



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



## FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PELÍCULA  
SALIVAL FORMADA SOBRE SUPERFICIES DE  
TITANIO EN LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA  
CONSTITUIDA POR *Pseudomonas aeruginosa*,  
*Staphylococcus aureus* Y *Staphylococcus*  
*epidermidis*.

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**CIRUJANA DENTISTA**

P R E S E N T A:

PAULINA POLET REYES MENDOZA

TUTORA: Dra. MIRYAM MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: Dr. VÍCTOR IRAHUEN GARCÍA PÉREZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente proyecto de investigación se realizó gracias a los recursos otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, Clave: **IA206522**.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por todo el amor, energía, apoyo y enseñanzas que han creado y compartido conmigo desde el momento que supieron de mi existencia, por hacerme ver cada acción y vivencia como un acto de amor en el cosmos: Vanessa y Guillermo mi amor por ustedes no tiene límites, estaré eternamente agradecida. Gracias, Karla y Rafael por haberme apoyado, soportado y animado durante estos cinco años, por darme fuerza cuando más la necesitaba, por inspirarme, llenarme de amor por la vida y la maravilla de compartirla.

A Juan, Bryan, Ilse, Leyla, Gemma, Guillermo, Jacqueline, Pamela Giovanna, compañeros del servicio social, clínica periférica y teatro musical por toda la ayuda, risas, cariño y amistad durante esta etapa. Espero que lo que ha unido la UNAM no acabe nunca.

A Mariana Chávez, por su apoyo en la elaboración de este trabajo. Gracias por compartir tu curiosidad, superación, amistad, pasión por la profesión, decreto poder seguir cultivando contigo este amor por la investigación.

Gracias a todas y todos los profesores que, con su alma enamorada por la ciencia, la salud y el arte que moldea esta profesión han dado forma a mi carrera profesional, por despertar la curiosidad de explorar la infinidad de posibilidades para mejorar la calidad de vida de la sociedad y amplificar la comprensión de la realidad que nos rodea y que creamos; por la inspiración, pasión y tiempo dedicado.

Especialmente a las Doctoras Dulce Rivero Gamallo, Gabriela Felicitas, Teresa Meléndez, Vania, Blanca, Magdalena, Lupita e Itzel mujeres profesionistas inspiradoras y asombrosas, al igual que a los Doctores Lezama, Eduardo Medina y Villavicencio; a todas y todos gracias por su apoyo, por creer en mis capacidades y reforzar mi confianza, pero sobre todo por compartir conmigo su amor por esta profesión y por lo que hacen.

A mi tutora, la Doctora Miryam Martínez Hernández, por su excelente dirección, constante estímulo científico, disponibilidad, paciencia y por todos los conocimientos que ha compartido conmigo, estaré eternamente agradecida, la admiro mucho, su pasión inspira.

A mi asesor Victor Irahuen García, por sus consejos, tiempo, inspiración, dirección y valiosas aportaciones.

A el Doctor Jesús Arenas Alatorre perteneciente al Centro de Microscopía Electrónica del instituto de Física de la UNAM, por la aportación y brillante labor en el análisis microscópico de las muestras.

Y por último al programa Verano Científico edición 2022 por darme la oportunidad de ser consciente de la existencia del magnífico mundo de la investigación. Al laboratorio de Biointerfases en la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la UNAM por adoptarme y enseñarme un mundo inimaginable.

## INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	1
2.1 Película salival.....	2
2.1.1 Etapas de formación de la película salival .....	7
2.2 Biopelículas orales .....	10
2.3 Formación de biopelículas sobre superficies de implantes dentales de Titanio (Ti).....	15
2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
2.6 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	25
3. PLANTEAMIENTO .....	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	28
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	28
6. HIPÓTESIS .....	29
7. OBJETIVOS.....	29
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos.....	29
8. MATERIALES.....	30
9. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA .....	31
9.1 Obtención de las muestras de saliva total.....	32
9.2 Incubación, durante 2 horas, de las superficies de Ti comercialmente puro con una muestra de saliva total para permitir la formación de la película salival sobre los sustratos de interés.....	32
9.3 Evaluación del efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> mediante mediciones espectrofotométricas.....	33
9.4 Evaluación del efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> mediante Microcopia Electrónica de Barrido.....	34

9.5 Análisis estadístico .....	34
10. RESULTADOS .....	36
10. 1 Obtención de las muestras de saliva total y formación de la película salival sobre las superficies de titanio.....	36
10.2 Efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; evaluación mediante mediciones espectrofotométricas.....	37
10.3 Efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> , evaluación mediante Microcopia Electrónica de Barrido.....	39
11. DISCUSIÓN .....	44
12. CONCLUSIONES .....	47
12. BIBLIOGRAFÍA .....	49

## RESUMEN

En las últimas décadas la asociación de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* con lesiones de periimplantitis ha cobrado relevancia. Distintos reportes han indicado que dichas especies bacterianas pueden ser aisladas en altas proporciones de las zonas periimplantarias de implantes dentales fallidos, al respecto, dichos reportes indican que la alta persistencia de estas especies bacterianas aerobias en implantes fallidos es debido a que presentan una alta afinidad por Titanio (Ti), sin embargo, no hay datos que nos indiquen en qué consiste esta afinidad frecuentemente reportada. Por lo anterior, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto la Película Salival (PA) formada sobre superficies de titanio en la formación de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. La evaluación de la formación de la biopelícula formada por las tres cepas bacterianas sobre superficies de Ti comercialmente puro acondicionadas con una PA se llevará a cabo mediante Espectrofotometría y a través de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

**Palabras clave:** Película salival; Superficies de Titanio; Biopelícula; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*.

## **ABSTRACT**

In the last decades the association of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* with periimplant lesions has gained relevance. Several reports have shown that these bacterial species can be isolated in high proportions from the periimplant zones of failed dental implants. In this regard, such reports indicate that the high persistence of these aerobic bacterial species in failed implants is due to their high affinity for titanium (Ti), however, there are no data that indicate what this frequently reported affinity consists of. Therefore, the present research work aims to evaluate the effect of the Salivary Pellicle (PA) formed on titanium surfaces on the formation of biofilm constituted by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The evaluation of the formation of the biofilm formed by the three bacterial strains on commercially pure Ti surfaces conditioned with a PA will be carried out by Absorbance and Scanning Electron Microscopy (SEM) assays.

**Keywords:** Salivary pellicle; Titanium surfaces; Biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*.

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton (1643-1727)

## **1.INTRODUCCIÓN**

La Película Salival Adquirida (PSA) también conocida como película salival acondicionante o simplemente Película Salival (PA) modula la adhesión bacteriana en la cavidad oral, particularmente en superficies de Titanio (Ti) se ha encontrado que la PA está constituida por más de 495 proteínas. Una vez que la película salival se forma sobre todas las superficies expuestas en la cavidad oral, comienza la adhesión o formación de biopelículas microbianas. Se sabe que la formación de biopelículas complejas sobre las superficies orales se asocia con el desarrollo de enfermedades infecciosas como caries, periodontitis y periimplantitis. En las últimas décadas el desarrollo de lesiones con periimplantitis ha sido asociado con la presencia, en altas proporciones, de bacterias patógeno-oportunistas y antibiótico-resistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Por otro lado, actualmente es aceptado que el comportamiento biológico de los implantes dentales de Titanio (Ti) depende en gran medida de las características de la película proteica adsorbida sobre dichas superficies inmediatamente después de que el dispositivo biomédico se expone a biofluidos como la sangre y la saliva. Por lo tanto, el presente proyecto de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de la película salival formada sobre superficies de Titanio (Ti) en la formación inicial de la biopelícula formada por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Película salival**

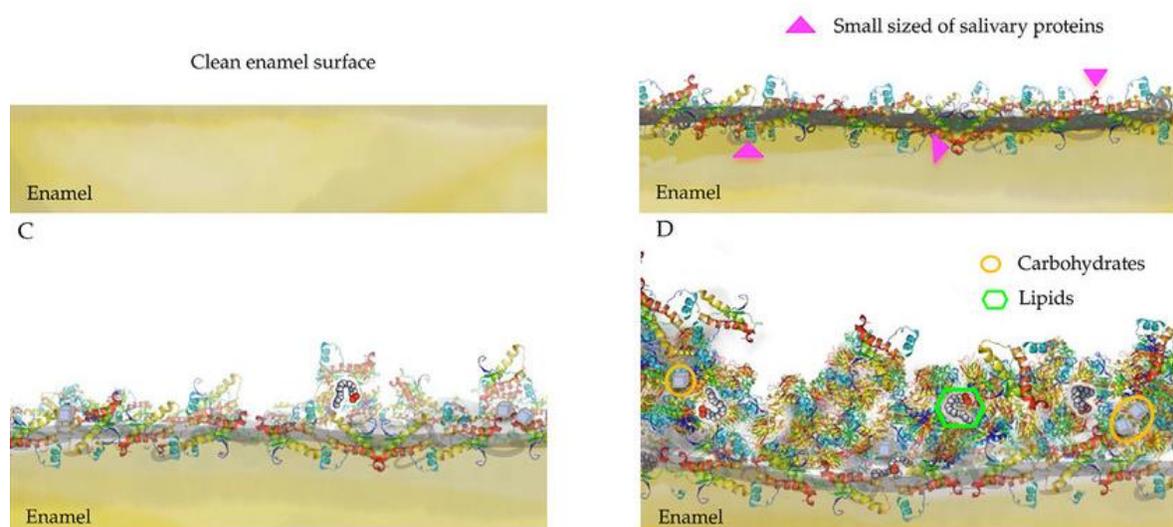
La película salival adquirida, o simplemente película salival (PA), es una delgada membrana biológica que se deposita en la superficie de todas las estructuras dentarias [1], como consecuencia de la adsorción selectiva de proteínas y otras biomoléculas de origen salival, [2].

La formación de la PA ocurre sobre todas las superficies bucales expuestas en la cavidad oral, como el esmalte dental, el cemento radicular, mucosas, aparatos protésicos como el caso de los componentes transmucosos de los implantes dentales y restauraciones, entre otros [3]. Actualmente se sabe que cada una de las PAs formadas sobre las diferentes superficies presentes en la cavidad oral poseen características físicas y una composición química diferente [4] [5].

La etapa inicial de la formación de la PA se caracteriza por un aumento en su grosor, de 10 a 20  $\mu\text{m}$ , en unos pocos minutos, permaneciendo estable durante unos 30 minutos [6]. Las proteínas salivales con una alta afinidad por la hidroxiapatita, comúnmente denominadas "precursores de la película", inician este proceso, a través de interacciones electrostáticas con la superficie del esmalte [7]. Estudios previos identificaron a las proteínas aPRP (Proteínas Ricas en Prolina ácidas), estaterina e histatinas como las primeras en adsorberse a la hidroxiapatita [8, 9]. Además de esas proteínas, estudios han confirmado la presencia de mucinas (MUC5B y MUC7), amilasa, cistatinas, lisozima y lactoferrina como las proteínas más abundantes en la PA [10, 11].

Por medio de ensayos químicos e inmunológicos se ha demostrado que la PA está constituida por diferentes proteínas, lípidos y glúcidos [12] [13]. Entre los constituyentes fundamentales proteicos que han sido identificados como parte de la película salival se pueden encontrar proteínas ácidas ricas en prolina como PRP1, PRP2, PRP3, PRP4, PIFs y PRPf, mucinas de alto peso molecular [14], además de estaterinas [15], cistatinas, histatinas,  $\alpha$ -amilasa e IgA secretoria [16], dichas proteínas pueden estar presentes en estado glicosilado o fosforilado [6]. También se han descubierto en menor medida inmunoglobulinas como IgM e IgG, anhidrasa carbónica, glucosiltransferasa de origen microbiano, seroalbúmina y variadas fracciones del complemento [17].

Se puede afirmar que la PA procede de la adsorción de proteínas intactas ya sean simples y/o conjugadas además de fragmentos producidos por la proteólisis parcial de las mismas macromoléculas, ya que se ha reportado que se forman péptidos que tienen afinidad por la hidroxiapatita adamantina esto debido a la degradación de las proteínas presentes en la secreción del fluido salival (**Figura 1**) [18].



**Figura 1.** Formación de la película salival. A: Superficie de esmalte limpia. B: Etapa inicial: unión de proteínas precursoras (de segundos a un par de minutos). C: Etapa de

desarrollo: reacción proteína-proteína (dentro de 45 min). D: Etapa de maduración: el equilibrio entre la adsorción y la desorción (dentro de 120 minutos) [19].

Como se puede observar en la figura anterior, los elementos glucídicos que componen a la película salival principalmente son azúcares neutros como glucosa, fucosa, galactosa y de amino azúcares como glucosamina y galactosamina [20]; también se encuentran otros glúcidos derivados, como el ácido siálico aunque en menor proporción [21]. La función de los carbohidratos presentes en la película salival no ha sido totalmente aclarada a la fecha, aunque existe evidencia que los involucra en el proceso de colonización bacteriana, ya que numerosas de las adhesinas presentes en las superficies microbianas se unen a la porción glucídica de los receptores que están localizados en la película salival [2].

La literatura menciona que los lípidos en la PA representan alrededor del 20% de su peso total [22]. Aproximadamente el 80% de ellos corresponde a glucolípidos, el 15% a lípidos neutros como los glicéridos, colesterol y ácidos grasos libres; la fracción remanente corresponde a fosfolípidos como los fosfoglicéridos y esfingomielinas [23]. Se ha demostrado en diversos artículos que la extracción de la fracción lipídica de la PA reduce prácticamente a la mitad la capacidad de la misma de retardar la propagación de ácido láctico [24]. De lo anterior se infiere que los lípidos tendrían la capacidad de prevenir la desmineralización por la propiedad de modular la colonización de las superficies de los órganos dentales y de regular la propagación de los ácidos que son originados por la fermentación bacteriana de azúcares [2].

Otro dato importante es el que indica que la naturaleza de la superficie sobre la que se formará la PA influye directamente en las características fisicoquímicas

de la película que se forme. De esta forma, la PA que se forma sobre las superficies naturales como el esmalte dental posee características fisicoquímicas importantes en comparación con la PA formada sobre las superficies de implantes dentales de Titano (Ti) [25]. El comportamiento biológico de los dispositivos biomédicos, como los implantes dentales, depende en parte de la película proteica que se forma en las superficies de Ti inmediatamente después de que el dispositivo se expone a biofluidos como la sangre y la saliva [26].

La composición de la PA que se forma sobre las superficies de los implantes dentales de Ti puede influir en procesos celulares esenciales, como la proliferación y la diferenciación celular [27]. Un fenómeno crítico asociado con la presencia de la PA puede ocurrir si la "carrera por la superficie" está dominada por microorganismos en lugar de las células huésped [28, 29]. Si las bacterias son las primeras en adherirse a la superficie, la formación de una biopelícula bacteriana ocurrirá, lo que conduce a respuestas inflamatorias severas en el huésped, y una cascada posterior de problemas infecciosos, incluido el riesgo de pérdida del dispositivo biomédico [28, 30].

En este caso, las características de la capa de proteica adsorbida en la superficie del implante influye directamente en la adhesión de bacterias que pueden conducir a un proceso inflamatorio destructivo, afectando los tejidos blandos y tejidos duros alrededor de los implantes además del éxito a largo plazo del dispositivo implantado [30]. Las superficies de los implantes dentales de titanio tienen características fisicoquímicas diferentes al esmalte dental; por lo tanto, la composición de la película salival formada sobre estas superficies es diferente [31].

La formación de la película salival es el resultado de un proceso de adsorción altamente selectivo, que está directamente influenciado por dos elementos principales; las características fisicoquímicas del sustrato y las propiedades inherentes de las proteínas adsorbidas [25]. Por un lado, las propiedades químicas y físicas de la superficie como la humectabilidad [32], distribución de carga [33] y rugosidad [34] afectan la cinética y la termodinámica de los procesos de adsorción de proteínas y los cambios conformacionales de proteínas específicas [35].

