



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud**

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA PELÍCULA SALIVAL ADQUIRIDA
HUMANA FORMADA SOBRE SUPERFICIES DE TITANIO Y SU EFECTO EN LA
FORMACIÓN INICIAL DE BIOPELÍCULAS**

TESIS

**Que para optar por el grado de
Doctora en Ciencias**

P R E S E N T A:

Miryam Martínez Hernández

TUTORA:

Dra. Argelia Almaguer Flores
Facultad de Odontología, DEPeI, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Sandra E. Rodil Posada
Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda
Instituto Nacional de Medicina Genómica

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO

2017



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.

CONTENIDO

<i>Resumen</i>	1
<i>Abstract</i>	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Dispositivos biomédicos implantables	5
1.1.1 Implantes dentales	6
1.1.2 Uso del Titanio como material de implantes dentales	6
1.2 Infecciones asociadas a implantes dentales	8
1.2.1 Adhesión bacteriana y formación de biopelículas sobre implantes dentales	9
1.3 Película salival (PS)	11
1.3.1 Formación y composición de la PS sobre superficies de esmalte dental	13
1.3.2 Formación y composición de la PS sobre superficies de Ti	16
1.4 Planteamiento del problema y justificación	20
1.5 Hipótesis	22
1.6 Objetivos	22
1.6.1 Objetivo general	22
1.6.2 Objetivos específicos	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1 Diseño experimental	24
2.2 Superficies experimentales	26
2.2.1 Superficies de titanio (Ti)	26
2.2.2 Superficies de esmalte	26
2.3 Caracterización de las superficies	27
2.3.1 Análisis de la topografía mediante SEM	27
2.3.2 Análisis de la rugosidad media (Ra)	28
2.3.3 Mediciones de ángulo de contacto	29
2.3.4 Mediciones del punto isoeléctrico (pI)	31
2.5 Evaluaciones biológicas	32
2.5.1 Obtención de las muestras de saliva total	32
2.5.2 Cuantificación de las proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies evaluadas mediante ensayos BCA	34
2.5.3 Identificación de las proteínas en la PS formada sobre las superficies evaluadas mediante LC-HR-MS/MS	37

2.5.4 Análisis de la ultraestructura de la PS formada sobre las superficies evaluadas por TEM	41
2.5.5 Determinación del efecto de la PS formada sobre las superficies evaluadas en la formación de biopelículas orales	42
2.6 Análisis estadístico	45
3. RESULTADOS	46
3.1 Caracterización de las superficies evaluadas	46
3.1.1 Análisis de la topografía con SEM, rugosidad media (R_a), ángulo de contacto y mediciones del punto isoelectrico	46
3.2 Ensayos biológicos	47
3.2.1 Caracterización de las muestras de saliva	47
3.2.2 Cuantificación e identificación de las proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies evaluadas	50
3.2.3 Análisis de la ultraestructura de la PS formada sobre las superficies evaluadas por TEM	70
3.2.4 Análisis del efecto de la PS formada sobre las superficies evaluadas en la formación de biopelículas orales	73
4. DISCUSIÓN	78
4.1 Influencia de la rugosidad media (R_a), topografía superficial, ángulo de contacto y punto isoelectrico de las superficies de esmalte y TiPT en la cantidad de proteínas adsorbidas	78
4.2 Identificación de las proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies evaluadas	81
4.3 Ultraestructura de la PS formada sobre las superficies evaluadas	91
4.4 Efecto de la PS formada sobre las superficies evaluadas en la formación de biopelículas orales	91
5. CONCLUSIONES	96
6. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO	98
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. ANEXOS	109
8.1 Consentimiento informado	109
8.2 Publicaciones derivadas del proyecto	115

Resumen

Objetivo. El propósito del presente estudio fue evaluar cuantitativa, cualitativa y ultraestructuralmente la Película Salival (PS) formada sobre superficies de Titanio (TiPT) y de esmalte dental, así como determinar el efecto de la PS en la formación inicial de biopelículas orales.

Metodología. Las superficies de TiPT y de esmalte, fueron caracterizadas mediante perfilometría, microscopía electrónica de barrido (SEM), punto isoeléctrico y ángulo de contacto. Los dos tipos de superficies fueron colocados en la cavidad oral de un sujeto periodontal y sistémicamente sano durante 2 horas, con la ayuda de un dispositivo de acrílico removible. Terminado este tiempo, se llevó a cabo la cuantificación e identificación de las proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies, mediante ensayos de BCA (ácido bicinónico) y análisis por nano espectrometría de masas (LC-HR-MS/MS, acrónimo de cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas de alta resolución), respectivamente. Adicionalmente, se realizó la caracterización ultraestructural de la PS mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Por otra parte, para la evaluación del efecto de la PS en la formación de biopelículas, las superficies experimentales fueron incubadas con una mezcla de muestras de saliva total de 10 sujetos periodontal y sistémicamente sanos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las superficies fueron incubadas durante 12 horas con una mezcla de bacterias representativas de la cavidad oral; *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*. El número de bacterias adheridas en cada muestra fue determinado mediante el ensayo XTT, mientras que la viabilidad bacteriana fue evaluada con microscopía de fluorescencia, utilizando el kit LIVE/DEAD® BacLight™. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante la prueba de ANOVA con la modificación de Bonferroni.

Resultados. Las micrografías por SEM mostraron diferencias topográficas entre las superficies de esmalte y TiPT, lo cual fue corroborado mediante los análisis de la rugosidad promedio (R_a), donde se observó que las superficies de TiPT tuvieron una mayor R_a (0.45 ± 0.07) con respecto a las superficies de esmalte (0.06 ± 0.02). También se obtuvo un mayor ángulo en las superficies de TiPT ($92.4 \pm 0.1^\circ$) con respecto a las superficies de esmalte ($43.8 \pm 0.4^\circ$). Sin embargo, se encontraron valores similares del punto isoeléctrico en ambas superficies, 3.60 y 4.27, para esmalte y TiPT, respectivamente.

Encontramos que del total de proteínas cuantificadas en muestras de saliva total ($506.4 \pm 32 \mu\text{g/mL}$), sólo $5.6 \mu\text{g}$ de proteínas estuvieron adsorbidas a las superficies de esmalte (1.1%) y $2.5 \mu\text{g}$ de proteínas estuvieron adsorbidas a las superficies de TiPT, es decir, se encontró 2.24 veces mayor cantidad de proteínas adsorbidas a las superficies de esmalte con respecto a las superficies de TiPT. Respecto a la identificación de las proteínas adsorbidas, en las superficies de esmalte se identificaron 295 diferentes proteínas, de las cuales 70 fueron exclusivas de estos sustratos. Mientras que en las

superficies de TiPT se identificaron 259 proteínas, encontrándose 34 tipos de proteínas exclusivas de estas superficies. Haciendo un total de 329 proteínas identificadas en ambos tipos de superficies. En el análisis por TEM, se observó la presencia de una capa homogénea cubriendo ambas superficies. En las superficies de TiPT se pudo observar la presencia de glóbulos distribuidos homogéneamente sobre las superficies. Con respecto a la formación de biopelículas, se observaron mayores conteos bacterianos en las superficies sin PS (control), encontrándose mayor adhesión bacteriana en las superficies TiPT en comparación con las superficies de esmalte. Sin embargo, en las superficies con la PS, la adhesión bacteriana fue similar en ambos sustratos, sin importar las diferencias físico-químicas de los mismos.

Conclusiones. Las diferencias en la cantidad de proteínas salivales adsorbidas entre las superficies de esmalte y TiPT fueron influidas por las características físico-químicas de ambos sustratos. El fenómeno de formación de la PS fue altamente selectivo, ya que sólo un bajo porcentaje de las proteínas presentes en saliva mostró afinidad por los sustratos evaluados. Por otro lado, las características físico-químicas de las superficies evaluadas, además de la presencia de la PS sobre dichos sustratos, influyeron en la formación de las biopelículas orales. Finalmente, algunos proteoglicanos identificados exclusivamente en los sustratos TiPT podrían representar blancos potenciales para futuras aplicaciones biomédicas.

ABSTRACT

Aim. The purpose of the present study was to evaluate quantitatively, qualitatively and ultrastructurally the formation of the salivary pellicle (SP) formed on enamel and titanium surfaces (TiPT), as well as to determine the effect of the PS on the initial formation of oral biofilms.

Methods. The TiPT and enamel surfaces were characterized by profilometry, scanning electron microscopy (SEM), isoelectric point and contact angle. The SP was formed after the intraoral incubation of the surfaces tested by two hours. An acrylic removable device with both types of surfaces was placed in the oral cavity of a systemically and periodontally healthy subject during two hours. After the incubation time, the quantitation and identification of the proteins present in the SP formed on the evaluated surfaces were carried out by BCA (Bicinchoninic Acid) assays and by nano mass spectrometry [(LC-HR-MS/MS) Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry], respectively. The ultrastructural characterization of the SP was made through transmission electron microscopy (TEM). To evaluate the effect of the SP on the biofilm formation, the experimental surfaces were incubated for two hours with a pool of saliva samples from 10 systemically and periodontally healthy subjects. After the incubation period, the surfaces were incubated during 12 hours with a mix of different bacterial strains (*Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*). The number of bacterial cells attached on each surface were determined by the XTT assay. While, bacterial viability was analyzed by fluorescence microscopy, using the LIVE/DEAD® BacLight™ kit. The significant differences were determined by ANOVA test with the Bonferroni modification.

Results. The SEM micrographs showed topographic differences between TiPT and enamel surfaces, and this was corroborated by the roughness average (Ra) analysis, where it was observed that TiPT surfaces had a higher Ra (0.45 ± 0.07) compared to the enamel surfaces (0.06 ± 0.02). A higher contact angle was also found on the TiPT surfaces ($92.4\pm 0.1^\circ$) compared to the enamel surfaces ($43.8\pm 0.4^\circ$). However, similar values of the isoelectric point in both surfaces were found, 3.60 and 4.27, for enamel and TiPT, respectively.

We found that of the total proteins quantified in whole saliva samples ($506.4\pm 32\mu\text{g}/\text{mL}$), only 5.6 μg of proteins were adsorbed on the enamel surfaces (1.1%) and 2.5 μg of proteins were adsorbed on the TiPT surfaces. On the enamel surfaces, 2.2 times fold more proteins were adsorbed compare to the TiPT surfaces. Regarding the identification of the adsorbed proteins, 295 different proteins were identified on the enamel surfaces, of which 70 were exclusive of these substrates. Whereas in the TiPT surfaces 259 proteins were identified, being 34 types of proteins exclusive of these surfaces. Making a total of 329 proteins identified on both types of surfaces. In the TEM analysis, the presence of a homogeneous layer covering both surfaces was observed. On the TiPT surfaces, it was possible to find the presence of globules distributed homogeneously on the surfaces. Concerning biofilm formation, higher bacterial counts were observed on surfaces without PS (control), with greater bacterial adhesion on TiPT surfaces compared to enamel surfaces. However, when PS was formed on the evaluated surfaces,

bacterial adhesion was similar in both substrates, regardless of physicochemical differences.

Conclusions. The differences of salivary proteins adsorbed on the enamel and TiPT surfaces were influenced by the physicochemical characteristics of both substrates. The phenomenon of PS formation was highly selective since only a low percentage of the proteins present in saliva showed an affinity for the substrates evaluated. On the other hand, the physicochemical characteristics of the evaluated surfaces, in addition to the presence of PS on the substrates, influenced the formation of oral biofilms. Finally, some proteoglycans identified exclusively on TiPT substrates could represent potential targets for future biomedical applications.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dispositivos biomédicos implantables

Un biomaterial es una sustancia o elemento que ha sido diseñado para formar parte de un sistema complejo, siendo empleado para dirigir, a través de la interacción con los componentes de los sistemas biológicos, el curso terapéutico o diagnóstico en medicina humana o veterinaria (Williams, 2009).

Cuando procesos destructivos como fracturas y cáncer dañan algún tejido del cuerpo provocando pérdida de su función, la utilización de los biomateriales resulta crucial para el reemplazo o restauración de la parte del cuerpo dañada en una manera segura, confiable y fisiológicamente aceptable. Los dispositivos biomédicos implantables han sido utilizados desde hace más de 2,000 años (algunos historiadores remontan la utilización de suturas desde hace más de 32,000 años), de acuerdo al NIH (National Institute of Health) se estima que entre el 8-10% de la población Norteamericana (20-25 millones de personas) portan un dispositivo biomédico (NIH, 2010).

Los biomateriales utilizados en el área médico-odontológica pueden ser clasificados en tres principales categorías: metales, polímeros y cerámicos. Los metales son utilizados cuando se requiere fuerza y durabilidad y sus usos típicos incluyen: restauraciones dentales, tornillos y placas de fijación ortopédica e implantes dentales, mientras que los cerámicos son empleados cuando la estética y la durabilidad química son importantes, se utilizan principalmente para la fabricación de coronas, cementos y dentaduras (Kelly, Nishimura, & Campbell, 1996). Los polímeros son útiles debido a sus

propiedades estéticas y adhesivas, sus usos van desde prótesis articulares, adhesivos, suturas y cementos óseos (Griffith, 2000).

1.1.1 Implantes dentales.

El reemplazo de dientes perdidos con restauraciones soportadas por implantes ha llegado a ser una modalidad de tratamiento para sujetos total o parcialmente edéntulos aceptada por la comunidad científica. Este avance en la rehabilitación oral fue posible con el descubrimiento de que los implantes dentales hechos de titanio se anclan en el tejido óseo maxilar mediante el contacto hueso-implante (osteointegración).

Desde la primera documentación científica basada en la experiencia clínica de los implantes dentales de titanio exitosamente osteointegrados en 1977 (Branemark, et al., 1977), muchos estudios con un seguimiento de más de 10 años han sido publicados (Esposito, et al., 2005; Ivanoff, et al., 2000; Lekholm, et al., 1999; Wyatt & Zarb, 1998).

1.1.2 Uso del Titanio como biomaterial de implantes dentales.

El Titanio (Ti) fue descubierto a finales de 1700 y es el cuarto metal más abundante en la corteza terrestre (Tschernitschek, Borchers, & Geurtsen, 2005). Sin embargo, fue hasta la introducción del proceso Kroll para la extracción del Ti en 1936, patentado en 1940 (Wilhelm, 1940), que el Ti estuvo disponible para la industria en abundantes cantidades y a un costo accesible para su utilización. El Ti está comúnmente disponible en cuatro diferentes grados (grados 1-4) con base en los diferentes contenidos admisibles de oxígeno y hierro.

Químicamente, el Ti es un elemento de transición. Se encuentra en el grupo IV, en el periodo 4 de la tabla periódica de Mendeléyev. La **tabla 1** presenta las principales propiedades físicas del Titanio (Liu, Chu, & Ding, 2004).

Tabla 1. Propiedades físicas del titanio.

PROPIEDAD		VALOR
Número atómico		22
Peso atómico (g/ml)		47. 90
Estructura cristalina		
Alfa, hexagonal, estrechamente empaquetada	c (Å)	4.6832 ± 0.0004
	a (Å)	2.9504 ± 0.0004
Beta, cúbica, centrada en el cuerpo	a (Å)	3.28 ± 0.003
Densidad (g cm ⁻³)		4. 54
Conductividad térmica (W/(m K))		19. 2
Temperatura de fusión (°C)		1668
Temperatura de transformación (°C)		882. 5
Resistencia a la fractura, α , (MPa)		785

El Ti “comercialmente puro” (c.p.) (ASTM F67) y la aleación Ti-6Al-4V (ASTM F136) son dos de los biomateriales para la fabricación de implantes dentales más comúnmente utilizados. El Ti desarrolla naturalmente una capa de óxido de pasivación en su superficie (Lausmaa, et al., 1989; Souto & Burstein, 1996). Según estudios espectroscópicos, esta capa de óxido que se genera en la superficie de implantes de Ti c.p. disponibles comercialmente tiene un grosor en el rango de 1.8 a 17 nm, y su composición química es principalmente TiO₂ (Binon, Weir, & Marshall, 1992; Lausmaa, Kasemo, & Mattsson, 1990; Olefjord & Hansson, 1993; Wälivaara, et al., 1994). Esta capa de óxido depende de la preparación de los implantes, en particular de las temperaturas

finales a las cuales los implantes fueron expuestos y a la duración de dichas exposiciones.

Presumiblemente, esta película de óxido es la responsable de la excelente biocompatibilidad de los implantes de Ti debido a su bajo nivel de conductividad electrónica (Zitter & Plenk, 1987), una alta resistencia a la corrosión y estado termodinámicamente estable a valores de pH fisiológicos (Solar, Pollack, & Korostoff, 1979; Williams, 1976). El Ti y sus óxidos tienen una baja tendencia a la formación de iones en ambiente acuosos (Tengvall & Lundstrom, 1992).

1.2 Infecciones asociadas a implantes dentales

Aunque el éxito a largo plazo de los implantes dentales de Ti es alto, existen complicaciones biológicas asociadas con la formación de placa microbiana e infecciones que pueden llegar a surgir durante el mantenimiento y retención de estos dispositivos biomédicos (Bragger, et al., 2005; Leonhardt, Dahlen, & Renvert, 2003). Las infecciones asociadas a implantes son causadas por microorganismos que crecen en estructuras denominadas biopelículas (Costerton, Montanaro, & Arciola, 2005). La patogénesis de tales infecciones involucra interacciones entre los microorganismos, el implante y el huésped. Dichas infecciones son clínicamente importantes debido a que las bacterias en las biopelículas muestran resistencia a los componentes antimicrobianos y persistencia mediante mecanismos de evasión del sistema inmune del huésped (Hall-Stoodley &

Stoodley, 2005). La evidencia clínica ha mostrado que las biopelículas deben ser removidas físicamente para que la infección pueda ser resuelta (Costerton, 2005).

El fallo en el establecimiento o mantenimiento de la osteointegración alrededor de los implantes dentales puede ser debido a fuerzas parafuncionales y/o carga prematura (van Steenberghe, et al., 1990; Zarb & Schmitt, 1990), o causado por infecciones microbianas (Bragger, Karoussis, Persson, Pjetursson, Salvi, & Lang, 2005; Leonhardt, Dahlen, & Renvert, 2003). El fracaso de los implantes puede ser cronológicamente dividido en fracaso temprano (antes de la carga) y fracaso tardío (posterior a la carga) (Esposito, et al., 1998a). La tasa de fallo a largo plazo es aproximadamente del 5 al 10 % (Esposito, et al., 1998b). La discriminación entre las causas del fallo de los implantes es de importancia para la instauración de una terapia implantar exitosa.

1.2.1 Adhesión bacteriana y formación de biopelículas sobre implantes dentales.

En la cavidad oral, las bacterias pueden adherirse a una gran variedad de superficies, incluyendo superficies blandas como encía y mucosas, y superficies duras como dientes y restauraciones. La adhesión es un determinante ecológico clave para que las bacterias orales sobrevivan y persistan (Jenkinson & Lamont, 1997).

La adhesión bacteriana y la subsecuente formación de la biopelícula en los implantes dentales es un problema persistente. La adhesión a una superficie es el paso esencial en el desarrollo de una biopelícula, siendo la colonización secuencial y formación de la placa dental un proceso altamente orquestado (Xie, et al., 2000). La asociación de bacterias dentro de biopelículas complejas no es aleatoria; se ha

demostrado que existen asociaciones específicas (complejos) entre las bacterias de las biopelículas dentales (Kolenbrander, et al., 2006; Socransky, et al., 1998).

Se ha sugerido que la colonización microbiana de los implantes dentales sigue el mismo patrón que el de los dientes (Lang, et al., 1993; Leonhardt, et al., 1992). Es decir, las especies que colonizan implantes dentales incluyen especies encontradas en salud gingival como *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis* y también especies encontradas en sitios con gingivitis como *Fusobacterium* sp. y *Peptostreptococcus* sp. (Mombelli, et al., 1987; Rams, et al., 1991). Estudios realizados a través de la toma de fluido crevicular gingival y usando sondas de DNA reportaron que en los implantes de titanio expuestos a la cavidad oral, las especies de *Streptococcus* predominaron como colonizadores tempranos. También se reportó que las especies de *Streptococcus* seguían predominando después de 4 horas y fue hasta las 48 horas que especies anaeróbicas como *Porphyromonas gingivalis* comenzaron a incrementarse (Furst, et al., 2007; Mombelli, et al., 1995; Nakazato, et al., 1989; Rams, Roberts, Feik, Molzan, & Slots, 1991).

Durante el daño peri-implantar se establece una compleja microbiota que recuerda cercanamente a la encontrada en la periodontitis crónica (Becker, et al., 1990; Rosenberg, Torosian, & Slots, 1991). Algunas de las especies bacterianas asociadas con las infecciones peri-implantares incluyen: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Camphylobacter* sp., *Parvimonas micra* (antes *Peptostreptococcus micros*) y *Streptococcus intermedius* (Hultin, et al., 2002; Tanner, et al., 1997). Otros microorganismos no asociados con periodontitis como *Staphylococcus* sp., *Candida* sp., y

entéricas sp., también han sido relacionados con infecciones peri-implantares (Leonhardt, Renvert, & Dahlen, 1999; Slots & Rams, 1991).

1. 3 Película salival (PS)

Una vez expuestas a la cavidad oral, todas las superficies son inmediatamente cubiertas por saliva, formando una película salival (PS). Esta película acondicionante fue primero identificada en superficies de esmalte, denominándose “Película de Esmalte Adquirida” término propuesto en una revisión de la nomenclatura de los tegumentos de la superficie del esmalte en 1963 (Dawes, Jenkins, & Tonge, 1963).

La saliva, es una solución hipotónica compleja que contiene aproximadamente 3,400 diferentes proteínas con una gran variedad de funciones biológicas y que está siempre en constante cambio (Rosa, et al., 2012). Cuando una persona se encuentra en estado de reposo, la producción de la saliva se debe principalmente a la glándula submandibular, mientras que sólo el 20% y el 8% es producida por las glándulas parótida y sublingual, respectivamente. Asimismo, la composición de la saliva estimulada y no estimulada puede ser alterada por factores predisponentes genéticos y por factores patológicos, ambientales y fisiológicos (de Almeida Pdel, et al., 2008; Dodds, Johnson, & Yeh, 2005).

La adsorción de proteínas es un fenómeno general en muchos sistemas donde fluidos biológicos entran en contacto con cualquier material. El proceso de formación de esta PS es altamente selectivo y dinámico, donde muchos factores influyen, incluyendo:

ciclos circadianos, composición de la flora microbiana oral, propiedades físico químicas de las superficies dentales, entre otros (Lendenmann, Grogan, & Oppenheim, 2000). Las interacciones no-covalentes involucradas en su formación incluyen: puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas y de van der Waals, entre las superficies y las proteínas salivales. Estas interacciones resultantes modulan la selectividad de adsorción de las proteínas presentes en saliva (Nakanishi, Sakiyama, & Imamura, 2001; Teughels, et al., 2006). De esta forma, las propiedades fisicoquímicas superficiales de la PS, incluyendo composición, densidad y/o configuración, son ampliamente dependientes de la naturaleza físico-química de la superficie dura subyacente (Baier & Glantz, 1978; Lee, Adamson, & Kim, 1974; Sipahi, Anil, & Bayramli, 2001).

Aunque los constituyentes de la PS derivan de diversas fuentes, incluyendo secreciones glandulares, fluido crevicular gingival, productos de células epiteliales orales y productos derivados de microorganismos (Hannig, et al., 2005a; Hannig & Joiner, 2006), estudios bioquímicos y ultraestructurales han demostrado que las proteínas salivales son los principales constituyentes de dichas películas depositadas *in vitro* o *in situ* no sólo en esmalte e hidroxiapatita, sino también en diversos materiales restaurativos (Berthold, 1979; Hannig, 1997; Schupbach, et al., 2001).

El estudio de la PS es importante debido a la amplia gama de funciones que posee, mientras que por un lado proporcionará lubricación (Berg, Rutland, & Arnebrant, 2003), protección contra el desgaste de los tejidos dentales y reparación de los tejidos duros y blandos (Bennick, et al., 1983; Moreno, Varughese, & Hay, 1979). Por otro lado, la formación de la PS en las superficies dentales es un proceso indispensable para que

ocurra la adhesión bacteriana y subsecuente formación de la biopelícula oral (Gibbons, 1996).

1.3.1 Formación y composición de la PS sobre superficies de esmalte dental.

El esmalte dental es una estructura de origen epitelial, que cubre externamente la superficie coronal de los dientes, es la estructura más dura y rígida de los mamíferos, es translúcido y es secretado por ameloblastos (He & Swain, 2008). El esmalte completamente formado representa el tejido con la mineralización más alta conocida, consistiendo de 96% de sales minerales, representadas por cristales de hidroxapatita y 4% de materia orgánica y agua (Ramirez Rozzi, 1998).

La formación de la PS sobre superficies de esmalte puede ser dividida en dos etapas, la primera etapa puede ser descrita como una adsorción inmediata de proteínas. En contacto con una solución de electrolitos, como la saliva, los iones de calcio de los cristales de esmalte tienen una tendencia más fuerte que los iones de fosfato para disolverse en la saliva. Como resultado, los iones de fosfato remanentes darán a la superficie de esmalte una carga general negativa. Esta superficie será cubierta con una capa cargada positivamente de iones de calcio. De esta forma, las proteínas salivales se adsorberán principalmente en la superficie de esmalte por medio de interacciones electrostáticas entre la capa doble iónica (iones de calcio y fosfato) por un lado, y por el otro lado, entre los grupos cargados de las proteínas (**Figura 1**).

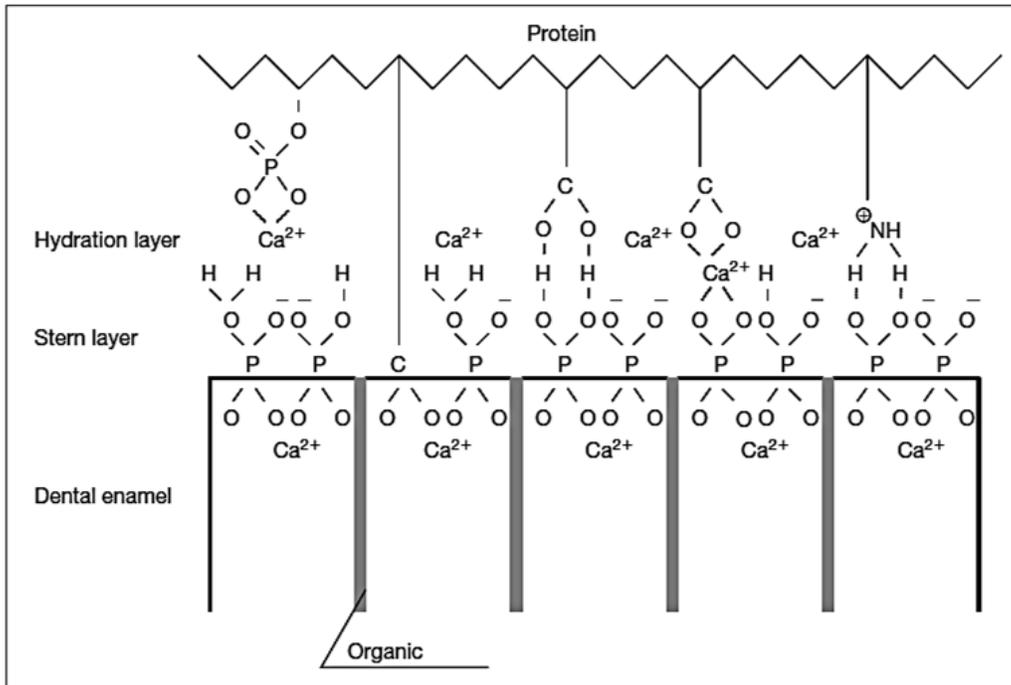


Figura 1. Imagen que muestra la formación de la PS sobre superficies de esmalte, indicando la adsorción de proteínas por medio de interacciones electrostáticas.

Esta adsorción inicial de proteínas a la superficie de los dientes es afectada de manera muy importante por los iones presentes en la saliva, como por ejemplo calcio (Ca²⁺) o sodio (Na⁺) (Lindh, et al., 2002). Ha sido reportado que las proteínas de la saliva que inicialmente se adsorben en la película son principalmente aquellas con peso molecular relativamente bajo tales como: proteínas ricas en prolina (PRP) ácidas y estaterina (Bennick, Chau, Goodlin, Abrams, Tustian, & Madapallimattam, 1983; Yao, Lamkin, & Oppenheim, 1999). También se ha sugerido que la mayoría de las proteínas en la PS están cargadas negativamente (Yao, et al., 2001). Otras proteínas como histatinas y mucinas (Lendenmann, Grogan, & Oppenheim, 2000), y enzimas, incluyendo: α -amilasa (Vacca-Smith, et al., 1996a), lisozima (Rölla, Ciardi, & Bowen,

1983), glucosiltransferasa y fructosiltransferasa bacteriana (Rölla, Ciardi, & Bowen, 1983; Vacca-Smith, et al., 1996b) también han podido ser identificadas como constituyentes de la PS.

