existen reportes que sugieren que una superficie con baja rugosidad permite disminuir la adhesión bacteriana (Liu et al., 2008).

Por otra parte, la proporción de la composición en las biopelículas mostró que la colonización de especies como *F. nucleatum* ss *nucleatum*, *P. gingivalis* y

S. sanguinis, fue predominante para todas las superficies, principalmente en las películas del Ti y el substrato SS. Estos resultados no son inesperados ya que el mecanismo de colonización bacteriano en una superficie es selectivo y complejo (Gibbons, 1989). *S. sanguinis* pertenece a los “colonizadores tempranos” y no es de extrañar que fuera encontrado en concentraciones mayores, sin embargo, *A. israelii* que también pertenece al grupo de los “colonizadores tempranos” y que se sabe que es uno de los colonizadores más predominantes del diente (Li et al., 2004) fue encontrado en cuentas bajas en las biopelículas en todas las superficies. Esto nos indica que efectivamente las diferencias en la composición química de la superficie afectan directamente la adhesión bacteriana. Es de llamar la atención que *F. nucleatum* ss *nucleatum* el cual pertenece pertenecen al grupo de los “microorganismos puente”, los cuales facilitan la colonización de otras bacterias promediado de los mecanismos coagregación (Bolstad et al., 1996), se encontrara en grandes cantidades en la superficies de a-C rugoso y en mucho menor proporción en las superficies de a-C liso. Esto nos indica que esta bacteria en específico es más sensible a la microtopografía que a la química superficial.

Otro ejemplo interesante, es la colonización de *P. gingivalis* la cual es considerada como un patógeno periodontal reconocido (Moore, 1987). Este microorganismo fue encontrado en elevadas cantidades, principalmente en las superficies de Ti y SS. Estos hallazgos son congruentes con los reportados previamente en donde se ha encontrado una colonización importante de este microorganismo sobre superficies de titanio (Gerber et al., 2006).

V. CONCLUSIONES

La adhesión bacteriana, es el primer paso en la formación de las biopelículas, y es afectada de manera importante, tanto por la composición química, como por la topografía (rugosidad) de las superficies. En este estudio, las superficies “rugosas” fueron colonizadas por un mayor número de bacterias en comparación de las superficies “lisas”. Además, en este estudio aunque hubo una mayor colonización bacteriana sobre las películas de carbono amorfo comparándolas con el material más utilizado en implantología como es el titanio, los resultados obtenidos dan pie a la investigación a cerca del mejoramiento y desarrollo de nuevos biomateriales con el fin de obtener mayores beneficios en el área de la implantología.

Se requieren otros estudios para evaluar otras características físicas, químicas y biológicas de las películas a-C y del Ti para entender las diferencias observadas y también analizar la formación secuencial de una biopelícula bacteriana sobre éstos y otras superficies del implante. Este es un trabajo con respecto a la colonización *in vitro* de una biopelícula bucal que esperamos pueda servir como precedente de futuros estudios *in vivo*.

VI. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características de las Superficies experimentales

Superficie o Película	Descripción	Ra*
a-C-r	Película de carbono amorfo con sandblasting	2.01 μm
a-C-s	Película de carbono amorfo sobre sustrato de silicio	0.02 μm
Ti-r	Película de titanio con sandblasting	1.83 μm
Ti-s	Película de titanio sobre sustrato de silicio	0.02 μm
SS	Acero inoxidable de grado médico 316L con sandblasting	1.89 μm

* Ra: Rugosidad promedio

Tabla 2. Cepas de referencia utilizadas para las biopelículas y la preparación de las sondas de DNA

Especie	No. de ATCC*
<i>Actinomyces israelii</i>	12102
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans serotipo b</i>	43718
<i>Campylobacter rectus</i>	33612
<i>Eikenella corrodens</i>	23834
<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	25586
<i>Peptostreptococcus micros</i>	33270
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556

* American Type Culture Collection, Rockville, MD

Figura 1. Imágenes del SEM de las diferentes superficies. (a) Carbono amorfo sobre silicio, (b) Carbono amorfo sobre acero inoxidable con sandblasting, (c) Titanio sobre silicio, (d) Titanio sobre acero inoxidable con sandblasting y (e) Acero inoxidable con sandblasting.