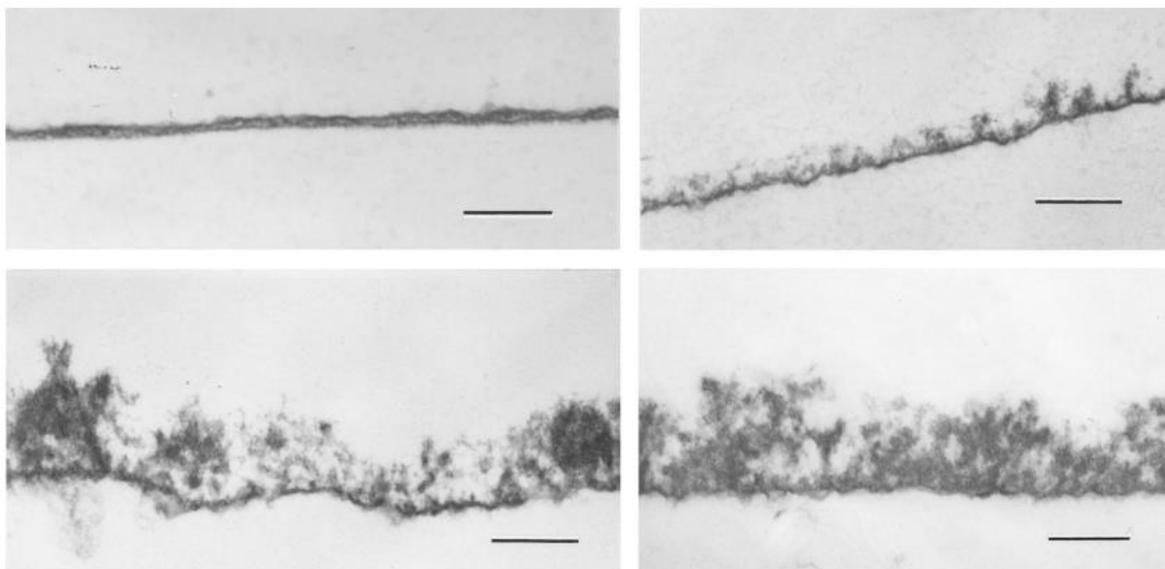
Por otro lado, los atributos de las proteínas como la composición y secuencia de aminoácidos [36], carga, tamaño y flexibilidad estructural (dura o blanda) [37, 38], contribuyen a modular su afinidad por un sustrato específico [39].

En la última década, se ha logrado un progreso sustancial en la elucidación de la composición biomolecular de la película salival del esmalte mediante la aplicación de enfoques proteómicos [25]. Hasta ahora, se han identificado más de 450 proteínas diferentes como constituyentes de la película salival formada después de 2 horas *in situ* sobre el esmalte dental [40-42].

Por el contrario, se sabe menos sobre la composición de la película salival formada en las superficies de implantes dentales de Ti. Se han identificado más de 495 proteínas diferentes de saliva estimulada adsorbidas, en condiciones *in vitro*, sobre sustratos de Ti [43, 44]. Estudios *in vitro* han informado con frecuencia como constituyentes principales de la película salival formada en las superficies de Ti proteínas como la albúmina sérica, la amilasa salival, la proteína inducible por prolactina y la cistatina-SA [44-47].

### 2.1.1 Etapas de formación de la película salival

La formación de la película salival está determinada por la adsorción de los componentes de la saliva, el líquido crevicular y las bacterias en la superficie del esmalte [11], solo una fracción de las proteínas disponibles en la saliva se encuentran formando parte de la película salival acondicionante [48].



**Figura 2.** Micrografías obtenidas mediante Microscopía electrónica de transmisión (MET) de la capa de película salival de 1 min (arriba, izquierda), 10 min (arriba, derecha), 60 min (abajo, izquierda) y 2 horas (abajo, derecha) formada *in situ* en especímenes de esmalte montados sobre la superficie bucal del primer molar superior [49].

La primera etapa de formación de la película salival se caracteriza por una adsorción casi instantánea de proteínas salivales en la superficie del esmalte [49]. Este proceso de adsorción inicial comienza en unos segundos y probablemente tarde un par de minutos en completarse [10]. El espesor de esta capa inicialmente adsorbida oscila entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  (**Figura 2**) [50].

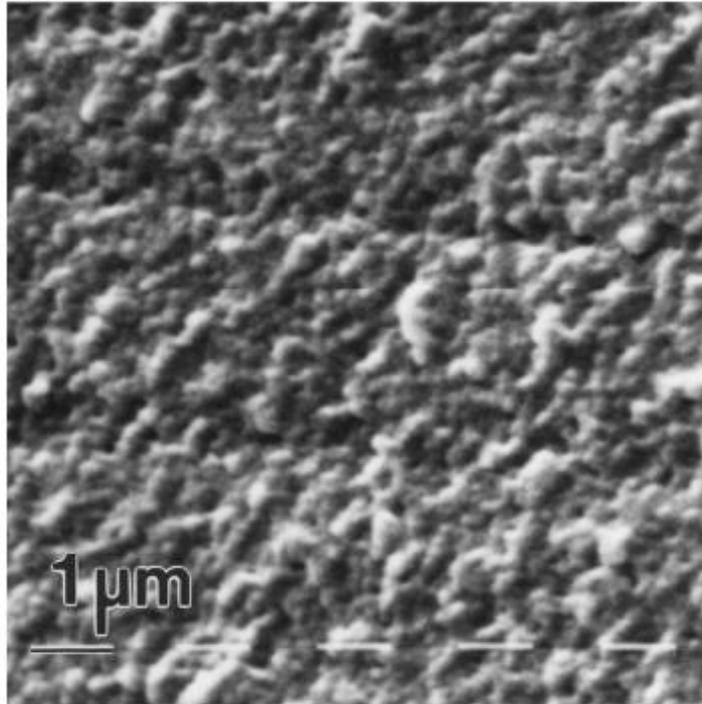
Como se observa en la imagen anterior, la película adsorbida se presenta como una capa superficial densa en electrones, de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de espesor, sobre la cual se forma una segunda capa de apariencia globular. La formación de la

capa de película exterior, poco estructurada, aumenta con tiempos más prolongados de exposición intraoral.

El primer nivel de formación de la película salival puede explicarse por la adsorción de proteínas discretas sobre la superficie del esmalte. La rápida fase inicial de adsorción de proteínas salivales es seguida por una segunda fase, comparativamente más lenta, de adsorción de proteínas sobre la superficie del esmalte recubierta de proteínas.

La segunda etapa de formación de la película salival se caracteriza por una adsorción continua de biopolímeros de la saliva. Este proceso implica interacciones proteína-proteína entre las proteínas ya adsorbidas, inmovilizadas en la capa de película, así como con agregados de proteínas presentes en la saliva. Los análisis de aminoácidos de la capa de película salival formada en superficies de esmalte portadas bucalmente [51] indican que la película adsorbida alcanza un espesor inicial en aproximadamente 2-3 minutos y permanece en ese nivel durante aproximadamente 30 minutos [52]. El espesor de la película aumenta hasta aproximadamente tres veces su espesor inicial y alcanza una meseta después de 30 a 90 minutos [6], por lo tanto, es razonable postular que la adsorción de agregados de proteínas en lugar de la adsorción de proteínas individuales contribuirá a la formación de la película [53]. Se informó anteriormente que la mayoría de las proteínas parótidas aparecen como agregados globulares con un diámetro de 100 a 200 $\mu$ m. Se sugiere que estos glóbulos tienen un interior hidrofóbico y una superficie cargada negativamente, y debido a su similitud con las micelas de la leche, se les ha llamado estructuras similares a micelas [54][55].

La capa de película formada *in situ* durante períodos de 30 a 120 minutos revela una textura superficial globular con diámetros de las estructuras similares a glóbulos adsorbidos que varían entre 80 $\mu$ m y 200 $\mu$ m [56]. Tales observaciones también indican que la formación de películas *in vivo* es causada principalmente por la adsorción de agregados de proteínas más que por biopolímeros salivales individuales (**Figura 3**).



**Figura 3.** Micrografía obtenida por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) que muestra la película adquirida de 2 horas formada *in situ* sobre una superficie de esmalte [11].

Dado que las superficies del esmalte están continuamente expuestas a la saliva total, así como a la actividad proteolítica del fluido oral, la formación de complejos heterotípicos [57], el entrecruzamiento enzimático [18, 58] o el procesamiento proteolítico pueden alterar las propiedades de las proteínas salivales y conducir a especies moleculares únicas que contribuirán a la formación de la película salival. Por lo tanto, la formación de películas salivales

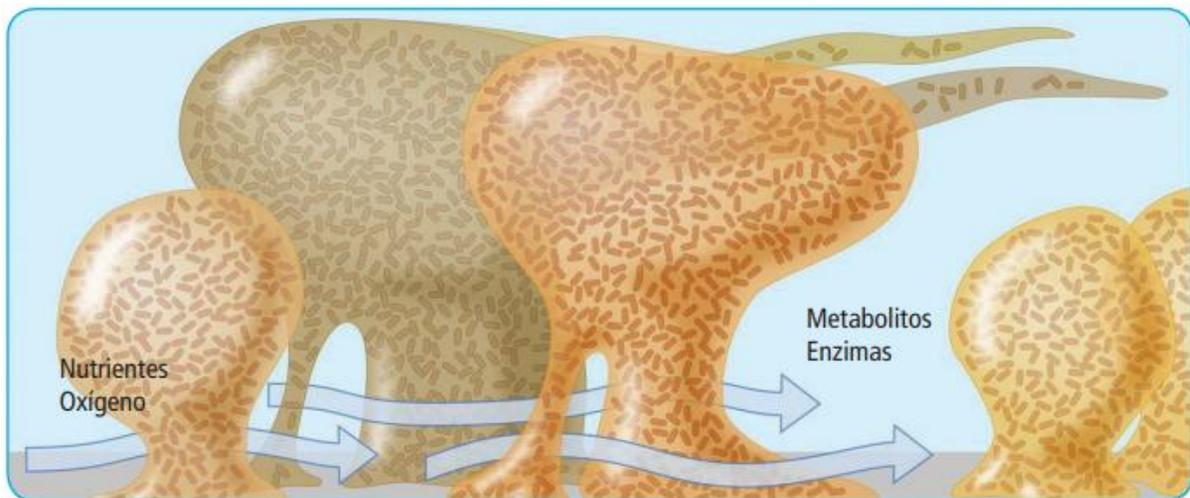
es un proceso dinámico [10] que está continuamente influenciado por los procesos de adsorción-desorción, la modificación de las moléculas adsorbidas por enzimas microbianas o del huésped y la formación de complejos intermoleculares con otras macromoléculas.

## **2.2 Biopelículas orales**

La cavidad oral de un adulto presenta un área superficial de aproximadamente 215 cm<sup>2</sup> con diversas superficies que pueden ser colonizadas por microorganismos, los cuales muestran una marcada selectividad por los diferentes tejidos y superficies, ya sea duros como los órganos dentales o blandos como la mucosa yugal, encía y lengua, todas estas superficies son constantemente bañadas por la saliva [59]. Según la base de datos del Microbioma Humano (en inglés Human Oral Microbiome Database (HOMD)), actualmente 774 especies bacterianas orales han sido identificadas, de las cuales el 58% tienen nombre oficial, el 16% no tienen nombre, pero son especies cultivables, y solo el 26% se conoce como filotipos no cultivables [60].

Las bacterias dentro de la cavidad oral se agrupan preferentemente en forma de biopelículas, las cuales consisten en ensambles de células microbianas adheridos a una superficie y envueltos en una matriz compuesta de polisacáridos principalmente [61]. Las biopelículas proveen protección a la comunidad microbiana de la predación de células del sistema inmune, de la perturbación física y del efecto de los antibióticos [62].

Las microcolonias que integran a las biopelículas están separadas unas de otras por espacios intersticiales o canales, que les permiten transportar nutrientes y desechos [63]. La sustancia polimérica extracelular o matriz de exopolisacáridos (EPS) que recubre a las biopelículas contiene entre el 50 al 90% del carbono orgánico total de la estructura y es el componente principal de estas [64] (**Figura 4**).

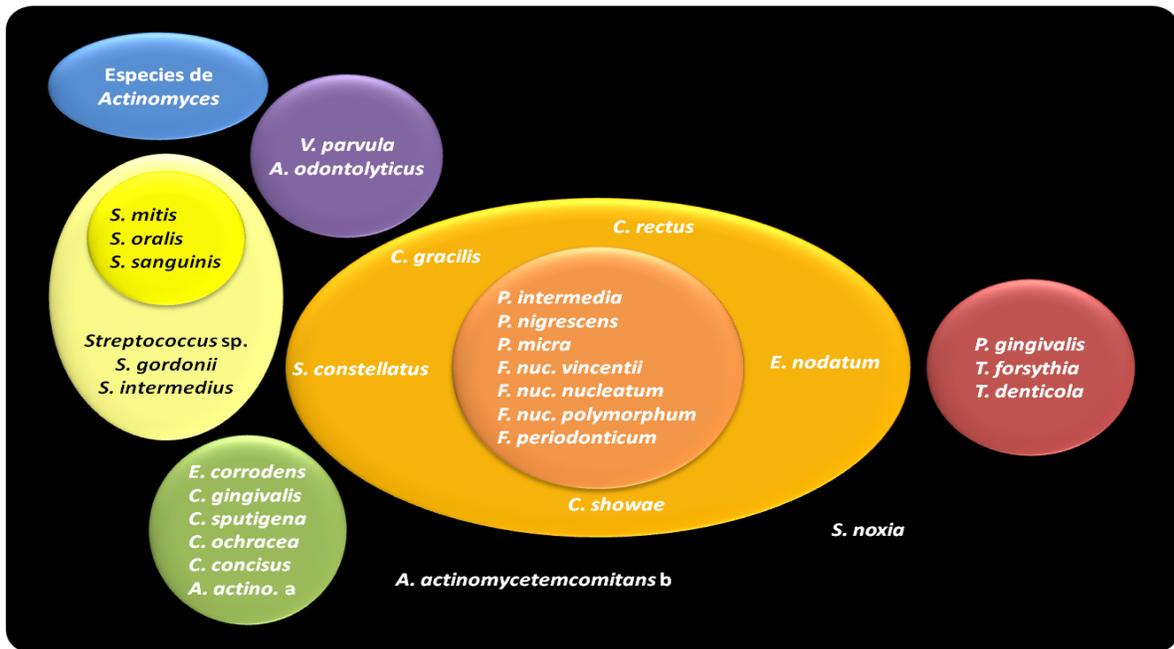


**Figura 4.** Estructura de una biopelícula [65].

La proximidad de las células microbianas dentro de las biopelículas provee del medio ambiente ideal para la formación de gradientes de nutrición, intercambio genético y un interesante mecanismo de comunicación bacteriana llamado *Quorum Sensing* (QS) [66]. Este mecanismo involucra un sistema de señalización dependiente de moléculas, las cuales se difunden dentro de la biopelícula y son capaces de regular la expresión de genes que se reportan como mediadores en la comunicación intercelular, que a su vez, es dependiente de la densidad celular bacteriana [67]. Complementariamente, se menciona que el sistema QS participa en procesos de adhesión y desprendimiento celular dentro de las biopelículas [68].

La formación de biopelículas complejas dentro de la cavidad oral está asociada con el desarrollo de dos de las enfermedades infecciosas más prevalente en el mundo, la caries y las enfermedades periodontales [69]. Las enfermedades periodontales comprenden un grupo de condiciones con diferentes manifestaciones clínicas, de naturaleza infecciosa principalmente que afectan a los tejidos de soporte dentarios [59]. Dentro de las enfermedades periodontales encontramos a la periodontitis, la cual se puede definir como una enfermedad inflamatoria multifactorial que está asociada con biopelículas dentales disbióticas. La periodontitis se manifiesta clínicamente a través de la pérdida de inserción clínica, sangrado gingival, supuración y pérdida dental [70].