Además de las interacciones iónicas, otras fuerzas, como interacciones van der Waals, contribuirán a la adsorción de proteínas en la superficie del esmalte. También se ha sugerido que interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la formación de la capa de película. Estas últimas interacciones son impulsadas termodinámicamente, como resultado de una ganancia en la entropía, la cual tiene lugar cuando una proteína adsorbida reemplaza a moléculas de agua en la superficie (Vassilakos, Arnebrant, & Glantz, 1993; Vassilakos, et al., 1992).

La rápida fase inicial de adsorción de proteínas salivales es seguida por una segunda fase, comparativamente más lenta de adsorción de proteínas en la superficie de esmalte cubierta por proteínas. La segunda etapa de formación de la película se caracteriza por una adsorción continua de biopolímeros de la saliva. Este proceso involucra interacciones proteína-proteína entre las proteínas ya adsorbidas e inmovilizadas en la capa de película, así como, proteínas y agregados de proteínas de la saliva (Hannig & Joiner, 2006).

Por análisis ultraestructural, se ha establecido que la PS puede ser dividida en una capa externa laxamente organizada, la cual puede ser fácilmente removida por fuerzas de cizallamiento y una capa basal que resiste estas fuerzas (Hannig, et al., 2005b). La capa basal permanece presente incluso después del cepillado dental, mientras que las proteínas unidas laxamente se forman solamente cuando las fuerzas de cizallamiento

son débiles o nulas (Hannig, 2002). La película madura formada *in vivo* ha sido descrita como un revestimiento de superficie homogénea y amorfa, libre de bacterias de grosores variables (Armstrong, 1968; Leach & Saxton, 1966; Meckel, 1965; Tinanoff, Glick, & Weber, 1976). En sitios de auto-limpieza de los dientes, el grosor de la película va de entre 30 nm y 80 nm (Tinanoff, Glick, & Weber, 1976), mientras que en áreas proximales la película puede llegar a un grosor mayor de 2 μm (Tinanoff, Glick, & Weber, 1976).

La capa de PS adsorbida consiste de un arreglo aleatorio de biopolímeros salivales diversos, los cuales están sujetos a ciertos cambios dependiendo del tiempo. La estructura variable de la capa de película (externa) refleja los procesos complejos de adsorción y desorción, los cuales siguen a la formación de la película. Por lo tanto, no es posible describir exactamente la velocidad de formación de la película o el grosor final de la misma. Sin embargo, en estudios previos donde se evaluó la velocidad de formación de la película, se concluye que la película incrementa en grosor por cerca de 1 hora y que la velocidad de formación de la película se estabiliza entre la primera y segunda hora (Kuboki, Teraoka, & Okada, 1987; Skjorland, Rykke, & Sonju, 1995).

1.3.2 Formación y composición de la PS sobre superficies de Ti.

Las superficies de Ti de los implantes dentales expuestas a la cavidad oral, proporcionan superficies duras que permiten la formación de una PS acondicionante (Grossner-Schreiber, et al., 2001; Wolinsky, et al., 1989). Esta PS influirá la colonización bacteriana inicial a dichos dispositivos biomédicos (Almaguer-Flores, et al., 2012), la adhesión de microorganismos a estas superficies duras es considerado el primer paso de

la formación de la biopelícula dental (Gibbons, 1996; Marsh, 1994). La formación de una biopelícula puede llevar a la inflamación de la mucosa adyacente y, subsecuentemente a la reabsorción del tejido óseo del implante osteointegrado, incrementando el riesgo de fallo del implante (Bragger, Karoussis, Persson, Pjetursson, Salvi, & Lang, 2005; Leonhardt, Dahlen, & Renvert, 2003).

Las superficies de Ti muestran sitios funcionales en su superficie (óxidos) a los cuales los iones se pueden adherir, además de ser los responsables de su punto isoeléctrico (pI). Se sabe que las propiedades de carga de la superficie tienen una influencia en la adsorción de proteínas (Krajewski, 1996; Krajewski, Piancastelli, & Malavolti, 1998).

Aunque el mecanismo exacto de formación de la PS sobre superficies de Ti no se conoce en su totalidad, el siguiente modelo ha sido propuesto. Las superficies de Ti reaccionan inmediatamente con el oxígeno cuando son expuestas al aire formando una capa de óxido en su superficie la cual consiste principalmente de dióxido de Ti (TiO_2), aunque óxido de titanio (III) (Ti_2O_3) y otros óxidos también pueden estar presentes (Kasemo, 1983). La capa de óxido de las superficies de Ti tiene una carga neta negativa a los valores de pH encontrados en los tejidos humanos. La superficie de óxido del Ti se une a cationes, particularmente a cationes polivalentes (Abe, 1982). Esta unión de cationes está basada en interacciones electrostáticas entre el O^- , unido al Ti en la superficie del implante, y los cationes. La capa de óxido es altamente polar y en general atrae agua y macromoléculas solubles en agua (Parsegian, 1983).

Las propiedades físicas de las superficies de Ti sugieren que iones de calcio, presentes en los biofluidos, pueden ser atraídos a la superficie de óxido del Ti por interacciones electrostáticas con el O⁻. Depósitos de calcio han sido observados en contacto directo con el óxido de Ti (Albrektsson & Hansson, 1986). De acuerdo con este modelo, las macromoléculas de unión a calcio podrían adsorberse selectivamente a las superficies de implantes de Ti *in vivo*. Las moléculas de unión a calcio son frecuentemente ácidas con grupos sulfato, fosfato o carboxilo expuestos en su superficie: Por ejemplo, los proteoglicanos, los cuales contienen grupos sulfato o carboxilo podrían unirse a las superficies de óxido de Ti por este mecanismo. La hidroxiapatita, el principal componente del esmalte, también muestra una superficie dominada por cargas negativas que puede atraer cationes y subsecuentemente macromoléculas aniónicas de unión a calcio (Bernardi & Kawasaki, 1968), de esta forma las características de las superficies de Ti probablemente cambien de un estado aniónico a catiónico por la adsorción de calcio a la superficie (**Figura 2**).

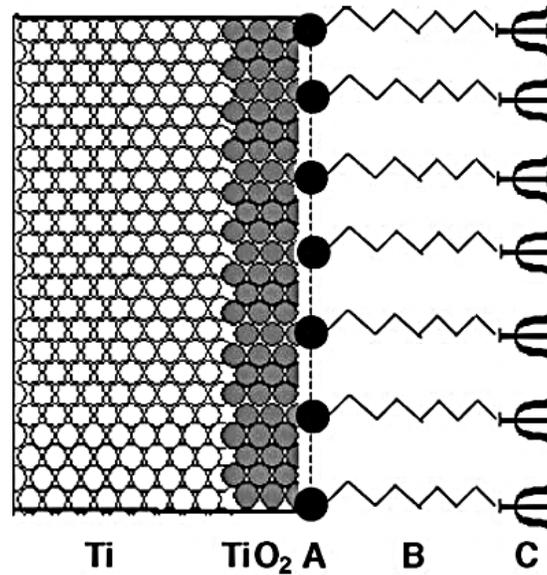


Figura 2. La imagen muestra el posible mecanismo de formación de la PS sobre superficies de Ti. La superficie metálica del Ti es cubierta por una capa de óxido la cual tiene una carga neta negativa a un pH fisiológico. El calcio presente en biofluidos reaccionará con esta superficie, además de reaccionar con macromoléculas de unión a calcio. (A) Oxígeno; (B) calcio; (C) macromoléculas (péptidos, proteínas, etc.).

Con base en datos previos se han podido identificar diversas proteínas adsorbidas selectivamente sobre sustratos de Ti como: α -amilasa y albúmina (Kohavi, et al., 1997; Steinberg, et al., 1995), lisozima (Hannig, et al., 2006), inmunoglobulina A secretora y cistatinas (Dorkhan, Svensater, & Davies, 2013), así como proteína inducible de prolactina, filagrina, desmogleina y α -macroglobulina (Cavalcanti, et al., 2014). La albúmina, es una proteína de unión a iones de calcio (Foster, 1960). Previamente se ha mostrado que el mecanismo de adsorción de proteínas, como la albúmina, al Ti depende de fuerzas electrostáticas (Klinger, et al., 1997; Kohavi, Klinger, Steinberg, Mann, & Sela, 1997).

1.4 Planteamiento del problema y justificación

Los implantes dentales de Ti son ampliamente utilizados para la rehabilitación protésica de sujetos total y parcialmente desdentados. Una vez que los implantes dentales son colocados en la cavidad oral, sus superficies son inmediatamente expuestas a la adsorción de proteínas salivales y del plasma sanguíneo, lo que los hace propensos a ser colonizados por bacterias pudiendo provocar la inflamación de la mucosa adyacente al sitio del implante y la subsecuentemente resorción ósea, de esta forma el riesgo de fallo o pérdida del implante se ve incrementando.

En nuestro grupo de trabajo hemos estudiado la adhesión y formación inicial de biopelículas de bacterias orales sobre diferentes materiales utilizados en el área biomédica y dental con el fin de analizar la influencia de características físicas como la rugosidad (topografía) y químicas, como la composición elemental de la superficie (Almaguer-Flores, Olivares-Navarrete, Wieland, Ximenez-Fyvie, Schwartz, & Boyan, 2012; Almaguer-Flores, et al., 2009; Almaguer-Flores, Ximenez-Fyvie, & Rodil, 2011; Martínez-Hernández, Olivares-Navarrete, & Almaguer-Flores, 2014) en la adhesión selectiva de diferentes especies bacterianas de importancia médica y odontológica a la superficie de dichos biomateriales. Los hallazgos encontrados, nos llevan a profundizar en el fenómeno de formación de biopelículas orales sobre superficies de Ti desde la primera etapa de colonización, es decir, desde el momento en que las superficies de Ti tienen contacto con las proteínas de la saliva.

Para entender la organización y función de un proteoma, así como para identificar posibles blancos terapéuticos o para diagnóstico médico, las propiedades

individuales y la relevancia de las proteínas presentes en un ambiente específico necesita ser explorado. El presente estudio se enfoca en analizar cómo influyen las características físico-químicas de superficies de Ti actualmente utilizadas en la práctica clínica en la adsorción de proteínas salivales, utilizando como grupo control superficies de esmalte dental, en la formación de la PS, mediante una aproximación proteómica de última generación. Además, de analizar el efecto de dicha PS en la colonización bacteriana, para así lograr una mayor comprensión de los eventos involucrados en la formación de biopelículas sobre superficies de Ti.

El análisis detallado de las proteínas en el proteoma de la PS formada en ambos sustratos permitiría identificar posibles patrones físico-químicos, estructurales o funcionales, involucrados en la biología de la formación inicial de biopelículas, además de la identificación de proteínas clave para posibles aplicaciones biomédicas.

1.5 Hipótesis

La identidad de las proteínas salivales de la PS formada sobre superficies de Ti es diferente de las proteínas de la PS que se forma sobre superficies de esmalte, afectando directamente la formación inicial de biopelículas orales sobre dichos sustratos.

1.6 Objetivos

1.6.1 General.

Identificar las proteínas presentes en la PS formada sobre superficies de Ti y de esmalte, y determinar su efecto en la formación inicial de biopelículas utilizando especies bacterianas representativas de la cavidad oral.

1.6.2 Específicos.

- Caracterizar las superficies de Ti y esmalte mediante análisis de rugosidad media (R_a), topografía superficial, ángulo de contacto y punto isoeléctrico.
- Cuantificar la cantidad proteínas presentes en la PS adsorbida en superficies de Ti y superficies de esmalte.
- Identificar las proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies de TiPT y compararla con la PS formada en las superficies de esmalte.
- Caracterizar ultraestructuralmente la PS formada sobre las superficies de TiPT y compararla con la PS formada en las superficies de esmalte.

- Determinar el efecto de la PS formada en superficies de TiPT y esmalte en la formación de biopelículas orales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

Con la finalidad de cumplir con los objetivos planteados en el presente estudio, se llevó a cabo la caracterización de las superficies experimentales y la realización de dos grupos de ensayos biológicos: el primer grupo de ensayos biológicos se realizó para evaluar la adsorción de las proteínas a los sustratos de Ti por medio de métodos cuantitativos y cualitativos, mientras que el segundo grupo de ensayos se realizó para determinar el efecto de la PS formada sobre las superficies evaluadas en la formación de biopelículas orales.

La caracterización de las superficies de Ti, el análisis de la rugosidad media (Ra) y la medición del ángulo de contacto se realizó en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM. El análisis de la topografía mediante microscopía electrónica de barrido [SEM (acrónimo de Scanning Electron Microscopy)] y las mediciones del punto isoeléctrico se realizaron en la Universidad Saarland, Homburg, Alemania.

Las evaluaciones biológicas se dividieron en dos grupos de experimentos, el primero de ellos consistió en la cuantificación de proteínas en muestras de saliva total y de las proteínas presentes en la PS de 2 horas formada sobre los distintos sustratos evaluados mediante ensayos de BCA (acrónimo de Bicinchoninic Acid), la identificación de las proteínas presentes en la PS de 2 horas formada sobre las superficies evaluadas mediante la técnica de nano espectrometría de masas (LC-HR-MS/MS), así como el análisis ultraestructural de la PS, de 3 minutos y 2 horas, formada en las superficies

evaluadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, acrónimo de Transmission Electron Microscopy). Para dichas evaluaciones, grupos superficies de esmalte y TiPT fueron colocados un dispositivo intraoral el cual fue portado por un sujeto sistémica y periodontalmente sano. Los análisis antes mencionados fueron realizados en la universidad de Saarland, Homburg en Alemania

El segundo grupo de experimentos consistió en ensayos de adhesión bacteriana sobre las superficies evaluadas, previamente incubadas con una mezcla de muestras de salival total obtenidas de 10 sujetos sistémica y periodontalmente sanos. La evaluación de la biopelícula de 12 horas se realizó mediante ensayos de XTT y mediante microscopía de fluorescencia. Adicionalmente, se evaluó ultraestructuralmente, mediante TEM, la presencia de una biopelícula formada *in situ* sobre los sustratos evaluados, los cuales fueron colocados un dispositivo intraoral el cual fue portado durante 24 horas por un sujeto sistémica y periodontalmente sano. Los ensayos de adhesión bacteriana se realizaron en el laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

2.2 Superficies experimentales

2.2.1 Superficies de titanio (Ti).

En el presente estudio se utilizaron discos de Ti de 15 mm de diámetro (área superficial de 4 cm²) preparados a partir de hojas de 1 mm de grosor de Ti c.p. grado 2 (ASTM F67). Los métodos que se utilizaron para producir estas superficies de titanio que en adelante llamaremos PT (Pre-Tratamiento) han sido reportados previamente (Schwarz, et al., 2007a; Schwarz, et al., 2007b). Dichos sustratos son representativos de superficies de implantes dentales comercializados actualmente (Straumann®). Todos los discos fueron fabricados por el instituto Straumann AG (Basel, Switzerland) y esterilizados por irradiación γ a 25-42 kGy, y fueron proporcionados listos para ser utilizados.

2.2.2 Superficies de esmalte.

Como superficies control se utilizaron superficies de esmalte de origen bovino. Previamente se ha demostrado que no hay diferencias significativas entre los elementos de concentración principal (Ca y P) en el esmalte de origen bovino en comparación con el de origen humano (Falla-Sotelo, et al., 2005). Por cuestiones éticas, la utilización de dientes bovinos resulta una excelente alternativa al uso de dientes humanos (ISO, 2003).

Las superficies cilíndricas de esmalte medían 5.7 mm de diámetro (0.59 cm² área superficial total) y fueron preparadas de la cara vestibular de incisivos bovinos por medio de pulido húmedo con papel abrasivo de carburo de silicio (grano de 400-4000). La capa de lodillo depositada sobre las superficies de esmalte fue removida siguiendo

un protocolo previamente reportado (Hannig, et al., 2007; Hannig, Khanafer, Hoth-Hannig, Al-Marrawi, & Acil, 2005b). Después de la desinfección de las superficies de esmalte, las muestras fueron almacenadas en H₂O destilada por 24 horas antes de su exposición en la cavidad oral.

2.3 Caracterización de las superficies

2.3.1 Análisis de la topografía mediante SEM.

El microscopio electrónico de barrido es comúnmente utilizado para el estudio de la topografía superficial de biomateriales (Sodhi, 1996; Vansteenkiste, et al., 1998). Esta técnica hace uso de un haz de electrones que interactúan con el espécimen de interés, generalmente en un ambiente de vacío, resultando en la emisión de diferentes tipos de electrones y ondas electromagnéticas. Los electrones secundarios expulsados de la superficie del espécimen son colectados y mostrados para proporcionar una micrografía en alta resolución (**Figura 3**).

Las superficies evaluadas en el presente estudio (esmalte y TiPT) fueron montadas en un porta-muestra de aluminio y fijadas con cinta de carbono. Las superficies fueron examinadas en un microscopio electrónico ambiental de barrido (ESEM XL30, FEI Company, Philips, Eindhoven, Netherlands). Las imágenes se obtuvieron en el modo de electrones secundarios a magnificaciones de entre 10-10000.

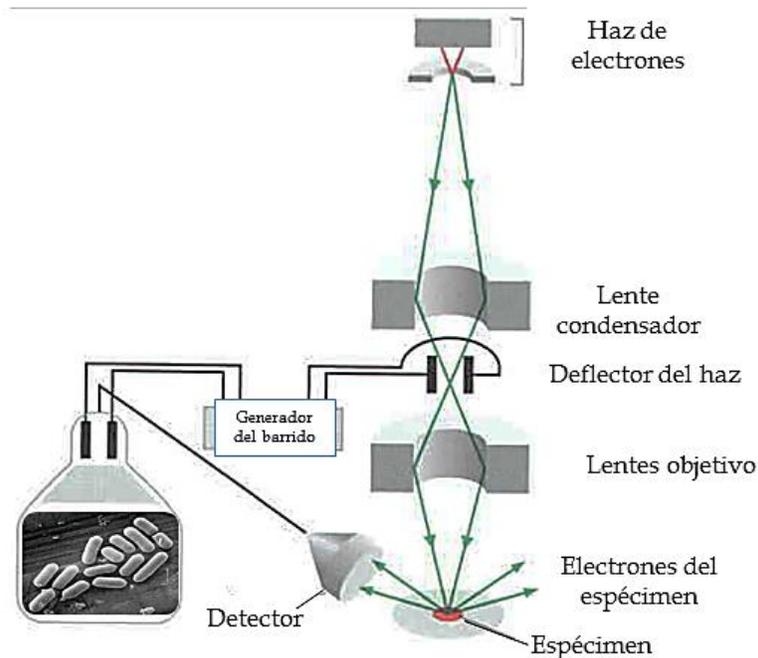


Figura 3. Microscopio electrónico de barrido (SEM). En un SEM un espécimen es escaneado por un haz de electrones que es llevado a foco por bobinas electromagnéticas que actúan como lentes. Un detector mide la cantidad de electrones dispersados o emitidos a medida que el haz de electrones barre la superficie de una muestra, mientras que se construye la imagen en una pantalla de video.

2.3.2 *Análisis de la rugosidad media (R_a).*

La rugosidad de superficie es una propiedad geométrica y muchos estándares han sido propuestos para clasificarla (Texture, 1995). La rugosidad media de una superficie (R_a) es definida como el promedio aritmético de la distancia de la superficie a una línea de referencia central (Taylor, Carrano, & Kandlikar, 2006) (**Figura 4**), y se utilizó como el principal parámetro de rugosidad para analizar las superficies utilizadas en el presente estudio. Por perfilometría se pueden obtener mediciones de patrones verticales en el rango de 10 nm hasta 1 mm.

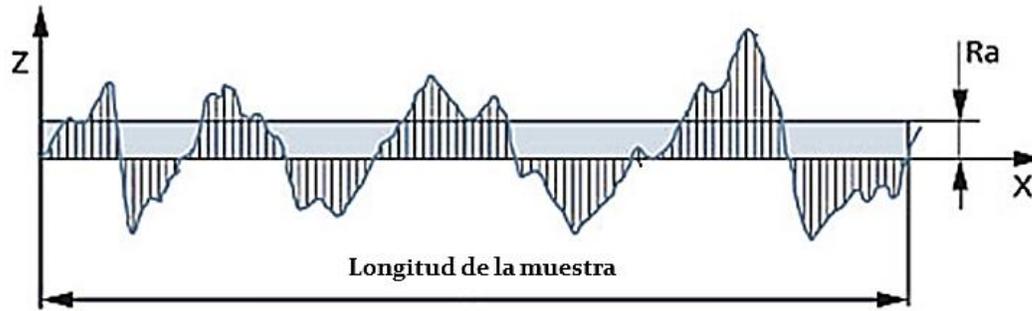


Figura 4. Representación de la definición de rugosidad promedio (R_a), la cual expresa el promedio aritmético de los valores absolutos de Z (picos y valles) en una longitud de muestra determinada (X).

La R_a de cada una de las superficies experimentales se determinó a través del perfilómetro (Dektak 150 Surface Profiler) en el modo de contacto. Se realizaron un total de 10 mediciones por 1 mm de longitud en cada muestra y esta medición se realizó por triplicado.

2.3.3. Mediciones del ángulo de contacto.

EL ángulo de contacto es definido como el ángulo formado por la intersección de la interfase líquido-sólido y la interfase líquido-vapor (geoméricamente adquirido aplicando una línea tangente desde el punto de contacto a lo largo de la interfaz líquido-vapor en el perfil de la gota). La interfaz donde sólido, líquido y vapor coexisten es denominada "línea de contacto de tres fases". La **Figura 5** muestra que un ángulo de contacto pequeño es observado cuando el líquido se extiende en la superficie, mientras que un ángulo de contacto grande es observado cuando el líquido no se extiende en la superficie (Yuan & Lee, 2013).

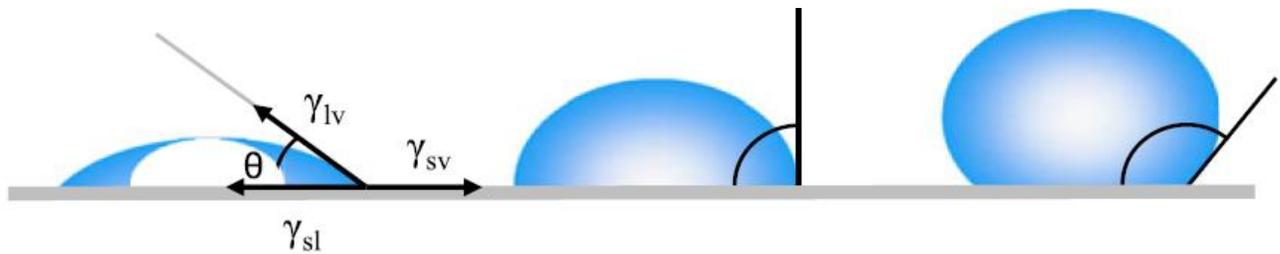


Figura 5. Ilustración de los ángulos de contacto formados por gotas sésiles de líquido en una superficie sólida homogénea. γ_{lv} , γ_{sv} , y γ_{sl} representan las tensiones interfaciales líquido-vapor, sólido-vapor y sólido-líquido, respectivamente, y θ es el ángulo de contacto.

La medición de ángulo de contacto nos proporciona información sobre la capacidad de mojabilidad de una superficie. La mojabilidad es la capacidad de los sólidos para formar interfaces con los líquidos. Un ángulo de contacto pequeño indica buena mojabilidad, mientras que un ángulo de contacto grande resulta en pobre mojabilidad, es decir, conforme el ángulo de contacto incrementa, la mojabilidad disminuye (Young, 1805).

Para esta caracterización se empleó la técnica de gota sésil-estática. Dicha técnica consiste en la colocación de una gota de agua desionizada de aproximadamente $5 \mu\text{L}$ en tres zonas diferentes de la superficie (para estimar una media del ángulo). Los ángulos de contacto estáticos fueron medidos por un mínimo de tres mediciones independientes. La toma de la imagen se realizó acoplado una cámara de video digital (KSV, model Cam 101) y posteriormente se realizó el análisis de la imagen para el ángulo de contacto, utilizando el programa Drop Snake Analysis (Krüss, Hamburg, Germany) del Software de análisis de imagen Image J.

2.3.4 Mediciones del punto isoeléctrico (pI).

El punto isoeléctrico es el valor de pH al cual una superficie no tiene una carga eléctrica neta, de esta forma sus cargas, negativa y positiva, son iguales. Este valor es encontrado ajustando el pH a un valor adecuado, la superficies responde llegando a ser más positiva conforme el pH disminuye (Figura 6). Por el contrario, la superficie tiende a ser más negativa a un pH más alto (Cleaves Ii, 2011). Los iones responsables de generar la carga de la superficie para el sistema son llamados iones determinantes del potencial. Los iones H^+ y OH^- son iones determinantes del potencial.

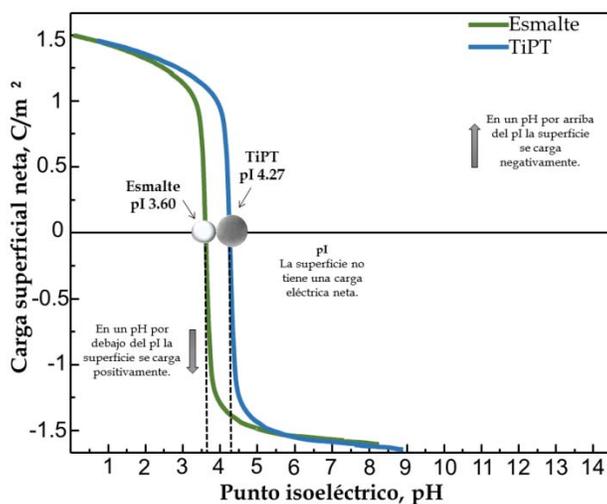


Figura 6. Ilustración de los puntos isoeléctricos de las superficies de esmalte y TiPT. La carga de una superficie cambia a diferentes pHs. En un pH por debajo del punto isoeléctrico la superficie posee una carga positiva, a un pH por arriba del punto isoeléctrico la superficie posee una carga negativa.

La obtención del valor del pI de los sustratos evaluados en el presente estudio fue obtenido por medio de mediciones del potencial zeta, que corresponden al potencial electrostático que se establece en la superficie dado un valor de pH, usando un analizador electrocinético comercial [Electrokinetic Analyzer (EKA), Anton Paar GmbH,

Graz, Austria]. Todas las mediciones fueron realizadas usando 1 mM KCl como electrolito. Los valores de pH fueron alcanzados mediante la adición de 0.1 M HCl. Los puntos isoeléctricos fueron medidos por un mínimo de tres mediciones independientes.

2.5 Evaluaciones biológicas

2.5.1 Obtención de las muestras de saliva total.

Para los ensayos de formación de la biopelícula oral sobre las superficies evaluadas en el presente estudio, fue necesaria la obtención de muestras de saliva total de 10 sujetos sistémica y periodontalmente sanos. Para dichos ensayos, se preparó una mezcla de las muestras de saliva total obtenidas con la intención de eliminar la variabilidad en el proteoma salival de los sujetos participantes del estudio. La mezcla de muestras de saliva en estudios clínicos es frecuente reportado (Baldini, et al., 2011).

El protocolo para la obtención de las muestras de saliva total fue sometido y aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología de la UNAM con el número de aprobación **CIE/02/19/06/2014**. Los criterios de inclusión y exclusión de los sujetos donadores de saliva son mostrados en la **tabla 4**. A todos los sujetos donadores se les realizó una historia clínica y evaluación periodontal completa, asimismo, se les dio a firmar un consentimiento informado (**ANEXO A**). La evaluación periodontal se realizó mediante mediciones clínicas a cada sujeto en seis sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) en todos los dientes excluyendo terceros molares (un máximo de 168 sitios por sujeto) como previamente ha sido descrito (Haffajee, Socransky, & Goodson, 1983). Las mediciones

clínicas incluyeron acumulación de placa (0/1, no detectada/ detectada), eritema gingival (0/1), sangrado al sondeo (0/1) y supuración (0/1). La profundidad de sondeo y las mediciones del nivel de inserción fueron registradas usando una sonda Carolina del Norte (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). El mismo examinador calibrado registro las mediciones dos veces, obteniendo un promedio del par de mediciones realizadas.

