



**Universidad Nacional Autónoma de
México**



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

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS SALIVALES Y
ADHESIÓN BACTERIANA EN SUPERFICIES
MICROESTRUCTURADAS DE TITANIO**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

P R E S E N T A:

Miryam Martínez Hernández

TUTORA :

Dra. Argelia Almaguer Flores

MÉXICO D.F.

2012



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.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	0
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
Ecología oral	4
Formación de la Placa Dentobacteriana	6
Película salival adquirida	12
Adhesión bacteriana en superficies de Titanio	18
Planteamiento del problema y justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Diseño experimental	25
Caracterización de las superficies experimentales	26
Ángulo de contacto	26
Análisis de la Rugosidad media (R_a)	26
Análisis de la topografía mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	27
Evaluaciones microbiológicas	27
Ensayos de adsorción de proteínas de la saliva	27
Técnica de ELISA para la detección y cuantificación de proteínas adsorbidas en las superficies experimentales	28
Ensayos de adhesión bacteriana sobre las superficies de Ti incubadas con cada una de las proteínas evaluadas	31
Análisis estadístico de los datos	33

RESULTADOS.....	34
Caracterización de Superficies experimentales	34
Evaluaciones microbiológicas	35
Adsorción de proteínas de la saliva	35
Adhesión bacteriana sobre superficies de Ti incubados con proteínas de la saliva.....	37
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMEN

Los implantes dentales de Titanio (Ti) proporcionan un microambiente único en la cavidad oral para la colonización bacteriana. Las superficies de Ti de los implantes dentales representan superficies duras en las cuales constituyentes del plasma sanguíneo y de la saliva se pueden adsorber resultando en la formación de una película salival característica, este proceso de adsorción de proteínas está influido por las propiedades químicas y estructurales de la superficie. Existe evidencia de que las proteínas adsorbidas a las superficies de Ti dictarán el tipo y cantidad de bacterias adheridas a dichas superficies. El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la adsorción de 3 proteínas específicas encontradas en saliva: Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa, en la adhesión bacteriana de dos especies representativas de la placa dental: *Streptococcus gordonii* y *Porphyromonas gingivalis*, en superficies de Ti con diferentes características físicas. Las superficies fueron caracterizadas mediante Perfilometría, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y ángulo de contacto. Para evaluar la adsorción de proteínas, éstas fueron incubadas individualmente en las superficies: PT (Pre-tratamiento), A (Grabado ácido) y SLA (Arenado/Grabado ácido) durante 2 horas a 37°C. La cantidad de proteína adsorbida a cada superficie fue cuantificada mediante ensayos de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Para evaluar la adhesión bacteriana, las muestras fueron incubadas previamente con cada una de las proteínas salivales y posteriormente incubadas durante 24 h con *S. gordonii* o *P. gingivalis*. A continuación las muestras fueron sonicadas y el número de bacterias adheridas en cada muestra fue determinado mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC's). También se evaluó cualitativamente la viabilidad de las bacterias adheridas a cada sustrato mediante microscopía de fluorescencia. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante la prueba de ANOVA con la modificación de Bonferroni.

Los resultados mostraron que Histatina 5 tuvo mayor afinidad por las superficies de titanio, mientras que Cistatina S fue detectada en menores cantidades en todos los sustratos probados. Con respecto a la adhesión bacteriana, las superficies SLA mostraron mayores conteos bacterianos independientemente de la previa adsorción con cualquiera de las proteínas. Se observó también que los sustratos incubados con α -Amilasa disminuyeron la adhesión de *S. gordonii*, mientras que la adhesión de *P. gingivalis* disminuyó significativamente en los sustratos incubados con Histatina 5. En las micrografías obtenidas con microscopía de fluorescencia se observó que ambas cepas se encontraban vitales al momento de la observación. Este estudio mostró que las propiedades físicas de los sustratos modificaron de forma importante la adsorción de las proteínas probadas, mientras que la adhesión bacteriana fue afectada principalmente por la rugosidad del sustrato y por la presencia de las diferentes proteínas que fueron previamente adsorbidas.

ABSTRACT

Titanium (Ti) dental implants provide a unique microenvironment in the oral cavity for bacterial colonization. The Ti surfaces of the dental implants expose hard surfaces on which plasma and salivary proteins can be adsorbed resulting in the formation of a characteristic salivary pellicle, the salivary adsorption process is influenced by the structural and chemical properties of the surface. Evidence shows that the proteins adsorbed on the Ti surfaces, will dictate the type and amount of the bacteria attached on these surfaces. The purpose of this study was to evaluate the effect of the adsorption of three specific salivary proteins: Histatin 5, Cystatin S and α -Amylase, on the bacterial adhesion of two species representative of the dental plaque: *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis* on Ti surfaces with different physical characteristics. The surfaces were characterized by profilometry, Scanning Electron Microscopy (SEM) and contact angle. To evaluate protein adsorption, Histatin 5, Cystatin S and α -Amylase were individually incubated on PT (Pre-treatment), A (Acid-etched) and SLA (Sand-blasted/Acid-etched) surfaces during 2 hours at 37°C. The amount of protein adsorbed on each substrate was quantified by ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) tests. To evaluate bacterial adhesion, the samples were pre-incubated with one of the salivary proteins and then incubated during two hours with *S. gordonii* or *P. gingivalis*. The samples were sonicated and the number of bacteria attached was determined by the counting of Colony Forming Units (CFU's) on each sample. In addition, the viability of the bacteria attached on each substrate was qualitatively evaluated by fluorescence microscopy. Significant differences were determined by ANOVA test using Bonferroni's modification. The results showed that Histatin 5 had the higher affinity to the Ti surfaces, while Cystatin S had lower affinity for all the substrates tested. Regarding bacterial adhesion, SLA surfaces showed the higher bacterial counts regardless previous adsorption of either protein. It was also observed that substrates coated with α -Amylase decreased the adhesion of *S. gordonii*, while the adhesion of *P. gingivalis* significantly decreased on the surfaces coated with Histatin 5. In fluorescence microscopy micrographs was observed that both strains were vital at the time of observation. This study shows that the adsorption of the proteins was influenced by the physical properties of the substrates and the bacterial adhesion was also influenced by the surface roughness and salivary protein previously adsorbed.

INTRODUCCIÓN

Ecología oral

Se ha estimado que el cuerpo humano está constituido por más de 10^{14} células, de las cuales, sólo alrededor del 10% son células humanas. Las células restantes, son microorganismos que comprenden la flora microbiana residente del huésped (Hooper et al. 1998). Esta flora microbiana tiene una relación dinámica con el huésped, contribuyendo directa e indirectamente al desarrollo normal de su fisiología, nutrición y sistema de defensa.

La cavidad oral representa un ambiente, no homogéneo, único para la colonización microbiana, en donde existen distintos hábitats que presentan diferencias entre los factores ecológicos claves como pH, nutrientes, potencial redox, oxígeno y temperatura. De esta forma los labios, el paladar, los carrillos, la lengua y las superficies de los dientes son hábitats distintos, y cada uno presenta una comunidad microbiana característica. El hábitat particular de cada especie dependerá de los distintos factores ecológicos, sin embargo, el metabolismo de estas especies puede modificar el ambiente adyacente, haciéndolo más adecuado para la colonización de otras especies.

Los dientes proporcionan superficies no-descamables que favorecen el crecimiento bacteriano, de esta forma, las bacterias que colonizan las superficies de los dientes se agrupan en un consorcio bacteriano referido como biopelícula o placa dentobacteriana, la cual está compuesta de microcolonias de células bacterianas que están distribuidas de manera no-aleatoria en una matriz polimérica auto-producida (Costerton et al. 1981; Socransky and Haffajee 2002). La formación de biopelículas bacterianas en superficies mucosas está restringida debido a la descamación epitelial.

Otra característica importante de la cavidad oral es que está continuamente bañada con saliva, la cual afecta directamente la ecología de la boca. La saliva tiene un rango de pH de 6.75 - 7.25 que favorece el crecimiento de muchos microorganismos.

La mayoría de los constituyentes orgánicos de la saliva son proteínas y glicoproteínas que influyen en la microbiología oral por varios mecanismos:

- Adsorbiéndose en las superficies orales, especialmente dientes, para formar una película acondicionante (película adquirida). Los receptores de la película adquirida juegan un papel importante en la adhesión bacteriana, involucrando interacciones moleculares específicas entre éstos y las adhesinas en la superficie de los microorganismos.
- Actuando como una fuente primaria de nutrientes (carbohidratos y proteínas) los cuales promueven el crecimiento de la microflora residente (Liljemark et al. 1997).
- Formando agregados de microorganismos y de esta forma facilitando su eliminación de la boca (Scannapieco et al. 1994).
- Inhibiendo la adhesión y crecimiento de algunos microorganismos exógenos, debido a los componentes del sistema de defensa del huésped como: IgAs, lisozimas y defensinas, principalmente (Amerongen and Veerman 2002).

Las condiciones ecológicas dentro de la boca son afectadas por la erupción y pérdida de los dientes, la inserción de prótesis como dentaduras o implantes dentales y por cualquier tratamiento dental como las profilaxis dentales (Rudney et al. 1995).

Los microorganismos orales son predominantemente bacterias, sin embargo, hongos (Holmes et al. 1996), mycoplasmas e incluso protozoos (Hayflick 1965; Kutisova et al. 2005) y arqueas (Kulik et al. 2001) pueden también ser encontrados.

Hasta ahora no todas las especies que forman parte de la microbiota oral han sido identificadas, aunque se ha anticipado que existen más de 700 diferentes especies bacterianas (Paster et al. 2006; Keijser et al. 2008).

Formación de la Placa Dentobacteriana

La adhesión bacteriana sobre la película salival adquirida formada sobre la superficie dental, es el paso inicial en la formación y desarrollo de la placa dentobacteriana.

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

Los procesos que median la adhesión bacteriana son complejos, e involucran básicamente dos etapas:

- a) Adhesión bacteriana primaria. Constituye el contacto inicial entre una superficie acondicionada y microorganismos planctónicos. Esta etapa es reversible y está dictada por muchas variables físico-químicas que definen la interacción entre la superficie de la célula bacteriana y la superficie acondicionada con la película adquirida. Primero, el microorganismo debe ser llevado a una proximidad cercana a la superficie, propulsado ya sea azarosamente (por ejemplo: por una corriente de fluido salival en la superficie) o en forma directa vía quimiotaxis y motilidad. Una vez que el microorganismo alcanza una proximidad crítica a la superficie (aproximadamente $< 1\text{nm}$), la determinación final de la adhesión bacteriana dependerá de la suma neta de las fuerzas atractivas y repulsivas generadas entre las dos superficies. Estas fuerzas incluyen interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, impedimento estérico, fuerzas de van der Waals, temperatura y fuerzas hidrodinámicas, por nombrar algunas (Carpentier and Cerf 1993; Dunne 2002). Es importante tener en mente que el contacto primario generalmente ocurre entre el microorganismo y la película adquirida, y que la hidrofobicidad de esta última puede variar grandemente dependiendo de las moléculas presentes en ella.

La duración de la adhesión primaria depende de la suma total de todas estas variables, sin embargo, la química de la superficie se inclina a favor de la adhesión sabiendo que sustancias orgánicas en solución se concentrarán cerca de una superficie y que los microorganismos tenderán a congregarse en ambientes ricos en nutrientes (Costerton et al. 1995).

b) Fase de anclaje. En esta segunda etapa, se involucran uniones mediadas molecularmente entre adhesinas bacterianas específicas y la película adquirida (Gibbons et al. 1976). En este punto, los microorganismos consolidan el proceso de adhesión produciendo exopolisacáridos que interactúan en conjunto con las adhesinas, que son ligandos específicos de receptores localizados en pilis, fimbrias o ambos (Klemm and Schembri 2000). Las adhesinas son componentes protéicos que se unen de una manera específica a moléculas complementarias, o receptores localizados en las células epiteliales o en la película adquirida que cubre a los dientes (Jones and Isaacson 1983; Gibbons 1984). Durante esta etapa de adhesión, los microorganismos planctónicos pueden también unirse unos con otros o bien con diferentes especies de organismos unidos a la superficie, formando agregados sobre el sustrato, mediante el proceso conocido como coagregación (Gibbons and Nygaard 1970). En la conclusión de la segunda etapa, la adhesión llega a ser irreversible en la ausencia de intervención física o química y los microorganismos están firmemente adheridos a la superficie, iniciando así el proceso de maduración de la biopelícula (Dunne 2002). **Figura 1.**

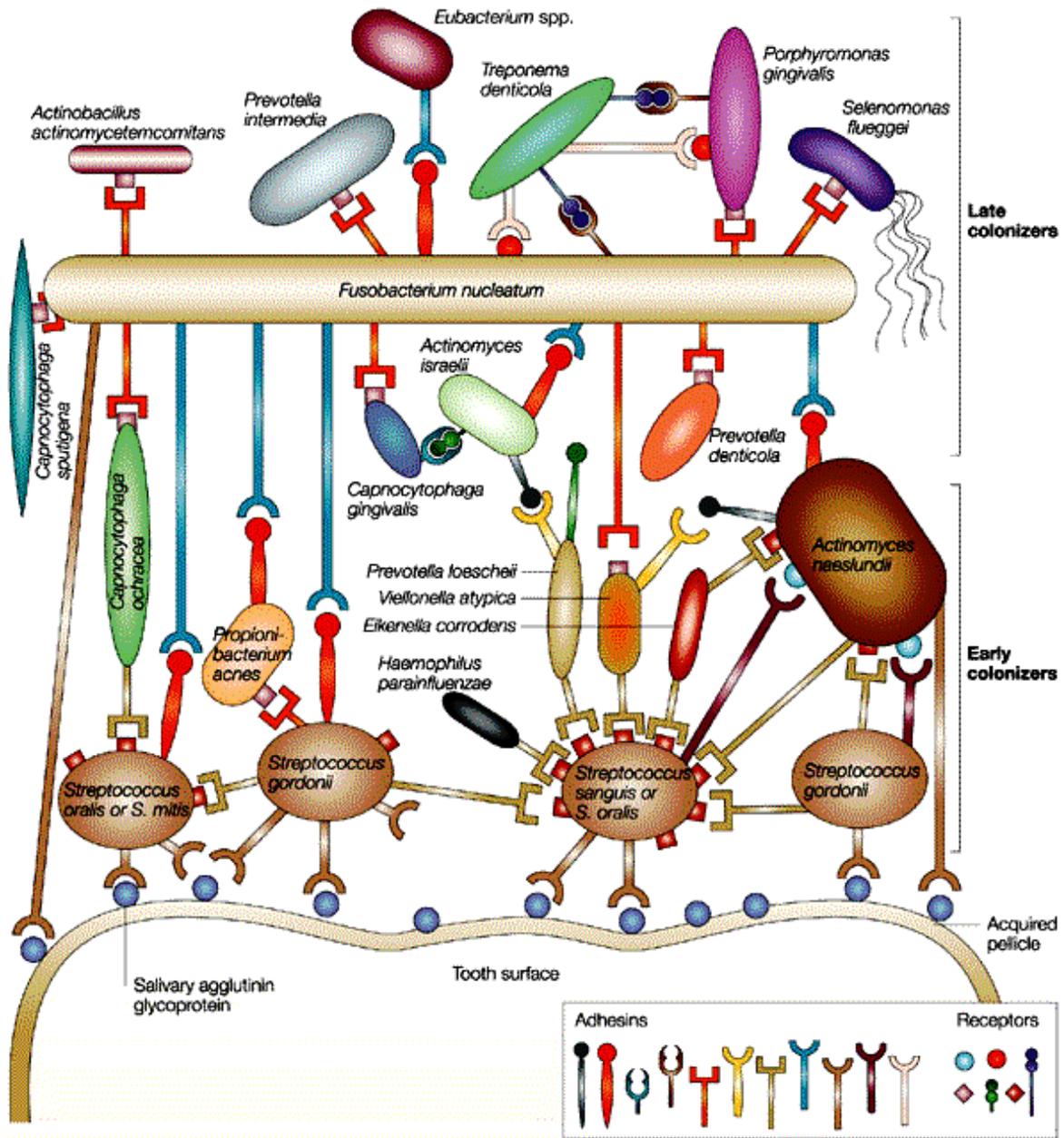
La asociación de bacterias dentro de las biopelículas complejas no es un evento aleatorio. Mediante técnicas moleculares de hibridación DNA-DNA, se demostró la presencia de asociaciones microbianas específicas dentro de la placa dentobacteriana, reconociéndose seis complejos representados por colores, los cuales tienen una secuencia de colonización característica (Socransky et al. 1998):

Los complejos azul y amarillo están compuestos por especies facultativas, Gram positivas consideradas colonizadoras primarias de los géneros *Actinomyces* y *Streptococcus*; las cuales se adhieren selectivamente a la superficie dental a través de un mecanismo de adhesión bioquímico proteína-proteína entre las fimbrias de las bacterias y las proteínas de la película adquirida (Gibbons et al. 1990).