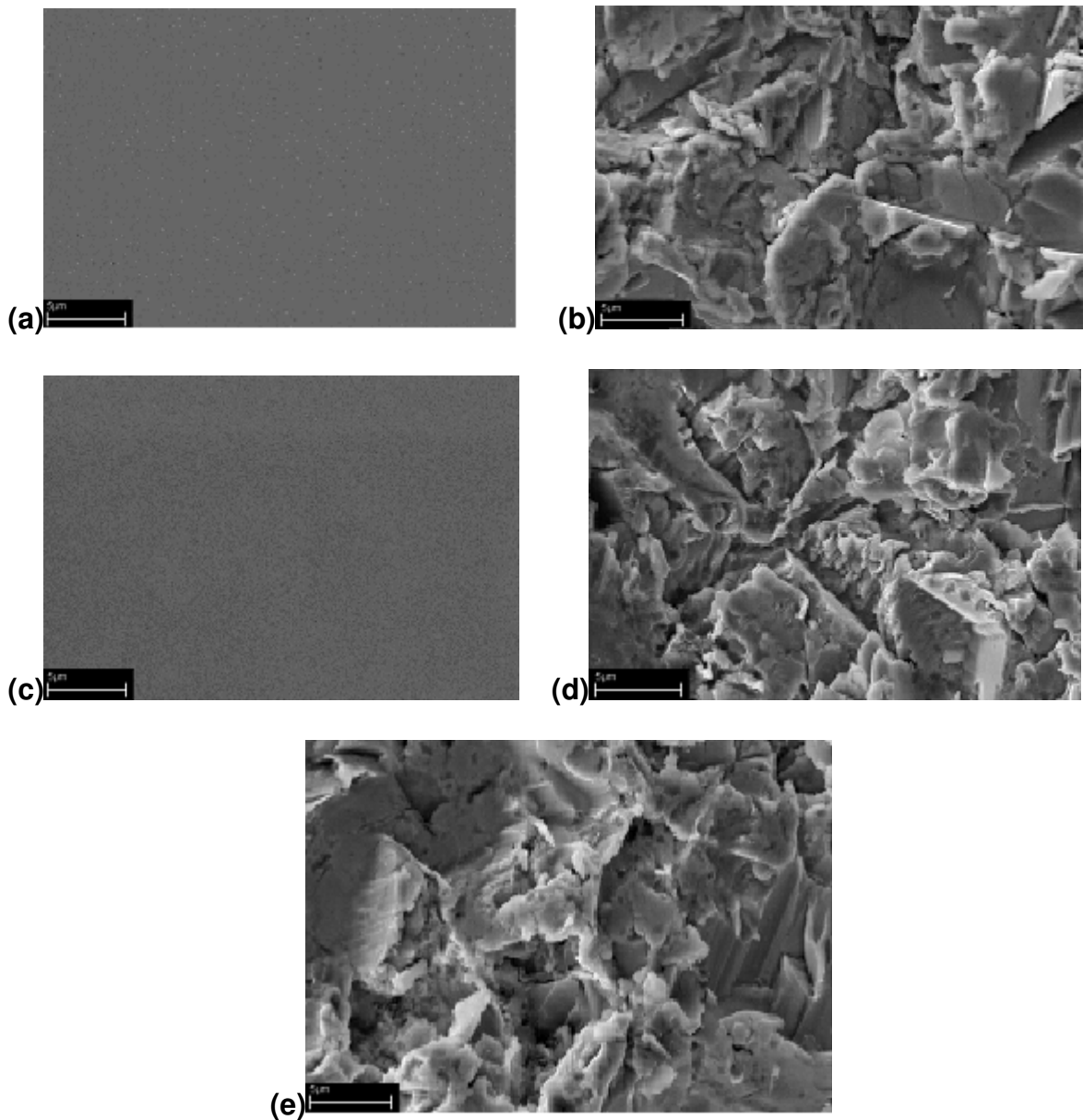


Figura 2. . Imágenes de AFM de las diferentes superficies. (a) Carbono amorfo sobre silicio, (b) Carbono amorfo sobre acero inoxidable con sandblasting, (c) Titanio sobre silicio, (d) Titanio sobre acero inoxidable con sandblasting y (e) Acero inoxidable con sandblasting.