Tabla 2. Criterios de selección de la población donadora.

CRITERIOS DE SELECCIÓN	
Inclusión	• Sujetos sistémicamente sanos (sin diagnóstico enfermedad sistémica).
	• Sujetos periodontalmente sanos (evaluación periodontal completa).
Exclusión	• Sujetos que estén bajo tratamiento médico (antibiótico, anticonvulsivantes, etc.).
	• Embarazo.
	• Sujetos fumadores.
	• Sujetos bajo tratamiento ortodóncico.
	• Enfermedad periodontal.

Con base en una revisión de la literatura (Ambatipudi, et al., 2009; Chang, et al., 2011; Mohamed, et al., 2012), se establecieron los siguientes pasos para la obtención de las muestras de saliva no estimulada. Todas las muestra se obtuvieron entre las 9 y las 12 horas, la recolección de las mismas se llevó a cabo en un tubo Falcon de 50 mL colocado en hielo, una vez obtenido un volumen aproximada de 10 mL de muestra, estas fueron centrifugadas a 16,000 x g a 4°C durante 15 min. Las muestras fueron conservadas en ultracongelación (-80°C) adicionándolas con inhibidor de proteasas

(Complete TM Protease Inhibitor Cocktail. Roche, Mannheim, Germany) para preservación de la integridad hasta su utilización. Las muestras de saliva total fueron caracterizadas por medio de geles de poliacrilamida en 1 y 2 dimensiones (1D- y 2D-PAGE). Adicionalmente, la cantidad de proteínas presentes en las muestra fue analizada mediante el ensayo BCA.

Para los análisis de cuantificación e identificación de proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies de esmalte y TiPT, un dispositivo de acrílico removible con las superficies de esmalte o TiPT fue usado por uno sujeto sistémica y periodontalmente, durante 2 horas.

2.5.2 Cuantificación de las proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies evaluadas mediante ensayos BCA.

Después de la incubación intraoral de las superficies experimentales, éstas fueron sometidas a un protocolo mecánico-químico de elución para la obtención de las muestras de PS formada sobre los diferentes sustratos. Los detergentes son compuestos anfífilos solubles (Helenius & Simons, 1975), ellos poseen grupos hidrofílico e hidrofóbico, y pueden ser clasificados en base a sus cargas: aniónicos como el SDS, no-iónicos como Triton X-100 (detergente derivado del polioxietileno), etc. Los detergentes no-iónicos, en particular, son útiles para solubilizar proteínas son afectar su estructura y función (Helenius, et al., 1979; Helenius & Simons, 1975). En el presente estudio Triton X-100 y el solvente RIPA [partes constituyentes: 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 % nonyl phenoxypolyethoxylethanol (NP-40), 1 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, Thermo Scientific, Pierce Protein Research Products, Rockford, USA], fueron los

detergentes de elección utilizados para la elución de la PS formada sobre las superficies evaluadas. RIPA (acrónimo de radioimmunoprecipitation assay bufer) es un solvente que desnaturaliza proteínas y las disuelve de las superficies donde se adsorbieron.

Solventes como RIPA son muy efectivos en remover proteínas adsorbidas a superficies como el oro, titanio, polimetil metacrilato [poly (methyl methacrylate) PMMA] o cerámica, independiente de las propiedades de mojabilidad de las muestras, por lo que puede ser considerado un solvente de limpieza “general (all-round)” (Kratz, et al., 2015), la efectividad de RIPA puede atribuirse a la mezcla de sustancias dentro de dicho solvente. Para la completa elución de la película de proteínas adsorbida sobre las superficies evaluadas, la ultrasonicación fue necesaria. La importancia de la ultrasonicación para la remoción de la película de proteínas adsorbidas ha sido mostrado en publicaciones previas (Hannig, Khanafer, Hoth-Hannig, Al-Marrawi, & Acil, 2005b; Muller, et al., 2010).

Para la cuantificación de las proteínas adsorbidas en los sustratos evaluados se utilizó el kit Micro BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific, Pierce Protein Research Products, Rockford, USA). El ensayo BCA es compatible con los solventes utilizados en este trabajo, por lo tanto, reacciones secundarias no deseadas fueron excluidas. El ensayo BCA ha mostrado ser una herramienta útil para determinar la cantidad de proteína adsorbida en superficies sólidas como el titanio (Kratz, et al., 2013). La cuantificación de proteínas adsorbidas en materiales dentales es de importancia crucial para investigaciones relacionadas con el desarrollo de nuevos materiales dentales. El

objetivo a largo plazo sería la creación de materiales dentales que reduzcan la adhesión bacteriana y que al mismo tiempo mantengan las propiedades protectoras de la PS.

El principio del ensayo BCA se basa en la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína bajo condiciones alcalinas, seguido de la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} . La cantidad de reducción de cobre es proporcional al número de enlaces peptídicos y de esta forma al número de moléculas de proteína presentes en la muestra. Se ha demostrado que cisteína, cistina, triptófano, tirosina y los enlaces peptídicos son capaces de reducir Cu^{2+} a Cu^{1+} (Wiechelman, Braun, & Fitzpatrick, 1988). El BCA ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$) forma un complejo púrpura-azul con Cu^{1+} en ambiente alcalino, esto proporciona las bases para monitorear la reducción de Cu^{2+} por las proteínas. El complejo resultante tiene una absorción óptica a 562 nm. Una guía de cómo realizar el ensayo BCA adecuadamente puede ser encontrado en la ficha de datos del kit Micro BCA™ Assay. Para asignar ciertos valores de absorción a ciertas concentraciones proteicas, se realiza una curva de calibración con concentraciones de proteínas conocidas fue medida con una solución stock de BSA de 2 gL^{-1} la cual fue diluida con agua ultra pura dentro de un rango de concentración de 50 a $0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

La cantidad total de proteína adsorbida en cada superficie experimental, fue cuantificada de la siguiente manera. Se colocaron individualmente en tubos Eppendorf $50 \text{ } \mu\text{L}$ de la muestra de PS eluida de las superficies experimentales y se agregaron $150 \text{ } \mu\text{L}$ del reactivo BCA y $100 \text{ } \mu\text{L}$ de dH_2O . El contenido de cada tubo fue mezclado mediante agitación con vórtex e incubados a 55°C por 1 hora. Después de permitir el enfriamiento de las muestras a temperatura ambiente, $200 \text{ } \mu\text{L}$ de cada muestra fueron transferidos a

una placa de 96 pozos. Las muestras fueron analizadas por un lector de placas Tecan (Tecan Trading AG, Männedorf, Swiss) a 562 nm. Previo a la medición de cada muestra, se realizó una curva de calibración para obtener la concentración de proteína presente en cada muestra.

2.5.3 Identificación de las proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies evaluadas mediante LC-HR-MS/MS.

Hace más de una década la espectrometría de masas mediante MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption-ionisation-reflection time-of-flight) fue introducida como una nueva aproximación para el estudio de la composición de la PS (Yao, Grogan, Zehnder, Lendenmann, Nam, Wu, Costello, & Oppenheim, 2001). La sensibilidad de detección y las tecnologías de cuantificación que continúan avanzando en el campo de la espectrometría de masas tienen el potencial de proporcionar una medición más detallada de proteínas diferencialmente expresadas en muestras de PS, especialmente si la complejidad de las muestras puede ser manejada exitosamente.

En el presente estudio, para la identificación de las proteínas presentes en las muestras de PS formadas sobre las superficies evaluadas, una aproximación por nano espectrometría de masas (LC-HR-MS/MS) fue utilizada. La técnica analítica de espectrometría de masas ha llegado a ser el método de elección para la identificación de péptidos y proteínas presentes en biofluidos. Un espectrómetro de masas determina la masa de una molécula (péptido) midiendo su relación masa-carga (m/z). Cada espectrómetro de masas consiste de tres componentes; 1) una fuente, la cual genera

iones de la muestra ya sea por ionización mediante desorción láser asistida por matriz (MALDI, acrónimo de matrix-assisted laser desorption ionization) o por ionización por electrospray (ESI, acrónimo de electrospray ionization), 2) un analizador de masas, el cual resuelve los iones peptídicos de acuerdo a su relación m/z , y 3) un detector, el cual determina la abundancia de iones para cada ion correspondiente resuelto por el analizador de masas de acuerdo a su valor m/z y genera un espectro de masas (**Figura 7**). Dependiendo del tipo de espectrómetro de masas usado, los datos de la masa del péptido (MS) y/o la secuencia del péptido (MS/MS) pueden ser obtenidos.

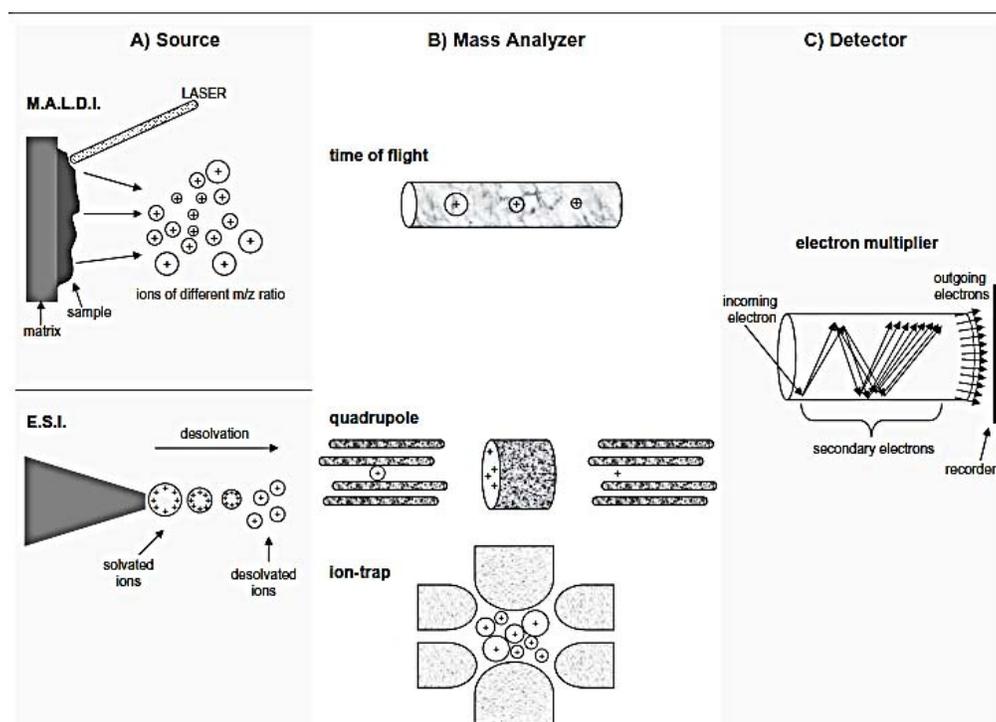


Figura 7. Esquema de un espectrómetro de masas. A) la fuente de iones para la ionización por electrospray (E.S.I) se encuentra a presión atmosférica, mientras que la fuente para MALDI está bajo vacío. B) El analizador de masas puede ser de tiempo de vuelo, una trampa de iones, un cuadrupolo, o bien un híbrido de los analizadores antes mencionados. C) el detector es normalmente un multiplicador de electrones. El analizador de masas y el detector están siempre dentro de una región de alto vacío.

Previo al análisis por LC-HR-MS/MS, las proteínas presentes en las muestras de PS eluidas de las superficies evaluadas, fueron separadas electroforéticamente. Esto se realizó en geles NuPAGE® de gradiente 4 %-12 %, fijadas en la presencia de etanol al 40 % y ácido acético al 10 % y visualizadas por tinción con Coomassie coloidal [etanol 20 % (v/v), ácido fosfórico al 10 % (v/v), sulfato de amonio al 10 % (w/v), Coomassie G-250 al 0.12 % (w/v)]. Las áreas teñidas fueron cortadas en tres piezas y lavadas dos veces alternativamente en solución A (50 mM NH₄HCO₃) y solución B [50 mM NH₄HCO₃ y acetonitrilo al 50 % (v/v)]. La reducción de los puentes disulfuro, fue obtenida por incubación a 56°C por 30 min en 50 mM NH₄HCO₃, 10 mM ditioneitol, seguido por carbamidometilación a 21°C en oscuridad por 30 min en la presencia de una solución con 50 mM NH₄HCO₃ y 5 mM iodoacetamida. Posteriormente, las piezas de geles fueron lavadas dos veces alternativamente con solución A y solución B y entonces secadas por centrifugación al vacío. Para la digestión en gel, las piezas de gel fueron incubadas con 15 µL de tripsina porcina (10 ng/µL, Promega) a 37°C toda la noche. Los péptidos resultantes fueron extraídos dos veces mediante agitación de las piezas de gel en buffer de extracción (ácido fórmico al 2.5 %, acetonitrilo al 50 %). Los péptidos extraídos fueron concentrados en una centrífuga al vacío y resuspendidos en ácido fórmico al 0.1 %.

Una alícuota de cada extracto peptídico trípico fue analizado por LC-HR-MS/MS nanoflujo online (Ultimate 3000 RSLC sistema nano UHPLC acoplado a un LTQ Orbitrap Velos Pro, todos de ThermoFisher Scientific, TF, Dreieich, Germany). Los péptidos fueron atrapados en una columna C18 trap (100 µm x 2 cm, Acclaim PepMap100C18, 5 µm, ThermoFisher Scientific) y separados en una columna de fase

reversa (nano viper Acclaim PepMap capillary column, C18; 2 μm ; 75 μm x 25 cm, ThermoFisher Scientific) a una velocidad de flujo de 300 nL/min con buffer A (agua y ácido fórmico al 0.1 %) y B (acetonitrilo al 90 % y ácido fórmico al 0.1 %). El efluente de la cromatografía fue directamente rociado en el espectrómetro de masas a través de un electrospray emisor cubierto de sílice (PicoTipEmitter, 30 μm , New Objective, Woburn, MA, USA) ionizado a 2.2 kV. Los espectros de masas fueron adquiridos en un modo dependiente de datos (cambio automático entre barrido completo MS y MS/MS). Barridos completos de los espectros MS (m/z 300-1700) fueron adquiridos en el analizador Orbitrap. Los 10 iones peptídicos más intensos con estados de carga $> + 2$ fueron fragmentados en una trampa de iones lineal de alta presión por disociación inducida por colisión (CID, acrónimo de collision-induced dissociation), medio más popular de fragmentación de iones peptídicos, de baja energía con energía de colisión normalizada de 35 %.

Los péptidos fragmentados fueron identificados usando el algoritmo MASCOT y el software TF Proteome Discoverer 1.4. Los péptidos fueron emparejados a espectros de masas en tándem por medio de Mascot versión 2.4.0 (Matrix Science, London, UK) mediante la búsqueda en una base de datos SwissProt (versión 2013_04) contra proteínas de humano. Los espectros de masa MS² fueron emparejados con una tolerancia de masas de 7 ppm para masas precursoras y 0.5 Da para iones de fragmentos usando digestión trípica y se permitió un máximo dos sitios de escisión pérdida. La carbamidometilación de cisteína fue establecida como una modificación fija y la desamidación de asparagina y glutamina, acetilación de lisina y oxidación de metionina

fueron establecidas como modificaciones variables. Los archivos de salida MASCOT (.dat) fueron cargados en el software Scaffold (Versión 4.0, Proteome software Inc., Portland, USA). Para asegurar una identificación proteica significativa, el filtro de probabilidad de proteína fue ajustado a 95 % y el filtro de probabilidad de péptido fue ajustado a 90 %. La identificación de dos péptidos únicos por proteína fue ajustada como el mínimo para la identificación de proteica.

2.5.4 Análisis de la ultraestructura de la PS formada sobre las superficies evaluadas por TEM.

El análisis en alta resolución por TEM posibilita la visualización y detección de películas de proteínas con grosores de solo algunos nanómetros. Especímenes seleccionados para análisis por TEM fueron utilizados para visualizar la película de proteínas adsorbida después de 3 min y 2 horas.

Después de la exposición intraoral, las superficies de esmalte y de TiPT cubiertas por la PS fueron cuidadosamente lavadas con agua estéril y fijadas en solución de glutaraldehído al 2.5 % por 1 hora a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 5 veces con solución salina amortiguada con fosfato (pH 7.4) por diez minutos cada lavado y almacenadas en la solución salina amortiguada con fosfato a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron fijadas en tetróxido de osmio al 2 % (O_2SO_4) en buffer de fosfatos por 2 horas. Después de la incubación con la solución ácida de osmio, los especímenes fueron lavados 5 veces en buffer de fosfatos y deshidratados en concentraciones crecientes de etanol. Las muestras fueron embebidas en Araldite M

(Serva, Darmstadt, Germany). Antes del seccionado ultradelgado, el material sustrato fue removido de acuerdo a como fue descrito previamente por Hannig, M. (Hannig, 1997). Después de que las muestras fueron embebidas en Araldite M, secciones ultrafinas fueron cortadas con un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert, Bensheim, Germany) usando una hoja de diamante (Microstar 45°, Plano GmbH, Wetzlar, Germany). Las secciones ultrafinas fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las características de la estructura de la PS formada sobre diferentes sustratos fueron investigadas en un microscopio TEM TECNAI 12 Biotwin (FEI, Eindhoven, The Netherlands) a magnificaciones de 30,000 a 50,000.

2.5.5 Determinación del efecto de la PS formada en las superficies evaluadas en la formación de biopelículas orales.

Cuatro cepas de bacterias anaeróbicas bucales de referencia (**Tabla 3**) fueron utilizadas para los ensayos de adhesión bacteriana *in vitro* sobre las superficies experimentales.

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 se cultivaron 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 menadiona (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.

Tabla 3. Especies bacterianas empleadas en las evaluaciones microbiológicas.

ESPECIE	ATCC*
<i>Actinomyces naeslundii</i>	12104
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp <i>nucleatum</i>	25586
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277

* American Type Culture Collection, Rockville, MD.

Las superficies experimentales fueron colocadas individualmente en placas de 24 pozos con 400 µL del pool de saliva e incubadas durante 2 horas a 37°C, bajo agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, las superficies fueron lavadas dos veces con 1 mL de H₂O_{dd} para retirar el excedente de proteínas no adsorbidas. Las superficies fueron transferidas a pozos nuevos y se les adicionó una suspensión con un pool de las cuatro especies anaeróbicas (1 x 10⁶ células de cada especie bacteriana) relacionadas con infecciones en dispositivos orales. Las superficies con las especies bacterianas fueron incubadas durante 12 horas a 35°C bajo condiciones anaeróbicas. Después de la incubación anaeróbica, cada muestra fue lavada dos veces con 1 mL de caldo enriquecido.

Cabe mencionar, que se utilizaron dos juegos de muestras para la realización de los dos ensayos para el análisis microbiológico: microscopía de fluorescencia y viabilidad bacteriana. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

La viabilidad de las células bacterianas adheridas a cada una de las superficies fue analizada utilizando el kit XTT (Sigma). En breve, las superficies lavadas fueron transferidas al pozo inmediato donde fueron adicionadas con 1 mL de caldo enriquecido para ser sonicadas durante 5 períodos de 10 segundos cada una, con el objetivo de desprender las bacterias adheridas sobre cada una de las superficies, las bacterias desprendidas fueron incubadas con 50 μ L de XTT al 5 %. Este método permite la medición de la viabilidad celular a través de la reducción de la sal de tetrazolio a formazan por parte de las enzimas utilizadas para la fosforilación oxidativa (respiración celular) presentes en la membranas de células bacterianas viables, la reducción del compuesto se observó como un cambio colorimétrico en el medio de cultivo. La absorbancia fue analizada a una longitud de onda de 450 nm utilizando el equipo FilterMax F5.

Otro juego de muestras fue procesado para evaluar la adhesión bacteriana sobre cada uno de los sustratos mediante microscopía de fluorescencia. En breve, transcurrida la incubación con la suspensión de bacterias cada superficie fue lavada en tres ocasiones con H_2O_{dd} , las muestras fueron fijadas a un portaobjetos donde se les añadieron 5 μ L de tinción LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen), las muestras fueron incubadas por 20-30 minutos protegidas de la luz dentro de una cámara húmeda, transcurrido el tiempo de incubación se realizaron lavados con abundante H_2O_{dd} , inmediatamente las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia (Axioskop 2, Carl Zeiss Microscopy).

Adicionalmente, un juego de muestras fue utilizado para la evaluación por TEM de la formación *in situ* de la biopelícula de 24 horas, para lo cual un dispositivo de

acrílico removible, con las superficies de esmalte o TiPT colocadas en el área bucal, fue usado por un sujeto sistémica y periodontalmente sano durante 24 horas. Para la preparación de las muestras para análisis por TEM se procedió como fue descrito en el apartado 2.5.4 (Análisis de la ultraestructura de la PS formada sobre las superficies evaluadas por TEM) de este documento.

2.6 Análisis estadístico

Los resultados de las mediciones del ángulo de contacto, rugosidad media, adsorción de proteínas, adhesión y viabilidad bacteriana entre las diferentes superficies experimentales se presentan como la media (ME) \pm el error estándar de la media (EEM).

Los análisis para determinar las diferencias en la cantidad de proteínas adsorbidas, bacterias adheridas y diferencias entre las funciones biológicas de las proteínas identificadas por LC-HR-MS/MS, entre cada una de las superficies experimentales se analizaron mediante la prueba de ANOVA, mientras que las diferencias significativas se determinaron utilizando la modificación de Bonferroni.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización de las superficies evaluadas

3.1.1 Análisis de la topografía con SEM, mediciones de la rugosidad media (R_a), ángulo de contacto y del punto isoeléctrico.

A continuación se describen los resultados obtenidos de la caracterización de las superficies evaluadas en este estudio. En la siguiente figura (**Figura 8**) se muestran las micrografías de las superficies evaluadas obtenidas mediante SEM con electrones secundarios donde se observan diferencias en la topografía de las superficies como consecuencia del distinto origen natural de ambos sustratos.

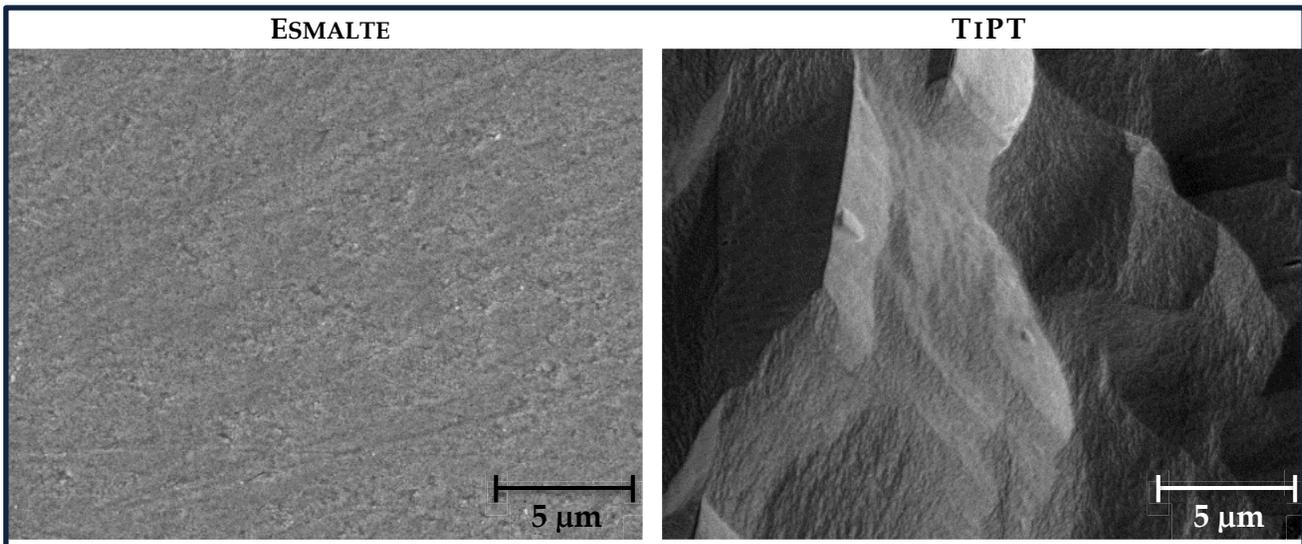


Figura 8. Micrografías por SEM de electrones secundarios de las superficies de esmalte y TiPT.

En la **tabla 4**, se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de la R_a por medio de perfilometría. Se puede observar que las superficies TiPT tuvieron una mayor R_a ($0.45 \pm 0.07 \mu\text{m}$) en comparación con las superficies de esmalte, las cuales tuvieron un valor de R_a de $0.06 \pm 0.02 \mu\text{m}$.

Por otro lado, los resultados de las mediciones del ángulo de contacto, empleando agua desionizada, también mostraron que las superficies TiPT tuvieron un mayor valor de ángulo de contacto en comparación con las superficies de esmalte, $92.4 \pm 0.1^\circ$ y $43.8 \pm 0.4^\circ$, respectivamente.

Finalmente, en dicha tabla también se puede observar que las superficies evaluadas mostraron un valor de punto isoeléctrico en el rango de entre 3.6 y 4.27.

Tabla 4. Caracterización de las superficies de esmalte y TiPT.

	ESMALTE	TiPT
Rugosidad promedio (Ra)	$0.06 \pm 0.02 \mu\text{m}$	$0.45 \pm 0.07 \mu\text{m}$
Ángulo de contacto ($^\circ$)	$43.8 \pm 0.4^\circ$	$92.4 \pm 0.1^\circ$
Punto isoeléctrico (pI)	3.60 ± 0.20	4.27 ± 0.01

3.2 Ensayos biológicos

3.2.1 Caracterización de las muestras de saliva.

Diez sujetos periodontalmente sanos (salud periodontal definida como la ausencia de sitios con profundidades de sondeo o pérdida de inserción clínica de ≥ 4 mm) (1999; Highfield, 2009) fueron seleccionados para la obtención de saliva total. Las muestras de saliva obtenidas fueron utilizadas como una mezcla para los ensayos de adhesión bacteriana sobre las superficies evaluadas. Las características clínicas de los sujetos donadores de las muestras de saliva total se muestran en la **tabla 5**.

Tabla 5. Características clínicas de los sujetos donadores de saliva total.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	(n = 10)
Edad (años)	28 ± 1
Número de dientes faltantes	1.7 ± 0.6
% hombres	50
Promedio de profundidad de sondeo (mm)	2.0 ± 0.1
Promedio de nivel de inserción (mm)	1.5 ± 0.2
<i>% de sitios con:</i>	
Placa	18.2 ± 1.1
Enrojecimiento gingival	5.6 ± 0.3
Sangrado al sondeo	3.3 ± 0.4
Supuración	0 ± 0

La cantidad de proteínas presentes en cada muestra de saliva total obtenida fue cuantificada mediante ensayos BCA, adicionalmente se realizó una evaluación electroforética para confirmación la integridad de las mismas. La cantidad promedio de proteínas presentes en las muestras de saliva total fue de $495 \pm 10 \mu\text{g/mL}$, mientras que en la separación electroforética de las muestras fue evidente que la heterogeneidad en la presencia de proteínas entre las distintas muestras evaluadas no estuvo relacionada con el género de los sujetos donadores (**Figura 9**).

MUESTRA	GÉNERO	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)
1	M	470
2	F	520
3	M	490
4	M	470
5	F	510
6	F	510
7	F	470
8	F	510
9	M	480
10	M	520

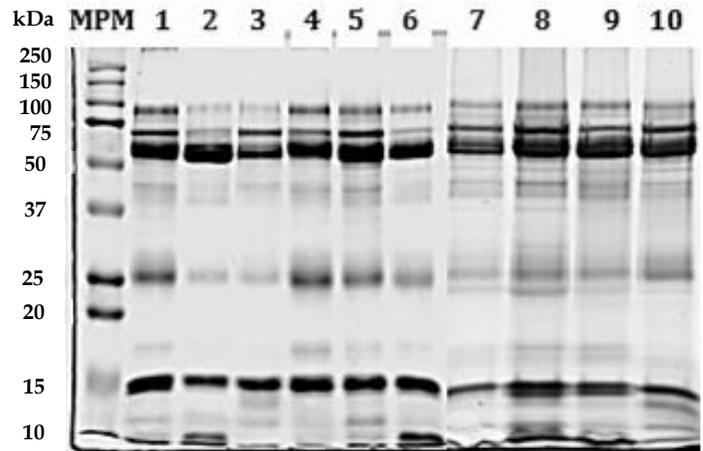


Figura 9. Análisis de las muestras de saliva total de cada uno de los sujetos donadores. La tabla de la izquierda indica la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras, así como el género del sujeto donador de las mismas, (M) Sujetos donadores del género masculino, (F) Sujetos donadores del género femenino. La imagen de la derecha muestra el análisis SDS-PAGE de cada muestra de saliva total obtenida de los sujetos donadores, cada carril en el gel representa el perfil de proteínas presente en cada muestra obtenida (20 μg de proteína fueron cargados en cada carril), la separación electroforética de las muestras se realizó en un rango de 10 a 250 kDa. El gel fue teñido con azul de Coomassie.