La colonización secundaria dentro de la placa dentobacteriana, se caracteriza por mecanismos de coagregación y multiplicación bacteriana de cocos y bacilos tanto Gram positivos como Gram negativos, como los de los complejos morado (*Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*) y verde (*Capnocytophaga* spp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo a, *Eikenella corrodens* y *Campylobacter concisus*), estos microorganismos poseen receptores superficiales que permiten la posterior coagregación de especies predominantemente Gram negativas que tienen poca capacidad para adherirse directamente a la superficie dental como son *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Corynebacterium matruchotii*, conocidos como colonizadores puente (miembros del complejo naranja).

En la tercera etapa de colonización, la placa dentobacteriana llega a ser más gruesa y madura y las concentraciones de oxígeno disminuyen, resultando en condiciones anaerobias. Estas condiciones facilitan la colonización de bacterias acidúricas y anaerobias estrictas Gram negativas tales como *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* (miembros del complejo rojo) (Lindhe et al. 1998; Nishihara and Koseki 2004). Las especies del complejo rojo son reconocidas como periodontopatógenas y se han encontrado en mayor proporción en zonas de infección y sangrado como son las bolsas periodontales (Socransky et al. 1998; Socransky and Haffajee 2005). Y finalmente dentro de las especies no agrupadas a ningún complejo se incluyen: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* b y *Seimonas noxia*. **Figura 2.**

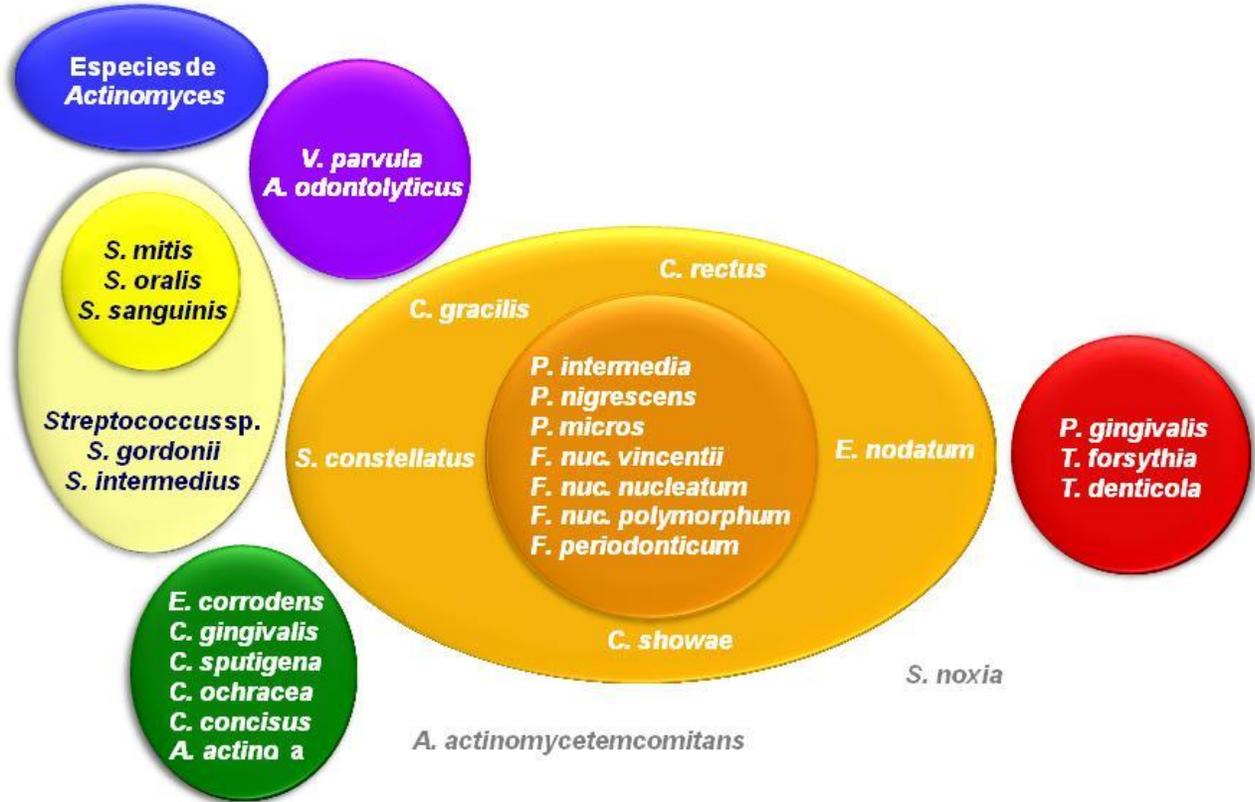
Figura 1. Modelo de formación de la placa dentobacteriana.



Nature Reviews | Microbiology

Fuente: Bakaletz (Bakaletz, 2004).

Figura 2. Complejos bacterianos de la placa dentobacteriana subgingival.



Fuente: Socransky et al (Socransky et al. 1998).

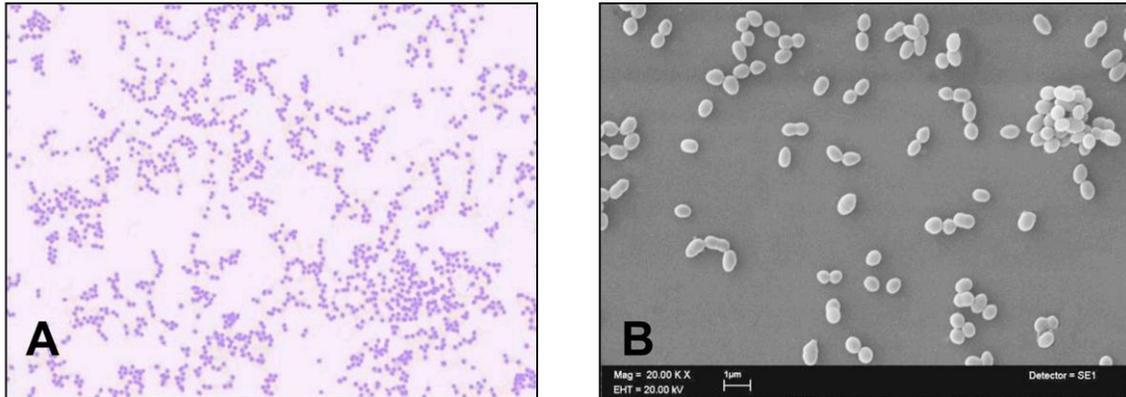
Especies representativas de la placa dentobacteriana incluidas en el presente estudio:

Streptococcus gordonii (ATCC 35105).

Es una bacteria Gram-positiva, no-motil, no-formadora de esporas, anaerobia facultativa, cuyo hábitat natural es la cavidad oral (Loo et al. 2000). Juega un papel integral iniciando la colonización de la biopelícula dental, facilitando la coagregación de otras especies. *S. gordonii* produce dos proteínas de unión a amilasa: la proteína de unión a amilasa A (AbpA) (Rogers et al. 1998) y la proteína de unión a amilasa B (Li et al. 2002). AbpA es una proteína de 20kDa que actúa como el principal receptor para la unión de la superficie bacteriana con la amilasa salival (Rogers et al. 2001). También se ha reportado

que *S. gordonii* se une ávidamente a PRPs ácidas adsorbidas en superficies de hidroxiapatita (HA) (Gibbons et al. 1991).

Figura 3. Imágenes de *Streptococcus gordonii* [**A.** Campo claro con tinción de Gram (100x) y, **B.** Microscopía electrónica de barrido (20K)].



Fotos tomadas de la tesis “Compendio ilustrado de especies bacterianas de la cavidad oral del ser humano” de Verónica Gabriela Pérez Soria (2011).

Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277).

Es una bacteria anaerobia, Gram-negativa, que obtiene energía del metabolismo de ciertos aminoácidos y tiene un requerimiento absoluto de calcio para su crecimiento.

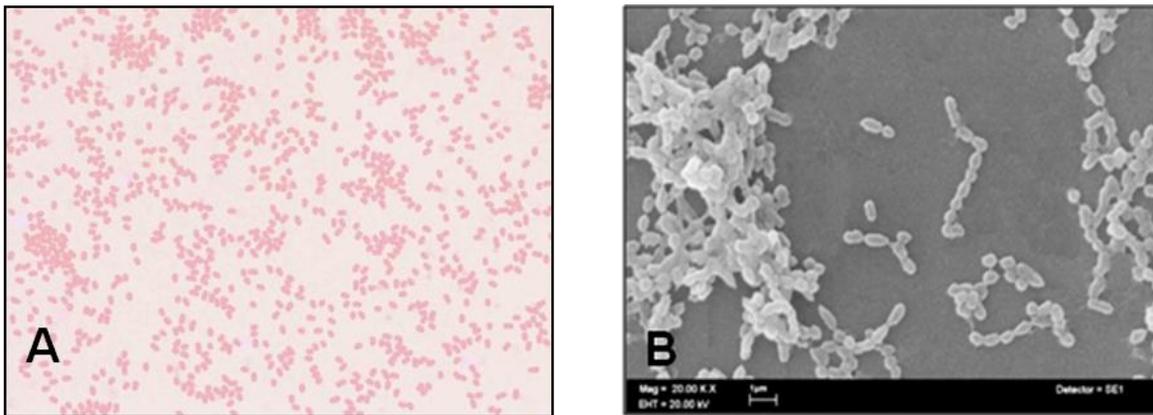
Es considerado un periodontopatógeno, el cual está asociado con formas severas de enfermedad periodontal (Dahlen 1993).

Muchos factores de virulencia han sido implicados en la patogenicidad de esta bacteria incluyendo: su cápsula, citotoxinas, adhesinas fimbriales y enzimas hidrolíticas extracelulares (Marsh et al. 1994).

Previamente se ha reportado que la fimbria de *P. gingivalis* (FimA) juega un papel importante en la unión de esta bacteria a proteínas salivales, pues dicha fimbria es requerida para la adhesión de *P. gingivalis* a las superficies de HA incubadas con saliva total, a través de interacciones específicas proteína-proteína (Lee et al. 1992). La fimbriolina, la cual es una sub-unidad estructural monomérica de 43 kDa, es el principal

componente de la fimbria que se extiende de la superficie de *P. gingivalis* (Sojar et al. 1991). Se ha reportado que la región carboxilo terminal correspondiente a los aminoácidos 266 a 337 de la fimbrilina de *P. gingivalis* juega un papel importante en su unión a proteínas salivales (Nagata et al. 1997).

Figura 3. Imágenes de *Porphyromonas gingivalis* [A. Campo claro con tinción de Gram (100x) y B. Microscopía electrónica de barrido (20K)].



Fotos tomadas de la tesis “Compendio ilustrado de especies bacterianas de la cavidad oral del ser humano” de Verónica Gabriela Pérez Soria (2011).

Película salival adquirida

La formación de la película adquirida en la superficie de los dientes es un proceso indispensable para que la adhesión bacteriana y subsecuente formación de la biopelícula ocurran.

Los dientes están expuestos, en la cavidad oral, a la saliva total (Oppenheim et al. 1971), la cual consiste principalmente de secreciones derivadas de tres pares de glándulas salivares mayores: glándulas parótidas, submandibulares y sublinguales. Las secreciones de estas glándulas salivales humanas contienen una gran cantidad de proteínas que tienen una fuerte afinidad por las superficies HA (Hay 1967). Estas proteínas después de

ser secretadas en la cavidad oral, selectivamente se adsorben en las superficies dentales, formando una capa de proteínas conocida como “película adquirida” (Dawes et al. 1963), la cual se forma inmediatamente después de cada limpieza mecánica del diente (Sonju and Rolla 1973).

Su formación se considera un proceso dinámico influido por muchos factores inherentes a propiedades individuales como el ciclo circadiano, microflora oral, actividad proteolítica y propiedades físico-químicas de los dientes, así como a la localización de los dientes en la boca (Rykke and Sonju 1991; Carlen et al. 1998; Lendenmann et al. 2000; Vacca Smith and Bowen 2000).

Su formación inicia por la adsorción instantánea de proteínas salivales a la superficie del esmalte (Lamkin et al. 1996; Carlen et al. 1998). En esta fase, la adsorción inicial de los componentes salivales ocurre por fuerzas de atracción electrostáticas que se generan entre los grupos cargados de las macromoléculas y los iones de calcio (cargas positivas) y fosfato del esmalte (cargas negativas) (Gorbunoff and Timasheff 1984; Moreno et al. 1984; Yin et al. 2003; Vitorino et al. 2007).

De esta forma, las proteínas básicas se unen inicialmente por interacciones electrostáticas entre los grupos amino y los iones fosfato de la HA, mientras que las proteínas ácidas se unen específicamente por la formación de complejos de sus grupos carboxilo y/o fosfato a los sitios de calcio.

En asociación con el proceso de adsorción a la HA, las proteínas precursoras de la película forman una capa más o menos soluble la cual se transforma en una película menos soluble e incluso insoluble. Esta insolubilidad, que caracteriza a la segunda parte de la formación de la película, puede surgir del procesamiento post-secretorio de las proteínas de la saliva, incluyendo entrecruzamiento y proteólisis (Yao et al. 1999; Yao et al. 2000; Lamkin et al. 2001).

Los progresos en el estudio de la composición macromolecular de la película adquirida *in vivo* se han logrado usando básicamente, la identificación inmunológica, lo cual ha resultado en la detección de Proteínas-Ricas en Prolina (PRPs) ácidas (Kousvelari et al. 1980), mucina MG1, Inmunoglobulina A secretoria (slgA), amilasa, cistatina SA-1 (Al-Hashimi and Levine 1989), aglutinina de la saliva parótida, albúmina del suero, mucina MG2 (Carlen et al. 1998), esterinas (Hay 1973), histatinas (Oppenheim et al. 1986) y anhidrasa carbónica VI (Leinonen et al. 1999). Sin embargo, las interrelaciones cuantitativas de estos componentes, y como están estructuralmente organizados en la superficie del diente, es todavía desconocida.

Investigaciones llevadas a cabo con proteínas sintéticas muestran que la unión más fuerte a la HA es mediada por fosfoserina, seguido por los ácidos glutámico y aspártico (Bernardi and Kawasaki 1968).

También se ha mostrado que la mayoría de las proteínas precursoras de la película llevan una carga negativa y presentan dominios funcionales localizados en la región N-terminal (Gibbons and Hay 1989; Yin et al. 2003). Por ejemplo, se sabe que las proteínas esterina y PRPs ácidas son fuertemente adsorbidas en las superficies de HA (Moreno et al. 1978; Moreno et al. 1979). Estas moléculas contienen residuos de fosfoserina y tienen un número importante de residuos cargados negativamente en sus regiones N-terminal, mientras que las regiones C-terminal contienen principalmente residuos no-cargados (Schlesinger and Hay 1977; Wong et al. 1979).

Hallazgos indican que la película adquirida incrementa de grosor durante la primera hora de su formación y posteriormente la velocidad de formación de la película se estabiliza, alcanzado su grosor final entre 1-2 horas de formada (Sonju and Rolla 1973; Oste et al. 1981). Mediante microscopía electrónica se ha mostrado que su grosor máximo es de aproximadamente 1 μ m (Len et al. 1963).

Con respecto a las funciones que desempeña la película adquirida en la cavidad oral, destacan la de barrera selectiva permeable, regulando los procesos de mineralización/desmineralización (Moreno and Zahradnik 1979), formando una barrera ante la erosión dental y dictando la composición de la biopelícula microbiana que se forma en la superficie de los dientes (Gibbons et al. 1988; Gibbons and Hay 1989).

Las interacciones moleculares entre la película adquirida y las superficies bacterianas son las principales responsables de la especificidad para la colonización bacteriana durante las etapas más tempranas de la formación de la placa dentobacteriana (Gibbons and Hay 1988).

Es importante recalcar que las propiedades superficiales físico-químicas de la película, incluyendo su composición, densidad y/o configuración, son ampliamente dependientes de la naturaleza física y química de la superficie dura subyacente (Lee et al. 1974; Baier and Glantz 1978; Sipahi et al. 2001).

Proteínas de la película salival adquirida incluidas en este estudio:

Histatina 5

Es una proteína salival de 24 residuos (2 de ellos negativos y 7 positivos) y una masa molecular de 3 037 Da (Johnsson et al. 1993).