A finales de los años 90 ´s del siglo pasado, con la técnica desarrollada por Socransky y cols., para hibridaciones de DNA-DNA denominada Checkerboard, fue posible analizar más de 13,000 muestras de placa dentobacteriana subgingival lo que permitió identificar asociaciones específicas entre las bacterias presentes en las biopelículas dentales, dichas asociaciones fueron denominadas "complejos bacterianos" o también conocidos como "los complejos de Socransky" [68], los cuales se muestran en la siguiente imagen **(Figura 5)**:



**Figura 5.** Diagrama de los complejos bacterianos de Socransky (fuente propia).

Como se puede apreciar en la figura anterior, las bacterias que conforman cada complejo se encuentran asociadas entre sí, los complejos amarillo, verde y morado se encuentran más relacionados entre sí y estos a su vez asociados al complejo naranja pero no con los miembros del complejo rojo [71]. Además, la **Figura 5** ejemplifica la secuencia de colonización de la biopelícula. De izquierda a derecha se observa la presencia de los complejos azul y amarillo, los cuales agrupan a las especies colonizadoras primarias de la superficie dental. Los complejos verde, morado y naranja se conforman por colonizadores puente o patógenos putativos, y por último el complejo rojo, el cual está formado por especies llamadas colonizadores tardíos o patógenos periodontales reconocidos [59].

Se estima que el grado de patogenicidad de la biopelícula dental está determinada por las condiciones ambientales locales [72], por la expresión de factores de virulencia microbianos [73], además de la cantidad e identidad de

las bacterias presentes en el medio; estudios realizados por Haffajee, Socransky y cols. muestran que en un fluido crevicular gingival (FCG) sano el número de bacterias presentes es de  $\sim 10^3$ , mientras que en un FCG profundizado o enfermo puede haber hasta  $\sim 10^8$  cuentas bacterianas [74, 75].

Otra enfermedad infecciosa oral relacionada con la presencia de una biopelícula oral disbiótica es la periimplantitis [76], la cual se define como una condición patológica que ocurre en el tejido que rodea a los implantes dentales oseointegrados, caracterizada por inflamación en la mucosa periimplantaria y la subsecuente pérdida progresiva del hueso de soporte, la mucositis periimplantaria precede a la periimplantitis, ambas patologías se asocian con un control deficiente de la biopelícula dental y con antecedentes de periodontitis previa. Según se indica, la periimplantitis parece progresar con un patrón acelerado y no lineal [77].

En el entorno clínico, la inflamación de los tejidos periimplantarios se evalúa mediante el sondaje, mientras que la pérdida ósea progresiva se identifica con base en imágenes radiográficas [77]. Los estudios sobre la ocurrencia de periimplantitis requieren definiciones de casos y valores umbral definidos para diferenciar la salud de la enfermedad periimplantaria, y así para diferenciar ambas condiciones de la mucositis periimplantaria [70].

Con respecto a la caracterización de la microbiota asociada con la presencia de daño periimplantar, mediante el uso de sonda de ADN y análisis de cultivos, ha sido posible aislar bacterias periodontopatógenas comunes en sitios de implantes enfermos [78, 79]. En general, se ha observado que, en comparación con los sitios periimplantarios sanos, los sitios con periimplantitis

se asociaron con recuentos más altos de 19 especies bacterianas, incluidas *P. gingivalis* y *T. forsythia* [80]. Además, se ha indicado que la periimplantitis se vincula frecuentemente con la presencia de patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* [81, 82], microorganismos fúngicos como *Candida albicans*, *Candida boidinii*, *Penicillium* spp, *Rhadorula laryngis*, *Paecilomyces* spp. [83, 84] y formas víricas como *Cytomegalovirus Humanus herpesviridae* 5 (HHV-5), Human herpesvirus 4 o virus de Epstein-Barr (VEB) [85] indicando así a una infección periimplantaria compleja y heterogénea [86-88].

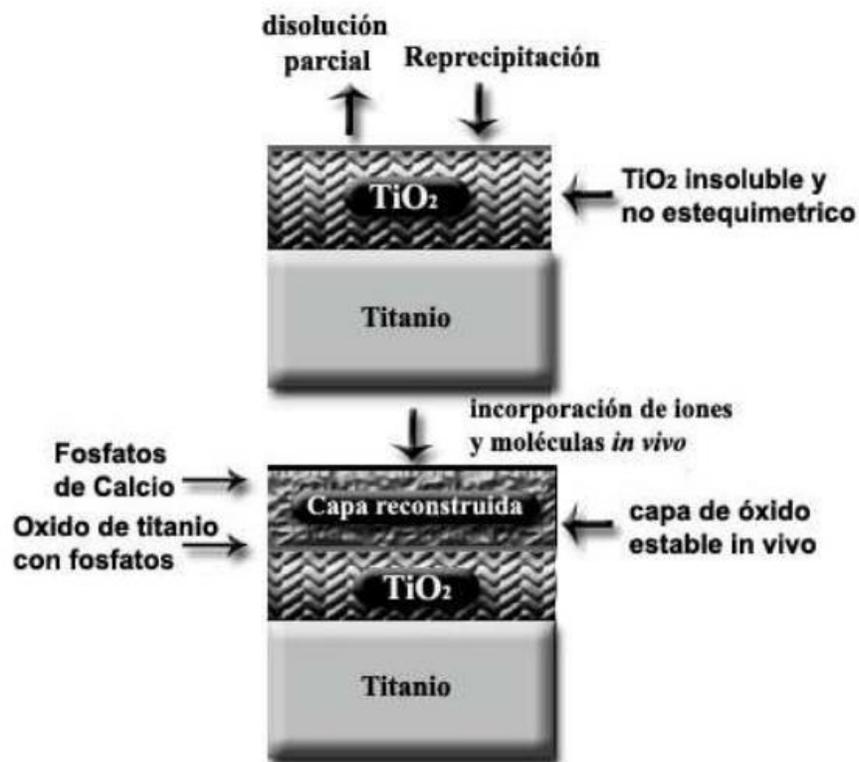
El componente aerobio dentro las enfermedades infecciosas orales suele ser polimicrobiano y posee la capacidad de potenciar la sinergia entre las diferentes especies bacterianas encontradas en cavidad oral [89]. En las últimas décadas, algunos autores han identificado que especies bacterianas aerobias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* desempeñan un papel relevante en la severidad de la enfermedad periimplantaria.

### **2.3 Formación de biopelículas sobre superficies de implantes dentales de Titanio (Ti).**

El uso de metales en odontología ya sea como material de restauración, protésico o en dispositivos biomédicos implantables está muy extendido en la actualidad [90-92]. El Ti y sus aleaciones poseen la propiedad de la biocompatibilidad [93] por lo que son considerados metales de alto valor para la implantología oral. Dichos metales poseen una alta resistencia a la corrosión, esto debido a la formación de una capa superficial de óxido (capa de pasivación) que protege al metal del ataque corrosivo [94, 95].

La pasivación, se refiere a la formación de una película relativamente inerte, sobre la superficie del material que lo enmascara contra de la acción de agentes externos [96]. En el caso del Ti, la capa de pasivación consiste en  $\text{TiO}_2$  no estequiométrico, adherente y no poroso, poco cristalino, de fácil y rápida regeneración incluso si es eliminado por completo [94]. La capa  $\text{TiO}_2$  que usualmente cubre el material es la responsable de la biocompatibilidad del sustrato [97].

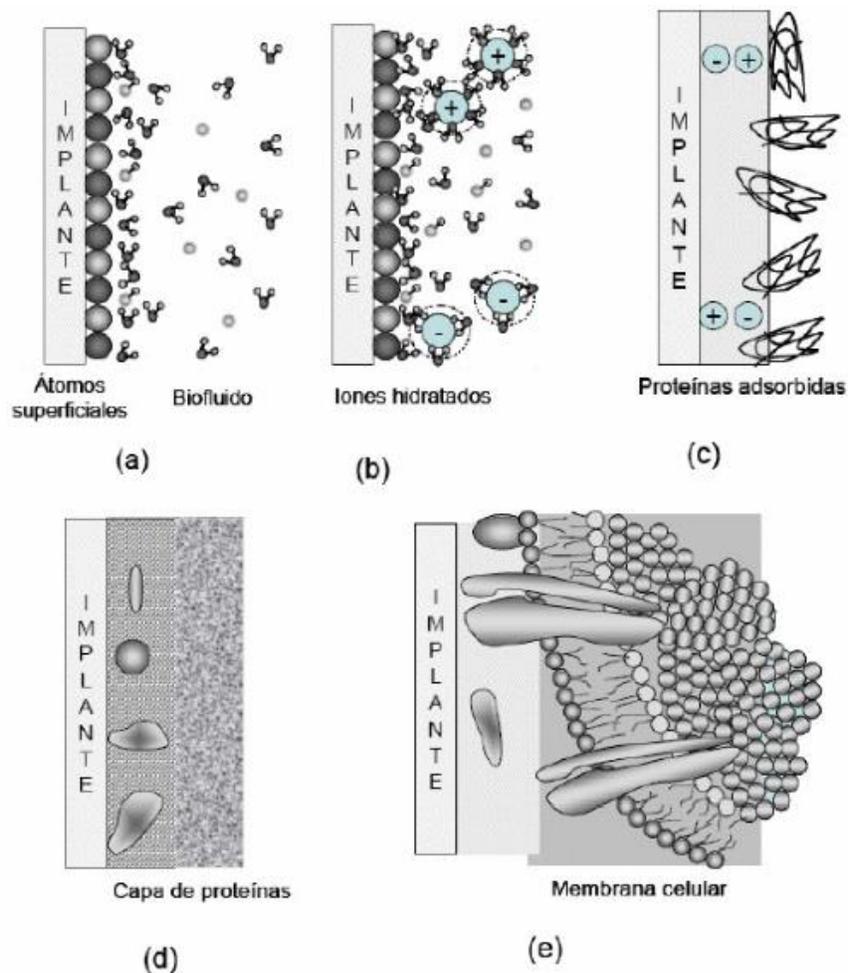
El titanio generalmente se pasiva por la reacción con el agua presente en el medio ambiente de acuerdo con la siguiente ecuación:  $\text{Ti} + 2\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{TiO} + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$  [98]. Pero en el caso de que en el medio se encuentren disueltos otros iones, la capa pasivada tendrá, además, incorporados tales iones [93, 99].



**Figura 6.** Representación esquemática de la capa superficial de óxido de titanio y la reconstrucción de la misma *in vivo*, de acuerdo con los estudios realizados por Hanawa [94].

Según la teoría de la pasivación, los biomateriales metálicos sumergidos en soluciones acuosas son sistemas en los cuales las superficies activas y pasivas coexisten en contacto con los electrolitos presentes [100]. Esto significa que la capa superficial de óxido en los materiales sufre un proceso continuo de disolución parcial y reprecipitación en soluciones acuosas [101]. Si la velocidad de disolución es mayor que la velocidad de precipitación gradualmente se liberarán iones metálicos (**Figura 6**).

Este proceso se conoce como una disolución anódica. Si el potencial de un material cambia anódicamente, la velocidad de disolución anódica se incrementa [102].



**Figura 7.** Secuencia de eventos que ocurren al colocar un biomaterial dentro del cuerpo humano [103].

Una vez de los implantes dentales son colocados en la cavidad oral, la superficie expuesta está sujeta a la adsorción de biomoléculas provenientes de la saliva, con la consecuente formación de la PA sobre el Ti [49]. La formación de la PA sobre las superficies de Ti expuestas permitirá la colonización bacteriana y el posterior desarrollo de biopelículas bacterianas (**Figura 7**) [104].

Se puede afirmar que las moléculas son los principales componentes estructurales bacterianos que permiten la adhesión bacteriana a diversas superficies las cuales se encuentran en la pared celular microbiana como los ácidos teicoicos, flagelos, *pili* y moléculas que son expresadas por los microorganismos cuando se encuentran bajo circunstancias de estrés; también llamadas componentes microbianos de superficie y que son capaces de reconocer moléculas de matriz adhesiva [105-107].

Al respecto, según la literatura, se ha observado que la adhesión de las distintas especies de *Staphylococcus* sobre una variedad de tipos de dispositivos médicos se produce cuando las proteínas de este microorganismo tienen una unión covalente a proteínas que son propias de la matriz extracelular del huésped como la elastina, colágena, la fibronectina y el fibrinógeno, las que recubren dispositivos médicos inmediatamente después de ser implantados [108-110] como en catéteres intravasculares, válvulas cardiacas o prótesis articulares. Las proteínas responsables de esta adhesión son: la proteína extracelular de unión a proteínas o Embp, a la asociada a adhesión [Aap], la asociada a la formación de biopelículas [Bap] y autolisina [Atl] [111].

Existe evidencia reportada por Ryder, Campoccia y cols. donde se menciona que cada especie bacteriana segrega determinado tipo de

exopolisacáridos (EPS) los cuales tienen la función de proporcionar una amplia variedad de rasgos fisicoquímicos expresados en la matriz extracelular de la biopelícula. Específicamente hablando de las bacterias que se estudian en el presente trabajo, la literatura revisada refiere que *Staphylococcus* spp. solo produce poli-N-acetilglucosamina, que es un EPS de adhesión intercelular; mientras que *Pseudomonas aeruginosa* secreta tres tipos de EPS: incluyendo su característico alginato, Pel y Psl [112] [113].

Usualmente, las bacterias presentan una carga superficial de pH negativo a pH neutro [114], pero también se ve alterada por las condiciones de cultivo, el pH y la fuerza iónica [115]. En general, el potencial Z se utiliza para determinar la carga superficial, y se calcula a partir de la movilidad del microorganismo en un campo eléctrico en concentraciones definidas de sales y un pH fisiológico [116].

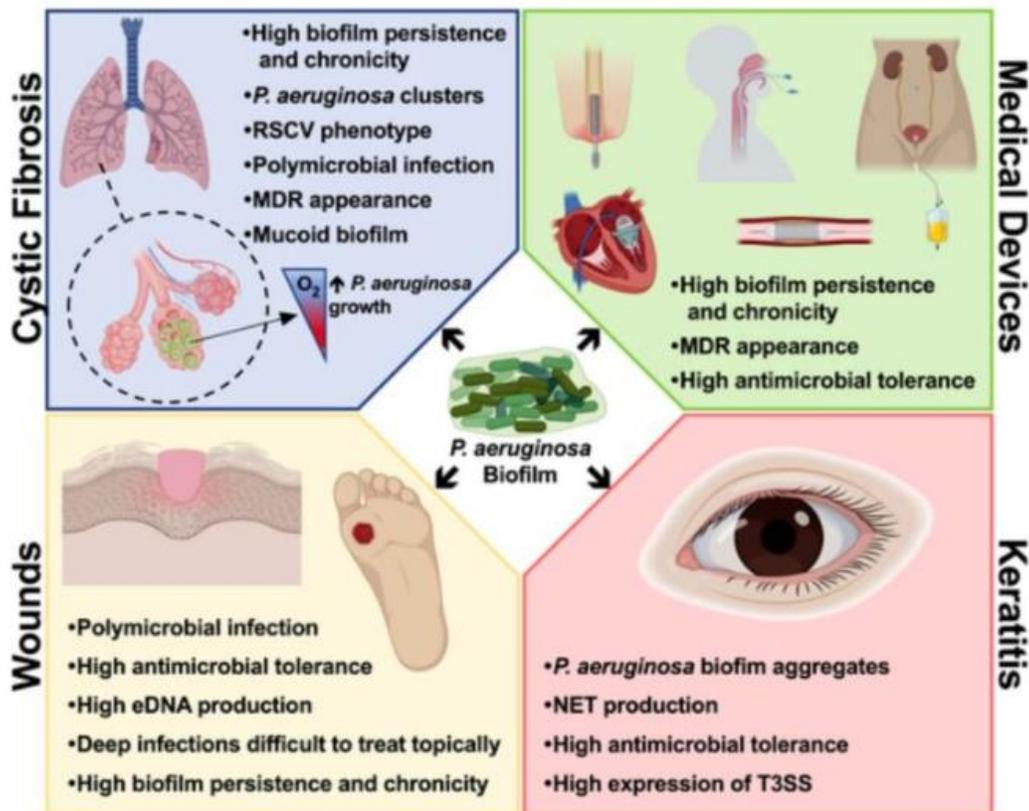
Hay varias teorías sobre la capacidad de un microorganismo para adherirse a un sustrato y la relación con su carga superficial [115]. Una posible explicación es que la carga de la bacteria se origina a partir de la disociación de grupos básicos y ácidos en la membrana celular [117]. Por lo tanto, el potencial Z del microorganismo dependerá de la fuerza iónica del medio en el que se encuentra. A medida que aumenta la fuerza iónica, mayor será la cantidad de iones disponibles para neutralizar la carga superficial. Por otro lado, la carga superficial de los sustratos sobre los que las bacterias se adhieren, también, es importante en la adhesión microbiana [118].