Adicionalmente, se realizaron geles bidimensionales (2D) (medidas: 7 cm x 1 mm de grosor) de las muestras de saliva total evaluadas en mezcla (**Figura 10**). Las proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 12 % bajo condiciones reductoras en una primera dimensión por enfoque isoeléctrico (pH 3-10 y de 4-7) y en la segunda dimensión con base en su peso molecular (10 a 250 kDa). Las proteínas fueron visualizadas por tinción de azul de Coomassie. En cada uno de los geles se cargaron 100 μg de la mezcla de muestras de saliva total.

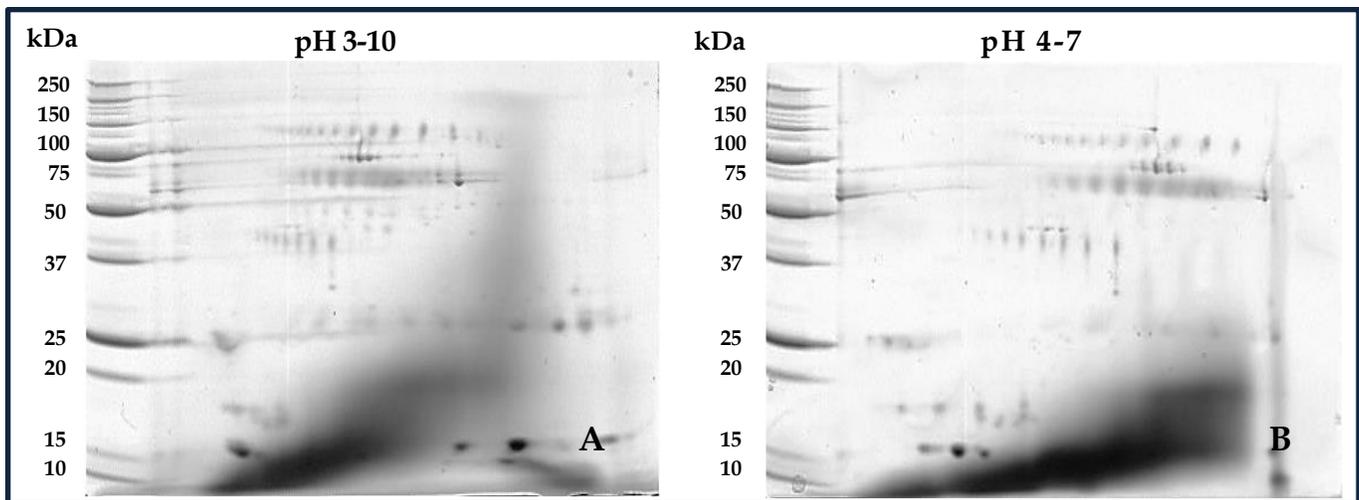


Figura 10. Patrón electroforético 2D típico de la mezcla de muestras de saliva total de los sujetos donadores obtenido en un rango de pH de 3-10 (A) y de 4-7 (B).

Una vez que se comprobó la efectividad de la toma de muestras de saliva con el protocolo establecido, se procedió a realizar los ensayos de formación de la PS para los ensayos de adhesión bacteriana sobre las superficies evaluadas.

3.2.2 Cuantificación e identificación de las proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies evaluadas.

La **figura 11** muestra los resultados de la cuantificación por ensayos de BCA de la cantidad de proteína adsorbida en la PS de 2 horas en las superficies de esmalte y TiPT. Cabe mencionar que los ensayos de formación de la PS se realizaron en tres ocasiones para cada grupo de superficies (esmalte y TiPT), además de realizarse en diferentes días. Adicionalmente, se muestran los resultados de la cuantificación de las proteínas presentes en muestras de saliva total, las cuales fueron obtenidas durante los diferentes días de formación de la PS sobre las superficies evaluadas.

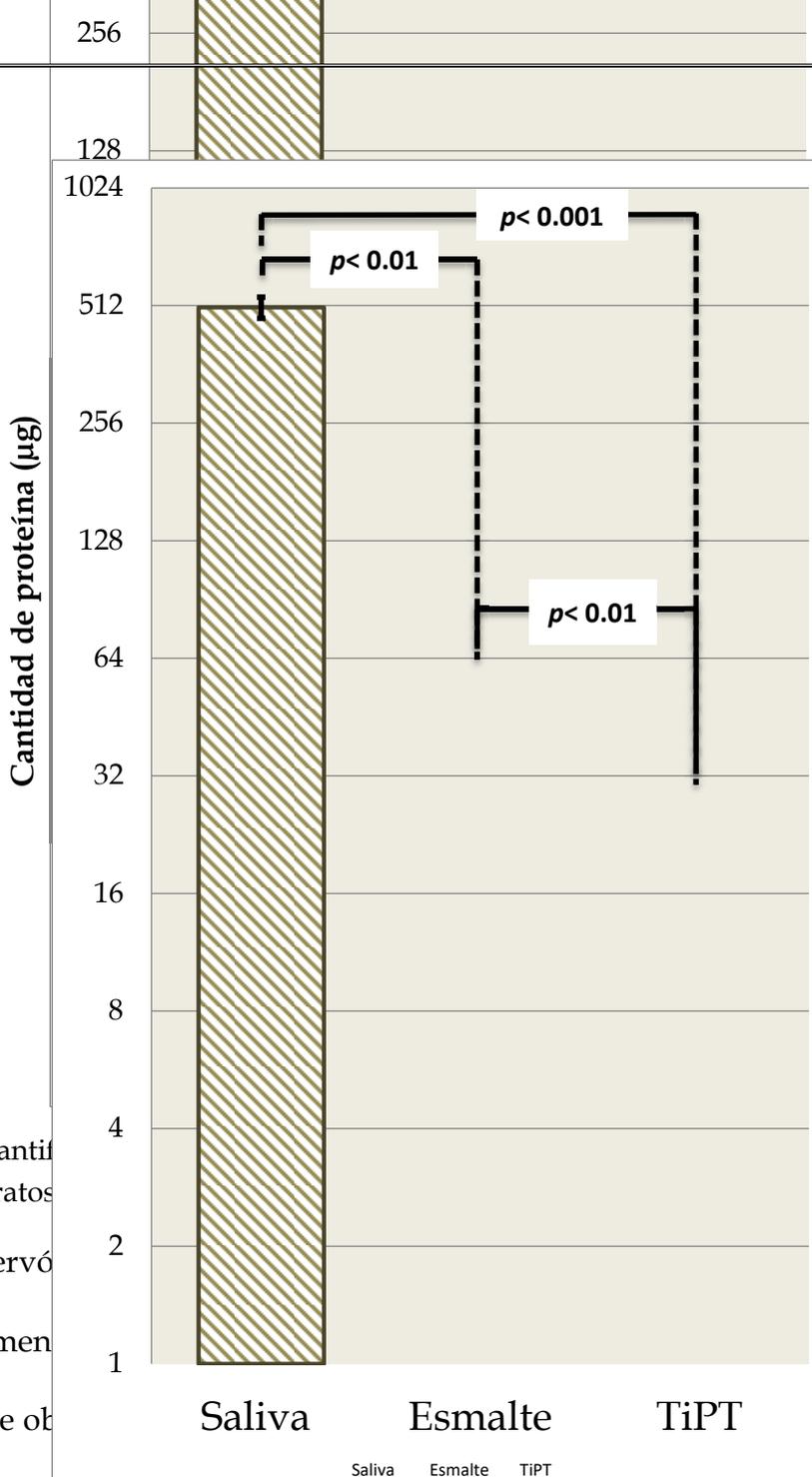


Figura 11. Cantidad de proteína adsorbida sobre los sustratos experimentales y de control.

Se observó una cantidad significativamente mayor de proteínas adsorbidas a los sustratos de esmalte ($p < 0.01$) en comparación con la cantidad de proteínas adsorbidas a las superficies TiPT ($p < 0.001$).

En general, se obtuvo una cantidad total de proteínas de $506.4 \pm 32 \mu\text{g/ml}$. En cuanto a la evaluación cuantitativa de la PS formada sobre los sustratos experimental (TiPT) y control (esmalte), se encontró una cantidad significativamente mayor de proteínas adsorbidas a los sustratos de esmalte ($p < 0.01$) en comparación con la cantidad de proteínas adsorbidas a las superficies TiPT ($p < 0.001$).

Se observó una cantidad significativamente mayor de proteínas adsorbidas a los sustratos de esmalte ($p < 0.01$) en comparación con la cantidad de proteínas adsorbidas a las superficies TiPT ($p < 0.001$).

En general, se obtuvo una cantidad total de proteínas de $506.4 \pm 32 \mu\text{g/ml}$. En cuanto a la evaluación cuantitativa de la PS formada sobre los sustratos experimental (TiPT) y control (esmalte), se encontró una cantidad significativamente mayor de proteínas adsorbidas a los sustratos de esmalte ($p < 0.01$) en comparación con la cantidad de proteínas adsorbidas a las superficies TiPT ($p < 0.001$).

En general, se obtuvo una cantidad total de proteínas de $506.4 \pm 32 \mu\text{g/ml}$. En cuanto a la evaluación cuantitativa de la PS formada sobre los sustratos experimental (TiPT) y control (esmalte), se encontró una cantidad significativamente mayor de proteínas adsorbidas a los sustratos de esmalte ($p < 0.01$) en comparación con la cantidad de proteínas adsorbidas a las superficies TiPT ($p < 0.001$).

La diferencia entre la mayor cantidad de proteína adsorbida en las superficies de esmalte ($5.6 \pm 0.2 \mu\text{g}$) en comparación con las superficies TiPT ($2.5 \pm 0.3 \mu\text{g}$) fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Este hallazgo equivale a una diferencia de 2.24 veces más proteína adsorbida en las superficies de esmalte en comparación con las superficies TiPT.

Adicionalmente, siguiendo el mismo protocolo de obtención de la PS de las superficies evaluadas, un grupo de muestras de PS fueron sometidas a análisis por LC-HR-MS/MS. En dichos análisis un total de 329 proteínas diferentes fueron identificadas (**Figura 12**). En la PS formada sobre las superficies de esmalte y TiPT se identificaron un total de 295 y 259 proteínas, respectivamente. La distribución del número de proteínas identificadas de acuerdo a la superficie evaluada es mostrada en el diagrama de Venn. Para la PS formada en las superficies de esmalte, sólo 70 proteínas estuvieron presentes exclusivamente en dichos sustratos, mientras que en la PS formada sobre las superficies TiPT 34 proteínas estuvieron exclusivamente presentes en dichos sustratos. 225 proteínas estuvieron presentes tanto en la PS formada sobre las superficies de esmalte como en las superficies TiPT.

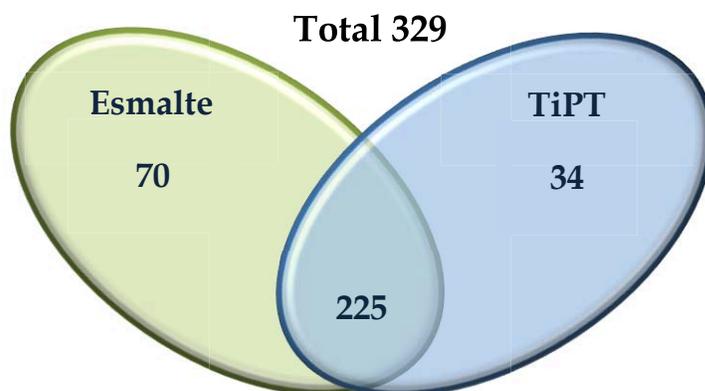


Figura 12. Diagrama de Venn donde se muestra el número de proteínas identificadas en la PS formada sobre cada superficie evaluada, haciendo un total de 329 diferentes proteínas identificadas.

La **Tabla 6** presenta el nombre, el número de acceso, el peso molecular y el número de conteos de péptidos únicos, para cada una de las 329 proteínas identificadas en las muestras de PS formada sobre los sustratos de esmalte y TiPT. Las proteínas fueron organizadas con base en su peso molecular de forma descendente.

Los números correspondientes a cada proteína identificada en cada grupo representa el número de conteos de péptidos únicos. Los péptidos fragmentados fueron identificados usando el algoritmo MASCOT y el software TF Proteome Discoverer 1.4. Los péptidos fueron contrastados con espectros de masas en tándem por medio de Mascot versión 2.4.0 (Matrix Science, London, UK) mediante la búsqueda en una base de datos SwissProt2015_1 contra proteínas de humano (*Homo sapiens*). Los archivos de salida MASCOT (.dat) fueron cargados en el software Scaffold (Versión 4.7.2, Proteome software Inc., Portland, USA). Para asegurar la identificación proteica significativa, el filtro de probabilidad de proteína fue ajustado a 95 % y el filtro de probabilidad de

péptido fue ajustado a 90 %. La identificación de dos péptidos únicos por proteína fue ajustada como el mínimo para la identificación de proteica.

Tabla 6. Identificación de proteínas por LC-HR-MS/MS para las muestras de PS formada sobre los sustratos de esmalte y TiPT.

#	Proteínas identificadas	Número de acceso	Peso molecular	Esmalte	TiPT
1	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNK_HUMAN	629 kDa	17	9
2	Mucin-5B	MUC5B_HUMAN	596 kDa	23	5
3	IgGfc-binding protein	FCGBP_HUMAN	572 kDa	7	3
4	Apolipoprotein B-100	APOB_HUMAN	516 kDa	4	3
5	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	PGBM_HUMAN	469 kDa		3
6	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	DMBT1_HUMAN	261 kDa	8	7
7	Envoplakin	EVPL_HUMAN	232 kDa	8	8
8	Myosin-9	MYH9_HUMAN	227 kDa	8	8
9	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	NACAM_HUMAN	205 kDa	3	
10	Periplakin	PEPL_HUMAN	205 kDa	8	9
11	Collagen alpha-1(XIV) chain	COEA1_HUMAN	194 kDa		2
12	Complement C4-B	CO4B_HUMAN	193 kDa	2	5
13	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGA1_HUMAN	189 kDa	3	3
14	Complement C3	CO3_HUMAN	187 kDa	2	6
15	Slit homolog 3 protein	SLIT3_HUMAN	168 kDa	2	4

16	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	A2ML1_HUMAN	161 kDa	8	7
17	Complement factor H	CFAH_HUMAN	139 kDa	2	2
18	Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN	129 kDa	11	14
19	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	ISK5_HUMAN	121 kDa	10	
20	Desmoglein-1	DSG1_HUMAN	114 kDa	5	7
21	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	AMD_HUMAN	108 kDa	3	3
22	Desmoglein-3	DSG3_HUMAN	108 kDa	7	5
23	Neutral alpha-glucosidase AB	GANAB_HUMAN	107 kDa	2	2
24	Alpha-actinin-4	ACTN4_HUMAN	105 kDa	9	8
25	Alpha-actinin-1	ACTN1_HUMAN	103 kDa		4
26	Calcium-activated chloride channel regulator 4	CLCA4_HUMAN	101 kDa	6	2
27	Desmocollin-2	DSC2_HUMAN	100 kDa	2	
28	Cadherin-1	CADH1_HUMAN	97 kDa	2	2
29	Programmed cell death 6-interacting protein	PDC6I_HUMAN	96 kDa	2	
30	Elongation factor 2	EF2_HUMAN	95 kDa	2	2
31	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	95 kDa	4	5
32	Endoplasmic reticulum chaperone protein	ENPL_HUMAN	92 kDa	3	3
33	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	TGM1_HUMAN	90 kDa	3	
34	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_HUMAN	89 kDa	3	3
35	Gelsolin	GELS_HUMAN	86 kDa	2	9
36	Heat shock protein HSP 90-alpha	HS90A_HUMAN	85 kDa	9	3

37	Glutamate carboxypeptidase 2	FOLH1_HUMAN	84 kDa		3
38	Niban-like protein 1	NIBL1_HUMAN	84 kDa	2	
39	Myeloperoxidase	PERM_HUMAN	84 kDa	10	14
40	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1_HUMAN	84 kDa	3	4
41	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	SYTC_HUMAN	83 kDa	2	
42	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR_HUMAN	83 kDa	9	10
43	Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B_HUMAN	83 kDa	6	2
44	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1_HUMAN	83 kDa	8	7
45	von Willebrand factor A domain-containing protein 2	VWA2_HUMAN	82 kDa		4
46	Calpain-1 catalytic subunit	CAN1_HUMAN	82 kDa	5	3
47	Junction plakoglobin	PLAK_HUMAN	82 kDa	9	13
48	Lactoperoxidase	PERL_HUMAN	80 kDa	7	11
49	Growth arrest-specific protein 6	GAS6_HUMAN	80 kDa	2	3
50	Lactotransferrin	TRFL_HUMAN	78 kDa	28	25
51	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	77 kDa	6	4
52	Galactocerebrosidase	GALC_HUMAN	77 kDa		3
53	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	TGM3_HUMAN	77 kDa	23	27
54	Fermitin family homolog 3	URP2_HUMAN	76 kDa		2
55	Protein-arginine deiminase type-2	PADI2_HUMAN	76 kDa	2	2
56	SPARC-like protein 1	SPRL1_HUMAN	75 kDa	10	8
57	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	BGH3_HUMAN	75 kDa		2
58	Protein-arginine deiminase type-1	PADI1_HUMAN	75 kDa	3	
59	Beta-galactosidase-1-like protein	GLB1L_HUMAN	74 kDa	2	3

60	Prelamin-A/C	LMNA_HUMAN	74 kDa	7	4
61	Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4_HUMAN	73 kDa	11	
62	Guanylate-binding protein 6	GBP6_HUMAN	72 kDa	2	2
63	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_HUMAN	72 kDa	13	3
64	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	71 kDa	7	2
65	Plastin-3	PLST_HUMAN	71 kDa	2	2
66	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	70 kDa	5	4
67	Ezrin	EZRI_HUMAN	69 kDa	4	2
68	Serum albumin	ALBU_HUMAN	69 kDa	26	19
69	Mesothelin	MSLN_HUMAN	69 kDa	3	7
70	Involucrin	INVO_HUMAN	68 kDa	4	3
71	Protein POF1B	POF1B_HUMAN	68 kDa		2
72	Transketolase	TKT_HUMAN	68 kDa	2	2
73	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	K22O_HUMAN	66 kDa	21	26
74	Galectin-3-binding protein	LG3BP_HUMAN	65 kDa	3	5
76	Glypican-4	GPC4_HUMAN	62 kDa		3
77	Keratin, type II cytoskeletal 5	K2C5_HUMAN	62 kDa	18	20
78	Glypican-1	GPC1_HUMAN	62 kDa		3
79	Heparanase	HPSE_HUMAN	61 kDa	2	
80	Extracellular matrix protein 1	ECM1_HUMAN	61 kDa	2	3
81	Suprabasin	SBSN_HUMAN	61 kDa	2	3
82	Keratin, type II cytoskeletal 6C	K2C6C_HUMAN	60 kDa	32	36
83	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_HUMAN	60 kDa	5	3
84	T-complex protein 1 subunit theta	TCPQ_HUMAN	60 kDa	2	2
85	Glucosidase 2 subunit beta	GLU2B_HUMAN	59 kDa	2	
86	Non-specific lipid-transfer protein	NLTP_HUMAN	59 kDa	3	3
87	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	59 kDa	12	16

88	Prosaposin	SAP_HUMAN	58 kDa	3	4
89	Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN	58 kDa	6	11
90	Alpha-amylase 1	AMY1_HUMAN	58 kDa	15	8
91	DnaJ homolog subfamily C member 3	DNJC3_HUMAN	58 kDa	8	8
92	Angiopoietin-1	ANGP1_HUMAN	58 kDa		3
93	Keratin, type II cytoskeletal 4	K2C4_HUMAN	57 kDa	43	41
94	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN	57 kDa	22	3
95	Keratin, type II cytoskeletal 78	K2C78_HUMAN	57 kDa	8	9
96	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_HUMAN	57 kDa	3	3
97	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_HUMAN	57 kDa	7	5
98	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	56 kDa	5	5
99	Phospholipid transfer protein	PLTP_HUMAN	55 kDa		3
100	ERO1-like protein alpha	ERO1A_HUMAN	54 kDa	3	
101	Annexin A11	ANX11_HUMAN	54 kDa	4	2
102	Vitronectin	VTNC_HUMAN	54 kDa	3	4
103	Bactericidal permeability-increasing protein	BPI_HUMAN	54 kDa	4	4
104	Nucleobindin-1	NUCB1_HUMAN	54 kDa	2	3
105	Vimentin	VIME_HUMAN	54 kDa	2	2
106	Cornulin	CRNN_HUMAN	54 kDa	3	3
107	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	6PGD_HUMAN	53 kDa	5	2
108	Clusterin	CLUS_HUMAN	52 kDa	8	8
109	BPI fold-containing family B member 1	BPIB1_HUMAN	52 kDa	7	13
110	Nucleotide exchange factor SIL1	SIL1_HUMAN	52 kDa		2

111	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	52 kDa		4
112	Serine protease HTRA1	HTRA1_HUMAN	51 kDa	7	7
113	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	51 kDa	3	
114	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDHP_HUMAN	51 kDa	2	
115	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDIA_HUMAN	51 kDa	2	
116	Keratin, type II cytoskeletal 80	K2C80_HUMAN	51 kDa	2	2
117	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	AL3A1_HUMAN	50 kDa	2	2
118	Nucleobindin-2	NUCB2_HUMAN	50 kDa	2	4
119	Fibulin-5	FBLN5_HUMAN	50 kDa	2	5
120	Tubulin alpha-1A chain	TBA1A_HUMAN	50 kDa	5	5
121	Ribonuclease inhibitor	RINI_HUMAN	50 kDa	2	
122	Tubulin beta-4B chain	TBB4B_HUMAN	50 kDa	3	2
123	Tubulin beta chain	TBB5_HUMAN	50 kDa	6	10
124	Keratin, type I cytoskeletal 13	K1C13_HUMAN	50 kDa	23	21
125	Ig mu chain C region	IGHM_HUMAN	49 kDa	8	11
126	BPI fold-containing family B member 2	BPIB2_HUMAN	49 kDa	2	4
127	Transcobalamin-1	TCO1_HUMAN	48 kDa	2	
128	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_HUMAN	48 kDa	4	3
129	Alpha-1-antichymotrypsin	AACT_HUMAN	48 kDa	3	
130	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN	47 kDa	5	2
131	Creatine kinase U-type, mitochondrial	KCRU_HUMAN	47 kDa	2	
132	Poly(U)-specific endoribonuclease	ENDO_U_HUMAN	47 kDa	4	

133	Alpha-1-antitrypsin	A1AT_HUMAN	47 kDa	2	2
134	Plasminogen activator inhibitor 2	PAI2_HUMAN	47 kDa	2	
135	Transmembrane protease serine 11B	TM11B_HUMAN	46 kDa	3	3
136	Transmembrane protease serine 11D	TM11D_HUMAN	46 kDa	5	2
137	Apolipoprotein A-IV	APOA4_HUMAN	45 kDa		3
138	Actin-related protein 2	ARP2_HUMAN	45 kDa	2	2
139	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN	45 kDa	2	3
140	Serpin B3	SPB3_HUMAN	45 kDa	4	2
141	Cathepsin D	CATD_HUMAN	45 kDa	2	
142	Serpin B13	SPB13_HUMAN	44 kDa	5	3
143	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_HUMAN	44 kDa	2	2
144	Prolargin	PRELP_HUMAN	44 kDa		6
145	Chitinase-3-like protein 2	CH3L2_HUMAN	44 kDa	2	2
146	Carbohydrate sulfotransferase 14	CHSTE_HUMAN	43 kDa		2
147	Protein NDRG1	NDRG1_HUMAN	43 kDa	2	2
148	Leukocyte elastase inhibitor	ILEU_HUMAN	43 kDa	9	3
149	Serpin B6	SPB6_HUMAN	43 kDa	3	
150	Serpin B5	SPB5_HUMAN	42 kDa	5	2
151	Pentraxin-related protein PTX3	PTX3_HUMAN	42 kDa		2
152	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1_HUMAN	42 kDa	3	2
153	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	42 kDa	14	13
154	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	PP1R7_HUMAN	42 kDa	2	
155	Alcohol dehydrogenase class 4 mu/sigma chain	ADH7_HUMAN	41 kDa	4	5
156	Hsc70-interacting protein	F10A1_HUMAN	41 kDa	2	
157	Chondroadherin	CHAD_HUMAN	40 kDa	4	5

158	Monocyte differentiation antigen CD14	CD14_HUMAN	40 kDa	6	6
159	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1_HUMAN	40 kDa		2
160	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	39 kDa	5	2
161	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_HUMAN	39 kDa	2	
162	Mucin-7	MUC7_HUMAN	39 kDa	2	2
163	Renin receptor	RENH_HUMAN	39 kDa		2
164	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	NHRF1_HUMAN	39 kDa	2	
165	Annexin A1	ANXA1_HUMAN	39 kDa	18	16
166	Annexin A2	ANXA2_HUMAN	39 kDa	15	13
167	Macrophage-capping protein	CAPG_HUMAN	38 kDa	3	3
168	UPF0762 protein C6orf58	CF058_HUMAN	38 kDa	3	2
169	Cathepsin B	CATB_HUMAN	38 kDa	2	
170	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	38 kDa	8	7
171	Pro-cathepsin H	CATH_HUMAN	37 kDa	2	
172	N-acetyl-D-glucosamine kinase	NAGK_HUMAN	37 kDa	4	
173	Cathepsin L2	CATL2_HUMAN	37 kDa	2	
174	Annexin A8	ANXA8_HUMAN	37 kDa	3	4
175	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_HUMAN	37 kDa	2	2
176	Annexin A3	ANXA3_HUMAN	36 kDa	2	2
177	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	HEM2_HUMAN	36 kDa	2	3
178	Apolipoprotein E	APOE_HUMAN	36 kDa		11
179	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	36 kDa	6	8
180	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN	36 kDa	7	3
181	Annexin A5	ANXA5_HUMAN	36 kDa	5	2

182	Annexin A4	ANXA4_HUMAN	36 kDa	4	4
183	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDHM_HUMAN	36 kDa	5	
184	Secreted frizzled-related protein 1	SFRP1_HUMAN	35 kDa	2	6
185	Carbonic anhydrase 6	CAH6_HUMAN	35 kDa	5	8
186	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GBLP_HUMAN	35 kDa	3	3
187	Intelectin-1	ITLN1_HUMAN	35 kDa	2	
188	Leucine-rich repeat-containing protein 26	LRC26_HUMAN	35 kDa		4
189	Zinc-alpha-2-glycoprotein	ZA2G_HUMAN	34 kDa	7	5
190	Retinoic acid receptor responder protein 1	TIG1_HUMAN	33 kDa	3	7
191	Monoglyceride lipase	MGLL_HUMAN	33 kDa	2	3
192	Alpha-soluble NSF attachment protein	SNAA_HUMAN	33 kDa	2	2
193	Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3_HUMAN	33 kDa	2	3
194	40S ribosomal protein SA	RSSA_HUMAN	33 kDa	4	3
195	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2_HUMAN	32 kDa	2	
196	F-box only protein 50	FBX50_HUMAN	31 kDa	5	5
297	Triosephosphate isomerase	TPIS_HUMAN	31 kDa	2	2
298	Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMAN	31 kDa	11	18
299	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1_HUMAN	31 kDa	2	2
200	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1_HUMAN	30 kDa	2	3
201	Kallikrein-10	KLK10_HUMAN	30 kDa	6	6
202	Matrilysin	MMP7_HUMAN	30 kDa	2	2