Es miembro de la familia de proteínas salivales de bajo peso molecular, catiónicas, ricas en histidinas, y es secretada por las glándulas parótida, submandibular y sublingual (Oppenheim et al. 1988).

La secuencia de la proteína Histatina 5 muestra un residuo aspártico (Asp1) en su extremo N-terminal. La carga en la cadena lateral del residuo Asp es similar a la de los residuos fosforilados presentes en la región N-terminal, lo que explica la fuerte interacción de las histatinas con las superficies de HA (Vitorino et al. 2007).

Como otras proteínas salivales, la Histatina 5 parece ser multifuncional y se ha reportado que su principal función es antifúngica contra la levadura *Candida albicans* (Pollock et al. 1984). Además, de sus propiedades fungicidas y fungistáticas, se le han atribuido también propiedades antibacterianas (MacKay et al. 1984; Gusman et al. 2001).

Con respecto a su actividad antibacteriana, se ha demostrado que inhibe la actividad de leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Murakami et al. 2002).

Cistatina S

Es una proteína aniónica de 141 residuos (21 de ellos negativos y 14 positivos) con una masa molecular de 14 190 Da (Johnsson et al. 1993).

Pertenece a la superfamilia cistatina (Isemura et al. 1991). Las cistatinas son potentes inhibidores de las proteinasas de cisteínas como: ficina (o ficaina), papaína y catepsinas B, H y L (Anastasi et al. 1983; Abrahamson et al. 1986). La superfamilia cistatina está agrupada en tres familias de acuerdo a su grado de homología estructural. A pesar de su diversidad estructural, su función fisiológica es común a todos los miembros de la superfamilia cistatina, sugiriendo que estas proteínas son derivadas de un antecesor común (Saitoh et al. 1988). Es encontrada en la saliva submandibular y sublingual pero no en la saliva parótida (Ryan et al.).

Las cistatinas están presentes en la película adquirida (Lamkin et al. 1991), y se les ha considerado como moléculas precursoras de la película. Las cistatinas salivales humanas presentan propiedades de inhibición de proteasas (Baron et al. 1999), y se ha reportado también que inhiben el crecimiento de *P. gingivalis* (Blankenvoorde et al. 1998).

α -Amilasa

Es una proteína que tiene 511 residuos (52 de ellos negativos y 51 positivos) con una masa molecular de 57 754 Da (Mayo and Carlson 1974). Es clasificada como

metaloenzima que hidroliza los enlaces α 1, 4 del almidón a glucosa y maltosa (Aguirre et al. 1987).

La amilasa es la enzima más abundante en la saliva humana, secretada principalmente por la glándula parótida pero también se forma en las glándulas sub-linguales (Sas and Dawes 1997). La amilasa ha sido detectada en películas experimentales (Stiefel 1976; Rolla et al. 1983), y en películas formadas *in situ* (Orstavik and Kraus 1974; Al-Hashimi and Levine 1989), mediante el uso de métodos enzimológicos, electroforéticos e inmunológicos.

Estos estudios indican que la amilasa es uno de los principales componentes de la película adquirida. Las isoformas glicosiladas y no-glicosiladas de la amilasa han sido detectadas en la película *in vivo* (Carlen et al. 1998). Estudios han mostrado que la amilasa es des-adsorbida más fácilmente de la película adquirida que otras enzimas o proteínas, sugiriendo una unión menos fuerte a la película (Pruitt et al. 1969; Stiefel 1976). La amilasa tiene la capacidad de formar selectivamente complejos heterotípicos a la mucina MG1, que es la mucina más abundante detectada en la película, además se sabe que MG1 por sí misma, se une firmemente a la HA (Iontcheva et al. 1997). Esto confirma la relevancia del complejo amilasa-MG1, además de otras proteínas (como estaterina y PRPs), como los principales precursores en la formación de la película temprana (2- horas) (Al-Hashimi and Levine 1989).

Esta proteína se une con alta afinidad a muchas especies de *Streptococcus* como *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. crista* y *S. anginosus* pero no a *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mutans*, *Actinomyces viscosus*, y a muchas otras bacterias orales Gram negativas (Scannapieco et al. 1989; Kilian and Nyvad 1990). Una vez unida a estas especies bacterianas α -Amilasa mantiene su actividad enzimática (Scannapieco et al. 1993).

La unión de α -Amilasa a *S. gordonii* es dependiente de una estructura secundaria y/o terciaria de la proteína, y una vez unida a esta bacteria, α -Amilasa, puede hidrolizar

almidón a glucosa, la cual es entonces metabolizada a ácido láctico por la bacteria (Douglas 1990; Scannapieco et al. 1990).

Tabla 1. Descripción de las proteínas Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa.

Proteína	Masa molecular (Da)	Concentración en saliva ($\mu\text{g/mL}$)
Histatina 5	3037	200*
Secuencia de aminoácidos: DSHAKRHHGY KRKFHEKHHS HRGY		
Cistatina S	14190	90**
Secuencia de aminoácidos: MARPLCTLLL LMATLAGALA SSSKEENRII PGGIYDADLN DEWVQRALHF AISEYNKATE DEYRRPLQV LRAREQTFGG VNYFFDVEVG RTICTKSQPN LDTCAFHEQP ELGKKQLCSF EIYVWPWEDR MSLVNSRQE A		
α – Amilasa	57754	400-500**
Secuencia de aminoácidos: MKLFWLLFTI GFCWAQYSSN TQQGRTSIVH LFEWRWVDIA LECERYLAPK GFGGVQVSPN NENVAIHNPV RPWWERYQPV SYKLCTRSGN EDEFNMVTR CNNVGVRIYV DAVINHMCGN AVSAGTSSTC GSYFNPGSRD FPAVPYSGD FNDGKCKTGS GDIENYNDAT QVRDCRLSGL LDLALGKDYV RSKIAEYMNH LIDIGVAGFR IDASKHMWPG DIKGILDKLH NLNSNWFPEG SKPFIYQEVV DLGGPEIKSS DYFGNGRVTE FKYGAKLGTV IRKWNGEKMS YLKNWGEVWG FMPSDRALVF VDNHDNQRGH GAGGASILTF WDARLYKMAV GFMLAHPYGF TRVMSSYRWP RYFENGKDVN DWVGPPNDNG VTKEVTINPD TTCGNDWVCE HRWRQIRNMV NFRNVVDGQP FTNWDNGSN QVAFGRGNRG FIVFNDDWT FSLTLQTGLP AGTYCDVISG DKINGNCTGI KIYVSDDGKA HFSISNSAED PFIAIHAESK L		

Fuente: <http://www.uniprot.org>, *Gusman et al (Gusman et al. 2004). ** Chiapin et al (Chiapin et al. 1998).

Adhesión bacteriana en superficies de Titanio

Los implantes dentales osteointegrados son la principal herramienta en la odontología protésica para el reemplazo de dientes únicos o múltiples (Weber and Lang 1991). Aunque la mayoría de los implantes presentan una tasa de supervivencia por arriba del 98% (Adell et al. 1990), las complicaciones pueden surgir durante el mantenimiento y retención de dichos dispositivos; las dos principales razones de los fracasos en la terapia con implantes son el esfuerzo mecánico y la infección bacteriana (Becker et al. 1990).

Los implantes de titanio proporcionan un microambiente único en la cavidad oral para la colonización bacteriana, debido a que presentan superficies duras expuestas a las proteínas del plasma y de la saliva, las cuales se pueden unir resultando en la formación de una película adquirida característica (Wolinsky et al. 1989), la cual puede mediar la adhesión bacteriana inicial a las superficies de titanio del implante dental (Castro et al. 2008).

La peri-implantitis, es una infección marginal crónica progresiva, definida como una reacción inflamatoria que afecta a los tejidos que rodean a los implantes dentales osteointegrados resultando en la pérdida del hueso de soporte (Tonetti and Schmid 1994). La peri-implantitis causa el 10-15% del fallo de los implantes después del primer año de carga (Esposito et al. 1998).

Dentro de los parámetros que juegan un papel crucial tanto en la osteointegración como en la formación de la biopelícula son la composición química, hidrofiliicidad y rugosidad de la superficie. Desde que se reconoció que la rugosidad de las superficies es crucial para el éxito a corto y a largo plazo de los implantes dentales (Albrektsson et al. 1981), muchos estudios se enfocaron en investigar el efecto del incremento de la rugosidad de superficie en la aposición ósea (Buser et al. 1999). Se demostró, en estudios *in vivo* e *in vitro*, que la superficie SLA presenta resultados superiores en relación a la osteointegración y anclaje

del implante en comparación con otras superficies. La superficie SLA de Straumann (US Patente Number: 5, 456, 723) fue reportada por primera vez en 1991 y es el acrónimo en lengua inglesa para Sand-blasted, Large grit, Acid-etched (Buser et al. 1991).

Sin embargo, mientras que la rugosidad favorece la osteointegración también favorece de manera importante la colonización bacteriana. Una superficie rugosa proporciona mayor área superficial para la adhesión bacteriana, así mismo, las rugosidades presentes en la superficie protegen a las bacterias del desprendimiento durante las fases tempranas de la adhesión (Nakazato et al. 1989; Quirynen et al. 1993; Tanner et al. 2005).

La biocompatibilidad del Ti es principalmente atribuida a la capa de óxido formada en su superficie (Kasemo et al. 1986). Esta capa de óxido, de aproximadamente 2 a 5 nm de grosor, muestra características anfotéricas lo que a su vez favorece la adsorción catiónica y aniónica. Los enlaces covalentes, iónicos y de hidrógeno median la adsorción de moléculas biopoliméricas del plasma sanguíneo, de la saliva o del fluido crevicular gingival a la superficie de óxido del titanio. Esta es una de las razones por las cuales tan pronto como los implantes son expuestos a la cavidad oral, patógenos putativos pueden ser detectados alrededor de estos dispositivos (Furst et al. 2007).

Se ha reportado que la colonización microbiana de los implantes dentales sigue el mismo patrón que el de los dientes (Leonhardt et al. 1992; Lang et al. 1993) Las especies que colonizan implantes dentales incluyen especies encontradas en salud gingival como *S. oralis* y *S. sanguinis* y también especies encontradas en sitios con gingivitis como *Fusobacterium* spp. y *Peptostreptococcus* spp. (Mombelli et al. 1987; Rams et al. 1991). Estudios realizados a través de la toma de fluido crevicular gingival y usando sondas de DNA reportaron que en los implantes de titanio expuestos a la cavidad oral, las especies de *Streptococcus* predominaron como colonizadores tempranos. También se reportó que las especies de *Streptococcus* seguían predominando después de 4 horas y fue hasta las

48 horas que especies anaeróbicas como *P. gingivalis* comenzaron a incrementarse (Nakazato et al. 1989; Rams et al. 1991; Mombelli et al. 1995; Furst et al. 2007).

Durante el daño peri-implantar una compleja microbiota se establece, recordando cercanamente a la encontrada en la periodontitis crónica (Becker et al. 1990; Rosenberg et al. 1991). Algunas de las especies bacterianas asociadas con las infecciones peri-implantares incluyen: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *F. nucleatum*, *Camphylobacter* spp., *Parvimonas micra* (antes *Peptostreptococcus micros*) y *Streptococcus intermedius* (Tanner et al. 1997; Hultin et al. 2002). Otros microorganismos no asociados con periodontitis como *Staphylococcus* spp., *Entericas* spp y *Candida* spp., también han sido encontradas en infecciones peri-implantares (Slots and Rams 1991; Leonhardt et al. 1999).

Sin embargo, mientras que se ha avanzado en la descripción de la biopelícula bacteriana que se forma sobre las superficies de Ti, no ha sido posible hasta ahora lograr caracterizar la secuencia de colonización sobre dichas superficies.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el uso de implantes dentales de Ti para la rehabilitación protésica ha aumentado con una alta tasa de éxito, debido principalmente a que los problemas en la cicatrización ósea han sido ampliamente resueltos, sin embargo, al ser un biomaterial implantado en la cavidad oral tiene el potencial de ser colonizado por bacterias y desarrollar periimplantitis, lo que pudiera provocar la falla y posterior retiro del implante.

Por lo tanto, resulta necesario entender los procesos que median la colonización bacteriana sobre las superficies de estos dispositivos biomédicos, para de esta forma desarrollar superficies que minimicen la adhesión bacteriana. Teniendo en mente que la adhesión bacteriana inicial se considera un evento clave en la patogénesis de infecciones relacionadas a los biomateriales.

El área de estudio enfocada en los procesos que median la formación de biopelículas sobre estos biomateriales resulta fascinante, pues aunque se sabe que la adhesión bacteriana dependerá en gran medida de la interacción entre las proteínas que se adsorban a la superficie y las bacterias que serán capaces de colonizar las superficies, existen a la fecha pocos estudios que reporten la adsorción de proteínas salivales y la adhesión bacteriana de forma conjunta en estas superficies duras.

Nuestro interés está enfocado en profundizar en el fenómeno de colonización bacteriana sobre superficies de titanio que han demostrado resultados superiores en cuanto a los procesos de osteointegración en el ámbito clínico, desde la primera etapa de colonización, es decir; desde el momento en que las superficies de titanio tienen contacto con las proteínas de la saliva. De la misma manera, nos interesa conocer cómo influyen las diferencias en la rugosidad e hidrofiliicidad de estas superficies en la adsorción de estas proteínas y como esto a su vez, podría influenciar el tipo y cantidad de especies bacterianas que colonizarán dichos sustratos.

En el presente estudio se evaluó el efecto de la adsorción de 3 proteínas específicas encontradas en saliva: Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa, en la colonización bacteriana de especies representativas de la placa dental como *Streptococcus gordonii* y *Porphyromonas gingivalis*, en superficies de Ti de alta relevancia clínica con diferentes características físicas.

HIPÓTESIS

El proceso de adsorción de proteínas de la saliva sobre sustratos de Ti con diferentes características físicas influye en la colonización selectiva de especies bacterianas representativas de la cavidad oral.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los patrones de adsorción de las proteínas: Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa de la saliva sobre sustratos de Ti con diferentes características físicas y su influencia en la colonización selectiva de especies bacterianas representativas de la cavidad oral como *Streptococcus gordonii* (ATCC 35105) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

Objetivos específicos

- Caracterizar las superficies experimentales de Ti mediante ángulo de contacto, rugosidad media (R_a) y microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Determinar los patrones de adsorción de proteínas salivales: Histatina 5, Cistatina S, y α -Amilasa, sobre superficies de titanio con diferente rugosidad e hidrofiliidad.

- Determinar el efecto de la adsorción de las proteínas salivales: Histatina 5, Cistatina S, y α -Amilasa, sobre diferentes superficies de titanio en la adhesión de especies bacterianas representativas de la cavidad oral: *Streptococcus gordonii* (ATCC 35105) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

La caracterización de las superficies experimentales se realizó en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, mientras que las evaluaciones microbiológicas se realizaron en el laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Las evaluaciones microbiológicas se dividieron en dos tipos de experimentos, el primero de ellos consistió en la realización de ensayos de adsorción de cada una de las proteínas evaluadas sobre los distintos sustratos de Ti con la finalidad de determinar la cantidad de proteína adsorbida en cada uno de los sustratos experimentales. La cantidad de proteína adsorbida fue cuantificada mediante ensayos de ELISA.

El segundo consistió en ensayos de adhesión bacteriana sobre sustratos experimentales previamente incubados con cada una de las proteínas de interés. La finalidad de este ensayo fue evaluar el efecto de la adsorción de las proteínas salivales en la adhesión bacteriana sobre cada uno los sustratos experimentales. La cuantificación de las células bacterianas adheridas a cada sustrato se realizó por medio de conteo directo de unidades formadoras de colonias (UFC's), así también, se evaluó la adhesión bacteriana de forma directa sobre cada uno de sustratos experimentales mediante microscopía de fluorescencia.

SUPERFICIES EXPERIMENTALES

Todos los discos fueron fabricados y tratados en el Instituto Straumann AG (Basel, Switzerland) y nos fueron enviados listos para ser usados.

Los discos de titanio con diámetros de 15 mm fueron preparados de hojas de Ti puro (ASTM F67) de 1mm de grosor. Los métodos que se utilizaron para producir las

superficies: Pre-Tratamiento (PT), Grabado Ácido (A) y con Grabado Ácido/Arenado (SLA) han sido reportados previamente (Schwarz et al. 2007; Schwarz et al. 2007), dichas modificaciones de superficie son representativas de superficies de implantes dentales comercializados actualmente por la compañía Straumann®.

Cada superficie fue usada por triplicado para los experimentos descritos más adelante.