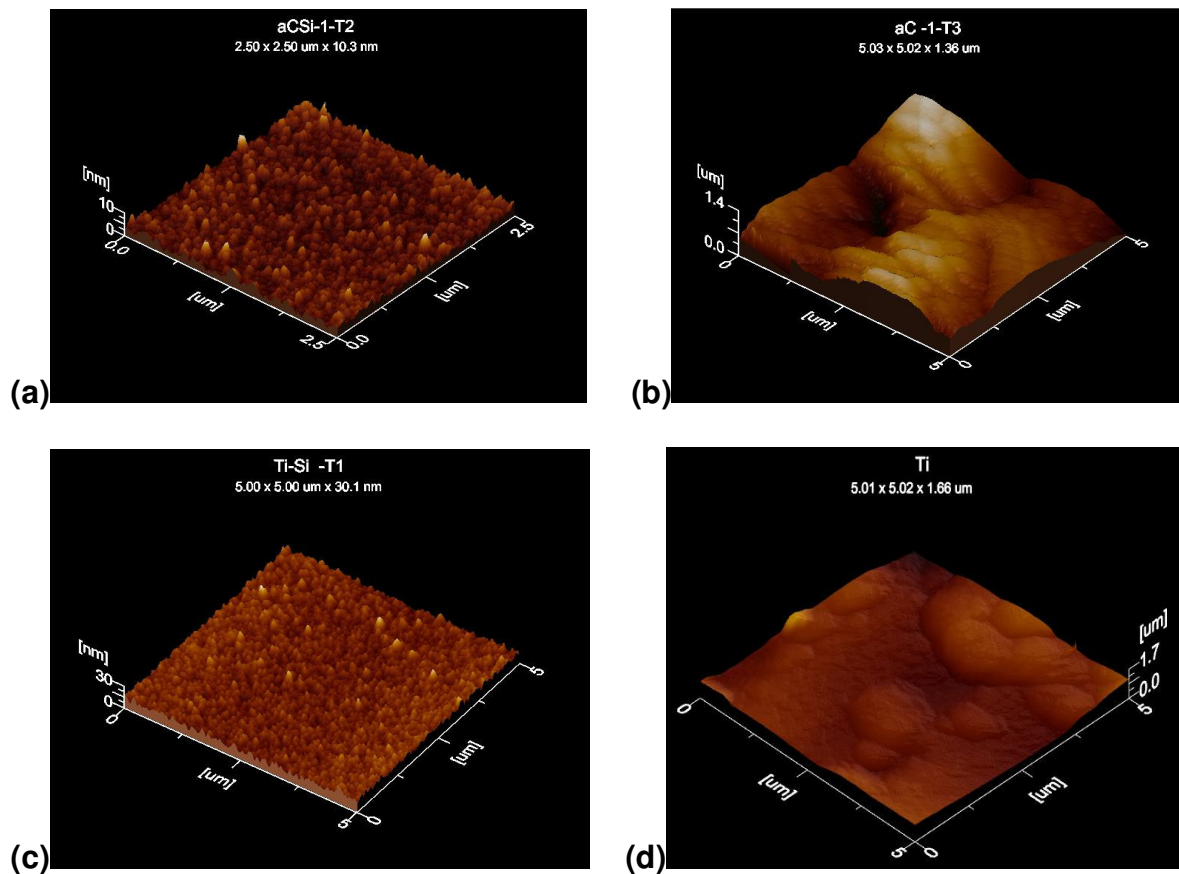
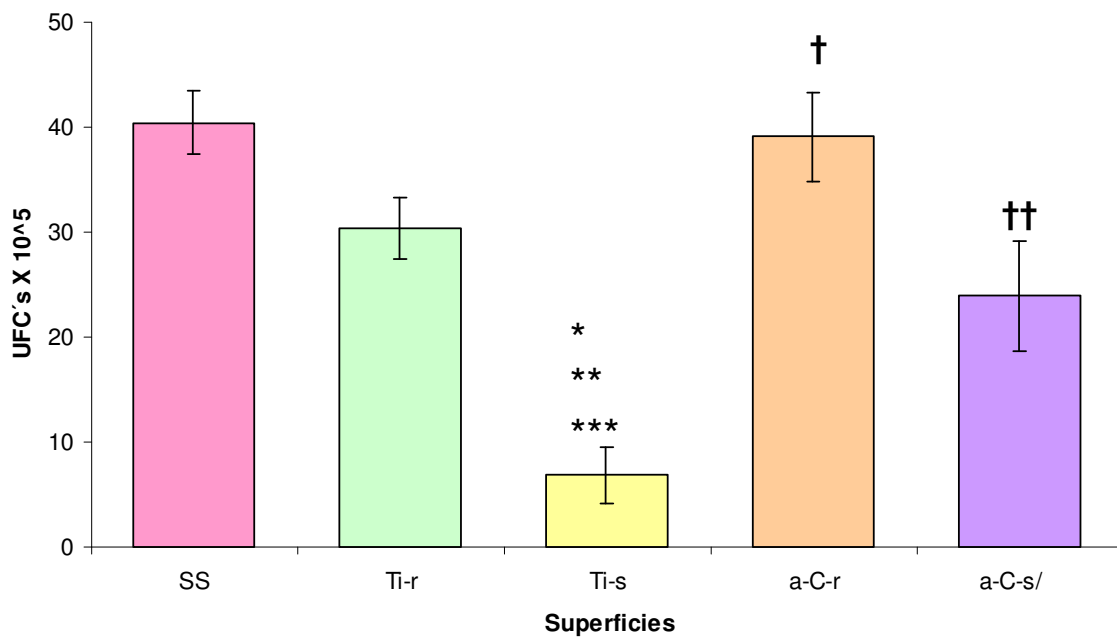