203	Ribonuclease T2	RNT2_HUMAN	29 kDa	2	
204	14-3-3 protein épsilon	1433E_HUMAN	29 kDa	3	2
205	Kallikrein-14	KLK14_HUMAN	29 kDa	2	
206	Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29_HUMAN	29 kDa	2	
207	Kallikrein-1	KLK1_HUMAN	29 kDa	2	2
208	Cathepsin G	CATG_HUMAN	29 kDa	3	5
209	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1_HUMAN	29 kDa	2	
210	Neutrophil elastase	ELNE_HUMAN	29 kDa		3
211	14-3-3 protein gamma	1433G_HUMAN	28 kDa	2	
212	14-3-3 protein eta	1433F_HUMAN	28 kDa		2
213	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN	28 kDa	3	
214	Myeloblastin	PRTN3_HUMAN	28 kDa		2
215	14-3-3 protein sigma	1433S_HUMAN	28 kDa	15	10
216	14-3-3 protein zeta/delta	1433Z_HUMAN	28 kDa	9	4
217	Serine/arginine-rich splicing factor 1	SRSF1_HUMAN	28 kDa	7	
218	Cysteine-rich secretory protein 3	CRIS3_HUMAN	28 kDa	4	4
219	BPI fold-containing family A member 2	BPIA2_HUMAN	27 kDa	8	11
220	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1_HUMAN	27 kDa	5	4
221	BPI fold-containing family A member 1	BPIA1_HUMAN	27 kDa		3
222	Eukaryotic translation initiation factor 6	IF6_HUMAN	27 kDa	3	2
223	Galectin-3	LEG3_HUMAN	26 kDa	3	3

224	Glutathione peroxidase 3	GPX3_HUMAN	26 kDa	2	
225	CD9 antigen	CD9_HUMAN	25 kDa	2	2
226	Serum amyloid P-component	SAMP_HUMAN	25 kDa	2	
227	Peroxiredoxin-6	PRDX6_HUMAN	25 kDa	2	2
228	Charged multivesicular body protein 4b	CHM4B_HUMAN	25 kDa	3	
229	High mobility group protein B1	HMGB1_HUMAN	25 kDa	7	
230	60S ribosomal protein L10a	RL10A_HUMAN	25 kDa	6	
231	PITH domain-containing protein 1	PITH1_HUMAN	24 kDa	2	
232	Ras-related protein Rab-14	RAB14_HUMAN	24 kDa	2	
233	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB_HUMAN	24 kDa	4	4
234	Ras-related protein Rab-2A	RAB2A_HUMAN	24 kDa	2	2
235	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A_HUMAN	23 kDa	2	3
236	Glutathione S-transferase P	GSTP1_HUMAN	23 kDa	2	3
237	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATPO_HUMAN	23 kDa	2	
238	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	GDIR1_HUMAN	23 kDa	2	
239	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1_HUMAN	23 kDa	2	2
240	Heme-binding protein 2	HEBP2_HUMAN	23 kDa	2	
241	Zymogen granule protein 16 homolog B	ZG16B_HUMAN	23 kDa	9	11
242	Proline-rich protein 27	PRR27_HUMAN	23 kDa	2	3
243	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	NGAL_HUMAN	23 kDa	4	2
244	Histone H1.3	H13_HUMAN	22 kDa	2	2
245	Interleukin-18	IL18_HUMAN	22 kDa	4	
246	Flavin reductase (NADPH)	BLVRB_HUMAN	22 kDa		2

247	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN	22 kDa	10	5
248	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5_HUMAN	22 kDa	5	5
249	Peroxiredoxin-2	PRDX2_HUMAN	22 kDa	3	
250	Programmed cell death protein 6	PDCD6_HUMAN	22 kDa	4	
251	Transforming protein RhoA	RHOA_HUMAN	22 kDa	2	2
252	Sorcin	SORCN_HUMAN	22 kDa	2	
253	Syndecan-4	SDC4_HUMAN	22 kDa		2
254	ADP-ribosylation factor-like protein 8B	ARL8B_HUMAN	22 kDa		2
255	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC2_HUMAN	21 kDa		4
256	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_HUMAN	21 kDa	2	
257	ADP-ribosylation factor 1	ARF1_HUMAN	21 kDa	3	4
258	60S ribosomal protein L11	RL11_HUMAN	20 kDa	2	2
259	ADP-ribosylation factor 6	ARF6_HUMAN	20 kDa	2	2
260	Myosin regulatory light chain 12A	ML12A_HUMAN	20 kDa	2	4
261	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4_HUMAN	20 kDa	2	2
262	Translationally-controlled tumor protein	TCTP_HUMAN	20 kDa	3	
263	Serine/arginine-rich splicing factor 3	SRSF3_HUMAN	19 kDa	4	
264	Cathelicidin antimicrobial peptide	CAMP_HUMAN	19 kDa	2	7
265	Lipocalin-1	LCN1_HUMAN	19 kDa	3	
266	40S ribosomal protein S10	RS10_HUMAN	19 kDa		2
267	S-phase kinase-associated protein 1	SKP1_HUMAN	19 kDa	2	
268	Cofilin-1	COF1_HUMAN	19 kDa	2	2

269	Small proline-rich protein 3	SPRR3_HUMAN	18 kDa	4	4
270	Immunoglobulin J chain	IGJ_HUMAN	18 kDa	3	2
271	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_HUMAN	18 kDa	4	3
272	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_HUMAN	18 kDa	3	2
273	60S ribosomal protein L12	RL12_HUMAN	18 kDa	4	6
274	40S ribosomal protein S18	RS18_HUMAN	18 kDa	2	3
275	Myosin light polypeptide 6	MYL6_HUMAN	17 kDa	2	2
276	Calmodulin-like protein 3	CALL3_HUMAN	17 kDa	4	2
277	Ribonuclease 4	RNAS4_HUMAN	17 kDa	3	3
278	Calmodulin	CALM_HUMAN	17 kDa	2	
279	Prolactin-inducible protein	PIP_HUMAN	17 kDa	10	9
280	Angiogenin	ANGI_HUMAN	17 kDa	2	2
281	Lysozyme C	LYSC_HUMAN	17 kDa	9	9
282	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	IF1AX_HUMAN	16 kDa	2	
283	Cystatin-SA	CYTT_HUMAN	16 kDa	6	2
284	Cystatin-SN	CYTN_HUMAN	16 kDa	4	2
285	Cystatin-S	CYTS_HUMAN	16 kDa	2	
286	Phospholipase A2, membrane associated	PA2GA_HUMAN	16 kDa	2	
287	40S ribosomal protein S19	RS19_HUMAN	16 kDa	2	4
288	Cystatin-C	CYTC_HUMAN	16 kDa	2	
289	Cellular retinoic acid-binding protein 2	RABP2_HUMAN	16 kDa	2	2
290	Fatty acid-binding protein,	FABP5_HUMAN	15 kDa	3	2

	epidermal				
291	Galectin-7	LEG7_HUMAN	15 kDa	2	2
292	Profilin-1	PROF1_HUMAN	15 kDa	2	3
293	40S ribosomal protein S15a	RS15A_HUMAN	15 kDa	2	2
294	60S ribosomal protein L22	RL22_HUMAN	15 kDa	2	2
295	Ig kappa chain V-IV region JI	KV403_HUMAN	15 kDa	2	2
296	40S ribosomal protein S12	RS12_HUMAN	15 kDa		4
297	Antileukoproteinase	SLPI_HUMAN	14 kDa	8	6
298	C-C motif chemokine 28	CCL28_HUMAN	14 kDa	2	2
299	Histone H2A type 1-D	H2A1D_HUMAN	14 kDa	2	2
300	Histone H2B type 1-K	H2B1K_HUMAN	14 kDa	2	3
301	Beta-2-microglobulin	B2MG_HUMAN	14 kDa	5	2
302	Serum amyloid A-1 protein	SAA1_HUMAN	14 kDa	2	4
303	40S ribosomal protein S20	RS20_HUMAN	13 kDa	2	2
304	Protein S100-A9	S10A9_HUMAN	13 kDa	7	6
305	Ig heavy chain V-III region BRO	HV305_HUMAN	13 kDa		2
306	Myotrophin	MTPN_HUMAN	13 kDa	2	
307	Ig heavy chain V-III region GAL	HV320_HUMAN	13 kDa	2	2
308	Matrix Gla protein	MGP_HUMAN	12 kDa	4	4
309	Ig heavy chain V-III region TIL	HV304_HUMAN	12 kDa	2	2
310	C-X-C motif chemokine 5	CXCL5_HUMAN	12 kDa	3	2
311	Protein S100-A16	S10AG_HUMAN	12 kDa	3	
312	Ig kappa chain V-I region EU	KV106_HUMAN	12 kDa	2	2
313	Ig kappa chain V-III region WOL	KV305_HUMAN	12 kDa	2	2
314	Protein S100-A11	S10AB_HUMAN	12 kDa	2	2
315	Thioredoxin	THIO_HUMAN	12 kDa	7	2
316	Protein S100-A14	S10AE_HUMAN	12 kDa	2	2
317	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	12 kDa	4	5

318	Ig lambda-3 chain C regions	LAC3_HUMAN	11 kDa	4	3
319	Apolipoprotein A-II	APOA2_HUMAN	11 kDa	2	2
320	Cystatin-B	CYTB_HUMAN	11 kDa	4	2
321	Protein S100-A2	S10A2_HUMAN	11 kDa	2	
322	Cystatin-A	CYTA_HUMAN	11 kDa	6	
323	Protein S100-A8	S10A8_HUMAN	11 kDa	8	4
324	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	SH3L3_HUMAN	10 kDa	2	
325	Neutrophil defensin 1	DEF1_HUMAN	10 kDa	4	4
326	Protein FAM25A	FM25A_HUMAN	9 kDa		2
327	40S ribosomal protein S21	RS21_HUMAN	9 kDa	2	
328	Small proline-rich protein 2B	SPR2B_HUMAN	8 kDa	2	2
329	40S ribosomal protein S28	RS28_HUMAN	8 kDa	2	

Adicionalmente, se hizo un análisis del peso molecular de las proteínas identificadas en las PS formadas en las superficies de esmalte y TiPT, encontrándose que el 92.9 % de las proteínas adsorbidas a los sustratos tuvieron pesos moleculares por debajo de los 100kDa, un dato similar encontramos para las proteínas adsorbidas a los sustratos TiPT, donde el 90.7 % de las proteínas identificadas tuvieron un peso molecular por debajo de los 100 kDa. En la **Figura 13** se presenta una gráfica donde se muestran las proteínas, identificadas en la PS formada sobre los sustratos evaluados, organizadas de forma ascendente con base en su peso molecular.

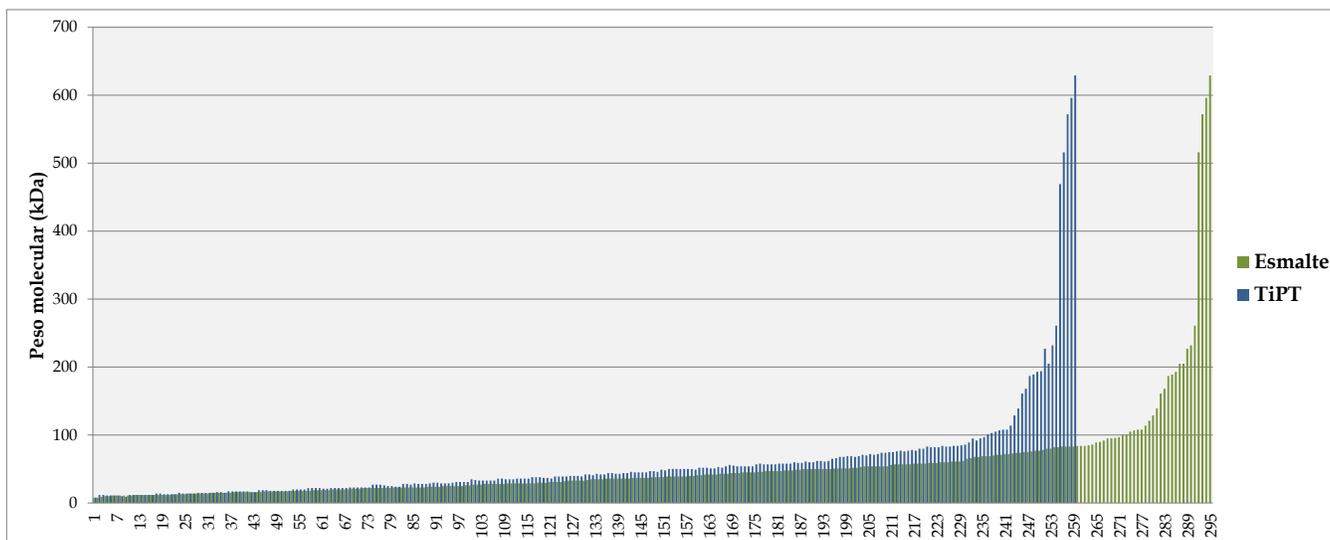


Figura 13. La gráfica muestra las proteínas identificadas en la PS formada sobre los sustratos de interés (esmalte y TiPT) organizadas de forma ascendente en base a su peso molecular.

La función biológica asociada a las proteínas identificadas en las muestras de PS también fue investigada, los hallazgos obtenidos pueden ser visualizados en la **Figura 14.**

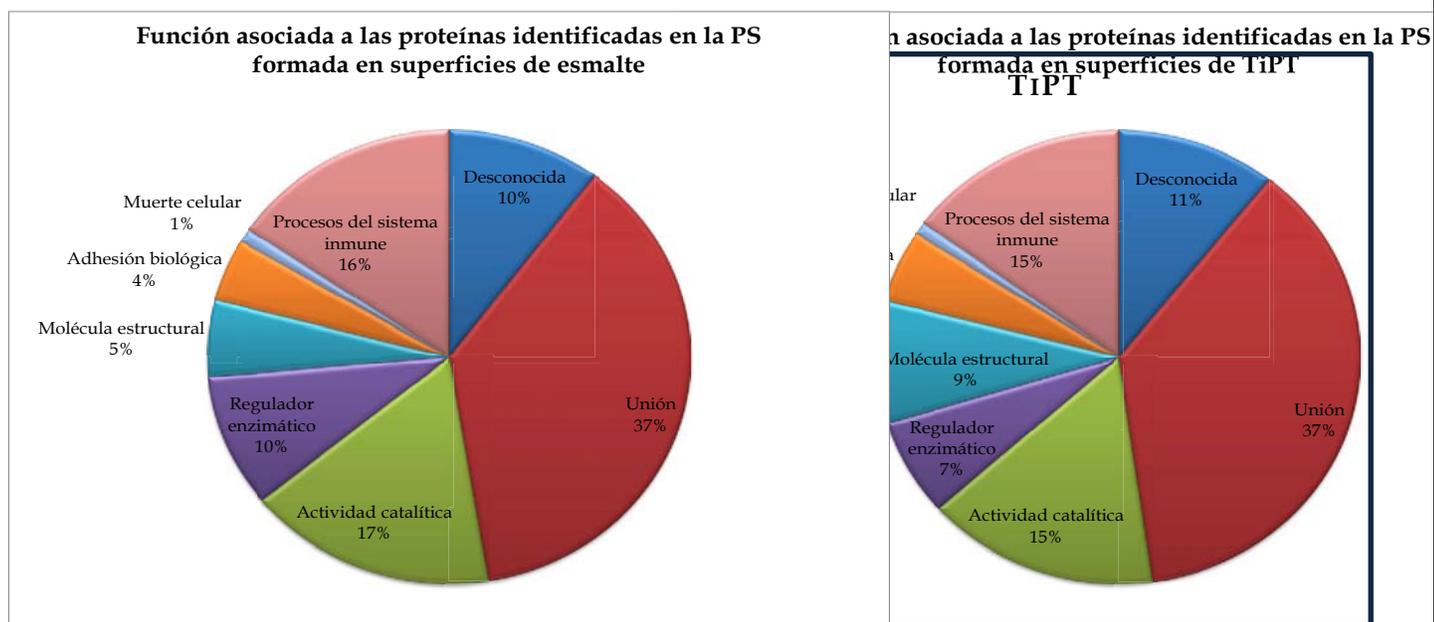


Figura 14. Se muestran las gráficas representativas de las funciones biológicas asociadas a las proteínas identificadas por LC-HR-MS/MS en la PS formada sobre las superficies de esmalte y TiPT.

El mayor porcentaje de proteínas adsorbidas en ambas superficies (37 %) posee una función de unión. Un 10 % y 7 % de las proteínas adsorbidas al esmalte y TiPT, respectivamente, estuvieron asociadas con funciones biológicas importantes como la regulación enzimática. Un 16 % de las proteínas adsorbidas al esmalte y un 15 % de las proteínas adsorbidas a las superficies TiPT, estuvo asociado a procesos del sistema inmune. Mientras que el porcentaje de proteínas que estuvo involucrado en procesos de muerte celular fue del 1 % en la PS formada en superficies de esmalte y TiPT. Finalmente, es importante recalcar que un 10-11 % del total de proteínas identificadas poseen una función desconocida.

3.2.3 Análisis de la ultraestructura de la PS formada sobre las superficies evaluadas por TEM.

Después de que las superficies, experimental (TiPT) y control (esmalte), fueron incubadas en la cavidad oral durante 3 min y 2 horas, una película de proteínas representativa fue establecida en la superficie de los sustratos evaluados, la cual es mostrada en las imágenes de TEM (**Figuras 15 y 16**).

Los análisis TEM demostraron la presencia de un material tipo película en todas las superficies analizadas, la evaluación por TEM reveló diferencias entre los patrones de formación de la película en las superficies de TiPT y de esmalte.

A los 3 min, los especímenes de esmalte expuestos estuvieron cubiertos completamente por una capa de película continua de morfología uniforme. La película observada en las micrografías por TEM se muestra como una capa orgánica delgada

cubriendo la superficie de cada sustrato de esmalte investigado. Dicha película se observa como una capa de película basal electrodensa de 10 ± 2 nm de grosor. Sobre esta capa basal una capa de película granular menos densa de grosor variable pudo ser detectada en las superficies de esmalte a los 3 min (15 ± 3 nm) y a las 2 horas (100 ± 20.3 nm) de formación *in situ* de la película, la diferencia en el grosor de esta segunda capa de película granular menos densa fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

ESMALTE

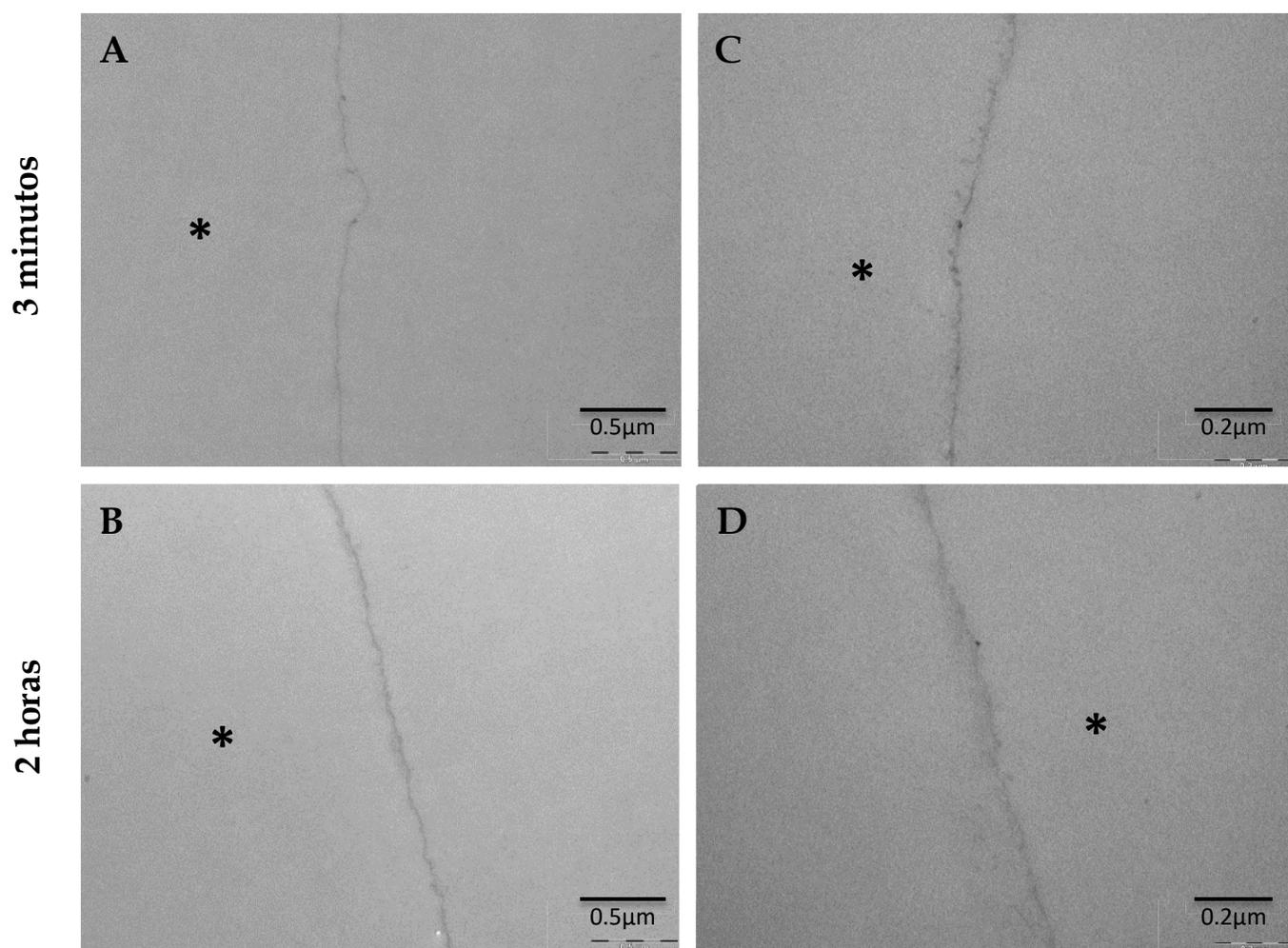


Figura 15. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la película saliva formada *in situ* en las superficies de esmalte posicionadas intraoralmente en las superficies bucales de la zona molar superior después de la exposición en periodos de 3 min (A y B) y de 2 horas (C y D). Las superficies de esmalte fueron removidas durante el procesamiento de los especímenes para análisis por TEM (*Previa superficie de esmalte).

En las micrografías por TEM (**Figura 16**) se muestra la presencia de una capa orgánica delgada cubriendo la superficie de cada sustrato de TiPT investigado a los 3 min y a las 2 hrs. Similar a las superficies de esmalte, los especímenes de TiPT estuvieron cubiertos completamente por una capa de película continua de morfología homogénea a los 3 min de formación *in situ* de la película. La película se observa como una capa de película basal electrodensa gruesa de 9 ± 1 nm de grosor en contacto con lo que fueron los sustratos de TiPT. Arriba de esta capa basal, una capa de película granular menos densa de grosor variable pudo ser detectada en las superficies TiPT a los 3 min (11 ± 3 nm) y a las 2 horas (70 ± 10 nm) las 2 horas de formación *in situ* de la película.

A las 2 horas de formación *in situ* de la PS se pudo observar la presencia de cúmulos globulares de polímeros salivales depositados sobre la PS adsorbida en la superficie de todos los sustratos de TiPT evaluados (flechas). Dichos cúmulos globulares tuvieron un promedio de 80 ± 30 nm.

TiPT

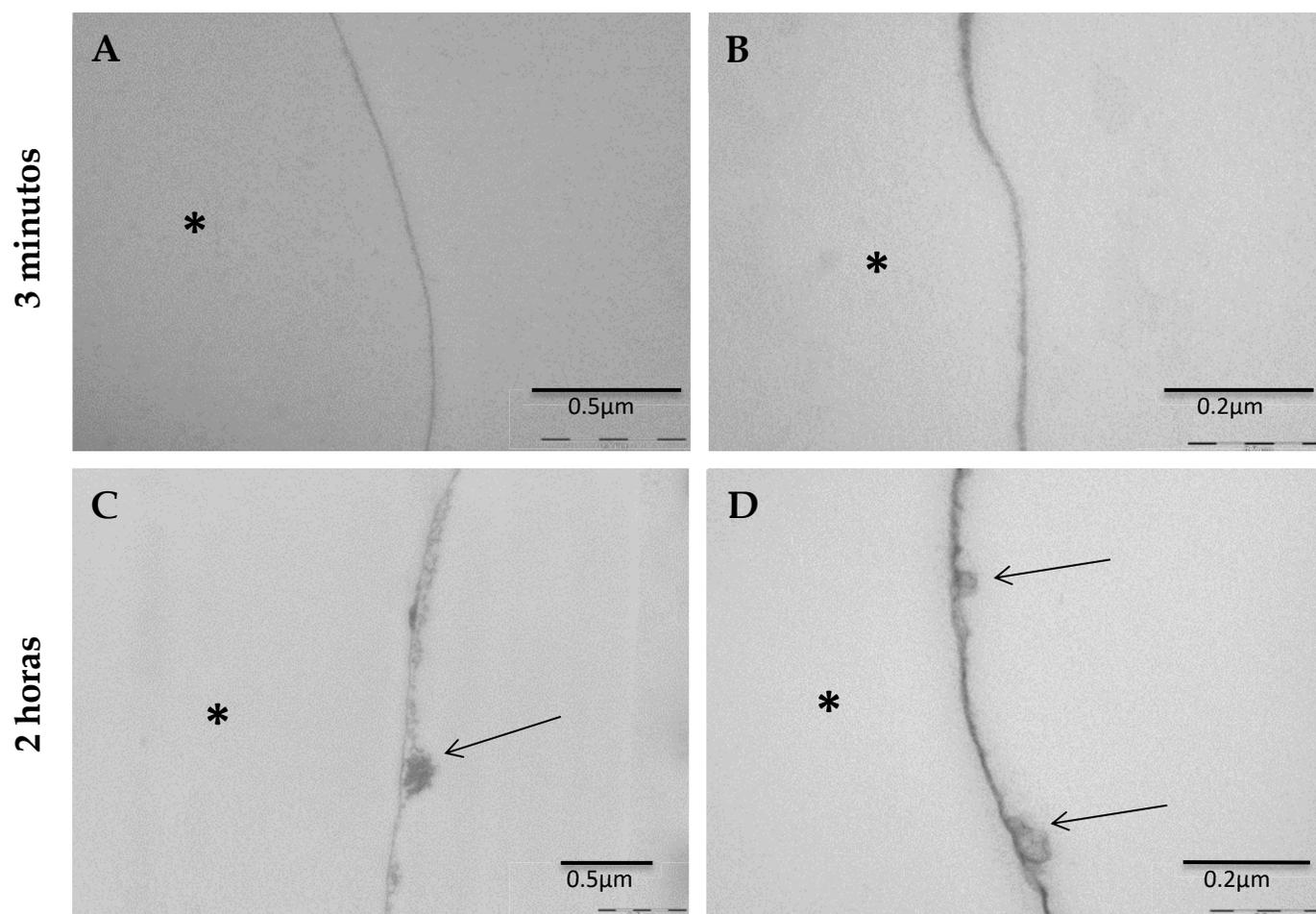


Figura 16. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la película saliva formada *in situ* en las superficies de TiPT posicionadas intraoralmente en las superficies bucales de la zona molar superior después de la exposición en periodos de 3 min (A y B) y de 2 horas (C y D). Las flechas señalan los cúmulos globulares de polímeros salivales depositados sobre la PS. Las superficies de Titanio fueron removidas durante el procesamiento de los especímenes para análisis TEM (*Previa superficie de Titanio).

3.2.4 Análisis del efecto de la PS formada sobre las superficies evaluadas en la formación de biopelículas orales.

La **Figura 17** muestra el efecto de la previa formación de la PS sobre los sustratos de esmalte y TiPT en los patrones de adhesión bacteriana.