Otros autores como Narendran y colaboradores [119], argumentan que la adhesión microbiana no solo es dada por la carga superficial celular, lo que

sugiere que la adherencia bacteriana es un mecanismo complejo en el que intervienen múltiples factores. Así que, la relación entre una superficie y una bacteria parece estar regulada por un conjunto complejo de interacciones físicas y químicas, y cada una de ellas se encuentra afectada por las características físicas y químicas del entorno en el que se encuentran expuestas.

#### 2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Es un patógeno oportunista presente como parte de la microbiota de la cavidad oral, relacionado con enfermedades como neumonía, infecciones urinarias y bacteriemia, encontrada en casos de fibrosis quística crónica con afecciones graves en pulmones que insuficiencia respiratoria, lo que resulta en un alto riesgo de morbilidad y mortalidad [120],(Figura 8).



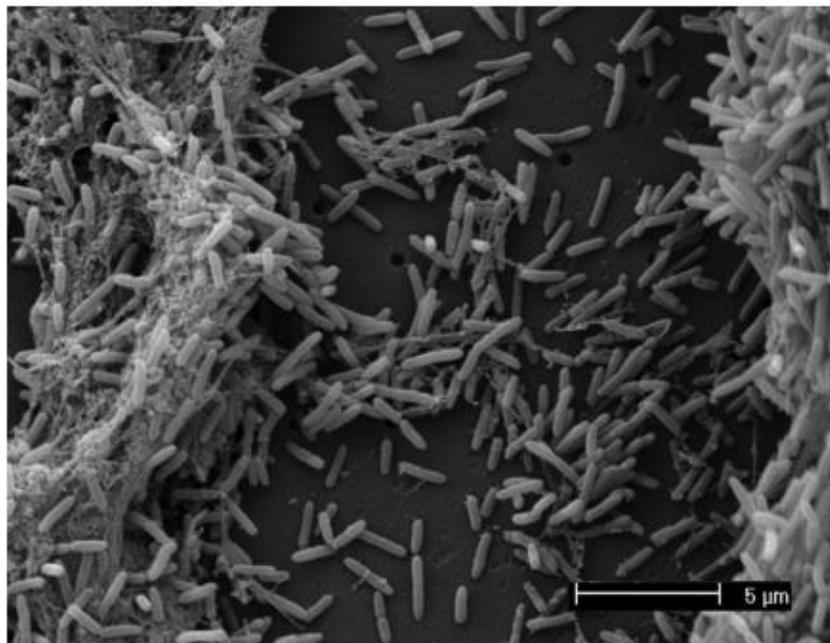
**Figura 8.** Describe las principales características de las biopelículas constituidas por *P. aeruginosa* y su asociación con diferentes patologías infecciosas [121].

*P. aeruginosa* es una bacteria aerobia relacionada con la presencia de infecciones en dispositivos biomédicos como implantes de rodilla, marcapasos, prótesis de cadera, en suturas, lentes de contacto, válvulas mecánicas del corazón, dispositivos ortopédicos entre otros, que más frecuentemente desarrolla mecanismos de resistencia [122-124]. Durante las últimas décadas, a escala mundial, se ha observado un incremento en la aparición de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes. En Asia, aproximadamente 42,8% de los casos de neumonías nosocomiales por *P. aeruginosa* son multi resistentes, mientras que el 4,9% son ultra resistentes [125].

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria con forma de bacilo Gram negativo aerobio facultativo, adaptable, capaz de resistir y crecer en entornos con bajos niveles de oxígeno en temperaturas que van desde los 4°C hasta los 42°C e incluso en condiciones de poca disponibilidad de nutrientes [126, 127]. Es una bacteria oxidasa y catalasa positiva con dimensiones aproximadas de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho, posee un flagelo con diferentes proteínas como *FliD*, la cual le permite adherirse al epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado de la mucosa de las vías respiratorias [120, 128, 129]. Dicha proteína puede ser la responsable de la primera interacción entre la bacteria y las células epiteliales de las vías aéreas, a través de su unión con el glicosfingolípido asialo M1 (aGM1) de las células pulmonares [130]. La proteína flagelar *FliC* de *Pseudomonas aeruginosa* es el factor principal que induce la secreción por parte del sistema inmunológico de péptidos antimicrobianos y de trampas extracelulares mediadas por los neutrófilos (NET's). Además, esta proteína también puede ser reconocida por los receptores Toll (TLR) tipo 5

(TLR5) [131] lo que produce una expresión de las interleucinas IL-18 e IL-1B, y puede provocar la muerte celular piroptótica por la vía NFκB o factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas [130, 132, 133]. La piroptosis es una muerte celular programada proinflamatoria por lisis celular seguida de una activación agresiva de las caspasas inflamatorias [134].

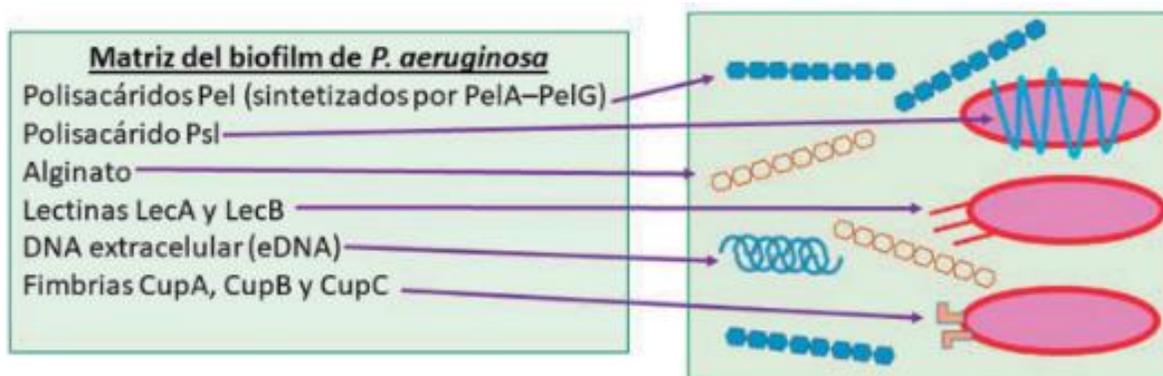
*Pseudomonas aeruginosa* también expresa pili tipo IV (T4P) los cuales se mueven de manera independiente en una superficie mediante un proceso conocido como *twitching motility*, que involucra la contracción y relajación de los pili [135]. Los T4P desempeñan diversos roles, como la adhesión a células humanas, formación de microcolonias, agregación bacteriana, receptor por fagos, evasión de la respuesta inmune y la señalización celular, considerados así, como factores de patogenicidad [66, 126, 136, 137]. En general, se les ha relacionado con la formación de biopelículas, ya que son indispensables para la colonización del huésped [138, 139].



**Figura 9.** Biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 en medio de cultivo líquido Luria-Bertani vista bajo Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), donde también se observa la matriz de exopolisacáridos [140].

*P. aeruginosa* tiene la capacidad para desarrollar biopelículas complejas, las cuales están embebidas en una matriz extracelular formada por proteínas de membrana externa, pilo, exopolisacáridos (EPS) y ácidos nucleicos [133], como se muestra en la **figura 9**.

En *Pseudomonas aeruginosa* las partes implicadas de los EPS se encuentran codificadas por genes encontrados en los tres operones independientes siguientes: *algU*, *psl* y *pel* los cuales están implicados en la creación de biopelículas [141]. *P. aeruginosa* produce tres polisacáridos secretados: PeI , Psl y Alginato, cada uno de los cuales aporta diferentes propiedades fisiológicas a la matriz exopolimérica que recubre su biopelícula (**Figura 10**) [133].



**Figura 10.** Esquema que muestra los componentes de la matriz de la biopelícula de *P. aeruginosa* [142].

En las últimas décadas ha existido un incremento en los reportes científicos que indican la existencia de una relación directa de *P. aeruginosa* con el desarrollo de periimplantitis. Diversos reportes indican que en implantes fallidos es posible aislar a *Pseudomonas aeruginosa* en altas proporciones [143-145], sin embargo, la afinidad de esta especie bacteriana por las superficies de Ti de implantes dentales no ha sido explorada en profundidad.

Además de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* también ha sido frecuentemente encontrada en casos de periimplantitis [145, 146]. Al respecto, se ha informado que la asociación de *P. aeruginosa* con *S. aureus* potencializa la formación de biopelículas, resultando en co-infecciones crónicas más resistentes [77, 111].

## **2.5 *Staphylococcus aureus***

"*Staphylococcus*", del griego "Staphylo" que significa "racimo de uvas" y "*aureus*", del latín "aurum" debido al pigmento color oro que presentan las colonias de esta especie bacteriana [147]. Es un coco Gram positivo, catalasa y coagulasa positivo  $\beta$  hemolítico que forma racimos cuando se asocia. Se ha descubierto que forma parte de la flora común de la especie humana, reside en la zona nasofaríngea, piel, axilas y pliegues inguinales [148, 149]. No obstante, *S. aureus* también es conocida por provocar infecciones en tejidos blandos como la piel, tendones, en músculos, tejido adiposo y vasos sanguíneos, además de poseer la capacidad de colonizar implantes médicos si su crecimiento no es regulado [150, 151], ha sido encontrada en implantes de rodilla, cadera y en implantes dentales, inclusive, se reporta que es la causa principal de bacteriemia nosocomial mundialmente.

Esta condición se debe a que expresa más de 21 adhesinas diferentes conocidas como MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) [152-154] presentes en la superficie de la bacteria, fungiendo un papel determinante en la colonización e invasión celular al hospedero, dichos MSCRAMM favorecen la formación de biopelículas complejas y por lo tanto al aumento de su resistencia [155]. En conjunto, la amplia gama

de los mecanismos de patogenicidad y virulencia que la bacteria posee, le permiten persistir en el huésped y en el ambiente, sobreviviendo a factores adversos, al sistema inmune y a los antimicrobianos.

Diversos autores han reportado la presencia de *Staphylococcus aureus* en lesiones de periimplantitis, informándose además que las superficies de titanio favorecen la colonización de esta especie bacteriana [62, 156]. Sin embargo, a pesar de que los diferentes reportes indican que *S. aureus* tiene cierta afinidad por el Ti, los mecanismos subyacentes de esa afinidad no han sido explorados en profundidad.

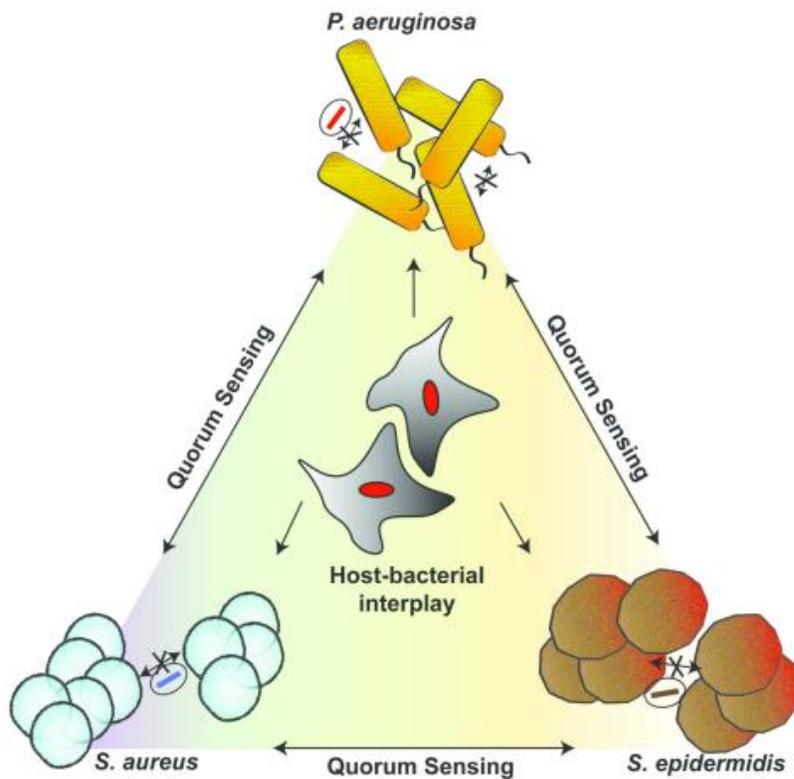
Al igual que lo reportado para *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* se ha encontrado con mayor frecuencia en casos de periimplantitis, y se han asociado con periodontitis resistentes al tratamiento [157]. La creciente evidencia sugiere que *S. aureus* puede ser un patógeno importante en el inicio de algunos casos de periimplantitis [158] y por lo tanto, podría fungir un papel importante en la pérdida implantaría [84].

Es importante tener en cuenta que, en el área médica de la ortopedia, *S. aureus* es el principal agente etiológico de infección de implantes y de la osteomielitis asociada, seguido por *S. epidermidis* y por otras especies como *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* [159-161].

## **2.6 *Staphylococcus epidermidis***

El género *Staphylococcus* coagulasa-negativo se encuentra dentro de los grupos bacterianos que más frecuentemente es aislado en los laboratorios microbiológicos [162], dentro de este género se encuentra *S. epidermidis*, el cual posee características importantes, como ser novobiocina sensible y

coagulasa negativo [163]. Este patógeno es reconocido por su papel en el desarrollo de diversas enfermedades incluyendo osteomielitis, bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos, además de colonizar e infectar prótesis articulares, implantes de cadera y dentales, marcapasos, válvulas cardíacas de tipo protésico, fístulas para hemodiálisis, en catéteres de diálisis peritoneal y endovenosos, injertos vasculares, hasta se ha reportado su presencia en endoftalmitis después de cirugías oculares y endocarditis de la válvula nativa [164].



**Figura 11.** Esquema ilustrativo de una infección polimicrobiana constituida por *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis* que indica la comunicación que tienen entre sí a través del fenómeno bioquímico Quorum Sensing [165].

Otro dato importante, que se ilustra en la **Figura 11**, es el papel que tiene la comunicación QS en la formación de biopelículas, el cual se ha examinado en varias especies bacterianas. En diversos artículos se menciona que en

*Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes* las señales QS y los EPS regulan positivamente la formación de biopelículas, mientras que en *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, QS regula negativamente la formación de biopelículas [165] [166-168].

Aunado a lo anterior, en estudios sobre la microflora bacteriana en implantes dentales de Ti han reportado altas proporciones de *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* [169] colonizando las superficies de dichos dispositivos biomédicos. Por lo que ambas especies bacterianas han sido asociadas a la flora subgingival alrededor de implantes fallidos [170].

### **3. PLANTEAMIENTO**

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* son tres de los microorganismos aislados en la cavidad oral con gran resistencia a tratamientos con antimicrobianos convencionales, colonizadores habituales de dispositivos biomédicos, como implantes dentales de titanio, que en últimas décadas han sido asociado con la pérdida implantaria dental y dispositivos biomédicos de ubicaciones no orales como implantes de cadera o rodilla. Debido a lo anterior, es necesario entender el comportamiento de adhesión de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* sobre superficies de titanio utilizadas para la fabricación de implantes dentales, evaluando, además, como la presencia de una película salival formada sobre los sustratos de Ti modula la adhesión de dichas especies bacterianas.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Debido al uso de primera elección del titanio como biomaterial para la fabricación de implantes dentales y a la alta tasa de pérdida por enfermedad periimplantaria, resulta crucial conocer la afinidad, frecuentemente reportada, de bacterias altamente patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* por superficies de Ti, lo anterior para comprender si dichas especies bacterianas presentan una afinidad marcada por el Ti o bien, es la película salival formada sobre superficies de Ti, la responsable de modular la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* a dichos sustratos.