Figura 3. Cuentas bacterianas de las Unidades Formadoras de Colonias (CFU's) x 10⁵ de las nueve cepas utilizadas sobre las superficies experimentales después de 24hrs. de incubación anaeróbica.



T - Test

* p < 0.05 SS - Ti-s

** p < 0.01 Ti-r - Ti-s

*** p < 0.05 a-C-r - Ti-s

† p < 0.01 a-C-r - Ti-r

†† p < 0.05 a-C-r - a-C-s

Figura 4. Proporción de cada una de las especies bacterianas sobre cada una de las superficies experimentales.

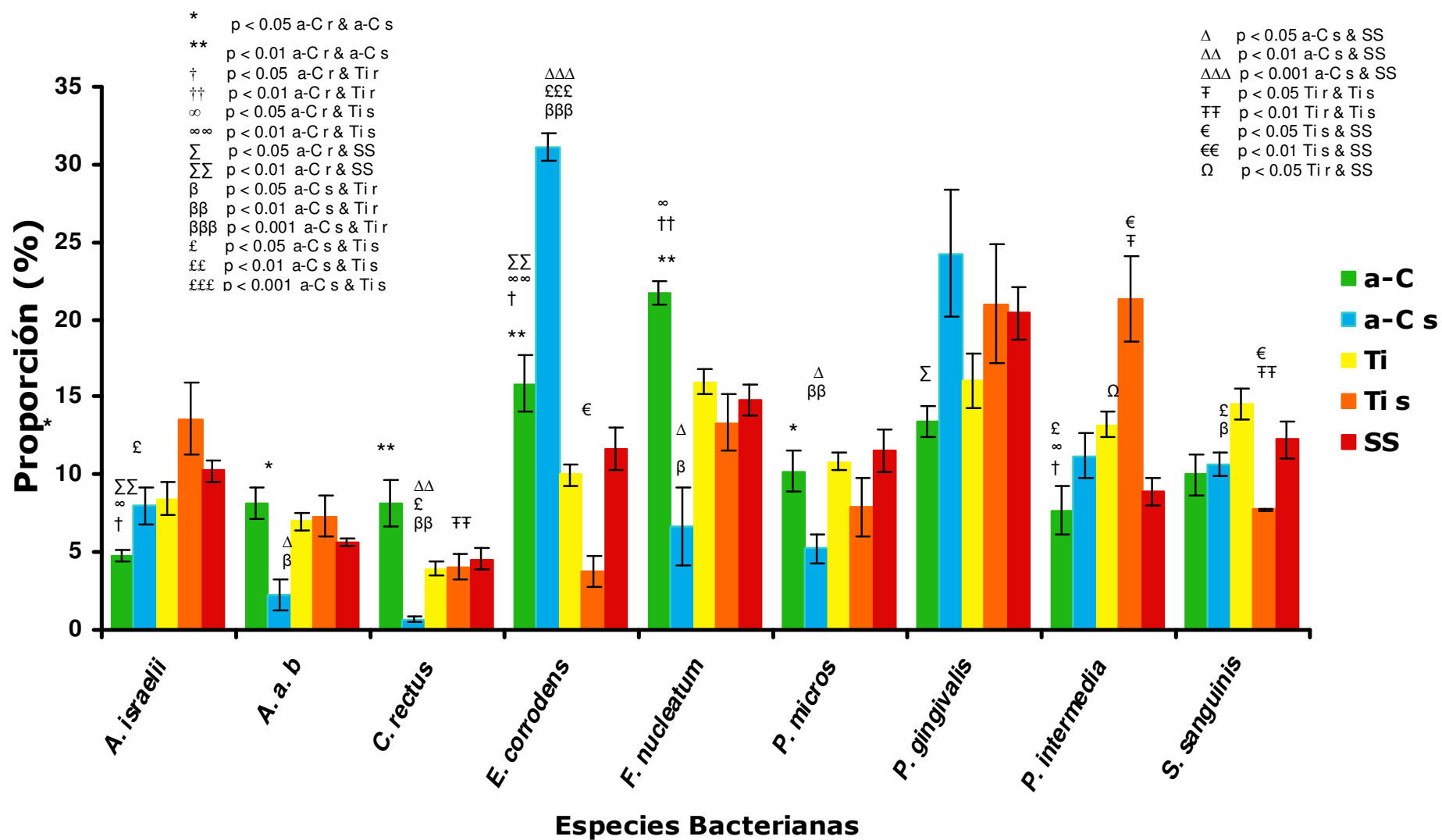
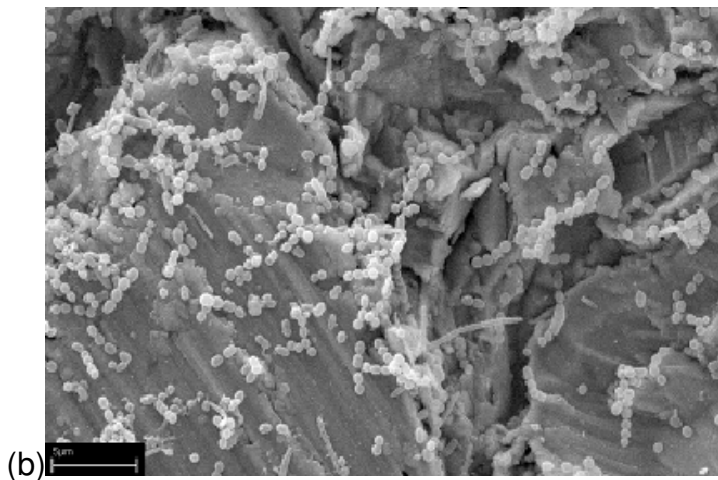
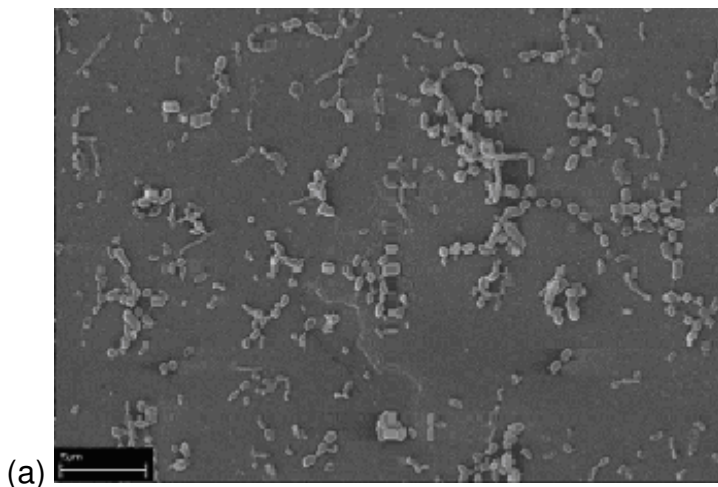
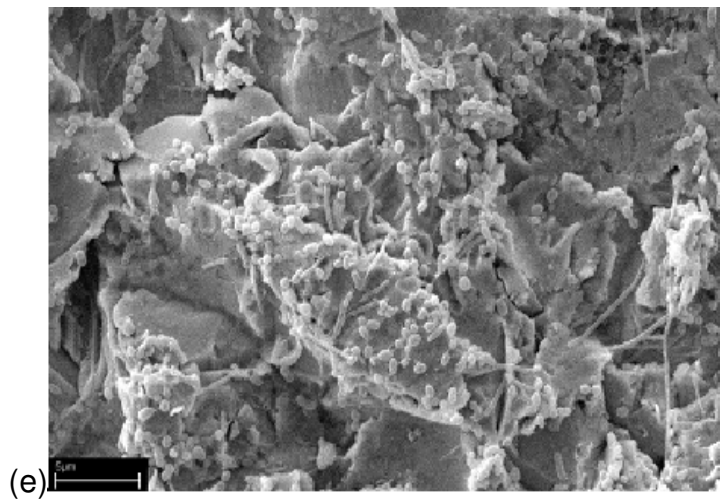
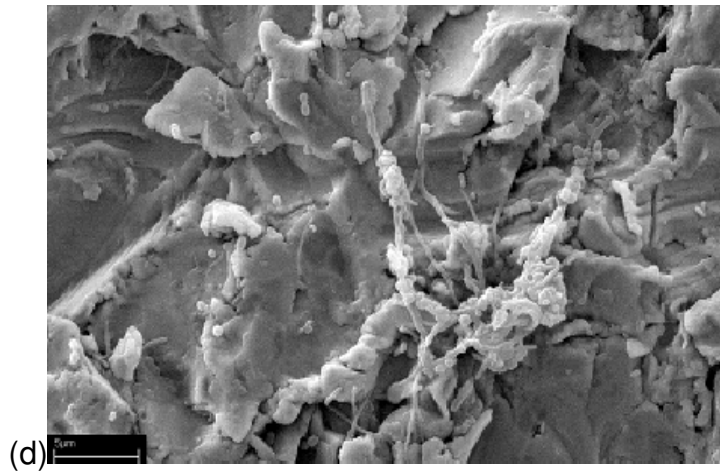
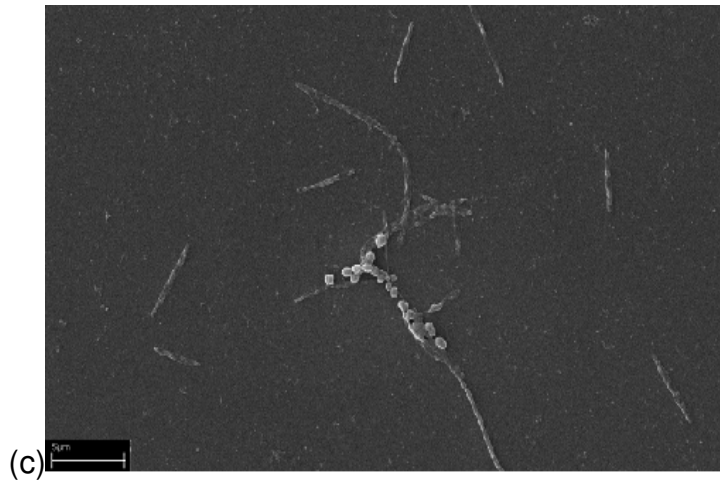