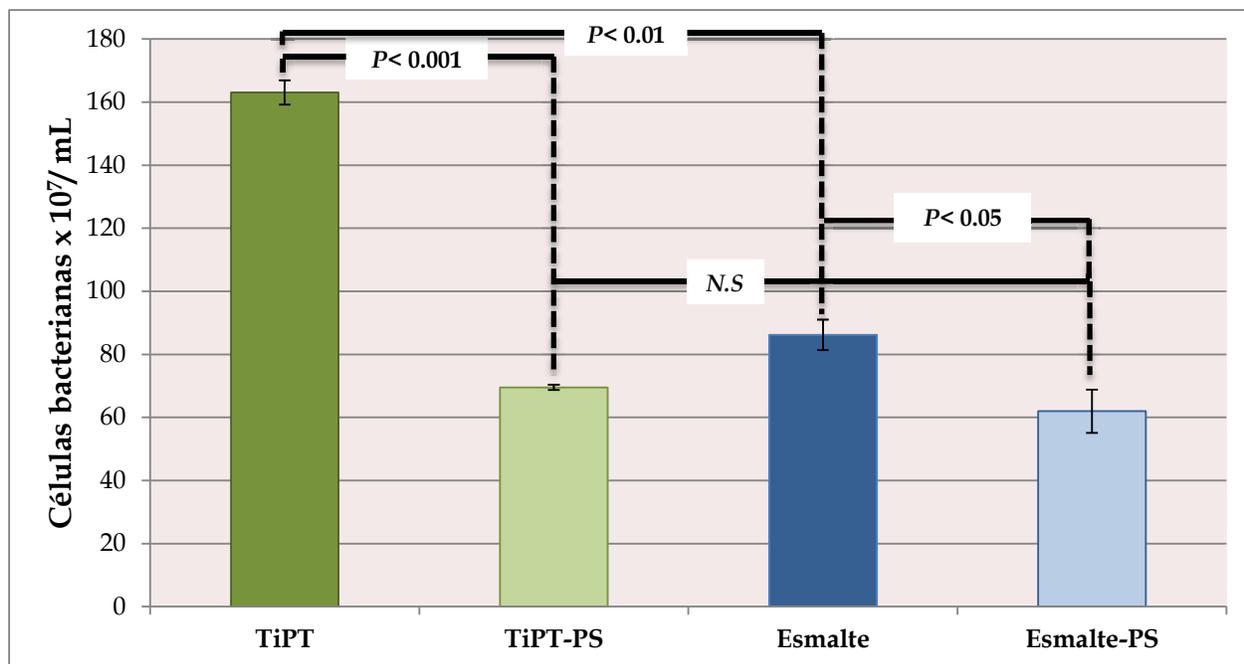


Figura 17. Conteos bacterianos totales (células bacterianas x 10⁷/mL) después de 12 horas de incubación anaeróbica en las superficies de esmalte y TiPT, con y sin PS adsorbida. Valores presentados como la ME ± EEM.

La adhesión bacteriana se vio influida por la presencia de la PS. En los sustratos en los que no se permitió la formación de una PS, se observaron mayores conteos de células bacterianas en comparación con las superficies donde sí se formó la PS (esmalte-PS y TiPT-PS). También se observó que en el grupo de superficies sin PS, la adhesión bacteriana fue significativamente mayor en los sustratos con mayor rugosidad, ángulo de contacto y punto isoeléctrico (TiPT) (163.06 x 10⁷ células/mL) en comparación con las superficies con menor rugosidad, ángulo de contacto y punto isoeléctrico (esmalte) (86.15 x 10⁷ células/mL) ($p < 0.01$).

Por otro lado, en el grupo de superficies donde se permitió la formación de la PS, una reducción estadísticamente significativa en la adhesión bacteriana fue observada. En las superficies TiPT una reducción de 2.3 veces el conteo de células bacterianas (de

163.06 x 10⁷ células/mL a 69.53 x 10⁷ células/mL) fue observada ($p < 0.001$). Mientras que en las superficies de esmalte se observó una reducción estadísticamente significativa en el conteo de células bacterianas de 86.15 x 10⁷ células/mL a 61.97 x 10⁷ células/mL ($p < 0.05$), es decir, una reducción de 1.4 veces el conteo de células bacterianas. En este grupo de superficies, en las cuales una PS estuvo formada, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de células bacterianas adheridas a las superficies de esmalte en comparación con las superficies de TiPT.

En la **Figura 18** podemos observar las micrografías de microscopía confocal representativas de la formación de la biopelícula a las 12 horas sobre las superficies de esmalte y TiPT, con y sin PS adsorbida. Como se puede observar, la mayoría de las células bacterianas estuvieron teñidas en verde, de forma que puede ser asumido que las cepas bacterianas estaban vivas al momento de las observaciones. En general, más bacterias pueden ser vistas en los sustratos con mayor rugosidad, ángulo de contacto y punto isoelectrónico (TiPT), sin importar si estuvieron o no cubiertos con la PS. Además se pudo confirmar que la presencia de la PS sobre los sustratos de esmalte y de TiPT provocó una reducción en la cantidad de células bacterianas adheridas.

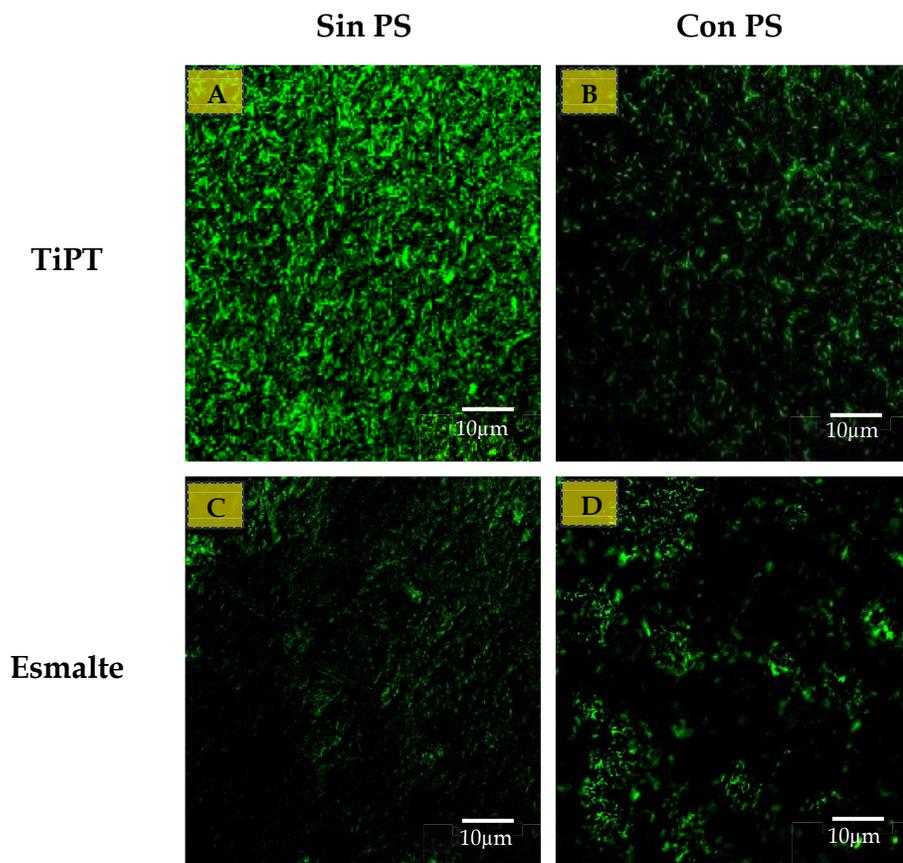


Figura 18. Imágenes de microscopía confocal de la formación de biopelículas después de 12 horas de cultivo a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis sobre los sustratos de esmalte y de TiPT sin PS (A y C, respectivamente) y con la presencia de la PS adsorbida (B y D, respectivamente). Las imágenes representan la visualización de las bacterias adheridas después del marcaje de las células bacterianas con la tinción live/dead. Barra de escala 10 µm.

Adicionalmente, se muestran los resultados de la evaluación por TEM de la biopelícula de 24 horas formada *in situ* en la cavidad oral del sujeto voluntario, sistémica y periodontalmente sano. Una biopelícula bacteriana fue establecida en la superficie de los sustratos evaluados, la cual es mostrada en la siguiente imagen de TEM (**Figura 19**).

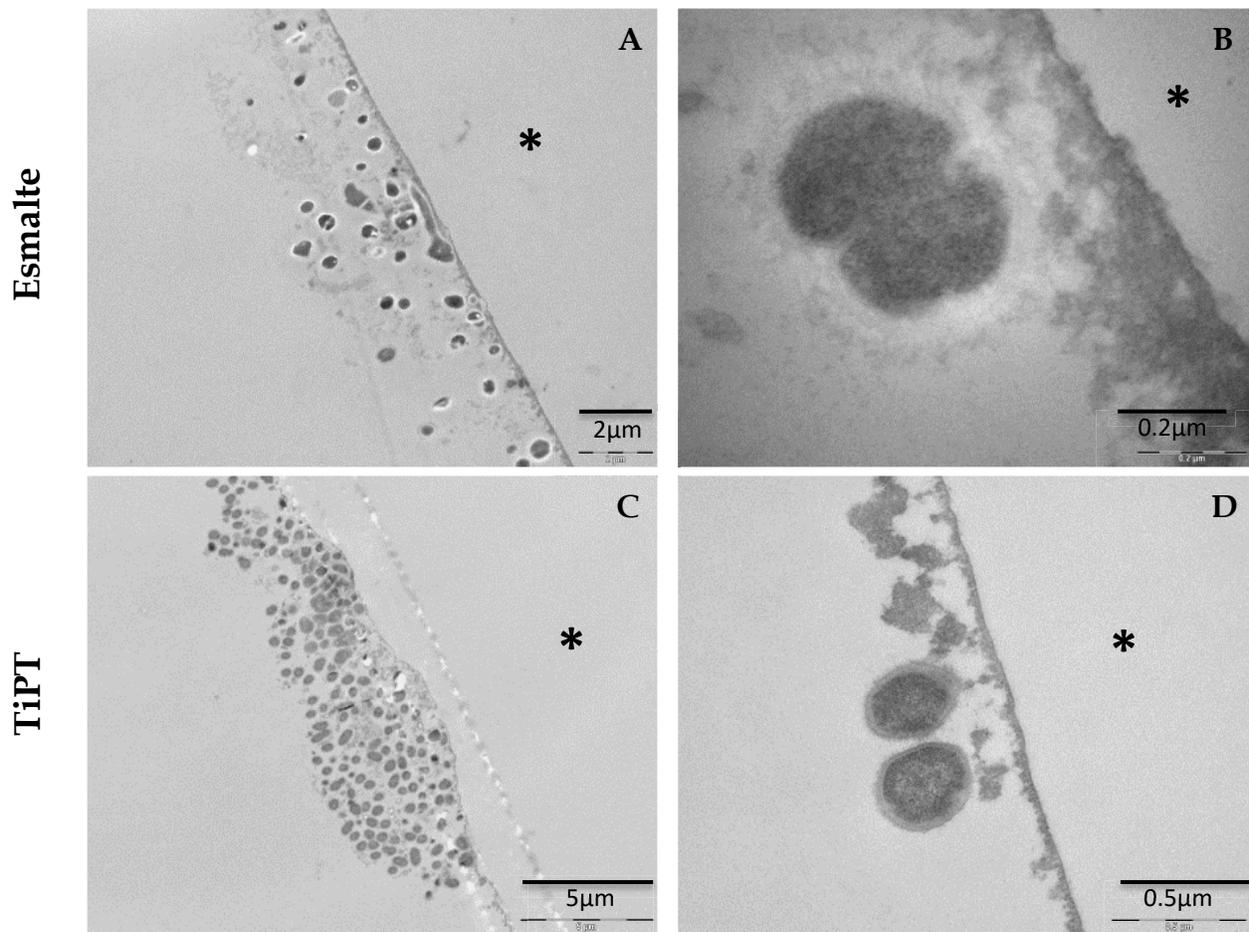


Figura 19. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la biopelícula formada *in situ* en las superficies de esmalte (A y B) y en las superficies de TiPT (D y E) posicionadas intraoralmente en las superficies bucales de la zona molar superior por un periodo de 24hrs. Las superficies de esmalte y TiPT fueron removidas durante el procesamiento de los especímenes para análisis TEM (*Previa superficie de esmalte/TiPT).

En las micrografías por TEM se muestra la presencia de una biopelícula bacteriana de grosor variable recubriendo la superficie de cada sustrato de esmalte y de TiPT investigado a las 24 hrs de exposición intraoral. En las superficies de esmalte esta biopelícula tuvo un grosor de $3.5 \pm 1 \mu\text{m}$, mientras que en las superficies TiPT el grosor de la biopelícula fue de $5.3 \pm 2 \mu\text{m}$.

4. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue identificar las proteínas presentes en la PS formada sobre superficies de Ti y de esmalte, así como determinar su efecto en la formación inicial de biopelículas orales. Para llevar a cabo esto, se realizó un análisis cuantitativo mediante BCA y cualitativo mediante LC-HR-MS/MS de la composición proteica de la PS formada las superficies estudiadas. Y la evaluación del efecto de la PS formada sobre los sustratos en la formación inicial de la biopelícula, se estudió mediante la cuantificación de la viabilidad bacteriana y con microscopía de fluorescencia.

A continuación se discuten los principales hallazgos encontrados en la presente investigación.

4.1 Influencia de la rugosidad media (R_a), topografía superficial, ángulo de contacto y punto isoeléctrico de las superficies de esmalte y TiPT en la cantidad proteínas adsorbidas

Se realizó un análisis para correlacionar las características físicas y químicas de las superficies, con la cantidad de proteínas presentes en la PS formada sobre ellas.

Con respecto a la R_a de las superficies evaluadas, nosotros identificamos 2.24 veces más proteína adsorbida a las superficies menos rugosas (esmalte, $R_a \sim 0.06 \mu\text{m}$) en comparación con las superficies de mayor rugosidad (TiPT, $R_a \sim 0.45 \mu\text{m}$). Aunque pudiera esperarse que la cantidad de proteína adsorbida en un sustrato se incrementa conforme incrementa la rugosidad superficial, debido a un aumento en el área de superficie, en la presente investigación no encontramos una correlación positiva entre

los valores de R_a con la cantidad de proteínas en la PS formada en los diferentes sustratos. Lo anterior podría ser explicado al hecho de que solo las características topográficas de una superficie con dimensiones similares a los de las proteínas unidas a las superficies (~ 10 nm) podrían tener un impacto significativo en el incremento de la adsorción de proteínas (Rechendorff, et al., 2006).

Por otro lado, con respecto a la hidrofobicidad de una superficie, se sabe que este parámetro tiene una gran influencia en la adsorción de proteínas (Luan, et al., 2014). Mientras que en la teoría de Young la hidrofobicidad empieza en ángulos de contacto mayores de 90° , estudios más recientes definen un ángulo de contacto de $>65^\circ$ como hidrofóbico (Vogler, 1998; Vogler, 1999; Yoon, Flinn, & Rabinovich, 1997). La mojabilidad puede influir en la fuerza de unión, en la conformación y la orientación de moléculas de proteína individuales, y en la cantidad total de proteínas unidas a una superficie, así como en la composición total de la película macromolecular que se forma en una superficie determinada por la adsorción selectiva del biofluido respectivo (Andrade & Hlady, 1986; Wilson, et al., 2005).

En la presente investigación, identificamos mayor cantidad de proteínas adsorbidas en las superficies más hidrofílicas (esmalte, con ángulo de contacto de $\sim 43.8^\circ$) en comparación con las superficies hidrofóbicas (TiPT, con ángulo de contacto de $\sim 92.4^\circ$). Se considera que en general, las proteínas tienden a adsorberse preferencialmente en superficies hidrofóbicas en comparación con las superficies hidrofílicas (Sigal, Mrksich, & Whitesides, 1998). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, podría ser que el comportamiento individual de las proteínas varío al

estar presentes en un biofluido complejo como la saliva, donde pueden ocurrir procesos como la adsorción competitiva y el desplazamiento de proteínas, lo que determina el perfil de adsorción final (Noh & Vogler, 2007).

Por otro lado, la composición química de ambos tipos de superficies, así como sus valores de punto isoeléctrico deben ser considerados. Se sabe que las superficies metálicas de Ti muestran sitios funcionales en la superficie (óxidos) donde los iones se pueden adherir, y que son responsables de su punto isoeléctrico. En la presente investigación mayor cantidad de proteínas se encontraron adsorbidas a las superficies de esmalte, las cuales tuvieron un valor de pI más bajo (pI de 3.60 ± 0.20) en comparación con las superficies de TiPT (pI de 4.27 ± 0.01). Los valores del pI para ambas superficies son muy cercanos, y teniendo en cuenta que a un pH fisiológico de ~ 6.7 , como el de la saliva (Baliga, Muglikar, & Kale, 2013), ambas superficies tienen una carga negativa, es de esperarse que en este estudio no se haya encontrado una relación directa entre la cantidad de proteína adsorbida a cada sustrato y el valor del pI de las superficies evaluadas. Además, teniendo en cuenta que interacciones del tipo electrostáticas entre los iones cargados es una de las principales rutas de formación de la PS en las superficies de los dientes y de otros materiales (Mozes, et al., 1987), la mayor cantidad de proteínas adsorbidas al esmalte podría ser explicado por la mayor distribución de grupos fosfato e iones calcio en las superficies de esmalte en relación con la capa de óxido del titanio. Esto podría resultar en una reducida afinidad entre el Ti y las proteínas salivales cargadas (Kasemo, 1983; Rolla, 1977).

4.2 Identificación de las proteínas presentes en la PS formada sobre las superficies evaluadas

Con respecto a identidad de las proteínas adsorbidas a las superficies de esmalte y titanio, mediante a los análisis por LC-HR-MS/MS realizados, se pudieron identificar 329 diferentes proteínas. El método de separación por cromatografía líquida descrito en este estudio, aumentó la separación de proteínas, y resultó en un incremento en el número de proteínas exitosamente identificadas, en comparación con estudios previos (Siqueira, et al., 2007), donde un máximo de 130 diferentes proteínas fueron identificadas en la PS formada sólo sobre superficies de esmalte.

Proteínas como α -amilasa, cistatina SN y lisozima fueron identificadas adsorbidas tanto en las superficies de esmalte como TiPT, lo cual concuerda con los hallazgos previamente publicados (Yao, et al., 2003; Yao, Grogan, Zehnder, Lendenmann, Nam, Wu, Costello, & Oppenheim, 2001) donde mediante análisis de la PS formada *in vivo* utilizando una combinación de separación electroforética y MALDI-TOF se mostró la presencia de cistatina SN, lisozima y amilasa.

Otro hallazgo importante, fue la identificación de la proteína albúmina en las muestras de PS formada en las superficies de esmalte y de TiPT. La albumina es el principal constituyente en el suero (aproximadamente 60 % de la cantidad total de proteínas presentes en el suero) (Roach, Farrar, & Perry, 2006), además de servir como un medio de transporte para varios metabolitos y como regulador de la presión osmótica. La adsorción de albúmina en la superficies de esmalte es de importancia clínica debido a sus propiedades protectoras en la película salival contra la

desmineralización erosiva de la superficie dental (Jager, et al., 2011). Asimismo, la albumina es una proteína relevante en aplicaciones de biomateriales y ha sido identificada en implantes de titanio *ex vivo* (Rosengren, et al., 1996). La albumina, induce una respuesta inflamatoria moderada aguda vía plaquetas y granulocitos neutrófilos dentro de segundos a minutos del contacto de la sangre con superficies de materiales recién implantados (Wettero, Tengvall, & Bengtsson, 2003). Algunas veces una preadsorción en la superficies de materiales con albumina es hecha para suprimir la adsorción no específica de proteínas del plasma, como el fibronógeno, e interacción concomitante con la superficie celular (Pegueroles, et al., 2012; Smith, et al., 2000), de esta forma, la albumina puede ser considerada una proteína de pasivación (Kottke-Marchant, et al., 1989).

Las proteínas ricas en prolina (PRPs) ácidas tienen una alta afinidad por la hidroxiapatita y son componentes obligados de la película salival formada *in vivo* sobre el esmalte dental (Bennick, Chau, Goodlin, Abrams, Tustian, & Madapallimattam, 1983; Kousvelari, et al., 1980). Estas proteínas de la película pueden actuar como inhibidores de precipitaciones inducidas por la superficie de sales de calcio en el esmalte (Bennick, 1977; Hay, Moreno, & Schlesinger, 1979), de esta forma proporcionando homeostasis mineral en la interface esmalte-saliva. Un hallazgo importante en la presente investigación fue la identificación de las PRP 27 y 3 adsorbidas tanto en las superficies de esmalte como TiPT, dicho hallazgo representa el primer reporte en la literatura de la presencia de PRPs adsorbidas en superficies de Ti.

Otro hallazgo relevante fue la identificación de la proteína anhidrasa carbónica 6 adsorbida tanto a los sustratos de esmalte como TiPT. En general, las anhidrasas carbónicas catalizan la reacción reversible $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, esta reacción de hidratación del dióxido de carbono en iones bicarbonato y protones es esencial para la regulación de la homeostasis del pH, balance de electrolitos y transporte de iones en mamíferos (Hilvo, et al., 2008). De esta forma, puede ser especulado que la anhidrasa carbónica salival inmovilizada en la capa de película cataliza y acelera la neutralización de ácidos, protegiendo, de esta forma, a la superficie de esmalte de la desmineralización. Previamente se ha mostrado que anhidrasa carbónica salival IV se acumulan en la película de esmalte y aún mantiene su actividad enzimática (Leinonen, et al., 1999).

También fuimos capaces de identificar proteínas de la matriz extracelular como: vitronectina y fibronectina, adsorbidas en los sustratos de esmalte y TiPT. La fibronectina y la vitronectina son proteínas importantes de adhesión celular que median varios aspectos en las asociaciones célula-matriz extracelular a través de una variedad de interacciones ligando-integrinas (Ayad, et al., 1998). Las integrinas esencialmente son un tipo de “puente” entre las proteínas de adhesión y el citoesqueleto (Hynes, 1992; Ruoslahti & Reed, 1994), anclando a las células al biomaterial o a la matriz extracelular. Además, la vitronectina es una proteína importante para la diferenciación osteoblástica (Salasznyk, et al., 2004), por lo que podría representar un blanco clave para futuras aplicaciones biomédicas.

Las queratinas son proteínas esenciales en la cavidad oral debido a que la mucosa oral y gingival son fuentes ricas de estos tipos de proteínas, y han sido previamente

reportadas en la película adquirida del esmalte (Yao, Berg, Costello, Troxler, & Oppenheim, 2003). En el presente estudio se identificaron 10 tipos de keratinas, algunas de ellas previamente reportadas en saliva, en película salival *in vivo*, suero y epitelio oral (Hu, et al., 2005; Juhl, Reibel, & Stoltze, 1989; Yao, Berg, Costello, Troxler, & Oppenheim, 2003). Las queratinas son proteínas también encontradas en la piel y el cabello y son frecuentemente detectadas como contaminantes debido a la alta sensibilidad de la tecnología de espectrometría de masas. En un experimento control usando un pozo vacío como control, pudimos identificar seis queratinas que no habían sido reportadas previamente en fuentes orales. Por lo tanto, estas seis queratinas fueron consideradas posibles contaminantes y fueron excluidas de los resultados.

Dentro de las proteínas diferencialmente expresadas entre los sustratos de esmalte y TiPT, encontramos que los proteoglicanos: glipican 1 y 4, y sindecan 4 fueron identificados solo en los sustratos TiPT. Los proteoglicanos glipicanos están involucrados en procesos biológicos fundamentales como en las interacciones célula-matriz extracelular y en el control de la morfogénesis, diferenciación y división celular (Filmus, Capurro, & Rast, 2008). A nivel de señalización, los glipicanos están involucrados en la regulación de las vías de señalización Wnt, del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), Hedgehog (Hh), proteínas morfogénicas óseas y del factor de crecimiento tipo insulina (Filmus, Capurro, & Rast, 2008). Dependiendo del contexto biológico, los glipicanos pueden o estimular o inhibir la actividad de señalización. Por otro lado, los sindecanos comprenden el grupo principal de proteoglucanos de heparan sulfato de la superficie celular (Couchman, 2010). Los sindecanos son importantes

durante la regeneración de una variedad de tejidos como: piel, tejido nervioso y vasos sanguíneos.(Chung, et al., 2016). En general, los proteoglicanos poseen una alta carga negativa debido a la presencia de grupos fosfato en la porción de polisacáridos no-ramificados (glucosaminoglucanos) que ellos poseen, dicha porción muestra una unión incrementada a los iones Ca^{2+} , los cuales tienen una afinidad más alta a las superficies de Ti en comparación con otros cationes mono- o divalentes, esto podría explicar la alta afinidad de dichas biomoléculas a las superficies TiPT.

Otra proteína que fue identificada solo en las superficies TiPT fue el fibrinógeno. El fibrinógeno consiste de tres cadenas polipeptídicas (α , β y γ) unidas covalentemente por enlaces disulfuro (McKee, Mattock, & Hill, 1970), dichas cadenas fueron identificadas en los sustratos TiPT. El fibrinógeno participa en los procesos de coagulación sanguínea y en la interacción de las plaquetas con superficies de biomateriales (Silvennoinen, et al., 2010; Silvennoinen, et al., 2011; Silvennoinen, et al., 2008; Xu & Siedlecki, 2007), además de ser muy importante en los procesos de hemostasia y trombosis (Cacciafesta, et al., 2001). Debido a las funciones biológicas asociadas al fibrinógeno como al grupo de proteoglicanos, glicanos y sindecanos, estas proteínas podrían ser consideradas como blancos importantes para futuras aplicaciones biomédicas.

Por otro lado, dentro de las proteínas que fueron solo identificadas en las superficies de esmalte encontramos a heparanasa y lipocalina 1. La heparanasa, es una enzima (endo- β -D-glucuronidasa) que degrada cadenas laterales de heparan sulfato (Goldberg, et al., 2013). Se sabe que la heparanasa controla la respuesta inflamatoria en múltiples niveles, incluyendo el secuestro de citosinas/quimiocinas en el espacio

extracelular, modulación de las interacciones de leucocitos con el endotelio y con la matriz extracelular y la iniciación de una respuesta inmune innata a través de interacciones con el receptor tipo-toll 4 (TLR4) (Akbarshahi, et al., 2011; Axelsson, et al., 2012; Johnson, et al., 2002). Por otro lado, las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que típicamente están involucradas en el transporte de pequeños compuestos biológicos, incluyendo vitaminas, hormonas esteroideas y varios metabolitos secundarios (Du, et al., 2015). Las lipocalinas juegan un importante papel en la respuesta inmune innata a la infección bacteriana, los patógenos usualmente obtienen hierro del huésped mediante la producción de sideróforos, los cuales son pequeños compuestos quelantes de alta afinidad al hierro, para sobrevivir y crecer. Como una defensa, el huésped produce siderocalinas, las cuales limitan el crecimiento del patógeno mediante la intercepción de sideróforos, previniendo la liberación del hierro al patógeno. Las siderocalinas son un subgrupo de unión a sideróforos , y de ellas incluye la lipocalina 1 (Correnti & Strong, 2012).

Otras proteínas que fueron identificadas solo en las superficies de esmalte son las catepsinas D y B. La catepsina D es una endopeptidasa aspártica lisosomal soluble (Kornfeld, 1990). Dentro de las funciones fisiológicas que se atribuyen a la catepsina D se encuentran la degradación metabólica de proteínas intracelulares, activación y degradación de enzimas polipeptídicas y factores de crecimiento, activación de precursores enzimáticos, así como regulador de la muerte celular programada (Baechle, et al., 2006; Bankowska, et al., 1997; Egberts, et al., 2004; Guicciardi, Leist, & Gores, 2004). Por otro lado, la catepsina B, proteasa de cisteína que es expresada

constitutivamente, está involucrada en el recambio de proteínas (Mohamed & Sloane, 2006).

Finalmente proteínas como cistatinas S, A y C, también fueron solo identificada en las superficies de esmalte. Las cistatinas son un grupo de proteínas presentes en saliva que tienen propiedades antimicrobianas. Ellas están involucradas en la regulación de la degradación de proteínas en sitios de inflamación o infección microbiana (Baron, Barrett-Vespone, & Featherstone, 1999) debido a que son inhibidores potentes de las peptidasas de cisteína como: catepsina B y L. La inhibición de estas enzimas reduce la actividad proteolítica de bacterias y virus (Baron, Barrett-Vespone, & Featherstone, 1999; Dickinson, 2002a; Dickinson, 2002b). Se ha reportado que diferentes isoformas de cistatinas (S, SN1, SN2 y SA-III, precursoras de la película) son identificadas sólo en la película de voluntarios libres de caries (Vitorino, et al., 2006), lo cual sugiere un papel protector de estas proteínas contra la caries.

Aunque se sabe que la adsorción selectiva de proteínas puede ser controlada por medio del cambio de las características de la superficie sobre la cual se adsorban, como la química (Roach, Farrar, & Perry, 2005; Srivastava, et al., 2005) o la topografía superficial (Lundqvist, Sethson, & Jonsson, 2004), la extensión a la cual estos factores contribuyen al control de la conformación, y de esta forma a los patrones de adsorción a las distintas superficies no es completamente entendido. Se sabe, por ejemplo, que la rugosidad de una superficie puede influir de forma importante en los patrones de adsorción de proteínas. Al respecto dos factores importantes deben tenerse en cuenta,

primero, como previamente se ha reportado, sólo valores de R_a en el rango de nanómetros (~ 30 nm) pueden modificar significativamente la afinidad de adsorción de diferentes proteínas (Roach, Farrar, & Perry, 2006). Teniendo en cuenta que los valores de R_a de las superficies evaluadas en el presente estudio se encuentran fuera del valor límite antes mencionado, se podría sugerir que el parámetro de rugosidad no tuvo una influencia significativa en la afinidad diferencial de las proteínas identificadas entre las superficies evaluadas.