Diversos estudios confirman que la asociación de *P. aeruginosa* y *S. aureus* potencializa la formación de biopelículas dando lugar a coinfecciones crónicas y más resistentes, sin embargo, ningún reporte conjunta estos microorganismos con medio salival, lo cual nos acerca a condiciones clínicas *in vivo*, por lo tanto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluación del efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

#### **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La película salival formada sobre superficies de titanio modificará la formación de la biopelícula formada por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*?

## **6. HIPÓTESIS**

**H0:** La película salival formada sobre superficies de titanio modificará la formación inicial de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

**H1:** La película salival formada sobre superficies de titanio no modificará la formación inicial de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

## **7. OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Evaluar del efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

### **Objetivos específicos:**

- 1.** Evaluar muestras de saliva total de un sujeto sistémica y periodontalmente sano para la formación de la película salival sobre las superficies de Ti comercialmente puro.
- 2.** Determinar del efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* mediante Espectrofotometría.
- 3.** Determinar del efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* mediante Microcopia Electrónica de Barrido.

## **8. MATERIALES**

### **8.1 Recursos humanos:**

- Tutora y asesor de tesis
- Tesista estandarizada para el manejo de los equipos de laboratorio y realización de pruebas bacterianas

### **8.2 Recursos materiales para el cultivo de microorganismos:**

- Cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43636 (Laboratorio de Biointerfases, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM)
- Cámara de incubación Felisa 35 °C
- Incubadora orbital con control de temperatura Cleaver 35 °C
- Placas de agar TSA con Vitamina K 1%
- Asas bacteriológicas
- Tubos de caldo enriquecidos HK
- Micropipetas de 10 µL, 200 µL y 1000 µL
- Tubos Falcon
- Mechero y piedra

### **8.3 Recursos materiales para los ensayos de formación de la PA:**

- Cámara de incubación Cleaver 35 °C
- Saliva total
- Coctel inhibidor de proteasas
- Filtro Whatmann de 0.20 µm
- Tubos Falcon
- Centrifuga refrigerada
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL y 200 µL
- Puntas de pipetas (azules y amarillas)

- Placas de 24 pozos estériles (Corning™ clear-poliestireno)
- Discos de Ti CP pulidos y estériles
- Pinzas Adson desdentadas
- Tubos Eppendorf de 1.7 mL

#### **8.4 Recursos materiales para los ensayos microbiológicos:**

- Espectrofotómetro
- Tubos Falcon
- Centrifuga refrigerada
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL y 200 µL
- Puntas de pipetas (azules y amarillas)
- Cámara de incubación Felisa 35 °C
- Cámara de incubación Cleaver 35 °C
- Lector de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode, Molecular Devices)
- Placa de 96 pozos estériles (Corning™ clear-poliestireno)
- Tubos Eppendorf de 1.7 mL
- Placas de agar TSA con Vitamina K 1%
- Tubos de caldo enriquecidos TSB con Vitamina K 1%
- Micropipetas de 20 µL, 200 µL y 1000 µL
- Puntas de pipetas (azules y amarillas)
- Pipetas Pasteur
- Asas bacteriológicas
- Mechero y piedra

### **9. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA**

Todos los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Biointerfases de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología, UNAM. Mientras que las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido fueron tomadas en el Instituto de Física de la UNAM. Para todos los ensayos se utilizaron superficies de discos de titanio comercialmente puro (Casa

Straumann) previamente pulidas, lavadas en ultrasonido Symphony VWR con etanol al 70% y esterilizadas en autoclave.

### **9.1 Obtención de las muestras de saliva total**

La toma de saliva total fue realizada por la mañana en un horario de 8:00am a 11:00 am, para lo cual se le pidió al sujeto donador que permaneciera en reposo hasta que una cantidad suficiente de saliva se haya acumulado en la zona anterior lingual. La saliva acumulada fue recolectada en un tubo Falcon de 50 mL y posteriormente procesada como previamente ha sido descrito [25]. En breve, la muestra de saliva fue centrifugada en una centrifugadora Multifuge 3 S-R Heraeus a 7500 x g durante 15 minutos para remover los detritos y sedimentos, para los sobrenadantes aclarados resultantes, se agregó un coctel inhibidor de proteasas sin EDTA (Sigma, 1 $\mu$ L/mL de saliva total). La saliva total obtenida fue filtrada con un filtro estéril marca Corning a 0-45  $\mu$ m y posteriormente a 0.20 $\mu$ m. Por último, la muestra de saliva total obtenida fue almacenada a -80° C para su posterior utilización.

### **9.2 Incubación, durante 2 horas, de las superficies de Ti comercialmente puro con una muestra de saliva total para permitir la formación de la película salival sobre los sustratos de interés**

Se colocaron triplicados de las superficies Ti en placas de cultivo celular 24 pozos y se incubaron con un volumen total de 300  $\mu$ L de la muestra de saliva total previamente procesada, o sólo con H<sub>2</sub>O<sub>DD</sub> (grupo de control), durante 2 horas a 37 °C, bajo agitación constante. Tras la incubación, los discos de Ti se lavaron dos veces con 1 mL de agua destilada estéril, para eliminar las proteínas no

adsorbidas. A continuación, las superficies se transfirieron a nuevas placas de cultivo celular estériles de 24 pocillos para ser inmediatamente utilizadas en los ensayos de formación de biopelícula.

### **9.3 Evaluación del efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* mediante mediciones espectrofotométricas**

Se recolectó el crecimiento bacteriano de cultivos de 24 horas de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43636, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (Laboratorio de Biointerfases Posgrado de Odontología e investigación UNAM) previamente descongelados de una temperatura a - 80°C y se ajustó la densidad óptica (DO) de cada tubo a 1 a 600µm en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer). Se colocaron superficies previamente acondicionadas con la saliva total en placas Thermo Fisher Scientific BioLit de 24 pozos, donde fueron adicionadas con un total de 10<sup>6</sup> células/mL de suspensión de cada cepa de referencia, o bien en cultivo bacteriano mixto. Cada una de las placas fue incubada durante 12 hrs a 37 °C, bajo condiciones de aerobiosis.

Tras la incubación aeróbica, cada superficie de Ti fue lavada dos veces con caldo TSB enriquecido (caldo soya tripticaseína) suplementado con 5µg/mL de hemina. Tras el lavado, se añadió 1 mL de medio de caldo TSB enriquecido y las muestras fueron sometidas a sonicación durante cinco períodos de 10 segundos cada uno, para desprender las bacterias adheridas de cada superficie. Tras los periodos de sonicación, se recobraron 200 µL de la suspensión bacteriana, los

cuales fueron transferidos a placas de 96 pozos. Las placas de cultivo de 96 pozos fueron analizadas con el lector de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode, Molecular Devices) a una  $\lambda = 620 \mu\text{m}$  para determinar el número total de bacterias adheridas en cada sustrato ensayado.

Un juego adicional de superficies de Ti acondicionadas con la película salival acondicionadas con la suspensión bacteriana e incubadas durante 12 hrs a 37 °C, bajo condiciones de aerobiosis, fue procesado para la evaluación de la formación de la biopelícula, como se describe a continuación.

#### **9.4 Evaluación del efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* mediante Microscopía Electrónica de Barrido**

Las superficies de Ti, acondicionadas con la película salival, sobre las cuales se permitió la formación de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fueron fijadas y deshidratadas. Posteriormente, las muestras se recubrieron con Au y se fijaron sobre una cinta de carbono colocada en un porta muestras de aluminio. Las imágenes SEM (JEOL JSM5600-LV, Japón) se obtuvieron en modo de bajo vacío con electrones secundarios a 20-25 kV y 20-25 Pa de presión en la cámara de muestras.

#### **9.5 Análisis estadístico**

Los datos de los recuentos bacterianos totales y de los valores de absorbancia se presentarán como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

Todos los datos se analizarán mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, y se determinarán las diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

## 10. RESULTADOS

### 10. 1 Obtención de las muestras de saliva total y formación de la película salival sobre las superficies de titanio

Para la obtención de las muestras de saliva total se seleccionó a un sujeto sistémica y periodontalmente sano. El sujeto voluntario aceptó su participación en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética en Estudios Humanos de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CIE/0708/11/2018), el cual fue realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Para la investigación, se definió como salud periodontal a la ausencia de sitios con profundidades de sondaje  $\leq 3$  mm y valores de sangrado al sondaje de boca completa  $<10\%$  [171]. Los resultados de la evaluación periodontal completa se presentan en la **tabla 1**.

**Tabla 1.** Características clínicas periodontales del sujeto donador.

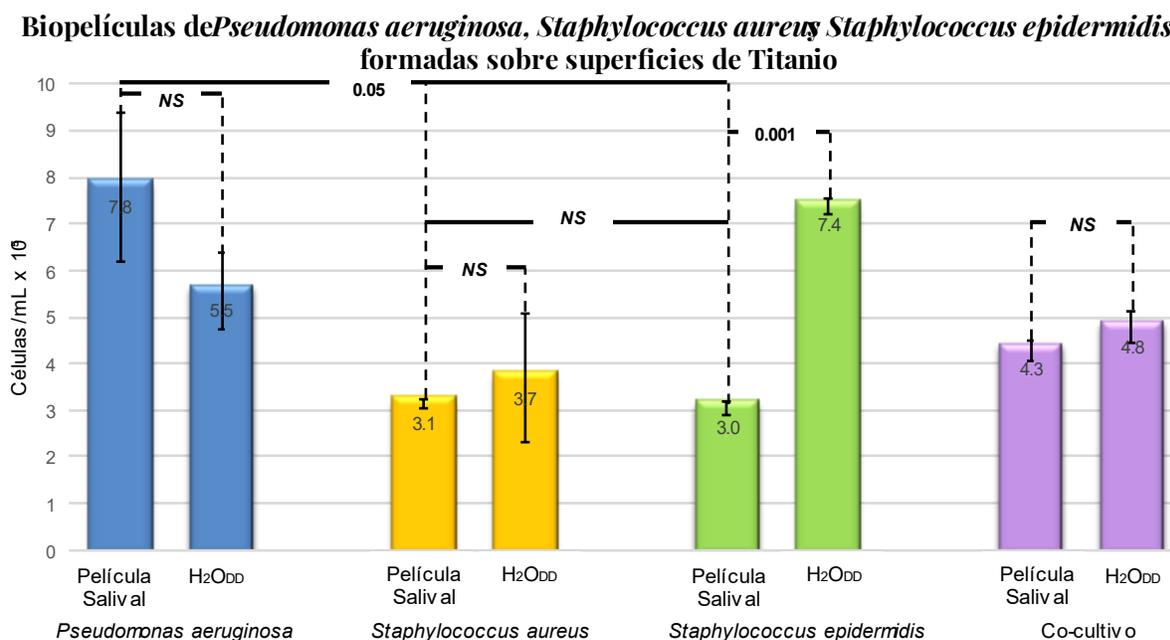
Número de dientes ausentes	4
Profundidad de sondeo (mm)	2.0 $\pm$ 0.1
Nivel de inserción clínica (mm)	1.5 $\pm$ 0.2
% de sitios con:	
Acumulación de Biopelícula	6.1 $\pm$ 0.1
Eritema Gingival	2.0 $\pm$ 0.1
Sangrado al sondeo	1.3 $\pm$ 0.1
Supuración	0 $\pm$ 0

Promedio  $\pm$  Desviación estándar

Con las muestras de saliva total donadas por el sujeto voluntario se procedió a la incubación, durante dos horas, de los sustratos de Ti para que la película salival se formara sobre dichas superficies.

### 10.2 Efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; evaluación mediante mediciones espectrofotométricas

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir de las mediciones por espectrofotometría de la formación de biopelículas de cada una de las bacterias evaluadas en el presente proyecto. La **figura 12** muestra los resultados de la formación de la biopelícula inicial de cada una de las bacterias por separado, además de la evaluación del co-cultivo de las tres especies bacterianas sobre las superficies de Ti acondicionadas con la película salival.



**Figura 12.** Muestra los resultados a partir de las mediciones por espectrofotometría de la formación de biopelículas de cada una de las bacterias de forma individual y en co-cultivo sobre las superficies de Ti acondicionadas con película salival y H<sub>2</sub>O.

Con respecto a la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* sobre las superficies de Ti, en la figura anterior se puede observar que la adhesión de dicha cepa fue mayor en las superficies que estaban cubiertas por la película salival (PA) ( $7.8 \times 10^5 \pm 1.6$ ), en comparación con las superficies de Ti que no fueron acondicionadas con la PA ( $5.5 \times 10^5 \pm 0.8$ ), sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa.

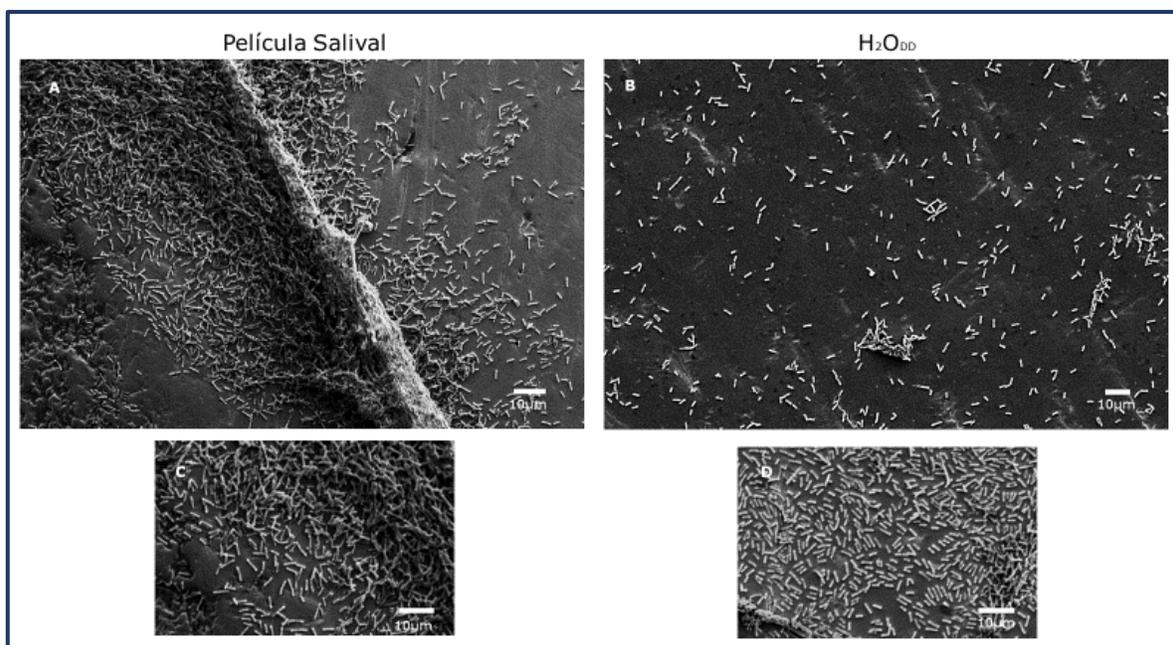
Por otro lado, cuando se evaluó formación de la biopelícula de *S. aureus* sobre los sustratos de Ti, se encontró que hubo mayor adhesión en las superficies que no fueron acondicionadas por la película salival (control) ( $3.7 \times 10^5 \pm 1.4$ ), con respecto a las que sí fueron acondicionadas ( $3.1 \times 10^5 \pm 0.1$ ), dicha diferencia no fue estadísticamente significativa.