Caracterización de las superficies experimentales

Ángulo de contacto

Para esta caracterización se empleó la técnica de gota sésil-estática. La cual consiste en la colocación de una gota de agua desionizada de aproximadamente 5 μ L en tres zonas diferentes de la superficie (para estimar una media del ángulo). La toma de la imagen se realizó acoplado una cámara de video digital (KSV, model Cam 101) y posteriormente el análisis de la imagen para el ángulo de contacto, se realizó por medio del programa DropSnake del Software de análisis de imagen (Image J).

Análisis de la Rugosidad media (R_a)

La rugosidad de superficie es una propiedad geométrica y muchos estándares han sido propuestos para clasificarla (ASME B46. 1996; ISO 2487. 1997). La rugosidad promedio de una superficie (R_a) es definida como el promedio aritmético de la distancia de la superficie a una línea de referencia central (Taylor et al. 2006), y se utilizó como el principal parámetro de rugosidad de superficie en este estudio. La R_a de cada una de las superficies se determinó a través del Perfilómetro (Dektak II A) en el modo de contacto, con un total de 20 mediciones por 1 mm de longitud. Cada muestra fue escaneada en 2 localizaciones al azar para la obtención de la información topográfica bidimensional.

Análisis de la topografía mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Las muestras fueron montadas en un porta-muestras de aluminio y fijadas con cinta de carbono. Se uso un microscopio electrónico de barrido (SEM-Cambridge – Leica, Stereoscan 440 a 20kV.). Las imágenes se obtuvieron en el modo de electrones secundarios con una magnificación de 5,000 X.

EVALUACIONES MICROBIOLÓGICAS

Ensayos de adsorción de proteínas de la saliva

Las proteínas Histatina 5 (No. De catálogo: GWB-FE3EF0), Cistatina S (No. De catálogo: 1296-PI-010) y α -Amilasa (No. De catálogo: A1031) fueron compradas de GenWay Biotech, Inc., R&D Systems y Sigma-Aldrich, Co., respectivamente.

En breve, las superficies experimentales se colocaron individualmente en placas de 24 pozos para cultivo celular (Corning Inc.) donde se les adicionaron 300 μ L de cada una de las proteínas a una concentración de 5 μ g/mL, y se incubaron durante 2 horas a 37°C, bajo agitación constante.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las superficies fueron lavadas 2 veces con PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.2-7.4, 0.2 μ m) para remover las proteínas no adsorbidas a las superficies. Después de los lavados, el siguiente paso fue desprender las proteínas adsorbidas a cada superficie, para lo cual se utilizó Tritón x-100 debido a que ha sido aceptado como un surfactante adecuado para un amplio rango de proteínas (Saitoh et al. 2004). Se colocaron 350 μ L de Tritón X-100 al 0.1% en cada uno de los pozos y las superficies fueron sonicadas durante dos periodos de 10 segundos cada uno, a continuación el sobrenadante de cada pozo (muestra) fue

sometido a ensayos de ELISA para la cuantificación de las proteínas adsorbidas a cada una de las superficies experimentales.

Ensayos de ELISA (acrónimo de las palabras en lengua inglesa *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

El ensayo de ELISA es un método muy sensible para la detección y cuantificación de una proteína específica en una mezcla compleja. El ensayo fue desarrollado por dos grupos independientes en 1971, por un lado Engvall y Perlmann (Engvall and Perlmann 1971) y por otro Van Weemen y Schuurs (Van Weemen and Schuurs 1971) para evitar los problemas asociados con los radioinmunoensayos. Este método posibilita el análisis de muestras de proteínas inmovilizadas en pozos de placas de poliestireno usando anticuerpos específicos. La técnica ha revolucionado a la inmunología y es comúnmente usada en laboratorios de investigación científica.

Aunque se han desarrollado muchas variantes al ensayo de ELISA (Spira and Scharff 1992; Maertens et al. 1999; Shiomi et al. 2008), todas ellas dependen de los mismos elementos básicos:

Captura/Revestimiento: inmovilización directa o indirecta de antígenos a la superficie de los pozos de la placa de poliestireno.

Bloqueo de la placa: adición de una proteína irrelevante u otra molécula para cubrir todos los sitios no-saturados de unión a la superficie de los pozos de la placa.

Detección: incubación con anticuerpos antígeno-específicos que tienen afinidad de unión a los antígenos.

Medición de la señal: detección de la señal generada vía marcaje directo o indirecto del anticuerpo específico.

En esta investigación se utilizó el ensayo de ELISA indirecto. En breve, placas de microtitulación de 96 pozos para ensayos de ELISA (Corning Inc.) fueron cubiertas con 100 μ L del sobrenadante de cada uno de los pozos con las proteínas salivales desprendidas de las superficies. Las muestras fueron incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los pozos fueron lavados 5 veces con 0.05% Tween 20 en PBS (200 μ L/pozo) (Sigma-Aldrich Co.).

El bloqueo de los pozos se realizó con 0.1% BSA en PBS (200 μ L/pozo), durante 1 hora de incubación, después de la incubación las placas fueron lavadas e incubadas con una dilución de 1:500 de anticuerpo primario diluido en 0.1% BSA en PBS (100 μ L/pozo) por 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación con el anticuerpo primario respectivo, las placas fueron lavadas e incubadas con una dilución de 1:2000 de anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a HRP (horseradish peroxidase) diluido en 0.1% BSA en PBS (100 μ L/pozo), y de 1:5000 de anticuerpo secundario anti-ratón-HRP diluido en 0.1% BSA en PBS (100 μ L/pozo, por 2 horas a temperatura ambiente (**Tabla 2**).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados.

Proteína	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
Histatina 5	Anti-Histatina, anticuerpo policlonal IgG de cabra	Anti-cabra–HRP
Cistatina S	Anti-Cistatina S humana, anticuerpo monoclonal de ratón	Anti-ratón–HRP
α – Amilasa	Anti-amilasa, anticuerpo monoclonal IgG de ratón	

El conjugado de HRP unido a los anticuerpos secundarios fue detectado colorimétricamente usando como sustrato H_2O_2 estabilizado (R & D Systems) (100 μL /pozo). Se permitió el desarrollo del color durante 8 minutos y la reacción se detuvo por la adición de 50 μL /pozo de solución de Stop ($2\text{N H}_2\text{SO}_4$) (R & D Systems).

Los valores de OD (Optical Density) fueron leídos en un Lector de Placas de Microtitulación (Awareness Technologies Stat Fx 2100 Microplate Reader. GMI) a una longitud de onda de 450 nm.

Realización de la curva estándar de cada una de las proteínas.

Se realizaron curvas de dilución seriada de cada una de las proteínas incluidas en el estudio para obtener los valores mínimos de detección. En breve, se colocaron 200 μL de la proteína de referencia a una concentración de 100 ng/mL, en el primer pozo (A1) de las placas de microtitulación de 96 pozos, a partir de este primer pozo se realizaron diluciones seriadas, de forma tal que en el pozo A2 se tenían 50 ng/mL de la proteína de referencia, en el pozo A3 25 ng/mL, y así sucesivamente hasta que en el pozo A11 se tenían 0.10 ng/mL de la proteína; el pozo A12 fue utilizado como control negativo (PBS), las diluciones se realizaron por triplicado. Las muestras fueron incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los pozos fueron lavados 5 veces con 0.05% Tween 20 en PBS (200 μL /pozo). A partir de este paso se procedió como previamente fue descrito para los ensayos de ELISA con la muestra de proteínas desprendidas de cada una de las superficies experimentales.

Los datos fueron analizados usando un modelo de ajuste de la curva logístico-logarítmico de cuatro parámetros (4-PL por sus siglas en inglés). La “bondad de ajuste” del ensayo es, para propósitos comparativos, un indicativo de que tan estrechamente los puntos de datos de la curva estándar de la proteína de referencia se ajustaron al modelo 4-PL. La bondad de ajuste es expresada como el coeficiente de regresión (R^2) de la curva

estándar. Un valor de R^2 que se aproxima a la unidad es indicativo de un buen ajuste para los datos de la curva.

Ensayos de adhesión bacteriana sobre superficies de Ti incubadas con cada una de las proteínas evaluadas

Se utilizaron dos cepas de referencia pertenecientes a la flora bucal (**Tabla 3**) para los ensayos de adhesión bacteriana. Ambas cepas se adquirieron como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las cepas se rehidrataron en caldo para *Mycoplasma* y cultivaron en agar enriquecido HK agar base para *Mycoplasma* (Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA) suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab S.A. de C.V., México, D.F.), 0.3 µg/mL de menadiona (vitamina K, Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, México), 5 µg/mL de hemina (Sigma) a 35 °C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂.

Tabla 3. Cepas de referencia utilizadas para ensayos de adhesión bacteriana.

Especie	No. de ATCC*
<i>Streptococcus gordonii</i>	35105
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277

* American Type Culture Collection, Rockville, MD

Las superficies experimentales se colocaron individualmente en placas de 24 pozos y se incubaron durante 2 horas a 37 °C con cada una de las proteínas analizadas; transcurrido el tiempo de incubación, las superficies fueron lavadas 2 veces con PBS para eliminar la proteína no adsorbida y se transfirieron a los pozos adyacentes donde, se les adicionó

una suspensión de 10^7 células/mL de cada especie bacteriana. Las placas, con la especie bacteriana correspondiente, fueron incubadas durante 24 horas a 35 °C bajo condiciones anaeróbicas para los ensayos de adhesión bacteriana.

Después de la incubación anaeróbica, cada muestra se lavó dos veces con caldo enriquecido. Después de los lavados, 1 mL de caldo enriquecido se colocó en cada pozo y un juego de muestras fueron sonicadas durante 5 períodos de 10 segundos cada una, con el objetivo de desprender las bacterias adheridas sobre cada una de las superficies experimentales. Posteriormente, se realizaron 4 diluciones seriadas (-1, -3, -4 y -6) del sobrenadante de cada una de las muestras sonicadas, y 100 μ L de las diluciones -4 y -6 fueron sembrados por triplicado en placas de agar enriquecido. Transcurridos 7 días de incubación anaerobia se realizó el conteo visual de las UFC's para determinar el porcentaje de crecimiento en cada una de las superficies que fueron analizadas.

Otro juego de muestras fue utilizado para evaluar la adhesión bacteriana sobre cada uno de los sustratos de Ti mediante microscopía de fluorescencia. En breve, después de la incubación, las muestras fueron lavadas con 1 mL de caldo enriquecido y posteriormente se les realizaron 3 lavados con ddH₂O, las muestras fueron fijadas a un portaobjetos, donde se les añadieron 5 μ L de tinción LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen), las muestras se incubaron por 20-30 minutos protegidas de la luz dentro de una cámara húmeda, transcurrido el tiempo de incubación cada una de las muestras se lavaron con abundante ddH₂O, inmediatamente la muestra fue observada al microscopio de fluorescencia (Axioskop 2, Carl Zeiss Microscopy).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los resultados de las mediciones del ángulo de contacto, rugosidad media, adsorción de proteínas y la adhesión de bacterias entre las diferentes superficies experimentales se presentan como la media (ME) \pm el error estándar de la media (EEM). Los análisis que determinaron las diferencias en la cantidad de proteínas adsorbidas y bacterias adheridas entre cada una de las superficies fueron analizados mediante la prueba de ANOVA y las diferencias significativas se determinaron utilizando la modificación de Bonferroni.

RESULTADOS

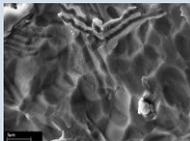
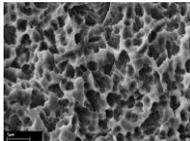
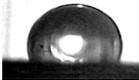
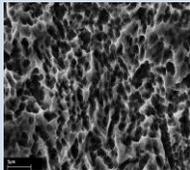
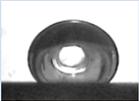
CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES EXPERIMENTALES

Ángulo de contacto, Rugosidad media (R_a) y Análisis de la topografía con SEM.

La **Tabla 4** muestra los resultados de la caracterización de las superficies. En las micrografías obtenidas mediante SEM con electrones secundarios, se observa las diferencias en la topografía de las superficies como consecuencia del distinto tratamiento que le fue realizado a cada sustrato.

Por otro lado, los resultados del ángulo de contacto, empleando sólo agua desionizada, muestran que las superficies A y SLA tuvieron los mayores ángulos de contacto, 95.0 ± 2.3 (media \pm EEM) y 131.7 ± 0.5 , respectivamente. Con respecto al análisis de la R_a por medio de perfilometría de superficie, los diferentes sustratos de Ti tuvieron los siguientes resultados: la superficie PT tuvo una R_a de $0.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$, la superficie A de $0.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ y la superficie SLA de $4 \pm 0.5 \mu\text{m}$.

Tabla 4. Caracterización de superficies utilizadas en este estudio.

Superficie	Descripción	SEM	(R_a)	Ángulo de contacto
PT	Pulida con pasta de diamante de $10 \mu\text{m}$		$0.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$	$82.4 \pm 0.4^\circ$ 
A	Grabado ácido		$0.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$	$95.0 \pm 2.3^\circ$ 
SLA	Grabado ácido y arenado		$4 \pm 0.5 \mu\text{m}$	$131.7 \pm 0.5^\circ$ 

EVALUACIONES MICROBIOLÓGICAS

Adsorción de proteínas de la saliva

Patrones de adsorción de Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa sobre los diferentes sustratos de Ti experimentales.

La cantidad de cada una de las proteínas adsorbidas sobre cada sustrato experimental de Ti fue cuantificada por medio de ensayos de ELISA, los datos pueden ser visualizados en la **figura 5**.

En general se observó que la proteína adsorbida en mayores cantidades a todos los sustratos probados (PT, A y SLA) fue Histatina 5, seguida de α -Amilasa, mientras que Cistatina S mostró la menor afinidad a todos sustratos.

En las superficies PT, las cuales presentan los menores valores de R_a y ángulo de contacto, se encontró que la cantidad adsorbida de Histatina 5 fue de 107.1 ± 0.05 ng/mL, de α -Amilasa de 41.1 ± 0.01 ng/mL, mientras que de Cistatina S fue de 27.2 ± 0.02 ng/mL, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre Histatina 5 y Cistatina S ($p < 0.001$), así como entre Histatina 5 con respecto a α -Amilasa ($p < 0.01$). Aunque hubo mayor cantidad de α -Amilasa adsorbida a los sustratos PT con respecto a Cistatina S, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Con respecto a las superficies A, la cantidad adsorbida de Histatina 5, Cistatina S o α -Amilasa fue de 100.8 ± 0.03 ng/mL, 20.3 ± 0.03 ng/mL y 41.1 ± 0.03 ng/mL, respectivamente. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de Histatina 5 con respecto a Cistatina S y α -Amilasa ($p < 0.001$), así como entre la cantidad de α -Amilasa y Cistatina S adsorbida a los sustratos A ($p < 0.05$).

Finalmente, con respecto a los sustratos SLA, los cuales presentaron la mayor R_a y ángulo de contacto, la cantidad de proteínas adsorbida fue la siguiente: 103.7 ± 0.04 ng/mL, 25.1 ± 0.01 ng/mL y 52.03 ± 0.01 ng/mL, para Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa respectivamente, encontrándose diferencias significativas entre la cantidad de Histatina 5

adsorbida con respecto a Cistatina S y α -Amilasa ($p < 0.001$), así como entre la cantidad de Cistatina S y α -Amilasa ($p < 0.01$).