El segundo factor que debe tenerse en cuenta es que un incremento en la rugosidad incrementada implicaría un incremento en la hidrofobicidad de la superficie. La relación entre rugosidad y mojabilidad de una superficie fue establecida por Wenzel en 1936, cuando reportó que una superficie químicamente hidrofóbica llegará a ser incluso más hidrofóbica cuando la rugosidad de la misma incrementa (Wenzel, 1936). De esta forma, tanto la hidrofobicidad de las superficies como la hidrofobicidad de las proteínas presentes en el sistema evaluado son de importancia crucial.

La exposición de una proteína hidrofóbica al agua es energéticamente desfavorable. La entalpía de esta interacción es pequeña y negativa, por lo que la energía libre de Gibbs incrementará como resultado de la contribución entrópica negativa ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Conforme una molécula de proteína interacciona con una superficie, la energía del sistema es minimizada. Aquí ocurre un cambio positivo en la entropía durante la pérdida de agua de la proteína y de la superficie. Cuando la superficie es hidrofóbica, la adsorción es incluso energéticamente más favorable. Se espera que la interacción de una proteína con una superficie hidrofóbica sea mayor en

comparación con una superficie hidrofílica, a menos que la proteína en cuestión contenga pocas regiones hidrofóbicas en su superficie. La exclusión del agua también permite que una mayor proporción de proteínas interactúen con la superficie, lo cual puede ayudar a explicar un mayor cambio conformacional de proteínas, como la albúmina y el fibrinógeno, en superficies hidrofóbicas (Kidoaki & Matsuda, 1999; Sigal, Mrksich, & Whitesides, 1998).

En la adsorción, la proteína distorsionará su estructura para maximizar cualquier interacción superficial con el sustrato. El grado de cambio conformacional dependerá, por lo tanto, de las interacciones individuales superficie-proteína y de las fuerzas de unión internas que mantienen a la proteína en su conformación particular (grado de flexibilidad) (Roach, Farrar, & Perry, 2005). La conformación de las proteínas dicta las posibles interacciones proteína-proteína una vez que éstas están adsorbidas en la superficie, esto podría explicar la adsorción diferencial de proteínas identificadas en las diferentes superficies evaluadas en el presente estudio. De esta forma encontramos que aunque el proteoglicano de heparan sulfato PGBM de 469 kDa fue identificado tanto en las superficies de esmalte como TiPT, sólo mostró interacción con los proteoglicanos glipican 1 y 4, y con sindecan 4, proteínas identificadas solo en superficies TiPT. Asimismo, la proteína albúmina, identificada en ambos tipos de superficies, mostró interacción con proteínas como catepsinas D y B, así como cistatinas S, A y C, proteínas identificadas sólo en superficies de esmalte.

Finalmente, el hecho de que la naturaleza química de las superficies evaluadas sea completamente diferente, sugiere que los grupos funcionales expuestos en ambas

superficies jugaron un papel importante en la adsorción selectiva de las proteínas identificadas en el presente estudio. Por un lado, las superficies metálicas (óxidos) TiPT exponen grupos -OH_2^+ superficiales (Sakiyama, et al., 2004), mientras que las superficies de esmalte, compuestas principalmente de sales de calcio y fosfato (hidroxiapatita), exponen grupos PO_4^{3-} y Ca^{2+} superficiales.

Debido a la que cinética y la energética de la adsorción de proteínas son complejas, no existe una única estrategia experimental o teórica que pueda proporcionar una explicación completa del proceso de adsorción selectivo de proteínas. En lugar de esto, dicho fenómeno debe ser abordado usando varias herramientas complementarias que juntas definan el curso-temporal del proceso de adsorción y los tiempos asociados a los cambios conformacionales y estructurales de la película adsorbida. En estudios futuros, la utilización de herramientas como la espectroscopia infrarroja con ángulos rasantes (GA-FTIR, acrónimo de Grazing Angle Infrared Spectroscopy:) nos proporcionaría información importante sobre los cambios conformacionales, tras la adsorción, de proteínas de interés.

Hasta donde sabemos, es la primera vez que se reporta la adsorción diferencial de las proteínas antes mencionadas entre las superficies de esmalte y de TiPT evaluadas dentro del mismo sistema.

4.3 Ultraestructura de la PS formada sobre las superficies evaluadas

Mediante el análisis por TEM pudimos observar la presencia de una capa electrodensa libre de bacterias recubriendo las superficies de esmalte y de TiPT desde los 3 min de incubación en boca. En las micrografías de la PS de 2 hrs formada sobre los sustratos de interés fue evidente además la presencia de una segunda capa de película de grosor variable laxamente organizada de tipo esponjosa recubriendo externamente la capa electrodensa en contacto cercano con la superficie respectiva (esmalte o TiPT).

En la presente investigación fue posible la detección de glóbulos de grosor variable en la PS de 2hrs formada sobre las superficies TiPT, tales observaciones indicarían que la formación de la PS es principalmente causada por la adsorción de agregados de proteína más que por biopolímeros salivales individuales. Dicho hallazgo concuerda con publicaciones previas que indican que la película formada *in situ* sobre periodos de 30-120 min revela una textura superficial globular compleja con diámetros de las estructuras tipo glóbulos adsorbidas que varían entre 80 y 200 nm (Deimling, et al., 2004; Hannig, et al., 2001).

4.4 Efecto de la PS formada sobre las superficies evaluadas en la formación de biopelículas orales

El reconocimiento de que las biopelículas microbianas son un factor importante asociado con el fallo de los implantes dentales (Esposito, Hirsch, Lekholm, & Thomsen, 1998b), nos llevó a plantearnos el objetivo de analizar el efecto de la PS formada sobre

superficies de TiPT en la formación de biopelículas orales y comparar este mismo fenómeno con el esmalte.

Se sabe que las propiedades físico-químicas de la superficie de los materiales (topografía, rugosidad, energía superficial, etc. de la superficie), de las bacterias mismas (carga e hidrofobicidad de la superficie, etc.) y del ambiente adyacente (temperatura, composición y pH del medio, etc.) contribuyen a los procesos iniciales de adhesión bacteriana (An & Friedman, 1998; Merritt & An, 2000). Sin embargo, el hecho de que todas estas propiedades físico-químicas estén interrelacionadas, hace difícil dilucidar del efecto individual de cada una de estas propiedades en el proceso de adhesión bacteriana (Boulangé-Petermann, 1996).

En el presente estudio, fue evidente que los patrones de adhesión bacteriana observados en los diferentes tipos de superficies variaron con relación a las características de los sustratos y sobre todo a la presencia o ausencia de la PS adsorbida sobre las superficies evaluadas. Esto es consistente con otros estudios que muestran el efecto del medio ambiente en la adhesión de especies selectivas de la microbiota oral (Almaguer-Flores, Olivares-Navarrete, Wieland, Ximenez-Fyvie, Schwartz, & Boyan, 2012; Martinez-Hernandez, Olivares-Navarrete, & Almaguer-Flores, 2014).

Con respecto al efecto de la PS en la formación de la biopelícula, encontramos que mientras que en ausencia de una PS formada sobre los sustratos de esmalte y TiPT, los valores de rugosidad promedio e hidrofobicidad principalmente, pudieran tener una correlación directa en la cantidad de bacterias adheridas, la presencia de una PS formada sobre los sustratos evaluados (esmalte y TiPT) anuló dicha correlación. Las

características de una superficie son rápidamente alteradas tras la adsorción de la película acondicionante (Hori & Matsumoto, 2010; Percival, et al., 2011). Sabemos que en un ambiente acuoso la película acondicionante que se forma inmediatamente después del contacto con la superficie cambiara las propiedades del sustrato y afectará directamente la adhesión bacteriana (Whitehead & Verran, 2009). De esta forma, en los sustratos de esmalte y TiPT en los cuales una PS estuvo presente, la adhesión bacteriana disminuyó significativamente, observándose conteos de células bacterianas a las 12 hrs de incubación anaeróbica similares entre ambos tipos de sustratos. Este hallazgo enfatiza la capacidad protectora de la formación de la PS sobre los sustratos evaluados.

Cuando la PS estuvo ausente, encontramos que la rugosidad e hidrofobicidad jugaron un papel importante en los diferentes patrones de adhesión bacteriana observados en las superficies evaluadas. Con respecto a la rugosidad de superficie, los valores límite que pudieran modular la adhesión bacteriana no han sido claramente definidos. En odontología, la formación incrementada de placa bacteriana ha sido reportada para valores de rugosidad superiores a $0.2 \mu\text{m}$ (Bollen, Lambrechts, & Quirynen, 1997). Sin embargo, nano-modificaciones superficiales tridimensionales que puedan satisfacer la rugosidad necesaria para prevenir la colonización bacteriana y simultáneamente mejorar la integración de tejido duro y blando, requerimientos importantes en sitios transgingivales de implantes dentales, han sido difíciles de lograr. En este estudio, cuando las bacterias fueron cultivadas en las superficies de esmalte y TiPT, sin la previa adsorción de proteínas salivales, se observó una mayor cantidad de bacterias en los sustratos con mayor rugosidad (TiPT, $R_a: 0.45 \pm 0.07 \mu\text{m}$). De esta forma

una correlación positiva entre la rugosidad de la superficie y la adhesión bacteriana *in vitro* fue demostrada.

Con respecto al efecto de la mojabilidad de las superficies en la adhesión bacteriana, previamente se ha reportado que la adhesión bacteriana se ve incrementada en superficies hidrofóbicas (Pringle & Fletcher, 1983). Dicha preferencia por superficies hidrofóbicas ha sido reportado para especies como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* (Gerson & Scheer, 1980). Se considera que materiales hidrofóbicos son más susceptibles a la adhesión bacteriana en comparación con los materiales hidrofílicos (Merritt & An, 2000). Sin embargo, esta observación parece depender de la cepa bacteriana que está siendo estudiada. Al respecto, Boulangé-Petermann et al., observaron que no hay una correlación directa entre la adhesión de *Streptococcus thermophiles* y la mojabilidad de una superficie (Boulangé-Petermann, Baroux, & Bellon-Fontaine, 1993). De esta forma, dependiendo de la hidrofobicidad tanto de la bacteria como de la superficie, las bacterias se adhieren de forma diferente a materiales con diferentes hidrofobicidades (Fletcher & Loeb, 1979; Hogt, et al., 1983; Satou, et al., 1988). En el presente estudio una correlación positiva entre la hidrofobicidad de la superficie, en ausencia de PS adsorbida, y el incremento en la adhesión bacteriana fue observada, ya que mayores conteos bacterianos fueron observados en las superficies hidrofóbicas (TiPT, ángulo de contacto: $92.4 \pm 0.1^\circ$).

Con respecto al efecto del punto isoeléctrico de las superficies evaluadas en la adhesión bacteriana, encontramos que de acuerdo a los valores de pI identificados en ambas superficies, éstas tienden a comportarse de forma similar, es decir, negativamente

cuando se encuentran rodeadas por una solución con un pH fisiológico (Parks, 1965) como la saliva, por lo tanto no se encontró una correlación directa entre este parámetro en las diferencias en la adhesión bacteriana observadas en los sustratos evaluados.

Por otro lado, mediante los análisis por TEM de la biopelícula de 24hrs formada *in situ* sobre los sustratos evaluados, una mayor adhesión bacteriana sobre los sustratos de TiPT fue observada.

A partir de estos hallazgos se podría hipotetizar que el efecto inhibitor de la formación de la PS sobre los sustratos evaluados parece ser crucial durante las etapas iniciales de formación de la biopelícula (a las 12 hrs), mientras que el desarrollo de una biopelícula considerada madura (24 hrs) depende principalmente de la interrelación bacterianas dentro de la biopelícula y de los elementos de defensa del huésped, sin embargo, teniendo en cuenta que diferentes técnicas analíticas fueron utilizadas, se requiere de estudios posteriores para poder resolver dicha hipótesis.

5. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se pudo observar que la composición química de los sustratos evaluados, así como la rugosidad e hidrofobicidad de los mismos tuvieron una mayor influencia en la adsorción de proteínas que los valores de pI de las superficies. Mayor cantidad de proteínas fueron identificadas en las superficies de esmalte en comparación con las superficies TiPT.
- La formación de la PS resultó ser un proceso altamente selectivo. De todas las proteínas identificadas, el 21.27% estuvo presente exclusivamente en las superficies de esmalte, mientras que el 10.33% estuvo presente exclusivamente en las superficies TiPT, el porcentaje restante (68.4%) estuvo presente en ambas superficies. Algunos proteoglicanos identificados exclusivamente en los sustratos TiPT podrían representar blancos potenciales para futuras aplicaciones biomédicas.
- La presencia de glóbulos distribuidos homogéneamente sobre la PS laxamente unida, formada sobre las superficies TiPT indica la adsorción de agregados proteicos.
- La presencia de la PS formada sobre los sustratos de esmalte y TiPT, mostró ser un factor crucial disminuyendo la cantidad de bacterias sobre los sustratos evaluados, independientemente de la rugosidad e hidrofobicidad de las superficies. Mientras que en ausencia de PS sobre los sustratos de esmalte y de TiPT, la rugosidad promedio y la mojabilidad de la superficie mostraron ser los

factores cruciales para el incremento de la formación de la biopelícula en las superficies más rugosas (TiPT).

6. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

En este estudio se realizó el hallazgo de 329 proteínas presentes en la PS formada sobre superficies de esmalte y titanio, e interesantemente se encontraron proteínas (10 % aproximadamente), de las cuales se desconoce hasta ahora su función fisiológica.

Esto hace necesario pensar en estudios adicionales para comprender las funciones de estas proteínas y de todas las proteínas identificadas en procesos biológicos relacionados con la integración de biomateriales metálicos con el huésped, así como ensayos adicionales para dilucidar el mecanismo de adsorción de las proteínas identificadas en la PS formada sobre los sustratos evaluados.

Por otro lado, también son necesarios más estudios para entender el papel particular que juegan las proteínas de la PS en la adhesión bacteriana y formación de biopelículas. De esta forma, mediante la utilización de que técnicas de identificación bacteriana, se podría llegar a una mejor comprensión de la interacción que existe entre los componentes naturales de la PS con las especies bacterianas involucradas con el desarrollo de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos con la intención de contribuir al desarrollo de tratamientos preventivos/terapéuticos que permitan modular la colonización bacteriana sobre biomateriales metálicos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1999). *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*. . Paper presented at the Papers, Oak Brook, Illinois.
- Abe, M. (1982). Oxides and hydrous oxides of multivalent metals as inorganic ion exchangers. *Inorganic Ion Exchange Materials*, 179-185.
- Akbarshahi, H., Axelsson, J. B., Said, K., Malmstrom, A., Fischer, H. & Andersson, R. (2011). TLR4 dependent heparan sulphate-induced pancreatic inflammatory response is IRF3-mediated. *J Transl Med*, **9**, 219.
- Albrektsson, T. & Hansson, H. A. (1986). An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. *Biomaterials*, **7**, 201-205.
- Almaguer-Flores, A., Olivares-Navarrete, R., Wieland, M., Ximenez-Fyvie, L. A., Schwartz, Z. & Boyan, B. D. (2012). Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro. *Clin Oral Implants Res*, **23**, 301-307.
- Almaguer-Flores, A., Olivares-Navarrete, R., Ximenez-Fyvie, L. A., Garcia-Zarco, O. & Rodil, S. E. (2009). Biocompatibility and Anti-microbial Properties of Silver Modified Amorphous Carbon Films. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc*, **1244**.
- Almaguer-Flores, A., Ximenez-Fyvie, L. A. & Rodil, S. E. (2011). Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **92**, 196-204.
- Ambatipudi, K. S., Lu, B., Hagen, F. K., Melvin, J. E. & Yates, J. R. (2009). Quantitative analysis of age specific variation in the abundance of human female parotid salivary proteins. *J Proteome Res*, **8**, 5093-5102.
- An, Y. H. & Friedman, R. J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*, **43**, 338-348.
- Andrade, J. D. & Hlady, V. (1986). Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses In *Biopolymers/Non-Exclusion HPLC*, pp. 1-63: Springer.
- Armstrong, W. G. (1968). Origin and nature of the acquired pellicle. *Proc R Soc Med*, **61**, 923-930.
- Axelsson, J., Xu, D., Kang, B. N., Nussbacher, J. K., Handel, T. M., Ley, K., Sriramarao, P. & Esko, J. D. (2012). Inactivation of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase accentuates neutrophil infiltration during acute inflammation in mice. *Blood*, **120**, 1742-1751.
- Ayad, S., Boot-Handford, R., Humphries, M., Kadler, K. & Shuttleworth, A. (1998). *The extracellular matrix factsbook*: Academic Press.
- Baechle, D., Flad, T., Cansier, A., Steffen, H., Schittek, B., Tolson, J., Herrmann, T., Dihazi, H., Beck, A., Mueller, G. A., Mueller, M., Stevanovic, S., Garbe, C., Mueller, C. A. & Kalbacher, H. (2006). Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *J Biol Chem*, **281**, 5406-5415.
- Baier, R. E. & Glantz, P. O. (1978). Characterization of oral in vivo films formed on different types of solid surfaces. *Acta Odontol Scand*, **36**, 289-301.
- Baldini, C., Giusti, L., Ciregia, F., Da Valle, Y., Giacomelli, C., Donadio, E., Sernissi, F., Bazzichi, L., Giannaccini, G., Bombardieri, S. & Lucacchini, A. (2011). Proteomic analysis of saliva: a unique tool to distinguish primary Sjögren's syndrome from secondary Sjögren's syndrome and other sicca syndromes. *Arthritis Res Ther*, **13**, R194.
- Baliga, S., Muglikar, S. & Kale, R. (2013). Salivary pH: A diagnostic biomarker. *J Indian Soc Periodontol*, **17**, 461-465.
- Bankowska, A., Gacko, M., Chyczewska, E. & Worowska, A. (1997). Biological and diagnostic role of cathepsin D. *Rocz Akad Med Białymst*, **42 Suppl 1**, 79-85.
- Baron, A., Barrett-Vespone, N. & Featherstone, J. (1999). Purification of large quantities of human salivary cystatins S, SA and SN: their interactions with the model cysteine protease papain in a non-inhibitory mode. *Oral Dis*, **5**, 344-353.

- Becker, W., Becker, B. E., Newman, M. G. & Nyman, S. (1990). Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **5**, 31-38.
- Bennick, A. (1977). The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein C, and comparison with calcium binding to protein A, a related salivary phosphoprotein. *Biochem J*, **163**, 241-245.
- Bennick, A., Chau, G., Goodlin, R., Abrams, S., Tustian, D. & Madapallimattam, G. (1983). The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch Oral Biol*, **28**, 19-27.
- Berg, I. C., Rutland, M. W. & Arnebrant, T. (2003). Lubricating properties of the initial salivary pellicle--an AFM study. *Biofouling*, **19**, 365-369.
- Bernardi, G. & Kawasaki, T. (1968). Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. *Biochim Biophys Acta*, **160**, 301-310.
- Berthold, P. (1979). Formation of salivary coating and dental plaque on two different supporting materials. An electron microscopic study. *J Periodontol*, **50**, 397-405.
- Binon, P. P., Weir, D. J. & Marshall, S. J. (1992). Surface analysis of an original Brånemark implant and three related clones. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **7**, 168-175.
- Bollen, C. M., Lambrechts, P. & Quirynen, M. (1997). Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*, **13**, 258-269.
- Boulangé-Petermann, L. (1996). Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. *Biofouling*, **10**, 275-300.
- Boulangé-Petermann, L., Baroux, B. & Bellon-Fontaine, M.-N. (1993). The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion. *Journal of adhesion science and technology*, **7**, 221-230.
- Bragger, U., Karoussis, I., Persson, R., Pjetursson, B., Salvi, G. & Lang, N. (2005). Technical and biological complications/failures with single crowns and fixed partial dentures on implants: a 10-year prospective cohort study. *Clin Oral Implants Res*, **16**, 326-334.
- Branemark, P. I., Hansson, B. O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J., Hallen, O. & Ohman, A. (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*, **16**, 1-132.
- Cacciafesta, P., Hallam, K. R., Watkinson, A. C., Allen, G. C., Miles, M. J. & Jandt, K. D. (2001). Visualisation of human plasma fibrinogen adsorbed on titanium implant surfaces with different roughness. *Surface Science*, **491**, 405-420.
- Cavalcanti, I. M., Ricomini Filho, A. P., Lucena-Ferreira, S. C., da Silva, W. J., Paes Leme, A. F., Senna, P. M. & Del Bel Cury, A. A. (2014). Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol*, **59**, 695-703.
- Cleaves Ii, H. J. J. (2011). Isoelectric Point In *Encyclopedia of Astrobiology*, pp. 858-858: Springer.
- Correnti, C. & Strong, R. K. (2012). Mammalian siderophores, siderophore-binding lipocalins, and the labile iron pool. *J Biol Chem*, **287**, 13524-13531.
- Costerton, J. W. (2005). Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res*, 7-11.
- Costerton, J. W., Montanaro, L. & Arciola, C. R. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*, **28**, 1062-1068.
- Couchman, J. R. (2010). Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **26**, 89-114.
- Chang, W. I., Chang, J. Y., Kim, Y. Y., Lee, G. & Kho, H. S. (2011). MUC1 expression in the oral mucosal epithelial cells of the elderly. *Arch Oral Biol*, **56**, 885-890.
- Chung, H., Multhaupt, H. A., Oh, E. S. & Couchman, J. R. (2016). Minireview: Syndecans and their crucial roles during tissue regeneration. *FEBS Lett*, **590**, 2408-2417.
- Dawes, C., Jenkins, G. N. & Tonge, C. H. (1963). The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. *Br Dent J*, **115**, 65-68.
- de Almeida Pdel, V., Gregio, A. M., Machado, M. A., de Lima, A. A. & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*, **9**, 72-80.

- Deimling, D., Breschi, L., Hoth-Hannig, W., Ruggeri, A., Hannig, C., Nekrashevych, Y., Prati, C. & Hannig, M. (2004). Electron microscopic detection of salivary alpha-amylase in the pellicle formed in situ. *Eur J Oral Sci*, **112**, 503-509.
- Dickinson, D. P. (2002a). Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, **13**, 238-275.
- Dickinson, D. P. (2002b). Salivary (SD-type) cystatins: over one billion years in the making--but to what purpose? *Crit Rev Oral Biol Med*, **13**, 485-508.
- Dodds, M. W., Johnson, D. A. & Yeh, C. K. (2005). Health benefits of saliva: a review. *J Dent*, **33**, 223-233.
- Dorkhan, M., Svensater, G. & Davies, J. R. (2013). Salivary pellicles on titanium and their effect on metabolic activity in *Streptococcus oralis*. *BMC Oral Health*, **13**, 32.
- Du, Z. P., Wu, B. L., Wu, X., Lin, X. H., Qiu, X. Y., Zhan, X. F., Wang, S. H., Shen, J. H., Zheng, C. P., Wu, Z. Y., Xu, L. Y., Wang, D. & Li, E. M. (2015). A systematic analysis of human lipocalin family and its expression in esophageal carcinoma. *Sci Rep*, **5**, 12010.
- Egberts, F., Heinrich, M., Jensen, J. M., Winoto-Morbach, S., Pfeiffer, S., Wickel, M., Schunck, M., Steude, J., Saftig, P., Proksch, E. & Schutze, S. (2004). Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci*, **117**, 2295-2307.
- Esposito, M., Coulthard, P., Thomsen, P. & Worthington, H. V. (2005). Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003815.
- Esposito, M., Hirsch, J. M., Lekholm, U. & Thomsen, P. (1998a). Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*, **106**, 527-551.
- Esposito, M., Hirsch, J. M., Lekholm, U. & Thomsen, P. (1998b). Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci*, **106**, 721-764.
- Falla-Sotelo, F. O., Rizzutto, M. A., Tabacniks, M. H., Added, N., Barbosa, M. D. L., Markarian, R. A., Quinelato, A., Mori, M. & Youssef, M. (2005). Analysis and discussion of trace elements in teeth of different animal species. *Brazilian Journal of Physics*, **35**, 761-762.
- Filmus, J., Capurro, M. & Rast, J. (2008). Glypicans. *Genome Biol*, **9**, 224.
- Fletcher, M. & Loeb, G. I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*, **37**, 67-72.
- Foster, J. (1960). *Plasma albumin. The plasma proteins*. New York, USA.
- Furst, M. M., Salvi, G. E., Lang, N. P. & Persson, G. R. (2007). Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*, **18**, 501-508.
- Gerson, D. F. & Scheer, D. (1980). Cell surface energy, contact angles and phase partition. III. Adhesion of bacterial cells to hydrophobic surfaces. *Biochim Biophys Acta*, **602**, 506-510.
- Gibbons, R. J. (1996). Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. *J Dent Res*, **75**, 866-870.
- Goldberg, R., Meirovitz, A., Hirshoren, N., Bulvik, R., Binder, A., Rubinstein, A. M. & Elkin, M. (2013). Versatile role of heparanase in inflammation. *Matrix Biol*, **32**, 234-240.
- Griffith, L. G. (2000). Polymeric biomaterials. *Acta materialia*, **48**, 263-277.
- Grossner-Schreiber, B., Griepentrog, M., Haustein, I., Muller, W. D., Lange, K. P., Briedigkeit, H. & Gobel, U. B. (2001). Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*, **12**, 543-551.
- Guicciardi, M. E., Leist, M. & Gores, G. J. (2004). Lysosomes in cell death. *Oncogene*, **23**, 2881-2890.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Goodson, J. M. (1983). Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol*, **10**, 298-310.
- Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol*, **13**, 7-10.
- Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E. & Al-Ahmad, A. (2007). Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol*, **52**, 1048-1056.
- Hannig, C., Hoch, J., Becker, K., Hannig, M. & Attin, T. (2005a). Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Arch Oral Biol*, **50**, 821-828.

- Hannig, C., Wasser, M., Becker, K., Hannig, M., Huber, K. & Attin, T. (2006). Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in situ. *J Biomed Mater Res A*, **78**, 755-761.
- Hannig, M. (1997). Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci*, **105**, 422-433.
- Hannig, M. (2002). The protective nature of the salivary pellicle. *International dental journal*, **52**, 417-423.
- Hannig, M., Herzog, S., Willigeroth, S. F. & Zimehl, R. (2001). Atomic force microscopy study of salivary pellicles formed on enamel and glass in vivo. *Colloid and Polymer Science*, **279**, 479-483.
- Hannig, M. & Joiner, A. (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci*, **19**, 29-64.
- Hannig, M., Khanafer, A. K., Hoth-Hannig, W., Al-Marrawi, F. & Acil, Y. (2005b). Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. *Clin Oral Investig*, **9**, 30-37.
- Hay, D. I., Moreno, E. C. & Schlesinger, D. H. (1979). Phosphoprotein-inhibitors of calcium-phosphate precipitation from salivary secretions. *Inorganic Perspectives in Biology and Medicine*, **2**, 271-285.
- He, L. H. & Swain, M. V. (2008). Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *J Mech Behav Biomed Mater*, **1**, 18-29.
- Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E. & Tanford, C. (1979). Properties of detergents. *Methods Enzymol*, **56**, 734-749.
- Helenius, A. & Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta*, **415**, 29-79.
- Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J*, **54 Suppl 1**, S11-26.
- Hilvo, M., Baranauskienė, L., Salzano, A. M., Scalon, A., Matulis, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Monti, S. M., Di Fiore, A., De Simone, G., Lindfors, M., Janis, J., Valjakka, J., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kulomaa, M. S., Nordlund, H. R., Supuran, C. T. & Parkkila, S. (2008). Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem*, **283**, 27799-27809.
- Hogt, A. H., Dankert, J., de Vries, J. A. & Feijen, J. (1983). Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *J Gen Microbiol*, **129**, 2959-2968.
- Hori, K. & Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, **48**, 424-434.
- Hu, S., Xie, Y., Ramachandran, P., Ogorzalek Loo, R. R., Li, Y., Loo, J. A. & Wong, D. T. (2005). Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics*, **5**, 1714-1728.
- Hultin, M., Gustafsson, A., Hallstrom, H., Johansson, L. A., Ekfeldt, A. & Klinge, B. (2002). Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*, **13**, 349-358.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25.
- ISO, I. S. O. (2003). TS 11405: Dental materials-testing of adhesion to tooth structure. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization ISO Central Secretariat.
- Ivanoff, C. J., Grondahl, K., Bergstrom, C., Lekholm, U. & Branemark, P. I. (2000). Influence of bicortical or monocortical anchorage on maxillary implant stability: a 15-year retrospective study of Branemark System implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **15**, 103-110.
- Jager, D. H., Vieira, A. M., Ligtenberg, A. J., Bronkhorst, E., Huysmans, M. C. & Vissink, A. (2011). Effect of salivary factors on the susceptibility of hydroxyapatite to early erosion. *Caries Res*, **45**, 532-537.
- Jenkinson, H. & Lamont, R. (1997). Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med*, **8**, 175-200.
- Johnson, G. B., Brunn, G. J., Kodaira, Y. & Platt, J. L. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol*, **168**, 5233-5239.
- Juhl, M., Reibel, J. & Stoltze, K. (1989). Immunohistochemical distribution of keratin proteins in clinically healthy human gingival epithelia. *Scand J Dent Res*, **97**, 159-170.