Figura 5. Imágenes del SEM de las biopelículas formadas sobre las diferentes superficies experimentales después de 24 hrs de incubación anaerobia. (a) Carbono amorfo sobre silicio, (b) Carbono amorfo sobre acero inoxidable con sandblasting, (c) Titanio sobre silicio, (d) Titanio sobre acero inoxidable con sandblasting y (e) Acero inoxidable con sandblasting.





VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B. & Branemark, P. I. (1981). A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* **10**, 387-416.
- Albrektsson, T., Dahl, E., Enbom, L., Engevall, S., Engquist, B., Eriksson, A. R., Feldmann, G., Freiberg, N., Glantz, P. O., Kjellman, O. & et al. (1988). Osseointegrated oral implants. A Swedish multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants. *J Periodontol* **59**, 287-296.
- Atassi, F. (2002). Periimplant probing: positives and negatives. *Implant Dent* **11**, 356-362.
- Bolstad, A. I., Jensen, H. B. & Bakken, V. (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* **9**, 55-71.
- Cook, G. S., Costerton, J. W. & Lamont, R. J. (1998). Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *J Periodontal Res* **33**, 323-327.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**, 435-464.
- Costerton, J. W., Cook, G. S. & Lamont, R. J. (1999) The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: *Dental Plaque Revisited: Oral biofilms in Health and Disease*, (eds.) N. H. Newman & M. Wilson, pp. 5-14. London: Eastman Dental Institute, University College London.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **176**, 2137-2142.
- Dalton, H. M. & March, P. E. (1998). Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr Opin Biotechnol* **9**, 252-255.
- Deitsch, K. W., Moxon, E. R. & Wellems, T. E. (1997). Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 281-293.
- Dunny, G. M. & Leonard, B. A. (1997). Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **51**, 527-564. doi:10.1146/annurev.micro.51.1.527.
- Dzink, J. L., Smith, C. M. & Socransky, S. S. (1987). Development of a broth medium for *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* **25**, 925.
- Edwards, R. A. & Puente, J. L. (1998). Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol* **6**, 282-287.
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J. & Muller, G. A. (1993). Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem* **210**, 235-244.
- Esposito, M., Hirsch, J. M., Lekholm, U. & Thomsen, P. (1998). Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* **106**, 527-551.

- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Geesink, R. G., de Groot, K. & Klein, C. P. (1988). Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg Br* **70**, 17-22.
- Gerber, J., Wenaweser, D., Heitz-Mayfield, L., Lang, N. P. & Persson, G. R. (2006). Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. *Clin Oral Implants Res* **17**, 1-7.
- Gibbons, R. & Nygaard, M. (1970). Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Arch Oral Biol* **15**, 1397-1400.
- Gibbons, R. J. (1989). Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* **68**, 750-760.
- Gibbons, R. J. (1996). Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. *J Dent Res* **75**, 866-870.
- Gibbons, R. J., Hay, D. I., Cisar, J. O. & Clark, W. B. (1988). Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect Immun* **56**, 2990-2993.
- Gibbons, R. J., Hay, D. I. & Schlesinger, D. H. (1991). Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun* **59**, 2948-2954.
- Groessner-Schreiber, B., Hannig, M., Duck, A., Griepentrog, M. & Wenderoth, D. F. (2004). Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? *Eur J Oral Sci* **112**, 516-522..
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. & Tschape, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**, 1089-1097.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**, 370-378.
- Hermann, J. S. & Buser, D. (1996). Guided bone regeneration for dental implants. *Curr Opin Periodontol* **3**, 168-177.
- Hultin, M., Gustafsson, A. & Klinge, B. (2000). Long-term evaluation of osseointegrated dental implants in the treatment of partly edentulous patients. *J Clin Periodontol* **27**, 128-133.
- Isidor, F. (1996). Loss of osseointegration caused by occlusal load of oral implants. A clinical and radiographic study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* **7**, 143-152.
- Jovanovic, S. A. (1993). The management of peri-implant breakdown around functioning osseointegrated dental implants. *J Periodontol* **64**, 1176-1183.
- Katsikogianni, M. & Missirlis, Y. F. (2004). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater* **8**, 37-57.
- Kolenbrander, P. E. & Andersen, R. N. (1986). Multigeneric aggregations among oral bacteria: a network of independent cell-to-cell interactions. *J Bacteriol* **168**, 851-859.

- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Clemans, D., Whittaker, C. & Klier, C. (1999) Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. In: *Dental Plaque Revisited: Oral biofilms in Health and Disease*, (eds.) N. H. Newman & M. Wilson, pp. 171-186. London: Eastman Dental Institute, University College London.
- Kolenbrander, P. E., Parrish, K. D., Andersen, R. N. & Greenberg, E. P. (1995). Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infect Immun* **63**, 4584-4588.
- Lang, N. P., Mombelli, A., Tonetti, M. S., Bragger, U. & Hammerle, C. H. (1997). Clinical trials on therapies for peri-implant infections. *Ann Periodontol* **2**, 343-356.
- Leknes, K. N., Lie, T., Boe, O. E. & Selvig, K. A. (1997). A correlation study of inflammatory cell mobilization in response to subgingival microbial colonization. *J Periodontol* **68**, 67-72.
- Leonhardt, A., Adolfsson, B., Lekholm, U., Wikstrom, M. & Dahlen, G. (1993). A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* **4**, 113-120.
- Li, J., Helmerhorst, E. J., Leone, C. W., Troxler, R. F., Yaskell, T., Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Oppenheim, F. G. (2004). Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* **97**, 1311-1318.
- Lindhe, J., Berglundh, T., Ericsson, I., Liljenberg, B. & Marinello, C. (1992). Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* **3**, 9-16.
- Listgarten, M. (1999). Formation of dental plaque and other oral biofilms. In: *Newman HN & Wilson M, ed. Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. Eastman Dental Institute, University College London*, 187-210.
- Liu, C., Zhao, Q., Liu, Y., Wang, S. & Abel, E. W. (2008). Reduction of bacterial adhesion on modified DLC coatings. *Colloids Surf B Biointerfaces* **61**, 182-187.
- Loesche, W. J. (1976). Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev* **9**, 65-107.
- Mecsas, J. J. & Strauss, E. J. (1996). Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerg Infect Dis* **2**, 270-288.
- Mergenhausen, S. E., Sandberg, A. L., Chassy, B. M., Brennan, M. J., Yeung, M. K., Donkersloot, J. A. & Cisar, J. O. (1987). Molecular basis of bacterial adhesion in the oral cavity. *Rev Infect Dis* **9 Suppl 5**, S467-474.
- Mombelli, A. (1993). Microbiology of the dental implant. *Adv Dent Res* **7**, 202-206.
- Mombelli, A., Marxer, M., Gaberthuel, T., Grunder, U. & Lang, N. P. (1995). The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol* **22**, 124-130.
- Moore, W. E. (1987). Microbiology of periodontal disease. *J Periodontal Res* **22**, 335-341.
- Pilliar, R. M. (1983). Powder metal-made orthopedic implants with porous surface for fixation by tissue ingrowth. *Clin Orthop Relat Res*, 42-51.

- Quirynen, M. & Listgarten, M. A. (1990). Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Implants Res* **1**, 8-12.
- Robertson, J. (2002). Diamond-like amorphous carbon. *Materials Science & Engineering R-Reports* **37**, 129-281.
- Rodil, S. E., Olivares, R. & Arzate, H. (2005). In vitro cytotoxicity of amorphous carbon films. *Biomed Mater Eng* **15**, 101-112.
- Rodil, S. E., Olivares, R., Arzate, H. & Muhl, S. (2003). Properties of carbon films and their biocompatibility using in-vitro tests. *Diamond and Related Materials* **12**, 931-937.
- Rodil, S. E., Olivares, R., Arzate, H. & Muhl, S. (2006) Biocompatibility, cytotoxicity and bioactivity of amorphous carbon films. In: *Topics in Applied Physics 100; The future material for advanced technology applications*, (eds.) G. Messina & S. Santangelo, pp. 55-75. Germany: Springer-Verlag.
- Schroeder, A. (1987). [Biologic considerations in use of dental implants]. *Tandlaegebladet* **91**, 736-739.
- Smith, G. L., Socransky, S. S. & Smith, C. M. (1989). Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* **4**, 47-51.
- Socransky, S. S. (1970). Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* **49**, 203-222.
- Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994). "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* **17**, 788-792.
- Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138.