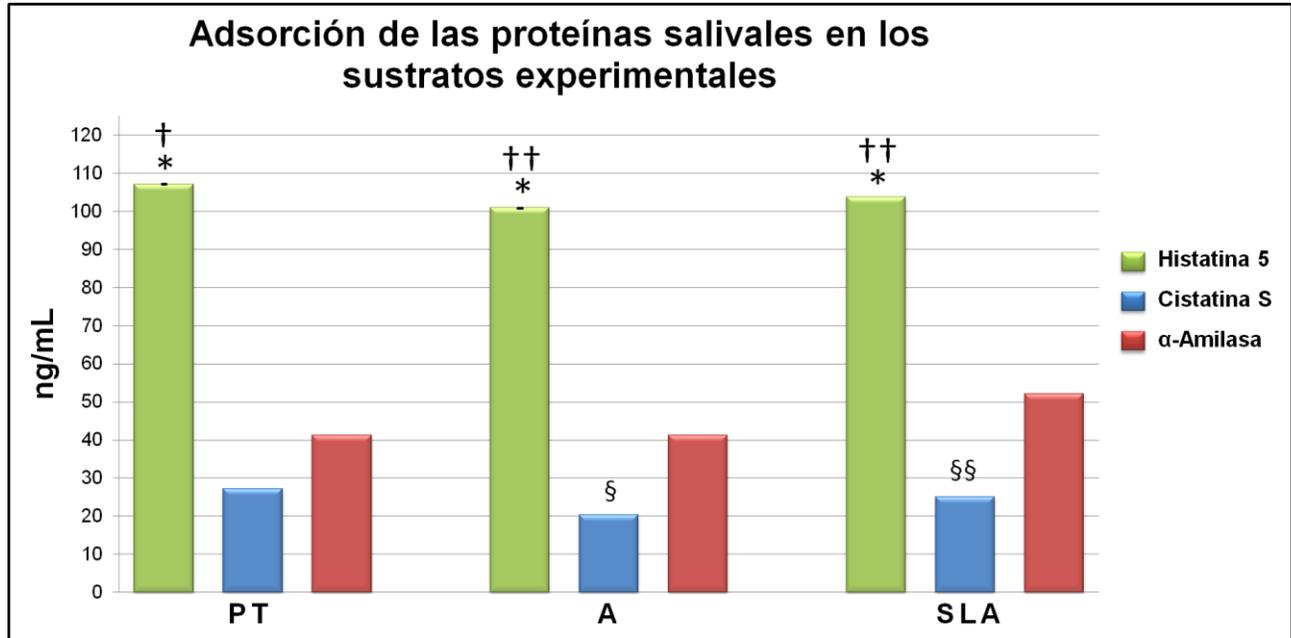


Figura 5. Adsorción de Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa sobre los sustratos PT (pretratamiento), A (Grabado Ácido) y SLA (Arenado/Grabado Ácido), cuantificada mediante ensayos de ELISA. Las diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron analizando la adsorción de las distintas proteínas sobre la misma superficie y fueron las siguientes: * $p < 0.001$, para Histatina 5 vs. Cistatina S; † $p < 0.01$, para Histatina 5 vs. α -Amilasa; †† $p < 0.001$, para Histatina 5 vs. α -Amilasa; § $p < 0.05$, para Cistatina S vs. α -Amilasa; §§ $p < 0.01$, para Cistatina S vs. α -Amilasa.

Adhesión bacteriana sobre superficies de Ti incubadas con proteínas de la saliva

Adhesión de Streptococcus gordonii sobre los sustratos experimentales incubados con las proteínas salivales.

La adhesión de *S. gordonii* fue evaluada mediante el conteo de UFC's. La mayor adhesión de bacterias fue observada en los sustratos SLA en comparación con los sustratos A y PT, independientemente de la proteína con la que fueron previamente incubados (**Figura 6**).

El número de UFCs detectados sobre los sustratos PT incubados con cada una de las proteínas salivales y sin proteína (PBS, Control) fue el siguiente: 286 ± 13 , 288 ± 7 , 114 ± 18 y 405 ± 25 , para los sustratos incubados con Histatina 5, Cistatina S, α -Amilasa y PBS, respectivamente. El mayor número de UFC's fue detectado en los sustratos control (PBS), mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a los sustratos incubados con Histatina 5 y Cistatina S ($p < 0.01$), así como con α -Amilasa ($p < 0.001$), en donde se encontró la menor adhesión de *S. gordonii*. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de UFC's de *S. gordonii* en los sustratos incubados con Histatina 5 y Cistatina S.

En el conteo de UFC's sobre los sustratos A incubados con las proteínas salivales se encontraron los siguientes valores: 355 ± 65 , 523 ± 30 , 332 ± 0 y 517 ± 25 , en los sustratos incubados con Histatina 5, Cistatina S, α -Amilasa y control, respectivamente. Aunque se encontró una mayor adhesión bacteriana sobre los sustratos incubados con la proteína Cistatina S, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Finalmente, en los conteos de UFC's en los sustratos SLA incubados con las proteínas salivales: Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa y con el control (PBS), se obtuvieron los siguientes valores: 637 ± 64 , 671 ± 82 , 522 ± 53 y 1156 ± 136 , respectivamente. Se observó

una mayor adhesión bacteriana sobre los sustratos SLA incubados sin ninguna proteína (control) en comparación con los sustratos incubados con Histatina 5 y Cistatina S ($p < 0.05$), así como con α -Amilasa ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la adhesión bacteriana respecto a las superficies incubadas con las proteínas salivales.

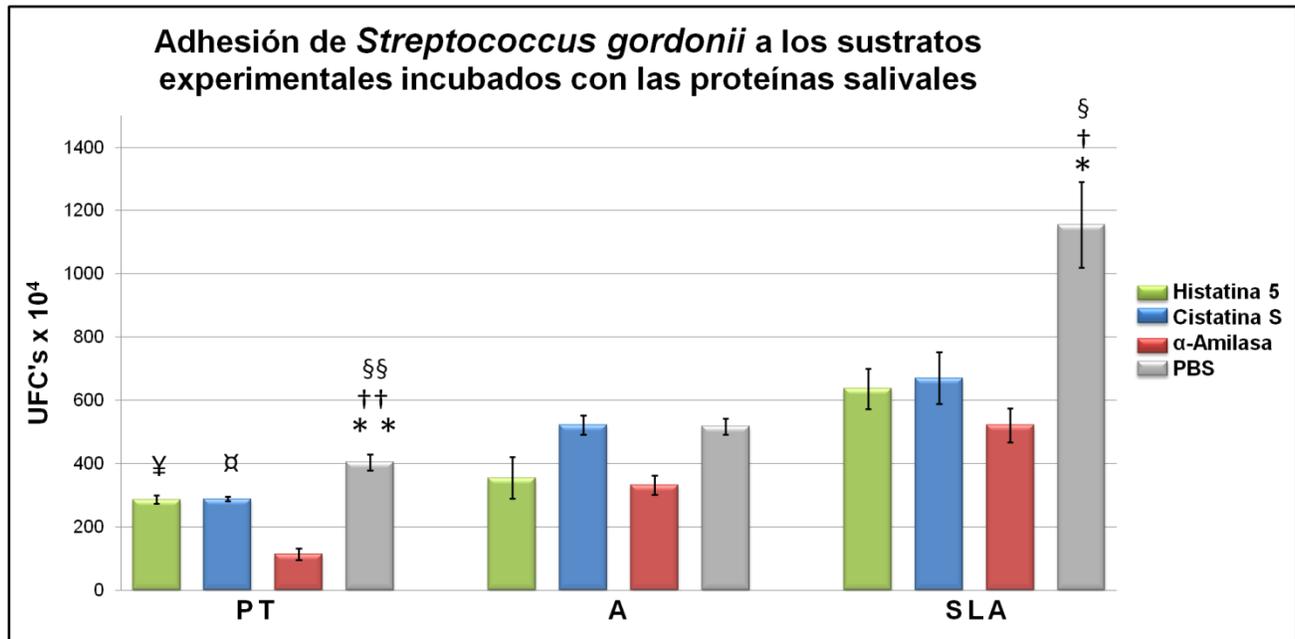


Figura 6. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (CFU's x 10⁴) de *S. gordonii* sobre los sustratos experimentales PT, A y SLA incubados con Histatina 5, Cistatina S, α -Amilasa y el control (PBS). Las diferencias estadísticamente significativas fueron las siguientes: * $p < 0.05$, para Control vs. Histatina 5; * * $p < 0.01$ para Control vs. Histatina 5; † $p < 0.05$, para Control vs. Cistatina S; † † $p < 0.01$, para Control vs. Cistatina S; § $p < 0.01$, para Control vs. α -Amilasa; § § $p < 0.001$, para Control vs. α -Amilasa; ¥ $p < 0.01$, para Histatina 5 vs. α -Amilasa; ¤ $p < 0.01$, para Cistatina S vs. α -Amilasa

Adhesión de Porphyromonas gingivalis sobre los sustratos experimentales incubados con las proteínas salivales.

Similar a los resultados encontrados en la adhesión de *S. gordonii*, la adhesión de *P. gingivalis* fue mayor en las superficies SLA con respecto a las superficies A y PT (**Figura 7**).

Con respecto a la adhesión de *P. gingivalis* sobre los sustratos PT incubados con las proteínas salivales, se encontraron los siguientes valores: 373 ± 29 , 492 ± 17 y 740 ± 58 para Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa, respectivamente, mientras que para los sustratos PT control los valores fueron de 634 ± 92 . En estos sustratos la menor adhesión bacteriana se encontró en los sustratos incubados con la proteína Histatina 5, mientras que la mayor adhesión se encontró en los sustratos incubados con la proteína α -Amilasa, dicha diferencia en la adhesión fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las superficies incubadas con Histatina 5 con respecto a las incubadas con Cistatina S ($p < 0.05$)

En los sustratos A, incubados con y sin proteínas salivales, se encontraron los siguientes valores: 580 ± 160 , 654 ± 174 , 1128 ± 152 y 829 ± 81 , para los sustratos incubados con Histatina 5, Cistatina S, α -Amilasa y para el sustrato control, respectivamente. Aunque se observó una mayor adhesión de *P. gingivalis* en los sustratos incubados con α -Amilasa esta diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a ninguno de los demás grupos.

Al analizar la adhesión bacteriana sobre los sustratos SLA incubados con Histatina 5, Cistatina S, α -Amilasa ó sin proteínas salivales (PBS), se obtuvieron los siguientes valores: 467 ± 29 , 1239 ± 88 , 1302 ± 235 y 1800 ± 101 , respectivamente. Los mayores conteos de UFC's se encontraron en los sustratos Control, mostrándose una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los sustratos incubados con Histatina 5 ($p < 0.01$), en los cuales se observó la menor adhesión. También se encontraron diferencias

estadísticamente significativas entre los sustratos incubados con Histatina 5 con respecto a los incubados con Cistatina S y α -Amilasa ($p < 0.05$).

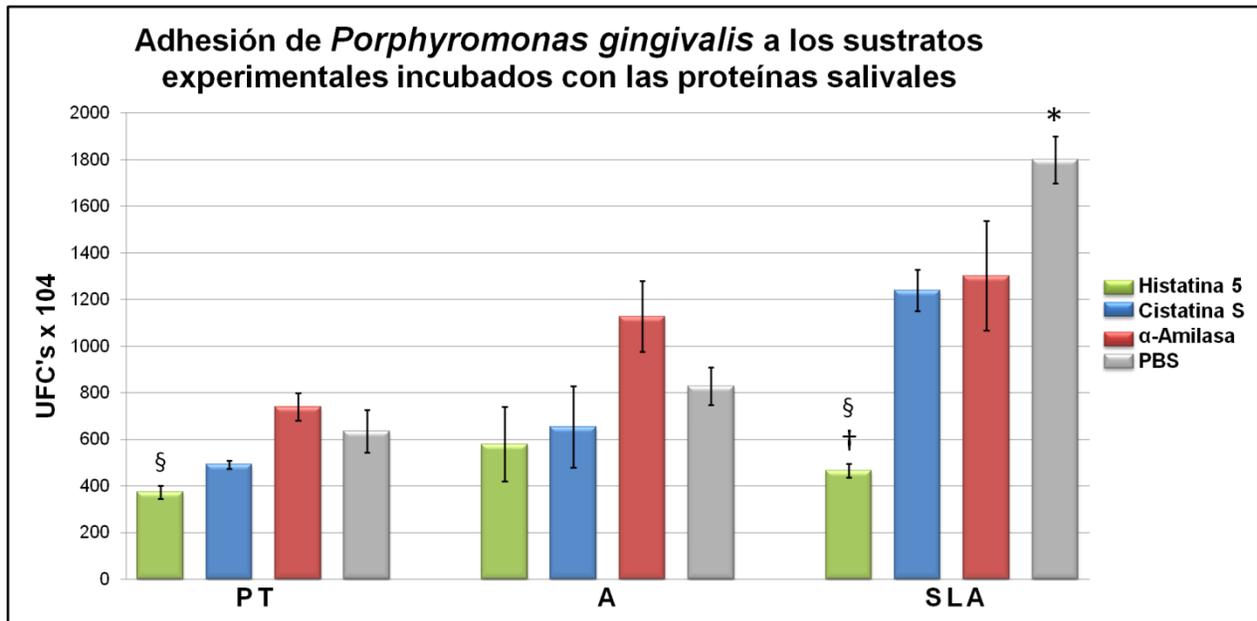


Figura 7. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (CFU's x 10⁴) de *Porphyromonas gingivalis* sobre los sustratos experimentales PT, A y SLA incubados con Histatina 5, Cistatina S, α -Amilasa y el control (PBS). Las diferencias estadísticamente significativas fueron las siguientes: * $p < 0.01$, para Control vs. Histatina 5; † $p < 0.05$, para Histatina 5 vs. Cistatina S; § $p < 0.05$, para Histatina 5 vs. α -Amilasa.

Adhesión bacteriana sobre superficies de Ti incubadas con proteínas de la saliva, evaluada con microscopía de fluorescencia.

Para observar cualitativamente los patrones de adhesión de cada cepa evaluada sobre los sustratos probados, las muestras fueron preparadas para microscopía de fluorescencia, para lo cual cada superficie fue teñida con el kit LIVE/DEAD® BacLight™. Este kit emplea dos tinciones, una tinción verde fluorescente (SYTO 9) y una roja fluorescente (ioduro de propidio), dichas tinciones difieren en su habilidad para penetrar

células bacterianas, pues el yoduro de propidio penetra sólo en las bacterias con la membrana dañada, de esta forma las bacterias vivas con membranas intactas fluorescen en verde, mientras que las bacterias muertas con las membranas dañadas fluorescen en rojo. Se tuvo dificultad para obtener las micrografías de las superficies, especialmente de los sustratos SLA debió a su rugosidad, por esta razón, algunas imágenes muestran áreas fuera de foco, lo que impidió el análisis cuantitativo que se pretendió hacer de las imágenes mediante el software ImageJ.

Las micrografías obtenidas de las superficies experimentales, muestran que las células bacterianas tanto de *S. gordonii* como de *P. gingivalis* fluorescieron en verde, por lo que se asume que ambas cepas se encontraban viables al momento de las observaciones. Con estas imágenes se pudo confirmar que la mayor adhesión, para ambas cepas, fue observada en los sustratos SLA, mientras que la menor adhesión se observó sobre los sustratos PT.

También se pudo observar que la previa incubación de las superficies experimentales con la proteína α -Amilasa, provocó una disminución en la adhesión bacteriana de *S. gordonii*. Mientras que para la cepa *P. gingivalis* se observó una disminución en la adhesión en los sustratos experimentales previamente incubados con la Histatina 5.

La adhesión de ambas cepas fue dependiente de las propiedades físicas del sustrato y dependiente de la proteína previamente adsorbida. Las micrografías representativas de la adhesión de *S. gordonii* y *P. gingivalis* a los sustratos experimentales pueden observarse en las **Figuras 8 y 9**, respectivamente.