Sin embargo, cuando se evaluó la formación de la biopelícula de *S. epidermidis* sobre los sustratos de Ti, se observó un efecto contrario al observado en las dos cepas anteriores, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Es decir, en las superficies que no fueron cubiertas por la película salival la adhesión bacteriana fue mayor ( $7.4 \times 10^5 \pm 0.2$ ) en comparación con las superficies que sí fueron acondicionadas por la PA, sobre las cuales se observó una disminución estadísticamente significativa en la adhesión de *S. epidermidis* ( $3.0 \times 10^5 \pm 0.1$ ) ( $p < 0.001$ ).

Finalmente, cuando se evaluó la formación de la biopelícula del co-cultivo de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis*, se encontró que hubo menor adhesión bacteriana en las superficies que fueron revestidas con la película salival ( $4.3 \times 10^5 \pm 0.2$ ) en comparación con la adhesión observada en las superficies que no fueron cubiertas por la PA ( $4.8 \times 10^5 \pm 0.4$ ), sin embargo, nuevamente, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa.

### 10.3 Efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, evaluación mediante Microscopia Electrónica de Barrido.

A continuación, se muestran las imágenes obtenidas bajo Microscopia Electrónica de Barrido mediante electrones secundarios de las biopelículas formadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* formadas sobre superficies de Ti acondicionadas con la película salival (experimental) y sin acondicionar por la película salival (control).



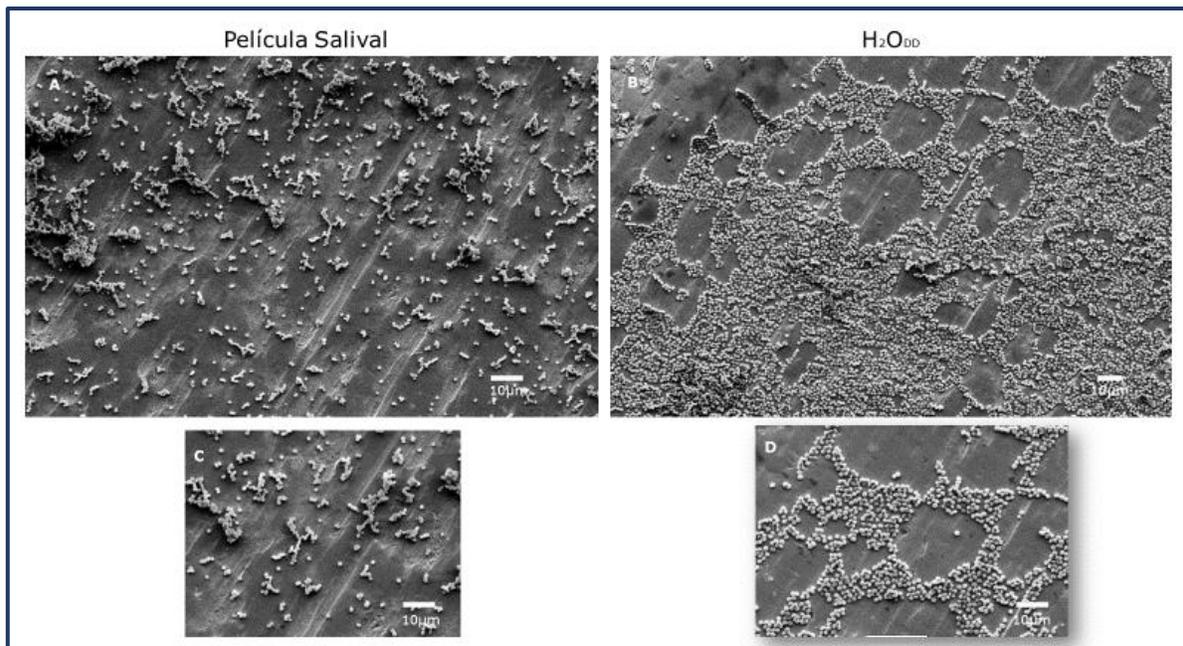
**Figura 13.** Biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* formadas sobre superficies de Ti **A.** Biopelícula formada sobre una superficie de Ti acondicionada con película salival (magnificación: x1000; 5kV) **B.** Biopelícula formada sobre una superficie de Ti sin acondicionar con película salival (magnificación: x1000; 5Kv) **C.** Mayor magnificación (x2500, 5kV) de la biopelícula formada en la superficie de Ti acondicionada con película salival **D.** Mayor magnificación (x2500; 5kV) de la biopelícula formada sobre la superficie de Ti control (incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>DD</sub>).

En la **figura 13** es posible observar la biopelícula formada por *Pseudomonas* sobre las superficies de titanio acondicionadas con la película salival comparadas con la biopelícula de *P. aeruginosa* formada superficies de Ti que no fueron acondicionadas con la PA (control).

Como se muestra en la **figura 13A y 13C** que corresponden a las superficies de Ti acondicionadas por la película salival, se observan mayor número de células bacterianas adheridas a la superficie, además de observarse la formación de una biopelícula sobre dichas superficies, esto en comparación con las superficies que no estaban cubiertas con la PA (**Figura 13B y 13D**), donde es evidente que hubo menor adhesión bacteriana, esto concuerda con los resultados obtenidos por medio de las mediciones espectrofotométricas. Es importante señalar que en las superficies de Ti experimentales y controles no se observa ninguna célula en división celular en ninguna de las micrografías evaluadas.

Contrario a lo observado en las biopelículas formadas por *P. aeruginosa* las biopelículas formadas por *Staphylococcus aureus* (**Figura 14**) fueron más complejas cuando se formaron sobre los sustratos de Ti control, es decir, aquellos que fueron incubados con  $H_2O_{dd}$  en comparación con las biopelículas de *S. aureus* que se formaron sobre los sustratos de Ti acondicionados con la película salival. En la **figura 14A**, correspondientes a una superficie de Ti acondicionada con la película salival, es posible observar células de *Staphylococcus aureus*, formando racimos bacterianos, distribuidas periódicamente sobre el sustrato acondicionado, sin embargo, sobre estas superficies no fue posible observar células bacterianas en división celular, ni

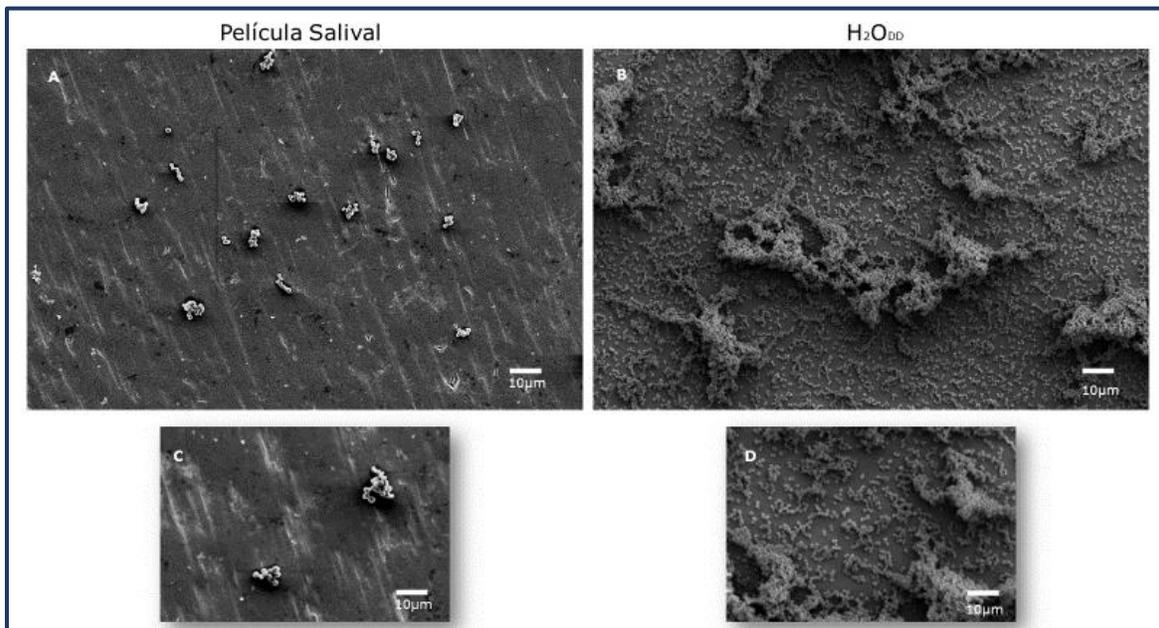
formación de biopelículas complejas, este hallazgo puede ser apreciado a mayor detalle mejormente apreciados en la **figura 14C**. Son respecto a los sustratos de Ti control (no acondicionadas con la película salival), las **figuras 14B y 14D** muestran que en dichas superficies ocurrió mayor adhesión bacteriana, observándose también, una distribución más homogénea sobre la superficie de racimos de cocos. Los hallazgos observados a partir de las micrografías obtenidas por Microscopía de Barrido concuerdan con los resultados obtenidos mediante el análisis espectrofotométrico.



**Figura 14.** Biopelículas de *Staphylococcus aureus* formadas sobre superficies de Titanio **A.** Biopelícula formada sobre una superficie de Ti acondicionada con película salival (magnificación x1000; 5K) **B.** Biopelícula formada sobre una superficie de Ti sin acondicionar con película salival (magnificación x1000; 5K) **C.** Mayor magnificación (x2500; 5Kv) de la biopelícula formada sobre una superficie de Ti acondicionada con película salival **D.** Mayor magnificación (x2500; 5Kv) de la biopelícula formada sobre una superficie de Ti control (incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>DD</sub>).

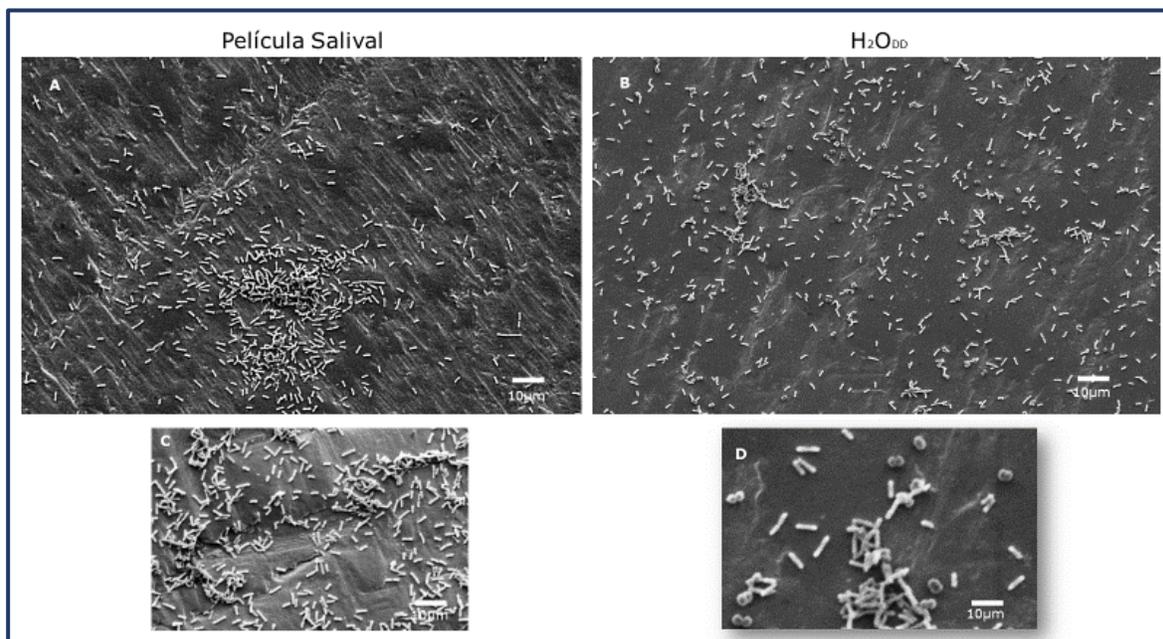
Similar a lo observado en la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* sobre los sustratos de Ti con (experimental) o sin película salival (control). La formación de las biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* fue

mayor en los sustratos control, es decir, aquellos que no estuvieron acondicionados con la película salival (**Figura 15**). En las superficies de Ti que fueron acondicionadas con la película salival (**Figura 15A y 15C**), es posible apreciar pocos racimos bacterianos adheridos en la superficie acondicionada, en comparación con las superficies de Ti que no estuvieron acondicionadas con la película salival; sobre dichas superficies fue posible observar un notable incremento en la adhesión bacteriana, además de la formación de biopelículas complejas cubriendo gran parte de la superficie de Ti (**Figura 15B y 15D**). Los resultados concuerdan con los datos cuantitativos obtenidos a través de las mediciones espectrofotométricas.



**Figura 15.** Biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* formadas sobre superficies de Ti **A.** Biopelícula formada sobre una superficie de Ti acondicionada con película salival (magnificación x1000; 5K) **B.** Biopelícula formada sobre una superficie de Ti sin acondicionar con película salival (magnificación x1000; 5K) **C.** Mayor magnificación (x2500; 5Kv) de la biopelícula formada sobre una superficie de Ti acondicionada con película salival **D.** Mayor magnificación (x2500; 5Kv) de la biopelícula formada sobre una superficie de Ti control (incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>DD</sub>).

Finalmente, en la **figura 16** se muestran las imágenes representativas de la formación de biopelículas constituidas por el co-cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, en las cuales es posible observar las diferencias en la formación de biopelículas sobre las superficies de Ti acondicionadas con la película salival en comparación con las biopelículas formadas sobre las superficies de titanio no acondicionadas con la película salival (superficies control incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>DD</sub>).



**Figura 16.** Biopelículas constituidas por el co-cultivo de las especies bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* formadas sobre superficies Titanio **A.** Biopelícula formada sobre una superficie de Ti acondicionada con película salival (magnificación x1000; 5K) **B.** Biopelícula formada sobre una superficie de Ti sin acondicionar con película salival (magnificación x1000; 5K) **C.** Mayor magnificación (x2500; 5Kv) de la biopelícula formada sobre una superficie de Ti acondicionada con película salival **D.** Mayor magnificación (x2500; 5Kv) de la biopelícula formada sobre una superficie de Ti control (incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>DD</sub>).

Como se puede observar en la figura anterior, no es posible identificar diferencias en la adhesión bacteriana en los sustratos acondicionados con la película salival en comparación con los sustratos que no fueron acondicionados

con la película saliva (control). Esto fue corroborado en las imágenes obtenidas a mayor magnificación (**Figuras 16C y 16D**). Un hallazgo importante consistió en la observación en la que las células bacterianas, derivadas del co-cultivo, se encontraron adheridas periódicamente sobre los sustratos de Ti experimental y control, con una aparente predominancia en la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa*, sobre todo en las superficies acondicionadas con la película salival (**Figura 16C**), ya que se observa la presencia de bacilos que concuerdan con su morfología, mientras que en las superficies que no estuvieron acondicionadas por la película saliva, fue posible observar en menores cantidades la adhesión de células bacterianas en forma de cocos, que podrían coincidir con la adhesión de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* a dichas superficies (**Figura 16D**).

## **11. DISCUSIÓN**

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo principal evaluar del efecto de la película salival formada sobre superficies de titanio en la formación inicial de la biopelícula constituida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Para cumplir con el objetivo general, se evaluó la adhesión de cada una de las cepas de interés sobre sustratos de Ti con o sin acondicionar con la película salival, así como la formación de biopelículas iniciales de las cepas bacterianas en co-cultivo.

A partir de los resultados obtenidos por medio de las mediciones espectrofotométricas y las evaluaciones por Microscopía Electrónica de Barrido se pudo observar que la presencia de la película salival formada sobre los sustratos de Ti inhibió la adhesión bacteriana de las cepas *Staphylococcus*

*aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, así con la formación de biopelículas iniciales del co-cultivo las cepas bacterianas *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Sin embargo, cuando se evaluó la adhesión de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* de forma individual, la presencia de la película salival formada sobre los sustratos de Ti favoreció la formación de biopelículas complejas, dicho incremento en la adhesión de *P. aeruginosa* sobre los sustratos acondicionados por la película salival fue estadísticamente significativo en comparación con los cultivos individuales de las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Previamente se ha demostrado que la adhesión de *Staphylococcus aureus* sobre superficies de implantes dentales de Ti [158] [84] se ve favorecida por las características químicas de dicho sustrato [62, 156]. Por otro lado, *S. aureus* no sólo es aislado con mayor frecuencia en sitios con periimplantitis, sino que también ha sido asociado con casos de periodontitis resistentes al tratamiento [157]. La creciente evidencia sugiere que *S. aureus* puede ser un patógeno importante en el inicio de algunos casos de periimplantitis [158] y por lo tanto, podría fungir un papel importante en la pérdida implantaría [84]. Sin embargo, a pesar de que los diferentes reportes indican que *S. aureus* tiene cierta afinidad por el Ti [172], los mecanismos subyacentes de esa afinidad no han sido explorados en profundidad.