- Kasemo, B. (1983). Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent*, **49**, 832-837.
- Kelly, J. R., Nishimura, I. & Campbell, S. D. (1996). Ceramics in dentistry: historical roots and current perspectives. *J Prosthet Dent*, **75**, 18-32.
- Kidoaki, S. & Matsuda, T. (1999). Adhesion forces of the blood plasma proteins on self-assembled monolayer surfaces of alkanethiolates with different functional groups measured by an atomic force microscope. *Langmuir*, **15**, 7639-7646.
- Klinger, A., Steinberg, D., Kohavi, D. & Sela, M. N. (1997). Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro. *J Biomed Mater Res*, **36**, 387-392.
- Kohavi, D., Klinger, A., Steinberg, D., Mann, E. & Sela, N. M. (1997). alpha-Amylase and salivary albumin adsorption onto titanium, enamel and dentin: an in vivo study. *Biomaterials*, **18**, 903-906.
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Jr., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I. & Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*, **42**, 47-79.
- Kornfeld, S. (1990). Lysosomal enzyme targeting. *Biochem Soc Trans*, **18**, 367-374.
- Kottke-Marchant, K., Anderson, J. M., Umemura, Y. & Marchant, R. E. (1989). Effect of albumin coating on the in vitro blood compatibility of Dacron arterial prostheses. *Biomaterials*, **10**, 147-155.
- Kousvelari, E. E., Baratz, R. S., Burke, B. & Oppenheim, F. G. (1980). Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle, and glandular tissue specimens. *J Dent Res*, **59**, 1430-1438.
- Krajewski, A., Malavolti, R., & Piancastelli, A. (1996). Albumin adhesion on some biological and non-biological glasses and connection with their Z-potentials. *Biomaterials*, **17**, 53-60.
- Krajewski, A., Piancastelli, A. & Malavolti, R. (1998). Albumin adhesion on ceramics and correlation with their Z-potential. *Biomaterials*, **19**, 637-641.
- Kratz, F., Grass, S., Umanskaya, N., Scheibe, C., Muller-Renno, C., Davoudi, N., Hannig, M. & Ziegler, C. (2015). Cleaning of biomaterial surfaces: protein removal by different solvents. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **128**, 28-35.
- Kratz, F., Müller, C., Körber, N., Umanskaya, N., Hannig, M. & Ziegler, C. (2013). Characterization of protein films on dental materials: Bicinchoninic acid assay (BCA) studies on loosely and firmly adsorbed protein layers. *physica status solidi (a)*, **210**, 964-967.
- Kuboki, Y., Teraoka, K. & Okada, S. (1987). X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. *J Dent Res*, **66**, 1016-1019.
- Lang, N. P., Bragger, U., Walther, D., Beamer, B. & Kornman, K. S. (1993). Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings. *Clin Oral Implants Res*, **4**, 2-11.
- Lausmaa, J., Ask, M., Rolander, U. & Kasemo, B. (1989). Preparation and analysis of Ti and alloyed Ti surfaces used in the evaluation of biological response. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc*, **110**, 647-653.
- Lausmaa, J., Kasemo, B. & Mattsson, H. (1990). Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *Applied Surface Science*, **44**, 133-146.
- Leach, S. A. & Saxton, C. A. (1966). An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. *Arch Oral Biol*, **11**, 1081-1094.
- Lee, R. G., Adamson, C. & Kim, S. W. (1974). Competitive adsorption of plasma proteins onto polymer surfaces. *Thromb Res*, **4**, 485-490.
- Leinonen, J., Kivela, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K. & Rajaniemi, H. (1999). Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. *Caries Res*, **33**, 185-190.
- Lekholm, U., Gunne, J., Henry, P., Higuchi, K., Linden, U., Bergstrom, C. & van Steenberghe, D. (1999). Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 10-year prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **14**, 639-645.
- Lendenmann, U., Grogan, J. & Oppenheim, F. G. (2000). Saliva and dental pellicle - a review. *Adv Dent Res*, **14**, 22-28.
- Leonhardt, A., Berglundh, T., Ericsson, I. & Dahlen, G. (1992). Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res*, **3**, 112-119.

- Leonhardt, A., Dahlen, G. & Renvert, S. (2003). Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. *J Periodontol*, **74**, 1415-1422.
- Leonhardt, A., Renvert, S. & Dahlen, G. (1999). Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res*, **10**, 339-345.
- Lindh, L., Glantz, P. O., Strömberg, N. & Arnebrant, T. (2002). On the adsorption of human acidic proline-rich proteins (PRP-1 and PRP-3) and statherin at solid/liquid interfaces. *Biofouling*, **18**, 87-94.
- Liu, X. Y., Chu, P. K. & Ding, C. X. (2004). Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science & Engineering R-Reports*, **47**, 49-121.
- Luan, Y., Li, D., Wang, Y., Liu, X., Brash, J. L. & Chen, H. (2014). 125I-radiolabeling, surface plasmon resonance, and quartz crystal microbalance with dissipation: three tools to compare protein adsorption on surfaces of different wettability. *Langmuir*, **30**, 1029-1035.
- Lundqvist, M., Sethson, I. & Jonsson, B.-H. (2004). Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir*, **20**, 10639-10647.
- Marsh, P. D. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, **8**, 263-271.
- Martinez-Hernandez, M., Olivares-Navarrete, R. & Almaguer-Flores, A. (2014). Influence of the periodontal status on the initial-biofilm formation on titanium surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*, **18**, 174-181.
- Martínez-Hernández, M., Olivares-Navarrete, R. & Almaguer-Flores, A. (2014). Influence of the periodontal status on the initial-biofilm formation on titanium surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*.
- McKee, P. A., Mattock, P. & Hill, R. L. (1970). Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin, and cross-linked insoluble fibrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **66**, 738-744.
- Meckel, A. H. (1965). The formation and properties of organic films on teeth. *Arch Oral Biol*, **10**, 585-598.
- Merritt, K. & An, Y. H. (2000). Factors influencing bacterial adhesion In *Handbook of Bacterial Adhesion*, pp. 53-72: Springer.
- Mohamed, M. M. & Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature Reviews Cancer*, **6**, 764-775.
- Mohamed, R., Campbell, J. L., Cooper-White, J., Dimeski, G. & Punyadeera, C. (2012). The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays. *Clin Transl Med*, **1**, 19.
- 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.
- Mombelli, A., van Oosten, M. A., Schurch, E., Jr. & Land, N. P. (1987). The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*, **2**, 145-151.
- Moreno, E. C., Varughese, K. & Hay, D. I. (1979). Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif Tissue Int*, **28**, 7-16.
- Mozes, N., Marchal, F., Hermesse, M. P., Van Haecht, J. L., Reuliaux, L., Leonard, A. J. & Rouxhet, P. G. (1987). Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. *Biotechnol Bioeng*, **30**, 439-450.
- Muller, C., Luders, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M. & Ziegler, C. (2010). Initial bioadhesion on dental materials as a function of contact time, pH, surface wettability, and isoelectric point. *Langmuir*, **26**, 4136-4141.
- Nakanishi, K., Sakiyama, T. & Imamura, K. (2001). On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng*, **91**, 233-244.
- Nakazato, G., Tsuchiya, H., Sato, M. & Yamauchi, M. (1989). In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **4**, 321-326.
- NIH (2010). National Institutes of Health. Technology Assessment Conference Summary.

- Noh, H. & Vogler, E. A. (2007). Volumetric interpretation of protein adsorption: competition from mixtures and the Vroman effect. *Biomaterials*, **28**, 405-422.
- Olefjord, I. & Hansson, S. (1993). Surface analysis of four dental implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **8**, 32-40.
- Parks, G. A. (1965). The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxo complex systems. *Chemical Reviews*, **65**, 177-198.
- Parsegian, V. A. (1983). Molecular forces governing tight contact between cellular surfaces and substrates. *J Prosthet Dent*, **49**, 838-842.
- Pegueroles, M., Tonda-Turo, C., Planell, J. A., Gil, F. J. & Aparicio, C. (2012). Adsorption of fibronectin, fibrinogen, and albumin on TiO₂: time-resolved kinetics, structural changes, and competition study. *Biointerphases*, **7**, 48.
- Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H. & Williams, D. W. (2011). Introduction to biofilms In *Biofilms and veterinary medicine*, pp. 41-68: Springer.
- Pringle, J. H. & Fletcher, M. (1983). Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*, **45**, 811-817.
- Ramirez Rozzi, F. (1998). Enamel structure and development and its application in hominid evolution and taxonomy. *J Hum Evol*, **35**, 327-330.
- Rams, T. E., Roberts, T. W., Feik, D., Molzan, A. K. & Slots, J. (1991). Clinical and microbiological findings on newly inserted hydroxyapatite-coated and pure titanium human dental implants. *Clin Oral Implants Res*, **2**, 121-127.
- Rechendorff, K., Hovgaard, M. B., Foss, M., Zhdanov, V. P. & Besenbacher, F. (2006). Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir*, **22**, 10885-10888.
- Roach, P., Farrar, D. & Perry, C. C. (2005). Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc*, **127**, 8168-8173.
- Roach, P., Farrar, D. & Perry, C. C. (2006). Surface tailoring for controlled protein adsorption: effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *J Am Chem Soc*, **128**, 3939-3945.
- Rolla, G. (1977). Formation of dental integuments--some basic chemical considerations. *Swed Dent J*, **1**, 241-251.
- Rölla, G., Ciardi, J. E. & Bowen, W. H. (1983). Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, α -amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res*, **91**, 186-190.
- Rosa, N., Correia, M. J., Arrais, J. P., Lopes, P., Melo, J., Oliveira, J. L. & Barros, M. (2012). From the salivary proteome to the OralOme: comprehensive molecular oral biology. *Arch Oral Biol*, **57**, 853-864.
- Rosenberg, E. S., Torosian, J. P. & Slots, J. (1991). Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res*, **2**, 135-144.
- Rosengren, A., Johansson, B. R., Danielsen, N., Thomsen, P. & Ericson, L. E. (1996). Immunohistochemical studies on the distribution of albumin, fibrinogen, fibronectin, IgG and collagen around PTFE and titanium implants. *Biomaterials*, **17**, 1779-1786.
- Ruoslahti, E. & Reed, J. C. (1994). Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell*, **77**, 477-478.
- Sakiyama, T., Tomura, J., Imamura, K. & Nakanishi, K. (2004). Adsorption characteristics of bovine serum albumin and its peptide fragments on a stainless steel surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerphases*, **33**, 77-84.
- Salasznyk, R. M., Williams, W. A., Boskey, A., Batorsky, A. & Plopper, G. E. (2004). Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol*, **2004**, 24-34.
- Satou, N., Satou, J., Shintani, H. & Okuda, K. (1988). Adherence of streptococci to surface-modified glass. *J Gen Microbiol*, **134**, 1299-1305.
- Schupbach, P., Oppenheim, F. G., Lendenmann, U., Lamkin, M. S., Yao, Y. & Guggenheim, B. (2001). Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro. *Eur J Oral Sci*, **109**, 60-68.

- Schwarz, F., Ferrari, D., Herten, M., Mihatovic, I., Wieland, M., Sager, M. & Becker, J. (2007a). Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at non-submerged titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *J Periodontol*, **78**, 2171-2184.
- Schwarz, F., Sculean, A., Wieland, M., Horn, N., Nuesry, E., Bube, C. & Becker, J. (2007b). Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. *Mund Kiefer Gesichtschir*, **11**, 333-338.
- Sigal, G. B., Mrksich, M. & Whitesides, G. M. (1998). Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 3464-3473.
- Silvennoinen, R., Hason, S., Vetterl, V., Penttinen, N., Silvennoinen, M., Myller, K., Cernochova, P., Bartakova, S., Prachar, P. & Cvrcek, L. (2010). Diffractive-optics-based sensor as a tool for detection of biocompatibility of titanium and titanium-doped hydrocarbon samples. *Appl Opt*, **49**, 5583-5591.
- Silvennoinen, R., Vanek, J., Silvennoinen, M., Penttinen, N., Prachár, P., Bartáková, S., Hason, S., Brezina, V. & Vetterl, V. (2011). *Optical detection of protein adsorption on doped titanium surface*: INTECH Open Access Publisher.
- Silvennoinen, R., Vetterl, V., Hason, S., Tuononen, H., Silvennoinen, M., Myller, K., Cvrcek, L., Vanek, J. & Prachar, P. (2008). Sensing of human plasma fibrinogen on polished, chemically etched and carbon treated titanium surfaces by diffractive optical element based sensor. *Opt Express*, **16**, 10130-10140.
- Sipahi, C., Anil, N. & Bayramli, E. (2001). The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent*, **29**, 197-204.
- Siqueira, W. L., Zhang, W., Helmerhorst, E. J., Gygi, S. P. & Oppenheim, F. G. (2007). Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res*, **6**, 2152-2160.
- Skjorland, K. K., Rykke, M. & Sonju, T. (1995). Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand*, **53**, 358-362.
- Slots, J. & Rams, T. E. (1991). New views on periodontal microbiota in special patient categories. *J Clin Periodontol*, **18**, 411-420.
- Smith, R. A., Mosesson, M. W., Daniels, A. U. & Gartner, T. K. (2000). Adhesion of microvascular endothelial cells to metallic implant surfaces. *J Mater Sci Mater Med*, **11**, 279-285.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, **25**, 134-144.
- Sodhi, R. N. S. (1996). Application of surface analytical and modification techniques to biomaterial research. *Journal of electron spectroscopy and related phenomena*, **81**, 269-284.
- Solar, R. J., Pollack, S. R. & Korostoff, E. (1979). In vitro corrosion testing of titanium surgical implant alloys: an approach to understanding titanium release from implants. *J Biomed Mater Res*, **13**, 217-250.
- Souto, B. M. & Burstein, G. T. (1996). A preliminary investigation into the microscopic depassivation of passive titanium implant materials in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **7**, 337-343.
- Srivastava, S., Verma, A., Frankamp, B. L. & Rotello, V. M. (2005). Controlled assembly of protein-nanoparticle composites through protein surface recognition. *Advanced Materials*, **17**, 617-621.
- Steinberg, D., Klinger, A., Kohavi, D. & Sela, M. N. (1995). Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorption of human salivary albumin. *Biomaterials*, **16**, 1339-1343.
- Tanner, A., Maiden, M. F., Lee, K., Shulman, L. B. & Weber, H. P. (1997). Dental implant infections. *Clin Infect Dis*, **25 Suppl 2**, S213-217.
- Taylor, J. B., Carrano, A. L. & Kandlikar, S. G. (2006). Characterization of the effect of surface roughness and texture on fluid flow-past, present, and future. *International journal of thermal sciences*, **45**, 962-968.
- Tengvall, P. & Lundstrom, I. (1992). Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. *Clin Mater*, **9**, 115-134.

- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I. & Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, **17 Suppl 2**, 68-81.
- Texture, S. (1995). Surface roughness, waviness and lay. *American Society of Mechanical Engineers Standard B*, **46**, 1.
- Tinanoff, N., Glick, P. L. & Weber, D. F. (1976). Ultrastructure of organic films on the enamel surface. *Caries Res*, **10**, 19-32.
- Tschernitschek, H., Borchers, L. & Geurtsen, W. (2005). Nonalloyed titanium as a bioinert metal--a review. *Quintessence Int*, **36**, 523-530.
- Vacca-Smith, A. M., Venkitaraman, A. R., Quivey, R. G., Jr. & Bowen, W. H. (1996a). Interactions of streptococcal glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol*, **41**, 291-298.
- Vacca-Smith, A. M., Venkitaraman, A. R., Schilling, K. M. & Bowen, W. H. (1996b). Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. *Caries Res*, **30**, 354-360.
- van Steenberghe, D., Lekholm, U., Bolender, C., Folmer, T., Henry, P., Herrmann, I., Higuchi, K., Laney, W., Linden, U. & Astrand, P. (1990). The applicability of osseointegrated oral implants in the rehabilitation of partial edentulism: a prospective multicenter study on 558 fixtures. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **5**, 272-281.
- Vansteenkiste, S. O., Davies, M. C., Roberts, C. J., Tendler, S. J. B. & Williams, P. M. (1998). Scanning probe microscopy of biomedical interfaces. *Progress in surface science*, **57**, 95-136.
- Vassilakos, N., Arnebrant, T. & Glantz, P. O. (1993). An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. *Scand J Dent Res*, **101**, 133-137.
- Vassilakos, N., Arnebrant, T., Rundegren, J. & Glantz, P. O. (1992). In vitro interactions of anionic and cationic surfactants with salivary fractions on well-defined solid surfaces. *Acta Odontol Scand*, **50**, 179-188.
- Vitorino, R., de Moraes Guedes, S., Ferreira, R., Lobo, M. J., Duarte, J., Ferrer-Correia, A. J., Tomer, K. B., Domingues, P. M. & Amado, F. M. (2006). Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *Eur J Oral Sci*, **114**, 147-153.
- Vogler, E. A. (1998). Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interface Sci*, **74**, 69-117.
- Vogler, E. A. (1999). Water and the acute biological response to surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed*, **10**, 1015-1045.
- Wälivaara, B., Aronsson, B. O., Rodahl, M., Lausmaa, J. & Tengvall, P. (1994). Titanium with different oxides: in vitro studies of protein adsorption and contact activation. *Biomaterials*, **15**, 827-834.
- Wenzel, R. N. (1936). Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry*, **28**, 988-994.
- Wettero, J., Tengvall, P. & Bengtsson, T. (2003). Platelets stimulated by IgG-coated surfaces bind and activate neutrophils through a selectin-dependent pathway. *Biomaterials*, **24**, 1559-1573.
- Whitehead, K. A. & Verran, J. (2009). The effect of substratum properties on the survival of attached microorganisms on inert surfaces In *Marine and industrial biofouling*, pp. 13-33: Springer.
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D. & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, **175**, 231-237.
- Wilhelm, K. (1940). Method for manufacturing titanium and alloys thereof: U. S. Patent No 2, 205, 854, 25 Jun. 1940.
- Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I. & Percy, M. J. (2005). Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng*, **11**, 1-18.
- Williams, D. F. (1976). Corrosion of implant materials. *Annual review of materials science*, **6**, 237-266.
- Williams, D. F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, **30**, 5897-5909.
- Wolinsky, L. E., de Camargo, P. M., Erard, J. C. & Newman, M. G. (1989). A study of in vitro attachment of *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* to saliva-treated titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **4**, 27-31.

- Wyatt, C. C. & Zarb, G. A. (1998). Treatment outcomes of patients with implant-supported fixed partial prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **13**, 204-211.
- Xie, H., Cook, G. S., Costerton, J. W., Bruce, G., Rose, T. M. & Lamont, R. J. (2000). Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol*, **182**, 7067-7069.
- Xu, L. C. & Siedlecki, C. A. (2007). Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, **28**, 3273-3283.
- Yao, Y., Berg, E. A., Costello, C. E., Troxler, R. F. & Oppenheim, F. G. (2003). Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem*, **278**, 5300-5308.
- Yao, Y., Grogan, J., Zehnder, M., Lendenmann, U., Nam, B., Wu, Z., Costello, C. E. & Oppenheim, F. G. (2001). Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol*, **46**, 293-303.
- Yao, Y., Lamkin, M. S. & Oppenheim, F. G. (1999). Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase. *J Dent Res*, **78**, 1696-1703.
- Yoon, R. H., Flinn, D. H. & Rabinovich, Y. I. (1997). Hydrophobic Interactions between Dissimilar Surfaces. *J Colloid Interface Sci*, **185**, 363-370.
- Young, T. (1805). An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 65-87.
- Yuan, Y. & Lee, T. R. (2013). Contact angle and wetting properties In *Surface science techniques*, pp. 3-34: Springer.
- Zarb, G. A. & Schmitt, A. (1990). The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants: the Toronto study. Part III: Problems and complications encountered. *The Journal of prosthetic dentistry*, **64**, 185-194.
- Zitter, H. & Plenk, H., Jr. (1987). The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility. *J Biomed Mater Res*, **21**, 881-896.

8. ANEXOS

8.1 Consentimiento Informado

A continuación se muestra una copia del consentimiento informado que fue proporcionado a cada sujeto donador de las muestras de saliva que participaron en el presente estudio.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. Argelia Almaguer Flores

CLÍNICO RESPONSABLE: M. Cs. Miryam Martínez Hernández.

INSTITUCIÓN: División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM.

TELÉFONO: 5622-5565 (horas y días hábiles).

TÍTULO DEL PROYECTO: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA PELÍCULA SALIVAL
ADQUIRIDA HUMANA FORMADA SOBRE SUPERFICIES DE
TITANIO Y SU EFECTO EN LA FORMACIÓN INICIAL DE
BIOPELÍCULAS (**IACOD # I1201711**).

INVITACIÓN A PARTICIPAR: Usted está invitado a participar en un estudio de investigación que analiza las proteínas presentes en la saliva, evaluando como se pegan estas proteínas a superficies presentes en la boca y su efecto en la adhesión de bacterias de la boca.

PROPÓSITO: Usted debe entender que los objetivos del estudio son determinar la identidad y cantidad de proteínas presentes en la saliva de personas con diferentes tipos de enfermedades de las encías y relacionar la presencia de estas proteínas pegadas en superficies de la boca con la adhesión de ciertas bacterias orales.

PROCEDIMIENTOS: Usted debe entender que para participar en el estudio no debe padecer ninguna enfermedad sistémica (incluyendo: diabetes, VIH, enfermedades autoinmunes, etc.) ni estar tomando algún medicamento y no ser fumador actual (por lo menos un año antes). Debe tener por lo menos 20 dientes naturales en la boca, no puede haber recibido una limpieza dental profesional en el último mes y no puede haber tomado ningún tipo de antibiótico en los últimos 3 meses. Asimismo, en el caso de ser mujer, no puede estar embarazada ni lactando.

Usted debe entender que su participación en este estudio de investigación requiere uno o más de los siguientes procedimientos:

- **La realización de una evaluación periodontal completa**, la cual consistirá en medir la profundidad de las pequeñas “bolsas” que se encuentran entre sus dientes y sus encías. Estas medidas serán tomadas con un instrumento especial llamado sonda que será introducido en dichas “bolsas” en 6 lugares diferentes alrededor de cada diente de su boca. Este es un procedimiento de rutina ampliamente utilizado en la práctica dental. Además de lo anterior, se le realizará una evaluación general de la salud de sus encías para saber si sangran, si están inflamadas, si están enrojecidas, etc.

- **La obtención de algunos de sus datos generales y médicos**, lo cual consistirá en el llenado de una historia clínica con preguntas que le serán leídas por el clínico que lo atienda y la medición de su peso, estatura, presión sanguínea, pulso y porcentaje de grasa corporal.
- **La toma de aproximadamente 5 mL de saliva**, lo cual se realizará en la mañana (de 9:00 a 11:00 horas). Para dicho procedimiento se le solicitará que el día de la toma de la muestra no haya comido 2 horas previas a la toma de la muestra, así como que haya realizado el lavado de sus dientes 2 horas previas. Se le pedirá que después de permanecer 15 minutos sentado, escupa en un dispositivo, el cual será entregado por el clínico encargado del procedimiento, hasta lograr la recolección de 5 mL de su saliva. Este procedimiento no debe causarle dolor o molestias durante todo el procedimiento.

Usted debe entender que todos los procedimientos serán realizados en un máximo de dos vistas que tendrán una duración máxima de 2 horas y que en este estudio participarán 10 (diez) personas.

Usted debe entender que su participación en el estudio no implica que será sometido a ningún tratamiento diferente o adicional a aquellos tratamientos que su clínico tratante considere necesarios para su caso.

RIESGOS: Usted debe entender que los riesgos que usted corre con su participación en este estudio son mínimos. La evaluación periodontal que se le realizará es la misma que

realiza cualquier dentista para determinar la salud de sus encías. Las muestras de placa se tomarán siguiendo procedimientos similares a los que se realizan durante una limpieza dental, y la muestra de saliva no debe causarle molestia alguna durante el procedimiento.

Debe entender que todos los procedimientos serán realizados por profesionales calificados y con experiencia, utilizando procedimientos de seguridad aceptados para la práctica clínica. Todo el personal que le atenderá utilizará guantes desechables, bata y cubrebocas para su propia protección y la de usted. Todos los materiales e instrumental que serán utilizados serán desechables y/o estarán esterilizados para su protección.

BENEFICIOS: Usted debe entender que su participación no le proporcionará ningún beneficio inmediato ni directo. Sin embargo, gracias a su participación, se obtendrá información nueva y más extensa sobre las causas de las infecciones en los implantes dentales, lo cual podría ayudar en un futuro al desarrollo de mejores implantes dentales que tengan un tiempo de vida más largo en la boca de los pacientes.

COMPENSACIONES: Usted debe entender que no existe ninguna compensación monetaria por su participación pero que tampoco incurrirá en ningún gasto adicional.

CONFIDENCIALIDAD: Usted debe entender que toda la información que sea obtenida tanto en sus historiales clínicos como en el análisis de sus muestras será mantenida en estricta confidencialidad. Así mismo, si cualquier publicación resultara de esta investigación, no se le identificará jamás por nombre.

RENUNCIA/RETIRO: Usted debe saber que su participación en el estudio es totalmente voluntaria y que puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin que esto represente algún perjuicio para su atención dental presente ni futura en las clínicas de la Facultad de Odontología de la UNAM. También debe entender que si cualquiera de los responsables de este estudio decidieran no incluirle en la investigación, pueden hacerlo si así lo creyeran conveniente.

DERECHOS: Usted tiene el derecho de hacer preguntas y de que éstas le sean contestadas a su plena satisfacción. Puede hacer sus preguntas en este momento, antes de firmar la presente forma o en cualquier momento en el futuro. Si desea mayores informes acerca de su participación en este estudio de investigación o sobre sus derechos como sujeto de estudio, puede contactar a cualquiera de los responsables llamando al número de teléfono que se encuentra en la parte superior de la primera página de esta forma.

ACUERDO: Al firmar en los espacios provistos a continuación usted constata que ha leído y entendido esta forma de consentimiento y que está de acuerdo con su participación en este estudio. Al terminar la visita recibirá una copia de esta forma.

Este estudio está realizado bajo la guía de la Declaración de Helsinki (www.conamed.gob.mx/prof_salud/pdf/helsinki.pdf), y aprobado por el comité de ética para estudios en humanos de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Nombre del Paciente

Firma del Paciente

Fecha

(Día/mes/año)

Nombre del Clínico Responsable

Firma del Clínico
Responsable

Fecha

(Día/mes/año)

8. 2 Publicaciones derivadas del presente estudio

Las publicaciones derivadas del presente estudio son las siguientes:

- A. **Martínez-Hernández M**, Almaguer-Flores A. Salivary Protein Adsorption and Bacterial Adhesion on Microstructured Titanium Surfaces. *J Dent Res* 91 (Spec Iss B): 3070, 2012 (www.dentalresearch.org).
- B. **Martínez-Hernández M**, Olivares-Navarrete R, Almaguer-Flores A. Influence of the Periodontal Status on the Initial-Biofilm Formation on Titanium Surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res* 2016 Feb; 18(1):174-81.
- C. **Martínez-Hernández M**, Almaguer-Flores A. Effect of the Protein Adsorption on Titanium Dental Implant Surfaces on the Colonization of Periodontal Bacteria. *J Prosthodont Res* 2017 (en espera de respuesta).