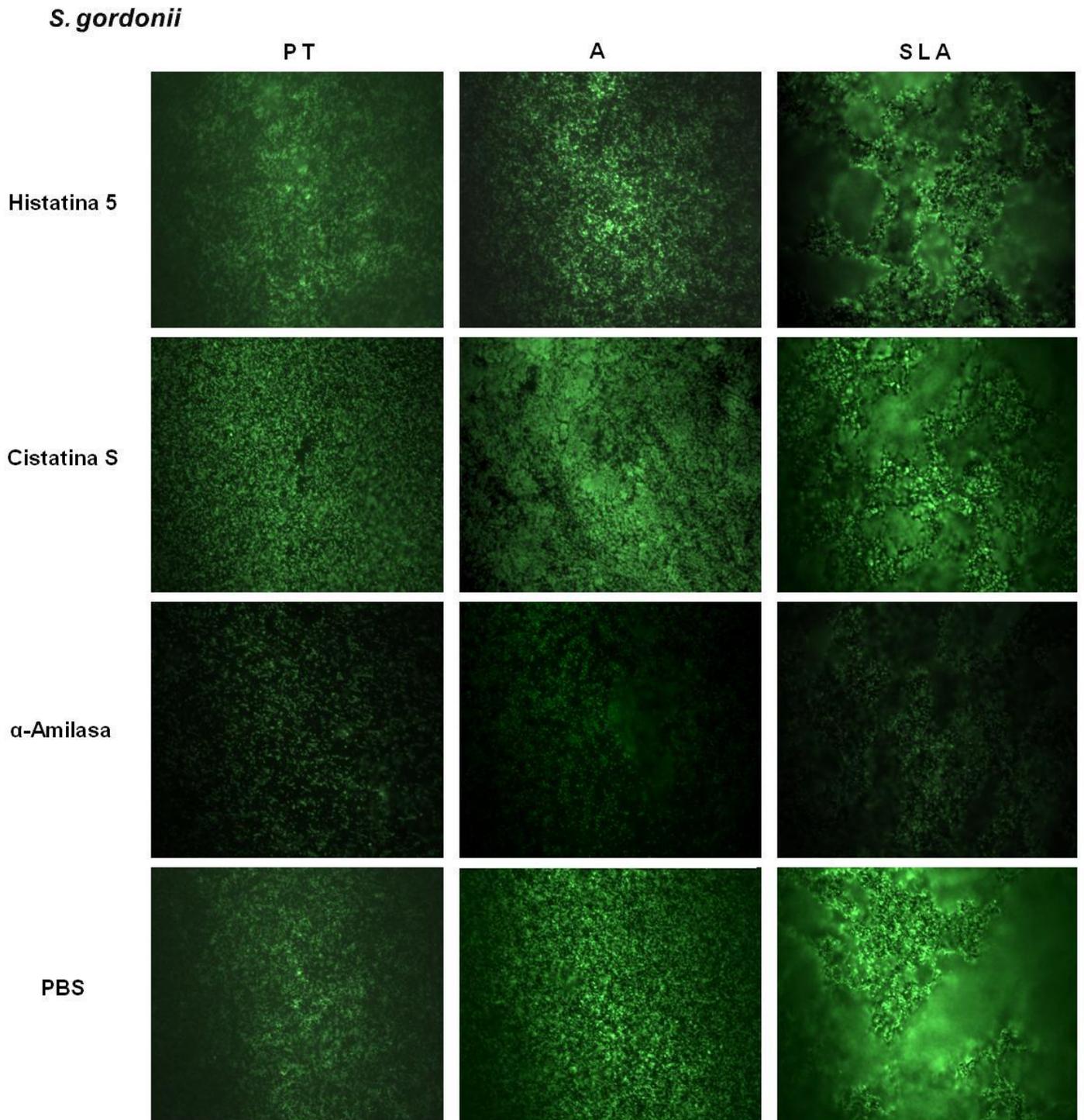


Figura 8. Micrográficas obtenidas por microscopía de fluorescencia de la adhesión de *Streptococcus gordonii* en los sustratos PT, A y SLA incubados con cada proteína salival (Histatina 5, Cistatina S o α -Amilasa) y el control (PBS). Magnificación de 80x. PT, pretratamiento; A, grabado ácido; SLA, grabado ácido/arenado.

P. gingivalis

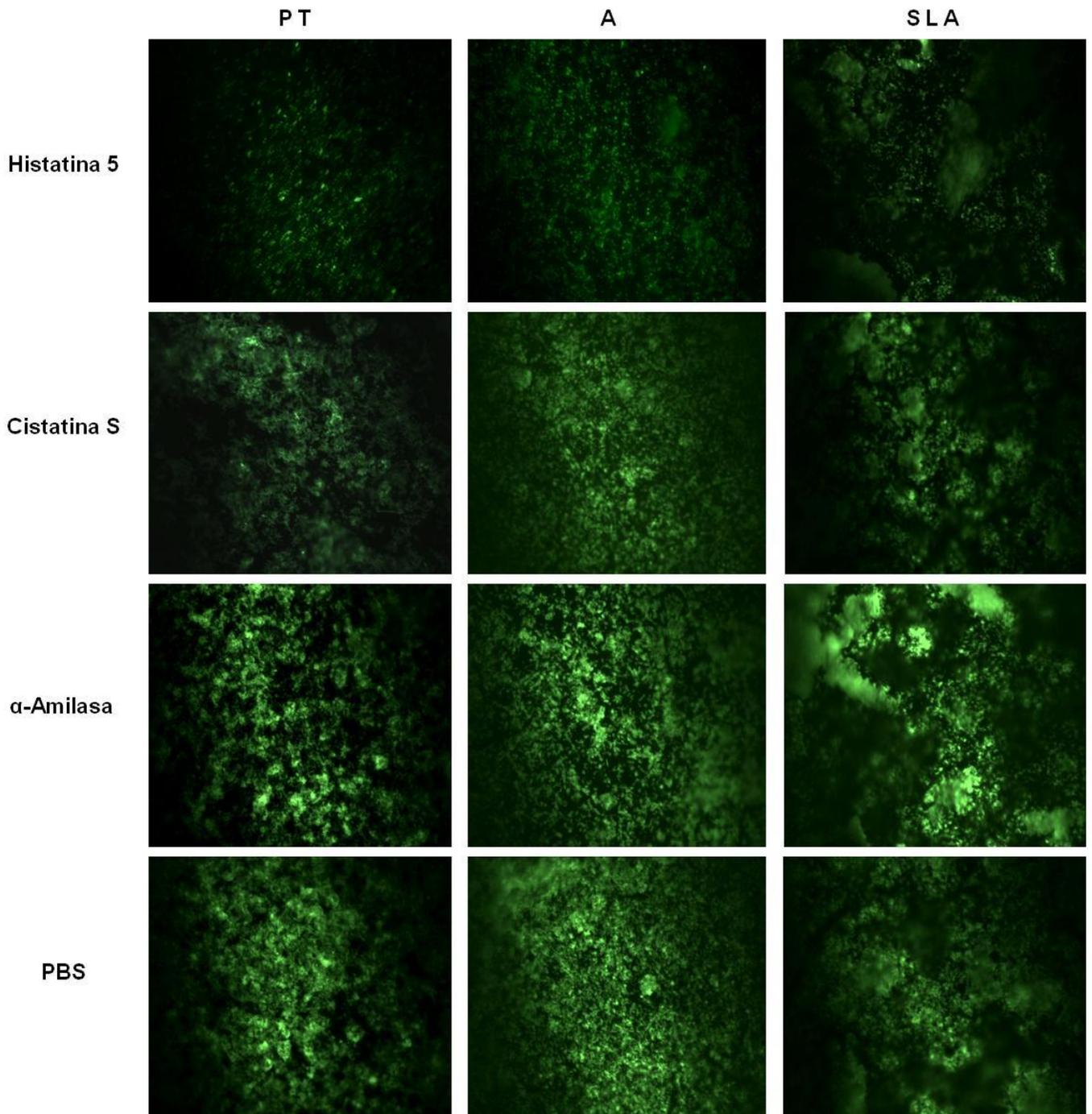


Figura 9. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia de la adhesión de *Porphyromonas gingivalis* en los sustratos PT, A y SLA incubados con cada proteína salival (Histatina 5, Cistatina S o α -Amilasa) y el control (PBS). Magnificación de 80x. PT, pretratamiento; A, grabado ácido; SLA, grabado ácido/arenado.

DISCUSIÓN

Las infecciones peri-implantares, son enfermedades únicas las cuales se desarrollan a partir de la microflora residente del huésped y están directamente relacionadas con la formación de biopelículas sobre la superficie del implante.

En México, la cantidad de implantes dentales colocados se incrementa día a día, desafortunadamente, no se cuenta con los datos estadísticos apropiados que nos orienten sobre la relación de implantes dentales colocados contra la cantidad de implantes perdidos debido a infecciones peri-implantares. Los datos publicados para poblaciones residentes en los Estados Unidos de Norte América reportan que 1,000,000 de implantes dentales son colocados al año, de los cuales del 5 al 10% llegan a infectarse (Weinstein et al. 2001), este dato es preocupante debido a las secuelas médicas y económicas que surgen si el implante llega a perderse por esta causa.

Para poder desarrollar superficies de dispositivos biomédicos que eviten la colonización de bacterias, es necesario entender primero los procesos que modifican los patrones de adhesión bacteriana sobre dichos dispositivos, como la adsorción de las proteínas que forman la película adquirida la cual determina el tipo de bacterias que podrán colonizar dichas superficies. Aunque ahora es bien aceptado que las etapas iniciales de adsorción de proteínas juegan un papel determinante en la colonización bacteriana de los biomateriales, estudios previos en este campo se habían enfocado principalmente en las interacciones bacteria-superficie (Baier et al. 1978).

Considerando que la saliva humana está constituida de aproximadamente 2290 proteínas (Loo et al. 2012), de las cuales aproximadamente 130 constituyen la película adquirida que se forma sobre la superficie de los dientes naturales (Siqueira et al. 2007), resulta difícil tratar de caracterizar la película que se forma sobre las superficies de Ti de los implantes dentales, debido a la complejidad de reproducir el ambiente *in vivo*. Por lo cual,

en este estudio se propuso un modelo *in vitro* para determinar la adsorción de tres proteínas de la saliva sobre superficies de titanio actualmente utilizadas para implantes dentales y su efecto en la colonización de dos especies bacterianas representativas de la placa dentobacteriana subgingival.

Patrones de adsorción de las proteínas salivales: Histatina 5, Cistatina S, y α -Amilasa, sobre superficies de titanio con diferentes características físicas.

Con los ensayos de adsorción de las proteínas de la saliva (Histatina 5, Cistatina S y α -Amilasa) sobre los sustratos de Ti (PT, A y SLA), se observó que las proteínas evaluadas se adsorbieron en cada uno de los sustratos experimentales, lo que concuerda con reportes previos que indican que las proteínas pueden adsorberse en cualquier superficie sólida (Malmsten et al. 1998). También se observó que hubo diferencias en la afinidad de las proteínas por los distintos sustratos, observándose siempre la misma tendencia siendo Histatina 5 la proteína que se adsorbió en mayores cantidades a todos los sustratos seguido por α -Amilasa, mientras que Cistatina S fue la proteína adsorbida en menores cantidades. Una posible explicación a estos resultados es que las proteínas sufren cambios conformacionales durante el proceso de adsorción y dichos cambios pueden llevar a diferencias cuantitativas en la cinética de adsorción. Los cambios conformacionales debido a la adsorción han sido frecuentemente descritos en la literatura (Norde et al. 1992), por ejemplo, se ha reportado que un sitio bioactivo específico localizado en el segmento C-terminal del fragmento D del fibrinógeno no es accesible cuando la proteína se encuentra en solución, pero queda expuesto cuando el fibrinógeno se adsorbe a la superficie de un biomaterial (Hu et al. 2001).

En este estudio, se analizó la relación entre las características físicas de los sustratos en la adsorción de cada una de las proteínas evaluadas. Por un lado se observó que

mientras mayor era la rugosidad del sustrato, se obtenía un mayor ángulo de contacto, confirmando lo que ha sido reportado previamente, que una de las formas para incrementar la hidrofobicidad en una superficie es mediante el incremento de la rugosidad del sustrato (Nosonovsky et al. 2007).

De acuerdo con los valores de ángulo de contacto de las superficies PT ($82.4 \pm 0.4^\circ$), A ($95.0 \pm 2.3^\circ$) y SLA ($131.7 \pm 0.5^\circ$), estos indican que el sustrato PT tiene mayor mojabilidad, mientras que las superficies A y SLA fueron más hidrofóbicas, tomando en cuenta que una superficie se considera hidrofóbica cuando presenta valores de ángulo de contacto mayores de 90° y menores de 150° (Bhushan et al. 2007).

Se ha reportado que los valores de ángulo de contacto influyen de manera importante en el grado de adsorción de una proteína a una superficie sólida (Jachimska et al. 2012). Al respecto, en este estudio se encontró una relación positiva entre el aumento en la cantidad de α -Amilasa adsorbida en los sustratos SLA que fueron los que tuvieron un mayor ángulo de contacto. Este dato concuerda con la idea general de que una superficie hidrofóbica adsorberá mayores cantidades de proteína que una superficie hidrofílica (Gray. 2004), debido a que en una superficie hidrofóbica, la proteína tiende a adsorberse por varias zonas hidrofóbicas de residuos presentes en esta. De esta forma, la proteína tiende a desplegar y expandir su centro hidrofóbico sobre la superficie, debido a la fuerza motriz termodinámica que buscará reducir el área neta de superficie hidrofóbica del sistema expuesto al solvente (Wertz et al. 2001).

Sin embargo, un efecto contrario se observó en la adsorción de las proteínas Histatina 5 y Cistatina S, las cuales mostraron mayor afinidad por la superficie con menor ángulo de contacto (PT), observándose una tendencia similar en los patrones de adsorción en ambas proteínas. Esto puede explicarse debido al hecho de que ambas proteínas son consideradas “flexibles” (Raj et al. 1998), por lo cual podrían mostrar una mayor afinidad por los sustratos más hidrofílicos. De acuerdo a Norde y Anusiem las proteínas pueden

ser clasificadas en dos tipos: proteínas “rígidas” (hard) y “flexibles” (soft) (Norde et al. 1992). Las proteínas rígidas presentan una conformación interna más fuerte y arreglos estructurales que sólo hacen pequeñas contribuciones a los procesos de adsorción, mientras que las proteínas flexibles, tienen menor estabilidad estructural y muestran una gran fuerza motriz para la adsorción como resultado de sus rearrreglos estructurales (Norde. 2008).

Sin embargo, cuando se trato de correlacionar los valores de R_a con los patrones de adsorción de proteínas, no se encontró una relación directa entre estos parámetros.

Por otra parte, se ha reportado que α -Amilasa es uno de los principales constituyentes de las películas salivales sobre superficies de HA y Ti y que además existen pocas diferencias cualitativas en la composición de esta película en ambos sustratos (Kohavi et al. 1997). Sin embargo, los datos obtenidos de este estudio muestran que Histatina 5 fue la proteína que mostró mayor afinidad por los sustratos de titanio evaluados, mientras que la cantidad de α -Amilasa adsorbida fue significativamente menor que de Histatina 5, pero mayor que de Cistatina S. En estudios realizados evaluando muestras de saliva total en donde más de una proteína está presente, tiende a ocurrir un proceso competitivo entre las diferentes proteínas por la adsorción a una superficie llamado efecto Vroman. Este efecto consiste en que cuando un material es expuesto a la saliva, las proteínas más pequeñas (como Histatina 5) y concentradas tienden a adsorberse primero a la superficie, y conforme avanza el proceso de adsorción, dichas proteínas son desplazadas por las más grandes y que interactúan más fuertemente con la superficie en fases posteriores (Vroman et al. 1969). Es por esto que al utilizar saliva total y al momento de realizar el análisis de la película salival, posiblemente ya ha ocurrido el desplazamiento de Histatina 5, debido a que es una proteína considerablemente más pequeña en comparación con α -Amilasa.

Es importante recalcar que el enfoque utilizado en este estudio representa una ventaja en comparación con otros previamente reportados, debido a que fue posible evaluar el comportamiento individual de cada una de las proteínas salivales adsorbidas a los diferentes sustratos y no el efecto de las proteínas totales que se pudieran encontrar en una muestra.

Edgerton et al, caracterizaron *in vitro* la composición de una película salival experimental adsorbida en superficies de Ti, y evaluaron además como esta película moduló la adhesión de especies de *Streptococcus* mediante Western-blott (Edgerton et al. 1996). Sus resultados mostraron que las amilasas y las PRPs estuvieron presentes como los principales constituyentes de las películas experimentales, mientras que no lograron la detección de proteínas de la familia Cistatina ya que el Western-blott es considerada una técnica semicuantitativa que depende de la intensidad de la banda electroforética (Biji et al. 2006), por lo que puede ser que no se detecten proteínas presentes en cantidades pequeñas, como el caso de la Cistatina S. En el presente estudio se logro no sólo la detección sino también la cuantificación de Cistatina S adsorbida a todos los sustratos utilizando de la técnica de ELISA, la cual tiene las ventajas de la especificidad y sensibilidad de detección del orden de pg/mL (Biji et al. 2006).

Efecto de la adsorción de las proteínas salivales sobre diferentes superficies de Ti en la adhesión de Streptococcus gordonii y Porphyromonas gingivalis.

En el presente estudio, fue evidente que los patrones de adhesión observados entre las cepas bacterianas utilizadas, variaron en relación a la proteína adsorbida y en relación a las características físicas del sustrato evaluado. Esto es consistente con otros estudios que muestran el papel determinante del microambiente en la adhesión de especies selectivas de la microbiota oral (Grossner et al. 2001).

Se observaron diferencias en la adhesión bacteriana en las superficies probadas en función de la rugosidad. Cuando las bacterias fueron cultivadas en superficies lisas (PT), se observó una cantidad reducida de bacterias adheridas en comparación con la adhesión bacteriana encontrada en las superficies más rugosas (A y SLA). Una correlación positiva entre la rugosidad de la superficie y la adhesión bacteriana *in vitro* ha sido mostrada, en parte al hecho de que las bacterias son capaces de colonizar picos y valles de superficies rugosas (Almaguer-Flores et al. 2009; Quirynen et al. 1996). Los resultados obtenidos en este estudio confirman dichas afirmaciones, e indican que el efecto de la rugosidad de la superficie fue más fuerte que el efecto de la mojabilidad (ángulo de contacto), ya que mediante el análisis de perfilometría con el parámetro Surface Index, el cual nos indica cual es el área total de la muestra evaluada, las superficies rugosas mostraron 1.2 veces mayor área efectiva que las superficies lisas.