En general, en el presente trabajo, se observó que la adhesión de *S. aureus* sobre las superficies de Ti acondicionadas o sin acondicionar con la película salival fue menor en comparación con la adhesión de *Staphylococcus epidermidis* sobre las superficies de Ti. Con respecto a la adhesión de

*Staphylococcus epidermidis* sobre las superficies de Ti, a partir de los resultados obtenidos, se encontró que la presencia de la película salival sobre los sustratos de Ti tuvo un efecto inhibitorio importante sobre dicha cepa. Previamente se ha mostrado que *S. epidermidis* puede colonizar superficies de Ti, los reportes indican que esta cepa bacteriana tiene afinidad por estos sustratos junto con *S. aureus* ya que ambas cepas bacterianas son aisladas en altas proporciones de superficies de implantes dentales de Ti [169, 173, 174]. Es importante enfatizar que tanto *Staphylococcus aureus* como *S. epidermidis* han sido asociadas con la flora subgingival alrededor de implantes fallidos [170].

Por otro lado, en el presente proyecto de investigación se encontró que la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* fue mayor en superficies de Ti acondicionadas con película salival, esto en comparación con la adhesión de las especies bacterianas *S. aureus* y *S. epidermidis* sobre las superficies de Ti acondicionadas con la película salival, evaluadas en cultivos individuales.

Cuando se evaluó la formación de biopelículas del co-cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* sobre las superficies de titanio, se observó que hubo una mayor predominancia de la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* en comparación de la colonización por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, esto concuerda con evidencia reportada previamente [29, 175] que muestra la dominancia de *P. aeruginosa* sobre *S. aureus* y *S. epidermidis* sobre superficies de implantes dentales de Ti ya que muestra mayor adhesión y presenta afinidad por superficies lisas de Ti grado 2 y mayormente de 4 ya que produjeron una cantidad considerablemente mayor de exopolisacáridos (EPS) sobre estas

superficies [143-146], además de coincidir con los datos que afirman la copatogenicidad de las mismas y la competencia por el medio [29], dato observado en el presente proyecto de las imágenes obtenidas de las superficies de Ti vistas bajo Microscopía Electrónica de Barrido donde se pudo examinar la posible predominancia de bacilos adheridos sobre las superficies de Ti experimentales y controles. La literatura reporta que *S. aureus* y *S. epidermidis* son capaces de proliferar abundantemente sobre superficies bióticas y abióticas como el Ti y sus aleaciones cuando se encuentran juntas [108, 145, 174]. Sin embargo, no existen reportes previos que evalúen la colonización conjunta de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis* sobre superficies de Ti acondicionadas con la película salival.

## **12. CONCLUSIONES**

A partir de los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación se puede concluir que la presencia de la película salival sobre sustratos de Ti comercialmente puro modula la adhesión de las cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Por un lado, la presencia de la película salival favoreció de forma positiva la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* sobre los sustratos de Ti, mientras que inhibió la formación de biopelículas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

En el caso de la biopelícula formada sobre los sustratos de Ti comercialmente puro por las cepas bacterianas en co-cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, la película salival tuvo el mismo efecto al inhibir la adhesión de *S. aureus* y *S. epidermidis*

y el favorecimiento de la adhesión de los bacilos de *P. aeruginosa* que predominó por sobre las especies de cocos estudiadas.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que, la formación de biopelículas de las cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* en superficies de titanio representativas de implantes dentales fue modulada por la presencia de la película salival.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Hannig, M. and M. Balz, *Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion*. Caries Res, 2001. **35**(2): p. 142-8.
2. Melchora, F.C., L.R. Guadalupe, and L.J. Battellino, *Película adquirida salival: revisión de la literatura*. Acta Odontológica Venezolana, 2007. **45**: p. 479-486.
3. Siqueira, W.L., W. Custodio, and E.E. McDonald, *New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle*. J Dent Res, 2012. **91**(12): p. 1110-8.
4. Araújo, M.M., *Los biofilms orales y sus consecuencias en la caries dental y enfermedad periodontal Oral biofilms and their consequences in dental caries and periodontal*. 2021.
5. Berg, I.C., M.W. Rutland, and T. Arnebrant, *Lubricating properties of the initial salivary pellicle--an AFM study*. Biofouling, 2003. **19**(6): p. 365-9.
6. Lendenmann, U., J. Grogan, and F.G. Oppenheim, *Saliva and Dental Pellicle-A Review*. Advances in Dental Research, 2000. **14**: p. 22 - 28.
7. Hay, D.I., *The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite*. Arch Oral Biol, 1973. **18**(12): p. 1517-29.
8. Jensen, J.L., M.S. Lamkin, and F.G. Oppenheim, *Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions*. J Dent Res, 1992. **71**(9): p. 1569-76.
9. Lamkin, M.S., A.A. Arancillo, and E.G. Oppenheim, *Temporal and Compositional Characteristics of Salivary Protein Adsorption to Hydroxyapatite*. Journal of Dental Research, 1996. **75**(2): p. 803-808.
10. Vacca Smith, A.M. and W.H. Bowen, *In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs*. Arch Oral Biol, 2000. **45**(4): p. 277-91.
11. Hannig, M. and A. Joiner, *The structure, function and properties of the acquired pellicle*. Monogr Oral Sci, 2006. **19**: p. 29-64.
12. Mayhall, C.W., *Amino acid composition of experimental salivary pellicles*. Journal of periodontology, 1977. **48**(2): p. 78-91.
13. Al-Hashimi, I. and M.J. Levine, *Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle*. Arch Oral Biol, 1989. **34**(4): p. 289-95.
14. Yao, Y., et al., *Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry*. Arch Oral Biol, 2001. **46**(4): p. 293-303.
15. Li, J., et al., *Statherin is an in vivo pellicle constituent: identification and immunoquantification*. Arch Oral Biol, 2004. **49**(5): p. 379-85.
16. Hannig, C., et al., *Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle*. Arch Oral Biol, 2004. **49**(6): p. 469-75.
17. Lamkin, M.S., et al., *New in vitro model for the acquired enamel pellicle: pellicles formed from whole saliva show inter-subject consistency in protein composition and proteolytic fragmentation patterns*. J Dent Res, 2001. **80**(1): p. 385-8.
18. Yao, Y., M.S. Lamkin, and F.G. Oppenheim, *Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase*. J Dent Res, 1999. **78**(11): p. 1696-703.
19. Chawhuaveang, D.D., et al., *Acquired salivary pellicle and oral diseases: A literature review*. Journal of Dental Sciences, 2021. **16**(1): p. 523-529.
20. Mayhall, C.W., *Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth*. Archives of Oral Biology, 1970. **15**(12): p. 1327-1341.
21. Mergenhagen, S.E., et al., *Molecular basis of bacterial adhesion in the oral cavity*. Rev Infect Dis, 1987. **9 Suppl 5**: p. S467-74.

22. Slomiany, B.L., et al., *Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man*. Arch Oral Biol, 1986. **31**(3): p. 187-91.
23. Slomiany, B.L., et al., *Effect of lipids on the lactic acid retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in vitro from saliva of caries-resistant and caries-susceptible human adults*. Arch Oral Biol, 1990. **35**(3): p. 175-80.
24. Gibbons, R.J. and I. Etherden, *Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles*. Infect Immun, 1983. **41**(3): p. 1190-6.
25. Martínez-Hernández, M., et al., *Roughness and wettability of titanium implant surfaces modify the salivary pellicle composition*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2021. **109**(7): p. 1017-1028.
26. Vogler, E.A., *Protein adsorption in three dimensions*. Biomaterials, 2012. **33**(5): p. 1201-37.
27. Horbett, T.A., *Fibrinogen adsorption to biomaterials*. J Biomed Mater Res A, 2018. **106**(10): p. 2777-2788.
28. Gristina, A.G., *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration*. Science, 1987. **237**(4822): p. 1588-95.
29. Pham, V.T.H., et al., *"Race for the Surface": Eukaryotic Cells Can Win*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016. **8**(34): p. 22025-22031.
30. Dryden, M., *Prosthetic joint infection: managing infection in a bionic era*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69 Suppl 1**: p. i3-4.
31. Svendsen, I.E. and L. Lindh, *The composition of enamel salivary films is different from the ones formed on dental materials*. Biofouling, 2009. **25**(3): p. 255-61.
32. Xu, L.C. and C.A. Siedlecki, *Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces*. Biomaterials, 2007. **28**(22): p. 3273-83.
33. Skepö, M., *Model simulations of the adsorption of statherin to solid surfaces: Effects of surface charge and hydrophobicity*. J Chem Phys, 2008. **129**(18): p. 185101.
34. Cavalcanti, Y.W., et al., *Titanium Surface Roughing Treatments contribute to Higher Interaction with Salivary Proteins MG2 and Lactoferrin*. The journal of contemporary dental practice, 2015. **16 2**: p. 141-6.
35. Ballet, T., et al., *Protein conformational changes induced by adsorption onto material surfaces: an important issue for biomedical applications of material science*. Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences, 2010. **58**(No 2): p. 303-315.
36. Sakiyama, T., et al., *Adsorption characteristics of bovine serum albumin and its peptide fragments on a stainless steel surface*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2004. **33**: p. 77-84.
37. Nakanishi, K., T. Sakiyama, and K. Imamura, *On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **91**(3): p. 233-244.
38. Benavidez, T.E., et al., *Adsorption of soft and hard proteins onto OTCEs under the influence of an external electric field*. Langmuir, 2015. **31**(8): p. 2455-62.
39. Martínez-Hernández, M., V.I. García-Pérez, and A. Almaguer-Flores, *Potential of salivary proteins to reduce oral bacterial colonization on titanium implant surfaces*. Materials Letters, 2019. **252**: p. 120-122.
40. Ventura, T., et al., *The proteomic profile of the acquired enamel pellicle according to its location in the dental arches*. Arch Oral Biol, 2017. **79**: p. 20-29.
41. Martini, T., et al., *Proteomics of acquired pellicle in gastroesophageal reflux disease patients with or without erosive tooth wear*. J Dent, 2019. **81**: p. 64-69.

42. Siqueira, W.L., et al., *Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS*. J Proteome Res, 2007. **6**(6): p. 2152-60.
43. Pantaroto, H.N., et al., *Proteome analysis of the salivary pellicle formed on titanium alloys containing niobium and zirconium*. Biofouling, 2019. **35**(2): p. 173-186.
44. Wei, C.X., et al., *In Vitro Salivary Protein Adsorption Profile on Titanium and Ceramic Surfaces and the Corresponding Putative Immunological Implications*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(9).
45. Dorkhan, M., G. Svensäter, and J.R. Davies, *Salivary pellicles on titanium and their effect on metabolic activity in Streptococcus oralis*. BMC Oral Health, 2013. **13**(1): p. 32.
46. Cavalcanti, I.M., et al., *Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma*. Arch Oral Biol, 2014. **59**(7): p. 695-703.
47. Zuanazzi, D., Y. Xiao, and W.L. Siqueira, *Evaluating protein binding specificity of titanium surfaces through mass spectrometry-based proteomics*. Clin Oral Investig, 2021. **25**(4): p. 2281-2296.
48. Yao, Y., et al., *Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5300-8.
49. Hannig, M., et al., *Initial salivary pellicle formation on solid substrates studied by AFM*. J Nanosci Nanotechnol, 2004. **4**(5): p. 532-8.
50. Hannig, M., *Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period*. Clin Oral Investig, 1999. **3**(2): p. 88-95.
51. Skjørland, K.K., M. Rykke, and T. Sønju, *Rate of pellicle formation in vivo*. Acta Odontol Scand, 1995. **53**(6): p. 358-62.
52. Sønju, T. and G. Rölla, *Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis*. Caries Res, 1973. **7**(1): p. 30-8.
53. Kuboki, Y., K. Teraoka, and S. Okada, *X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel*. J Dent Res, 1987. **66**(5): p. 1016-9.
54. Rolla, G. and M. Rykke, *Evidence for presence of micelle-like protein globules in human saliva*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1994. **3**(3): p. 177-182.
55. Young, A., M. Rykke, and G. Rölla, *Quantitative and qualitative analyses of human salivary micelle-like globules*. Acta Odontol Scand, 1999. **57**(2): p. 105-10.
56. Hannig, M., et al., *Atomic force microscopy study of salivary pellicles formed on enamel and glass in vivo*. Colloid and Polymer Science, 2001. **279**(5): p. 479-483.
57. Iontcheva, I., F.G. Oppenheim, and R.F. Troxler, *Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins*. J Dent Res, 1997. **76**(3): p. 734-43.
58. Yao, Y., M.S. Lamkin, and F.G. Oppenheim, *Pellicle precursor protein crosslinking characterization of an adduct between acidic proline-rich protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase*. J Dent Res, 2000. **79**(4): p. 930-8.
59. Flores, A.A. and J.G.V. Olea, *Ecología oral*. 2017: Editorial El Manual Moderno.
60. Database, e.H.O.M. 2023; Available from: <https://www.homd.org/>.
61. Costerton, J.W., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *Biofilm in implant infections: its production and regulation*. Int J Artif Organs, 2005. **28**(11): p. 1062-8.
62. Paredes Rodríguez, V.M., et al., *Enfermedades periimplantarias I: definición y etiopatogenia*. Cient. dent.(Ed. impr.), 2016: p. 97-101.

63. Tolker-Nielsen, T. and S. Molin, *Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities*. Microb Ecol, 2000. **40**(2): p. 75-84.
64. Sutherland, I., *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microbiology (Reading), 2001. **147**(Pt 1): p. 3-9.
65. Farinati, A., *Biopelículas: Un desafío para entender la patogénesis y la terapia antiinfectiva*. Apunt Lab NVI Britania, 2016: p. 1-15.
66. Sharma, G., et al., *Pseudomonas aeruginosa biofilm: Potential therapeutic targets*. Biologicals, 2014. **42**(1): p. 1-7.
67. Rutherford, S.T. and B.L. Bassler, *Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(11).
68. Costerton, J.W., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *Bacterial communications in implant infections: a target for an intelligence war*. Int J Artif Organs, 2007. **30**(9): p. 757-63.
69. Fernández, C.E., *Una de las enfermedades más prevalentes del mundo no es transmisible y puede ser controlada*. Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral, 2016. **9**(2): p. 175-176.
70. Papapanou, P.N., et al., *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. J Clin Periodontol, 2018. **45 Suppl 20**: p. S162-s170.
71. Haffajee, A.D., et al., *Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(5): p. 346-53.
72. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment*. J Periodontal Res, 1991. **26**(3 Pt 2): p. 195-212.
73. Neiders, M.E., et al., *Heterogeneity of virulence among strains of Bacteroides gingivalis*. Journal of Periodontal Research, 1989. **24**(3): p. 192-198.
74. Haffajee, A.D. and S.S. Socransky, *Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases*. Periodontol 2000, 1994. **5**: p. 78-111.
75. Franch, F., F. Luengo, and A. Bascones, *Evidencia microbiana de la periimplantitis, factores de riesgo coadyuvantes, diagnóstico y tratamiento según los protocolos científicos*. Avances en Periodoncia e Implantología Oral, 2004. **16**: p. 143-156.
76. Araujo, M.G. and J. Lindhe, *Peri-implant health*. Journal of Periodontology, 2018. **89**: p. S249-S256.
77. Schwarz, F., et al., *Peri-implantitis*. J Periodontol, 2018. **89 Suppl 1**: p. S267-s290.
78. Casado, P.L., et al., *Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites*. Implant dentistry, 2011. **20**(3): p. 226-235.
79. Renvert, S., et al., *Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation*. Clinical oral implants research, 2007. **18**(4): p. 509-516.
80. Renvert, S. and G.R. Persson, *Treatment of periodontal disease in older adults*. Periodontology 2000, 2016. **72**(1): p. 108-119.
81. Leonhardt, Å., S. Renvert, and G. Dahlén, *Microbial findings at failing implants*. Clinical oral implants research, 1999. **10**(5): p. 339-345.
82. Mombelli, A. and F. Décaillot, *The characteristics of biofilms in peri-implant disease*. Journal of clinical periodontology, 2011. **38**: p. 203-213.
83. Schwarz, F., K. Becker, and S. Renvert, *Efficacy of air polishing for the non-surgical treatment of peri-implant diseases: a systematic review*. Journal of clinical periodontology, 2015. **42**(10): p. 951-959.
84. Albertini, M., et al., *Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis*. Clinical Oral Implants Research, 2015. **26**(8): p. 937-941.