La adhesión *S. gordonii*, el cual es considerado un “colonizador temprano” de la placa dentobacteriana (Gibbons et al. 1996), se vio significativamente disminuida cuando los sustratos fueron incubados con α -Amilasa, este dato contrasta con los reportes previos que muestran una alta afinidad de *S. gordonii* por α -Amilasa (Scannapieco et al. 1989).

Sin embargo, previamente se ha reportado que α -Amilasa puede ejercer efectos antibacterianos, los cuales son atribuidos a una inhibición del crecimiento de la bacteria por medio de la disminución de nutrientes (Gregory et al. 1983) o a una interacción directa con α -Amilasa ya que se ha reportado que dependiendo de la conformación de α -Amilasa, ésta puede formar complejos con la proteína de unión a α -Amilasa de *S. gordonii* (AbpA) y con la enzima glucosiltransferasa Gtf-G, dichos complejos han mostrado la capacidad de inhibir la adhesión de *S. gordonii* (Chaudhuri et al. 2007). Los cambios conformacionales en las proteínas adsorbidas tienen grandes efectos en la actividad biológica del sustratos de los materiales y las interacciones celulares dependerán en gran medida de la naturaleza de dichos cambios conformacionales (Candiloros et al. 1996).

Otro hallazgo importante es que la adhesión de *P. gingivalis*, el cual es un reconocido patógeno periodontal (Holt et al. 2005), fue mayor en todos los sustratos evaluados en comparación con *S. gordonii*. Este hallazgo es consistente con aquellos reportados previamente donde se muestra que *P. gingivalis* es capaz de colonizar superficies de Ti en altas proporciones (Yoshinari et al. 2000. Almaguer-Flores et al. 2011).

Aunado a esto, se encontró una disminución en la adhesión de *P. gingivalis* a todos los sustratos incubados con Histatina 5, lo cual puede ser explicado por datos previamente publicados que muestran una actividad inhibitoria de las histatinas contra las actividades de hema-aglutinina de *P. gingivalis* (Murakami et al. 1992), así también, se ha reportado la inhibición del crecimiento de *P. gingivalis*, cuando un péptido derivado de la Histatina 5 se adsorbió previamente a las superficies de Ti. (Makihira et al. 2010). Este dato también es consistente con los resultados obtenidos de los ensayos de adsorción de proteínas de este estudio, pues es evidente la relación entre la disminución de la adhesión *P. gingivalis* en los sustratos incubados con Histatina 5.

Como se ha reportado previamente, el proceso de adsorción de proteínas es seguido por muchos pasos posteriores, como la alteración de las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas adsorbidas y el cambio en las propiedades de la superficie donde están adsorbidas (Pruitt et al. 1969). Esta podría ser una de las explicaciones dadas a las diferencias observadas en los patrones de adhesión de *S. gordonii* y *P. gingivalis* en los sustratos incubados con las distintas proteínas evaluadas en este estudio.

En el presente estudio, también se usó microscopía de fluorescencia para evaluar cualitativamente la adhesión y viabilidad bacteriana a diferentes sustratos de Ti. A través de este modelo, se confirmó que la viabilidad de las células bacterias adheridas fue la misma sin importar la naturaleza del sustrato y de la proteína previamente adsorbida. Es importante recalcar que la viabilidad bacteriana durante la adhesión y desarrollo de la

biopelícula es un factor importante en la patogenicidad de la placa dentantobacteriana.
(Weiger et al. 1999).

CONCLUSIONES

La adsorción de proteínas a diferentes superficies es un proceso complejo que puede determinar el tipo y cantidad de células que posteriormente colonizarán estas superficies.

En este proyecto, se propuso estudiar el efecto que tiene la adsorción de tres proteínas de la saliva en el proceso de adhesión bacteriana sobre sustratos de Ti de relevancia clínica, analizando las características de los sustratos experimentales como la rugosidad media y el ángulo de contacto y relacionando esta información con el efecto en la adsorción de las proteínas y la adhesión bacteriana.

Es importante mencionar que el análisis de los resultados fue complicado, ya que se incluyeron tres superficies (PT, A y SLA) con diferentes características físicas, tres diferentes proteínas (Histatina 5, α -Amilasa y Cistatina S) y dos cepas bacterianas (*Streptococcus gordonii* y *Porphyromonas gingivalis*).

Con los resultados obtenidos en este estudio podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- Las características físicas de las superficies probadas tuvieron un papel crítico en el proceso de adsorción de las proteínas salivales evaluadas. Histatina 5 y Cistatina S mostraron mayor adsorción en los sustratos PT, los cuales tuvieron el menor ángulo de contacto y R_a , mientras que α -Amilasa se adsorbió en mayores cantidades en los sustratos que presentaron el mayor ángulo de contacto y R_a (SLA).
- La adhesión bacteriana fue distinta en las cepas evaluadas, sin embargo, una mayor adhesión bacteriana fue observada siempre en los sustratos con mayor R_a (SLA).

- La adhesión bacteriana fue dependiente de la composición de la película experimental previamente adsorbida al sustrato. *Streptococcus gordonii* mostró una menor adhesión en los sustratos incubados con α -Amilasa, mientras que *Porphyromonas gingivalis* disminuyó su adhesión sobre sustratos incubados con Histatina 5.

Finalmente, los datos obtenidos en este estudio proporcionan la base para posteriores investigaciones que permitan entender la relación estructura-función de los péptidos/proteínas dentro de la película adquirida y dilucidar el efecto de esta película sobre la adhesión bacteriana en dispositivos biomédicos como los implantes dentales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamson, M., A. J. Barrett, G. Salvesen and A. Grubb (1986). "Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids." J Biol Chem **261**(24): 11282-9.
- Adell, R., B. Eriksson, U. Lekholm, P. I. Branemark and T. Jemt (1990). "Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws." Int J Oral Maxillofac Implants **5**(4): 347-59.
- Aguirre, A., M. J. Levine, R. E. Cohen and L. A. Tabak (1987). "Immunochemical quantitation of alpha-amylase and secretory IgA in parotid saliva from people of various ages." Arch Oral Biol **32**(4): 297-301.
- Al-Hashimi, I. and M. J. Levine (1989). "Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle." Arch Oral Biol **34**(4): 289-95.
- Albrektsson, T., P. I. Branemark, H. A. Hansson and J. Lindstrom (1981). "Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man." Acta Orthop Scand **52**(2): 155-70.
- Almaguer-Flores, A., R. Olivares-Navarrete, M. Wieland, L. A. Ximenez-Fyvie, Z. Schwartz and B. D. Boyan (2011). "Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro." Clin Oral Implants Res **18**(4): 501-8.
- Anastasi, A., M. A. Brown, A. A. Kembhavi, M. J. Nicklin, C. A. Sayers, D. C. Sunter and A. J. Barrett (1983). "Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum." Biochem J **211**(1): 129-38.
- ASME B46.1-1995 (1996), Surface Texture (Surface Roughness, Waviness, and Lay): An American National Standard, New York.
- Avrameas, S. (1969). "Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies." Immunochemistry **6**(1): 43-52.
- Avrameas, S. and J. Uriel (1966). "[Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]." C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **262**(24): 2543-5.
- Baier, R. E. and P. O. Glantz (1978). "Characterization of oral in vivo films formed on different types of solid surfaces." Acta Odontol Scand **36**(5): 289-301.
- Bakaletz, L. O. and P. O. Glantz (2004). "Developing animal models for polymicrobial diseases." Nature Rev Micro **36**(5): 289-301.
- Baron, A., A. DeCarlo and J. Featherstone (1999). "Functional aspects of the human salivary cystatins in the oral environment." Oral Dis **5**(3): 234-40.
- Becker, W., B. E. Becker, M. G. Newman and S. Nyman (1990). "Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure." Int J Oral Maxillofac Implants **5**(1): 31-8.
- Bennick, A., G. Chau, R. Goodlin, S. Abrams, D. Tustian and G. Madapallimattam (1983). "The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface." Arch Oral Biol **28**(1): 19-27.
- Bernardi, G. and T. Kawasaki (1968). "Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns." Biochim Biophys Acta **160**(3): 301-10.
- Bhushan, B., and Y. Chae-Jung (2007). "Wetting study of patterned surfaces for superhydrophobicity." Ultramicroscopy **107**(9): 1033-41.
- Biji, T., R. Kurien and H. Scofield (2006). "Western blotting." Methods **38**: 283-293.
- Blankenvoorde, M. F., W. van't Hof, E. Walgreen-Weterings, T. J. van Steenberg, H. S. Brand, E. C. Veerman and A. V. Nieuw Amerongen (1998). "Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*." Biol Chem **379**(11): 1371-5.

- Buser, D., T. Nydegger, T. Oxland, D. L. Cochran, R. K. Schenk, H. P. Snetivy and L. P. Nolte (1999). "The interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs." *J Biomed Mater Res* **45**(2): 75-83.
- Buser, D., R. K. Schenk, S. Steinemann, J. Fiorellini, C. Fox and H. Stich (1991). "Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs." *J Biomed Mater Res* **25**(7): 889-902.
- Candiloros H., S. Muller, O. Ziegler, M. Donner and P. Drouin (1996). "Role of albumin glycation on the erythrocyte aggregation: an in vitro study". *Diabetic Med* **13**: 646-650.
- Carlen, A., A. C. Borjesson, K. Nikdel and J. Olsson (1998). "Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite." *Caries Res* **32**(6): 447-55.
- Carpentier, B. and O. Cerf (1993). "Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry." *J Appl Bacteriol* **75**(6): 499-511.
- Costerton, J. W., R. T. Irvin and K. J. Cheng (1981). "The role of bacterial surface structures in pathogenesis." *Crit Rev Microbiol* **8**(4): 303-38.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber and H. M. Lappin-Scott (1995). "Microbial biofilms." *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-45.
- Chaudhuri B., J. Rojek, M. M. Vickerman, J. M. Tanzer and F. A. Scannapieco (2007). "Interaction of salivary alpha-amylase and amylase-binding-protein A (AbpA) of *Streptococcus gordonii* with glucosyltransferase of *S. gordonii* and *Streptococcus mutans*". *BMC Microbiology*: 7:60.
- Dahlen, G. G. (1993). "Black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis." *FEMS Immunol Med Microbiol* **6**(2-3): 181-92.
- Douglas, C. W. (1990). "Characterization of the alpha-amylase receptor of *Streptococcus gordonii* NCTC 7868." *J Dent Res* **69**(11): 1746-52.
- Dunne, W. M., Jr. (2002). "Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?" *Clin Microbiol Rev* **15**(2): 155-66.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." *Immunochemistry* **8**(9): 871-4.
- Esposito, M., J. M. Hirsch, U. Lekholm and P. Thomsen (1998). "Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology." *Eur J Oral Sci* **106**(1): 527-51.
- Furst, M. M., G. E. Salvi, N. P. Lang and G. R. Persson (2007). "Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants." *Clin Oral Implants Res* **18**(4): 501-8.
- Gregory M.R., W. W. Gregory, D. E. Bruns and J. J. Zakowski (1983) "Amylase inhibits *Neisseria gonorrhoeae* by degrading starch in the growth medium". *J Clin Microbiol* **18**: 1366-1369.
- Gibbons, R. and M. Nygaard (1970). "Interbacterial aggregation of plaque bacteria." *Arch Oral Biol* **15**(12): 1397-400.
- Gibbons, R. J. (1984). "Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth." *J Dent Res* **63**(3): 378-85.
- Gibbons, R. J. and D. I. Hay (1988). "Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces." *Infect Immun* **56**(2): 439-45.
- Gibbons, R. J. and D. I. Hay (1989). "Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces." *J Dent Res* **68**(9): 1303-7.
- Gibbons, R. J., D. I. Hay, J. O. Cisar and W. B. Clark (1988). "Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces." *Infect Immun* **56**(11): 2990-3.
- Gibbons, R. J., D. I. Hay and D. H. Schlesinger (1991). "Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces." *Infect Immun* **59**(9): 2948-54.
- Gibbons, R. J., D. M. Spinell and Z. Skobe (1976). "Selective adherence as a determinant of the host tropisms of certain indigenous and pathogenic bacteria." *Infect Immun* **13**(1): 238-46.
- Gorbunoff, M. J. and S. N. Timasheff (1984). "The interaction of proteins with hydroxyapatite. III. Mechanism." *Anal Biochem* **136**(2): 440-5.
- Gray, J. J. (2004). "The interaction of proteins with solid surfaces." *Current Opin Struct Biol* **14**(2): 110-115-5.

- Gusman, H., J. Travis, E. J. Helmerhorst, J. Potempa, R. F. Troxler and F. G. Oppenheim (2001). "Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease." *Infect Immun* **69**(3): 1402-8.
- Hay, D. I. (1967). "The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel." *Arch Oral Biol* **12**(8): 937-46.
- Hay, D. I. (1973). "The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite." *Arch Oral Biol* **18**(12): 1517-29.
- Hayflick, L. (1965). "The Mycoplasma (Pplo) Species of Man." *Trans N Y Acad Sci* **27**: 817-27.
- Holmes, A. R., R. McNab and H. F. Jenkinson (1996). "Candida albicans binding to the oral bacterium Streptococcus gordonii involves multiple adhesin-receptor interactions." *Infect Immun* **64**(11): 4680-5.
- Hooper, L. V., L. Bry, P. G. Falk and J. I. Gordon (1998). "Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem." *Bioessays* **20**(4): 336-43.
- Hu, W. J., J. Eaton and L. Tang (2001). "Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions." *Blood* **98**(4): 1231-1238.
- Hultin, M., A. Gustafsson, H. Hallstrom, L. A. Johansson, A. Ekfeldt and B. Klinge (2002). "Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis." *Clin Oral Implants Res* **13**(4): 349-58.
- Iontcheva, I., F. G. Oppenheim and R. F. Troxler (1997). "Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins." *J Dent Res* **76**(3): 734-43.
- ISO 2487: (1997), Geometrical Product Specifications (GPS)-Surface Texture: Profile Method-Terms, Definitions, and Surface Texture Parameters, The International Organization for Standardization.
- Isemura, S., E. Saitoh, K. Sanada and K. Minakata (1991). "Identification of full-sized forms of salivary (S-type) cystatins (cystatin SN, cystatin SA, cystatin S, and two phosphorylated forms of cystatin S) in human whole saliva and determination of phosphorylation sites of cystatin S." *J Biochem* **110**(4): 648-54.
- Jenkinson, H. and R. Lamont (1997). "Streptococcal adhesion and colonization." *Crit Rev Oral Biol Med* **8**(2): 175-200.
- Jachimaska, B. and A. Pajor (2012). "Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces." *Bioelectrochemistry* **87**: 138-46.
- Jensen, J. L., M. S. Lamkin, R. F. Troxler and F. G. Oppenheim (1991). "Multiple forms of statherin in human salivary secretions." *Arch Oral Biol* **36**(7): 529-34.
- Johansson, M., M. J. Levine and G. H. Nancollas (1993). "Hydroxyapatite binding domains in salivary proteins." *Crit Rev Oral Biol Med* **4**(3-4): 371-8.
- Jones, G. W. and R. E. Isaacson (1983). "Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors." *Crit Rev Microbiol* **10**(3): 229-60.
- Kapatral, V., I. Anderson, N. Ivanova, G. Reznik, T. Los, A. Lykidis, A. Bhattacharyya, A. Bartman, W. Gardner, G. Grechkin, L. Zhu, O. Vasieva, L. Chu, Y. Kogan, O. Chaga, E. Goltsman, A. Bernal, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, N. Kyrpides and R. Overbeek (2002). "Genome sequence and analysis of the oral bacterium Fusobacterium nucleatum strain ATCC 25586." *J Bacteriol* **184**(7): 2005-18.
- Kasemo, B. and J. Lausmaa (1986). "Surface science aspects of inorganic biomaterials." *CRC Crit Rev Biocompat* **2**: 335-80.
- Keijser, B. J., E. Zaura, S. M. Huse, J. M. van der Vossen, F. H. Schuren, R. C. Montijn, J. M. ten Cate and W. Crielaard (2008). "Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults." *J Dent Res* **87**(11): 1016-20.
- Kilian, M. and B. Nyvad (1990). "Ability to bind salivary alpha-amylase discriminates certain viridans group streptococcal species." *J Clin Microbiol* **28**(11): 2576-7.
- Klemm, P. and M. A. Schembri (2000). "Bacterial adhesins: function and structure." *Int J Med Microbiol* **290**(1): 27-35.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* **256**(5517): 495-7.
- Kolenbrander, P. E. (1988). "Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque." *Annu Rev Microbiol* **42**: 627-56.
- Kolenbrander, P. E. (2000). "Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems." *Annu Rev Microbiol* **54**: 413-37.