85. Jankovic, S., et al., *Prevalence of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival plaque at peri-implantitis, mucositis and healthy sites. A pilot study.* International journal of oral and maxillofacial surgery, 2011. **40**(3): p. 271-276.
86. Rakic, M., M.G. Grusovin, and L. Canullo, *The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review.* International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 2016. **31**(2).
87. Padial-Molina, M., et al., *Microbial profiles and detection techniques in peri-implant diseases: a systematic review.* Journal of oral & maxillofacial research, 2016. **7**(3).
88. Pérez Arenas, D.V. and J. Pérez Avendaño, *Características microbiológicas de la periimplantitis y la periodontitis.* MEDISAN, 2020. **24**: p. 982-1003.
89. Peña Sisto, M., et al., *Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas.* MEDISAN, 2012. **16**: p. 1137-1148.
90. Correa, D.R.N., et al., *Microstructure and selected mechanical properties of aged Ti-15Zr-based alloys for biomedical applications.* Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018. **91**: p. 762-771.
91. Tanoue, N., et al., *Longevity of resin-bonded fixed partial dentures made of metal alloys: A review of the literature.* J Prosthodont Res, 2021. **65**(3): p. 267-272.
92. Nazemismalman, B., et al., *Polarography Can Successfully Quantify Heavy Metals in Dentistry.* Medicina (Kaunas), 2022. **58**(3).
93. Hanawa, T., *In vivo metallic biomaterials and surface modification.* Materials Science and Engineering A, 1999. **267**(2): p. 260-266.
94. Hanawa, T., *Metal ion release from metal implants.* Materials Science and Engineering: C, 2004. **24**(6-8): p. 745-752.
95. Blesa, M.A., P.J. Morando, and A.E. Regazzoni, *Chemical dissolution of metal oxides.* 2018: CRC press.
96. Aas, J.A., et al., *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity.* Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(11): p. 5721-5732.
97. Mu, Y., et al., *Metal ion release from titanium with active oxygen species generated by rat macrophages in vitro.* J Biomed Mater Res, 2000. **49**(2): p. 238-43.
98. Vanegas Acosta, J.C., D. Garzón-Alvarado, and M. Casale, *Interacción entre osteoblastos y superficies de titanio:: aplicación en implantes dentales.* Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 2010. **29**: p. 0-0.
99. Salazar-Jiménez, J.A., *Introduction to Corrosion Phenomena: Types, Influencing Factors and Control for Material's Protection.* Revista Tecnología en Marcha, 2015. **28**(3): p. 127-136.
100. Cárdenas, J. and R. Landers, *Análisis químico y topográfico de la superficie de implantes dentales.* Odontología Sanmarquina, 2014. **15**: p. 5.
101. Hanawa, T. and M. Ota, *Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution.* Biomaterials, 1991. **12**(8): p. 767-74.
102. Hanawa, T., K. Asami, and K. Asaoka, *Repassivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated bioliquid.* J Biomed Mater Res, 1998. **40**(4): p. 530-8.
103. Rodil, S.E., *Modificación superficial de biomateriales metálicos.* Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 2009. **29**: p. 67-83.
104. Schwarz, F., et al., *Surgical therapy of peri-implantitis.* Periodontology 2000, 2022. **88**(1): p. 145-181.
105. Hook, A.L., et al., *Discovery of novel materials with broad resistance to bacterial attachment using combinatorial polymer microarrays.* Adv Mater, 2013. **25**(18): p. 2542-7.

106. Omali, N.B., et al., *Protein deposition and its effect on bacterial adhesion to contact lenses*. *Optom Vis Sci*, 2013. **90**(6): p. 557-64.
107. Becker, K., C. Heilmann, and G. Peters, *Coagulase-negative staphylococci*. *Clin Microbiol Rev*, 2014. **27**(4): p. 870-926.
108. Speziale, P., et al., *Protein-based biofilm matrices in Staphylococci*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. **4**: p. 171.
109. Pietrocola, G., et al., *Molecular Interactions of Human Plasminogen with Fibronectin-binding Protein B (FnBPB), a Fibrinogen/Fibronectin-binding Protein from Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(35): p. 18148-62.
110. Buck, A.W., et al., *Bonds between fibronectin and fibronectin-binding proteins on Staphylococcus aureus and Lactococcus lactis*. *Langmuir*, 2010. **26**(13): p. 10764-70.
111. Ortega-Peña, S. and E. Hernández-Zamora, *Microbial biofilms and their impact on medical areas: physiopathology, diagnosis and treatment*. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 2018. **75**: p. 79-88.
112. Ryder, C., M. Byrd, and D.J. Wozniak, *Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. *Curr Opin Microbiol*, 2007. **10**(6): p. 644-8.
113. Campoccia, D., et al., *Exopolysaccharide Production by Staphylococcus Epidermidis and its Relationship with Biofilm Extracellular DNA*. *The International Journal of Artificial Organs*, 2011. **34**(9): p. 832-839.
114. Chen, Y., et al., *Nanoscale cell wall deformation impacts long-range bacterial adhesion forces on surfaces*. *Appl Environ Microbiol*, 2014. **80**(2): p. 637-43.
115. Kim, K.Y. and J.F. Frank, *Effect of Nutrients on Biofilm Formation by Listeria monocytogenes on Stainless Steel*. *J Food Prot*, 1995. **58**(1): p. 24-28.
116. Lerebour, G., S. Cupferman, and M.N. Bellon-Fontaine, *Adhesion of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis to the Episkin reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate*. *J Appl Microbiol*, 2004. **97**(1): p. 7-16.
117. Dan, N., *The effect of charge regulation on cell adhesion to substrates: salt-induced repulsion*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003. **27**(1): p. 41-47.
118. Gilbert, P., et al., *Surface characteristics and adhesion of Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Bacteriol*, 1991. **71**(1): p. 72-7.
119. Narendran, V., *Bacterial attachment to meat surfaces : a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Food Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand*. 2003, Massey University.
120. Strateva, T. and D. Yordanov, *Pseudomonas aeruginosa—a phenomenon of bacterial resistance*. *Journal of medical microbiology*, 2009. **58**(9): p. 1133-1148.
121. Cendra, M.d.M. and E. Torrents, *Pseudomonas aeruginosa biofilms and their partners in crime*. *Biotechnology Advances*, 2021. **49**: p. 107734.
122. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. *Science*, 1999. **284**(5418): p. 1318-1322.
123. Lasa, I., et al., *Biofilms bacterianos e infección*. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 2005. **28**: p. 163-175.
124. Shah, N.B., et al., *Pseudomonas prosthetic joint infections: a review of 102 episodes*. *Journal of Bone and Joint Infection*, 2016. **1**(1): p. 25-30.
125. Ding, C., et al., *Prevalence of Pseudomonas aeruginosa and antimicrobial-resistant Pseudomonas aeruginosa in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis*. *Int J Infect Dis*, 2016. **49**: p. 119-28.
126. Ochoa, S.A., et al., *Pathogenic characteristics of Pseudomonas aeruginosa strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation*. *Boletín médico del hospital infantil de México*, 2013. **70**(2): p. 136-150.

127. Stover, C.K., et al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. *Nature*, 2000. **406**(6799): p. 959-964.
128. Mesquita, C.S., P. Soares-Castro, and P.M. Santos. *Pseudomonas aeruginosa: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance*. 2013.
129. Arora, S.K., et al., *The Pseudomonas aeruginosa flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion*. *Infect Immun*, 1998. **66**(3): p. 1000-7.
130. Al-Wrafy, F., et al., *Pathogenic factors of Pseudomonas aeruginosa - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2017. **71**(0): p. 78-91.
131. Arnason, J.W., et al., *Human  $\beta$ -defensin-2 production upon viral and bacterial co-infection is attenuated in COPD*. *PLOS ONE*, 2017. **12**(5): p. e0175963.
132. Cendra, M.d.M., M. Christodoulides, and P. Hossain, *Signaling Mediated by Toll-Like Receptor 5 Sensing of Pseudomonas aeruginosa Flagellin Influences IL-1 $\beta$  and IL-18 Production by Primary Fibroblasts Derived from the Human Cornea*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017. **7**.
133. Kipnis, E., T. Sawa, and J. Wiener-Kronish, *Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis*. *Medecine et maladies infectieuses*, 2006. **36**(2): p. 78-91.
134. Bergsbaken, T., S.L. Fink, and B.T. Cookson, *Pyroptosis: host cell death and inflammation*. *Nature Reviews Microbiology*, 2009. **7**(2): p. 99-109.
135. Xicohtencatl-Cortes, J., et al., *The type 4 pili of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(1): p. 411-21.
136. Skerker, J.M. and H.C. Berg, *Direct observation of extension and retraction of type IV pili*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(12): p. 6901-6904.
137. Li, Y.H. and X. Tian, *Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms*. *Sensors (Basel)*, 2012. **12**(3): p. 2519-38.
138. Hahn, H.P., *The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of Pseudomonas aeruginosa--a review*. *Gene*, 1997. **192**(1): p. 99-108.
139. Bertrand, J.J., J.T. West, and J.N. Engel, *Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2010. **192**(4): p. 994-1010.
140. Woodworth, B.A., et al., *An in vitro Model of Pseudomonas aeruginosa Biofilms on Viable Airway Epithelial Cell Monolayers*. *American Journal of Rhinology & Allergy*, 2008. **22**: p. 235 - 238.
141. Ryder, C., M. Byrd, and D.J. Wozniak, *Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. *Current opinion in microbiology*, 2007. **10**(6): p. 644-648.
142. Paz-Zarza, V.M., et al., *Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria*. *Revista chilena de infectología*, 2019. **36**: p. 180-189.
143. Bevilacqua, L., et al., *Biofilms Developed on Dental Implant Titanium Surfaces with Different Roughness: Comparison Between In Vitro and In Vivo Studies*. *Curr Microbiol*, 2018. **75**(6): p. 766-772.
144. Truong, V.K., et al., *Self-organised nanoarchitecture of titanium surfaces influences the attachment of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa bacteria*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015. **99**(16): p. 6831-6840.
145. Ivanova, E.P., et al., *Differential attraction and repulsion of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa on molecularly smooth titanium films*. *Sci Rep*, 2011. **1**: p. 165.

146. Truong, V.K., et al., *The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium*. Biomaterials, 2010. **31**(13): p. 3674-83.
147. Orenstein, A., *The discovery and naming of Staphylococcus aureus*. Periodical [serial online], 2011.
148. Zendejas-Manzo, G.S., H. Avalos-Flores, and M.Y. Soto-Padilla, *Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación*. Revista Biomédica, 2014. **25**(3): p. 129-143.
149. Naber, C.K., *Staphylococcus aureus bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies*. Clinical infectious diseases, 2009. **48**(Supplement\_4): p. S231-S237.
150. Wann, E.R., S. Gurusiddappa, and M. Höök, *The Fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of Staphylococcus aureus Is a Bifunctional Protein That Also Binds to Fibrinogen*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(18): p. 13863-13871.
151. Velásquez, L.A., et al., *Colonización por Staphylococcus aureus en una población de pacientes VIH positivos de la ciudad de Medellín: perfil de sensibilidad antimicrobiana y caracterización de la resistencia a la meticilina*. Nova, 2010. **8**(14): p. 133-139.
152. Patti, J.M. and M. Höök, *Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules*. Current opinion in cell biology, 1994. **6**(5): p. 752-758.
153. Patti, J.M., et al., *MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues*. Annual Reviews in Microbiology, 1994. **48**(1): p. 585-617.
154. Speziale, P., et al., *Structural and functional role of Staphylococcus aureus surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host*. Future microbiology, 2009. **4**(10): p. 1337-1352.
155. Pasachova Garzón, J., S. Ramírez Martínez, and L. Muñoz Molina, *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular*. Nova, 2019. **17**: p. 25-38.
156. Renvert, S., A.M. Roos-Jansåker, and N. Claffey, *Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review*. Journal of clinical periodontology, 2008. **35**: p. 305-315.
157. Slots, J. and T.E. Rams, *New views on periodontal microbiota in special patient categories*. J Clin Periodontol, 1991. **18**(6): p. 411-20.
158. Heitz-Mayfield, L.J.A. and N.P. Lang, *Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis*. Periodontology 2000, 2010. **53**: p. 167-181.
159. Arciola, C.R., et al., *Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates*. The International journal of artificial organs, 2005. **28**(11): p. 1091-1100.
160. Campoccia, D., et al., *Characterization of 26 Staphylococcus warneri isolates from orthopedic infections*. The International journal of artificial organs, 2010. **33**(9): p. 575-581.
161. Von Eiff, C., et al., *Emerging Staphylococcus species as new pathogens in implant infections*. The International journal of artificial organs, 2006. **29**(4): p. 360-367.
162. Tenenbaum, H., et al., *Long-term prospective cohort study on dental implants: clinical and microbiological parameters*. Clin Oral Implants Res, 2017. **28**(1): p. 86-94.
163. Gill, S.R., et al., *Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain*. Journal of bacteriology, 2005. **187**(7): p. 2426-2438.
164. Callan, D.P., C.M. Cobb, and K.B. Williams, *DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study*. J Periodontol, 2005. **76**(1): p. 115-20.

165. Buch, P.J., Y. Chai, and E.D. Goluch, *Bacterial chatter in chronic wound infections*. Wound Repair and Regeneration, 2021. **29**(1): p. 106-116.
166. Burgui Erice, S., *Evaluation of new strategies to combat Staphylococcus aureus biofilm mediated infections in medical devices*. 2018.
167. Vuong, C., et al., *Quorum-sensing control of biofilm factors in Staphylococcus epidermidis*. The Journal of infectious diseases, 2003. **188**(5): p. 706-718.
168. Davies, D.G., et al., *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*. Science, 1998. **280**(5361): p. 295-298.
169. Rams, T.E., D. Feik, and J. Slots, *Staphylococci in human periodontal diseases*. Oral Microbiol Immunol, 1990. **5**(1): p. 29-32.
170. Quirynen, M. and W. Teughels, *Pacientes con riesgo microbiológico y su impacto sobre los implantes dentales*. Periodontology, 2000: p. 119-128.
171. Chapple, I.L., et al., *Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. Journal of periodontology, 2018. **89**: p. S74-S84.
172. Aguayo, S., et al., *Nanoadhesion of Staphylococcus aureus onto Titanium Implant Surfaces*. Journal of Dental Research, 2015. **94**(8): p. 1078-1084.
173. Bürgers, R., et al., *Induced surface proteins of Streptococcus epidermidis adhering to titanium implant substrata*. Clinical Oral Investigations, 2018. **22**(7): p. 2663-2668.
174. Morales Andrade, P.A., *Comparación de la cantidad de Staphylococcus epidermidis en la interfase implante-pilar, en diferentes marcas de implantes*. 2017, Quito: UCE.
175. Gristina, A., P. Naylor, and Q. Myrvik, *Infections from biomaterials and implants: a race for the surface*. Medical progress through technology, 1988. **14**(3-4): p. 205-224.