- Kolenbrander, P. E. and R. N. Andersen (1986). "Multigeneric aggregations among oral bacteria: a network of independent cell-to-cell interactions." *J Bacteriol* **168**(2): 851-9.
- Kolenbrander, P. E., R. J. Palmer, Jr., S. Periasamy and N. S. Jakubovics "Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance." *Nat Rev Microbiol* **8**(7): 471-80.
- Kousvelari, E. E., R. S. Baratz, B. Burke and F. G. Oppenheim (1980). "Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle, and glandular tissue specimens." *J Dent Res* **59**(8): 1430-8.
- Kulik, E. M., H. Sandmeier, K. Hinni and J. Meyer (2001). "Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis." *FEMS Microbiol Lett* **196**(2): 129-33.
- Kutisova, K., J. Kulda, I. Cepicka, J. Flegr, B. Koudela, J. Teras and J. Tachezy (2005). "Tetratrachomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans." *Parasitology* **131**(Pt 3): 309-19.
- Lamkin, M. S., A. A. Arancillo and F. G. Oppenheim (1996). "Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite." *J Dent Res* **75**(2): 803-8.
- Lamkin, M. S., J. L. Jensen, M. R. Setayesh, R. F. Troxler and F. G. Oppenheim (1991). "Salivary cystatin SA-III, a potential precursor of the acquired enamel pellicle, is phosphorylated at both its amino- and carboxyl-terminal regions." *Arch Biochem Biophys* **288**(2): 664-70.
- Lamkin, M. S., D. Migliari, Y. Yao, R. F. Troxler and F. G. Oppenheim (2001). "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* **80**(1): 385-8.
- Lancy, P., Jr., J. M. Dirienzo, B. Appelbaum, B. Rosan and S. C. Holt (1983). "Cornucob formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus sanguis*." *Infect Immun* **40**(1): 303-9.
- Lang, N. P., U. Bragger, D. Walther, B. Beamer and K. S. Kornman (1993). "Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings." *Clin Oral Implants Res* **4**(1): 2-11.
- Lee, J. Y., H. T. Sojar, G. S. Bedi and R. J. Genco (1992). "Synthetic peptides analogous to the fimbrillin sequence inhibit adherence of *Porphyromonas gingivalis*." *Infect Immun* **60**(4): 1662-70.
- Lee, R. G., C. Adamson and S. W. Kim (1974). "Competitive adsorption of plasma proteins onto polymer surfaces." *Thromb Res* **4**(3): 485-90.
- Leinonen, J., J. Kivela, S. Parkkila, A. K. Parkkila and H. Rajaniemi (1999). "Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle." *Caries Res* **33**(3): 185-90.
- Lendenmann, U., J. Grogan and F. G. Oppenheim (2000). "Saliva and dental pellicle--a review." *Adv Dent Res* **14**: 22-8.
- Leonhardt, A., T. Berglundh, I. Ericsson and G. Dahlen (1992). "Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs." *Clin Oral Implants Res* **3**(3): 112-9.
- Leonhardt, A., S. Renvert and G. Dahlen (1999). "Microbial findings at failing implants." *Clin Oral Implants Res* **10**(5): 339-45.
- Li, L., J. M. Tanzer and F. A. Scannapieco (2002). "Identification and analysis of the amylase-binding protein B (AbpB) and gene (abpB) from *Streptococcus gordonii*." *FEMS Microbiol Lett* **212**(2): 151-7.
- Liljemark, W. F., C. G. Bloomquist, B. E. Reilly, C. J. Bernards, D. W. Townsend, A. T. Pennock and J. L. LeMoine (1997). "Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management." *Adv Dent Res* **11**(1): 14-23.
- Lindhe, J., T. Karring and P. Lang (1998). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Copenhagen, Munksgaard.
- Loo, C. Y., D. A. Corliss and N. Ganeshkumar (2000). "Streptococcus gordonii biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes." *J Bacteriol* **182**(5): 1374-82.
- Loo, J. A., W. Yan, P. Ramachandran and D.T. Wong (2010). "Comparative human salivary and plasma proteomes." *J Dent Res* **89**(25): 1016-1023.
- MacKay, B. J., L. Denepitiya, V. J. Iacono, S. B. Krost and J. J. Pollock (1984). "Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*." *Infect Immun* **44**(3): 695-701.
- Maertens, J., J. Verhaegen, H. Demuyne, P. Brock, G. Verhoef, P. Vandenberghe, J. Van Eldere, L. Verbist and M. Boogaerts (1999). "Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by

- a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis." J Clin Microbiol **37**(10): 3223-8.
- Makihira, S. Shuto, T. Nikawa, H. Okamoto, K. Mine, Y. Takamoto, Y. Ohara, and K. Tsuji (2010). "Titanium immobilized with antimicrobial peptide derived from histatin accelerates the differentiation of osteoblastic cell line, MC3T3-E1" Int J Mol Sci **11**(4): 1458-70.
- Mayo, J. W. and D. M. Carlson (1974). "Isolation and properties of four alpha-amylase isozymes from human submandibular saliva." Arch Biochem Biophys **163**(2): 498-506.
- Mombelli, A., M. Marxer, T. Gaberthuel, U. Grunder and N. P. Lang (1995). "The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease." J Clin Periodontol **22**(2): 124-30.
- Mombelli, A., M. A. van Oosten, E. Schurch, Jr. and N. P. Land (1987). "The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants." Oral Microbiol Immunol **2**(4): 145-51.
- Moreno, E. C., M. Kresak and D. I. Hay (1978). "Adsorption of two human parotid salivary macromolecules on hydroxy-, fluorhydroxy- and fluorapatites." Arch Oral Biol **23**(7): 525-33.
- Moreno, E. C., M. Kresak and D. I. Hay (1984). "Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite." Calcif Tissue Int **36**(1): 48-59.
- Moreno, E. C., K. Varughese and D. I. Hay (1979). "Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate." Calcif Tissue Int **28**(1): 7-16.
- Moreno, E. C. and R. T. Zahradnik (1979). "Deminerlization and remineralization of dental enamel." J Dent Res **58**(Spec Issue B): 896-903.
- Murakami, Y., T. Xu, E. J. Helmerhorst, G. Ori, R. F. Troxler, E. T. Lally and F. G. Oppenheim (2002). "Inhibitory effect of synthetic histatin 5 on leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Oral Microbiol Immunol **17**(3): 143-9.
- Nagata, H., A. Sharma, H. T. Sojar, A. Amano, M. J. Levine and R. J. Genco (1997). "Role of the carboxyl-terminal region of *Porphyromonas gingivalis* fimbriin in binding to salivary proteins." Infect Immun **65**(2): 422-7.
- Nakane, P. K. and G. B. Pierce, Jr. (1967). "Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens." J Cell Biol **33**(2): 307-18.
- Nakazato, G., H. Tsuchiya, M. Sato and M. Yamauchi (1989). "In vivo plaque formation on implant materials." Int J Oral Maxillofac Implants **4**(4): 321-6.
- Nishihara, T. and T. Koseki (2004). "Microbial etiology of periodontitis." Periodontol 2000 **36**: 14-26.
- Norde, W. and J. Favier (1992). "Structure of adsorbed and desorbed proteins" Col Surf **26**: 87-93.
- Norde W. and A. C. I. Anusiem (1992). "Adsorption, desorption and re-adsorption of proteins on solid surfaces". Colloids Surf. **66**: 73-80.
- Norde, W. (2008). "My voyage of discovery to proteins in flatland...and beyond". Colloids Surf. B Biointerf. **61**: 1-9.
- Nosonovsky M. and B. Bhushan (2007). "Hierarchical roughness optimization for biomimetic superhydrophobic surfaces" Ultramicroscopy **107**: 969-979.
- Oppenheim, F. G., D. I. Hay and C. Franzblau (1971). "Proline-rich proteins from human parotid saliva. I. Isolation and partial characterization." Biochemistry **10**(23): 4233-8.
- Oppenheim, F. G., T. Xu, F. M. McMillian, S. M. Levitz, R. D. Diamond, G. D. Offner and R. F. Troxler (1988). "Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*." J Biol Chem **263**(16): 7472-7.
- Oppenheim, F. G., Y. C. Yang, R. D. Diamond, D. Hyslop, G. D. Offner and R. F. Troxler (1986). "The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion." J Biol Chem **261**(3): 1177-82.
- Orstavik, D. and F. W. Kraus (1974). "The acquired pellicle: enzyme and antibody activities." Scand J Dent Res **82**(3): 202-5.
- Oste, R., A. Ronstrom, D. Birkhed, S. Edwardsson and M. Stenberg (1981). "Gas-liquid chromatographic analysis of amino acids in pellicle formed on tooth surface and plastic film in vivo." Arch Oral Biol **26**(8): 635-41.

- Paster, B. J., I. Olsen, J. A. Aas and F. E. Dewhirst (2006). "The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites." Periodontol 2000 **42**: 80-7.
- Pollock, J. J., L. Denepitiya, B. J. MacKay and V. J. Iacono (1984). "Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*." Infect Immun **44**(3): 702-7.
- Pruitt, K. M., R. C. Caldwell, A. D. Jamieson and R. E. Taylor (1969). "The interaction of salivary proteins with tooth surface." J Dent Res **48**(5): 818-23.
- Quirynen, M., H. C. van der Mei, C. M. Bollen, A. Schotte, M. Marechal, G. I. Doornbusch, I. Naert, H. J. Busscher and D. van Steenberghe (1993). "An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque." J Dent Res **72**(9): 1304-9.
- Quirynen, M., C.M. Bollen, W. Papaioannou, J. Van Eldere and D. Van Steenberghe (1996) "The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: Short-term observations". Int J Oral Maxillofac Implants **11**: 169-178.
- Rams, T. E., T. W. Roberts, D. Feik, A. K. Molzan and J. Slots (1991). "Clinical and microbiological findings on newly inserted hydroxyapatite-coated and pure titanium human dental implants." Clin Oral Implants Res **2**(3): 121-7.
- Raj, P.A., E. Marcus and D.K. Sukumaran. (1998) "Structure of human salivary histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions". Biopolymers **45**: 51-67.,
- Roach, P., D. Eglin, K. Rohde and C. C. Perry (2007). "Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications." J Mater Sci: Mater Med **18**: 1263-77.
- Rogers, J. D., E. M. Haase, A. E. Brown, C. W. Douglas, J. P. Gwynn and F. A. Scannapieco (1998). "Identification and analysis of a gene (*abpA*) encoding a major amylase-binding protein in *Streptococcus gordonii*." Microbiology **144** (Pt 5): 1223-33.
- Rogers, J. D., R. J. Palmer, Jr., P. E. Kolenbrander and F. A. Scannapieco (2001). "Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation." Infect Immun **69**(11): 7046-56.
- Rolla, G., J. E. Ciardi and W. H. Bowen (1983). "Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva." Scand J Dent Res **91**(3): 186-90.
- Rosenberg, E. S., J. P. Torosian and J. Slots (1991). "Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants." Clin Oral Implants Res **2**(3): 135-44.
- Ryan, C. M., P. Souda, F. Halgand, D. T. Wong, J. A. Loo, K. F. Faull and J. P. Whitelegge "Confident assignment of intact mass tags to human salivary cystatins using top-down Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry." J Am Soc Mass Spectrom **21**(6): 908-17.
- Rykke, M. and T. Sonju (1991). "Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours." Scand J Dent Res **99**(6): 463-9.
- Saitoh, E., S. Isemura, K. Sanada, H. S. Kim, O. Smithies and N. Maeda (1988). "Cystatin superfamily. Evidence that family II cystatin genes are evolutionarily related to family III cystatin genes." Biol Chem Hoppe Seyler **369** Suppl: 191-7.
- Saitoh, T., N. Hattori and M. Hiraide (2004). "Protein separation with surfactant-coated polystyrene involving Cibacron Blue 3GA-conjugated triton X-100." J Chromatogr A **27** (1). 149-53.
- Sas, R. and C. Dawes (1997). "The intra-oral distribution of unstimulated and chewing-gum-stimulated parotid saliva." Arch Oral Biol **42**(7): 469-74.
- Scannapieco, F. A., E. J. Bergey, M. S. Reddy and M. J. Levine (1989). "Characterization of salivary alpha-amylase binding to *Streptococcus sanguis*." Infect Immun **57**(9): 2853-63.
- Scannapieco, F. A., K. Bhandary, N. Ramasubbu and M. J. Levine (1990). "Structural relationship between the enzymatic and streptococcal binding sites of human salivary alpha-amylase." Biochem Biophys Res Commun **173**(3): 1109-15.
- Scannapieco, F. A., G. Torres and M. J. Levine (1993). "Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation." Crit Rev Oral Biol Med **4**(3-4): 301-7.

- Schlesinger, D. H. and D. I. Hay (1977). "Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva." J Biol Chem **252**(5): 1689-95.
- Schwarz, F., D. Ferrari, M. Hertel, I. Mihatovic, M. Wieland, M. Sager and J. Becker (2007). "Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at non-submerged titanium implants: an immunohistochemical study in dogs." J Periodontol **78**(11): 2171-84.
- Schwarz, F., A. Sculean, M. Wieland, N. Horn, E. Nuesry, C. Bube and J. Becker (2007). "Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study." Mund Kiefer Gesichtschir **11**(6): 333-8.
- Shiomi, K., Y. Hagiwara, K. Sonoue, T. Segawa, K. Miyashita, M. Maeda, H. Izumi, K. Masuda, M. Hirabayashi, T. Moroboshi, T. Yoshiyama, A. Ishida, Y. Natori, A. Inoue, M. Kobayashi, Y. Sakao, H. Miyamoto, K. Takahashi and O. Hino (2008). "Sensitive and specific new enzyme-linked immunosorbent assay for N-ERC/mesothelin increases its potential as a useful serum tumor marker for mesothelioma." Clin Cancer Res **14**(5): 1431-7.
- Siqueira, W.L., W. Zhang and F.G. Oppenheim (2007). "Identification of protein components in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS." J Prot Res **6**(6): 2152-2160.
- Sipahi, C., N. Anil and E. Bayramli (2001). "The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials." J Dent **29**(3): 197-204.
- Slots, J. and R. J. Gibbons (1978). "Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets." Infect Immun **19**(1): 254-64.
- Slots, J. and T. E. Rams (1991). "New views on periodontal microbiota in special patient categories." J Clin Periodontol **18**(6): 411-20.
- Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2002). "Dental biofilms: difficult therapeutic targets." Periodontol 2000 **28**: 12-55.
- Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2005). "Periodontal microbial ecology." Periodontol 2000 **38**: 135-87.
- Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith and R. L. Kent, Jr. (1998). "Microbial complexes in subgingival plaque." J Clin Periodontol **25**(2): 134-44.
- Sojar, H. T., J. Y. Lee, G. S. Bedi, M. I. Cho and R. J. Genco (1991). "Purification, characterization and immunolocalization of fimbrial protein from *Porphyromonas (bacteroides) gingivalis*." Biochem Biophys Res Commun **175**(2): 713-9.
- Sonju, T. and G. Rolla (1973). "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 **7**(1): 30-8.
- Spira, G. and M. D. Scharff (1992). "Identification of rare immunoglobulin switch variants using the ELISA spot assay." J Immunol Methods **148**(1-2): 121-9.
- Stiefel, D. J. (1976). "Characteristics of an in vitro dental pellicle." J Dent Res **55**(1): 66-73.
- Tanner, A., M. F. Maiden, K. Lee, L. B. Shulman and H. P. Weber (1997). "Dental implant infections." Clin Infect Dis **25 Suppl 2**: S213-7.
- Tanner, J., C. Robinson, E. Soderling and P. Vallittu (2005). "Early plaque formation on fibre-reinforced composites in vivo." Clin Oral Investig **9**(3): 154-60.
- Taylor, J. B., A.L. Carrano and S. G. Kandlikar (2006). "Characterization of the effect of surface roughness and texture on fluid flow-past, present and future." Int J Therm Sci **45**: 962-68.
- Tonetti, M. S. and J. Schmid (1994). "Pathogenesis of implant failures." Periodontol 2000 **4**: 127-38.
- Vacca Smith, A. M. and W. H. Bowen (2000). "In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs." Arch Oral Biol **45**(4): 277-91.
- Van Weemen, B. K. and A. H. Schuurs (1971). "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates." FEBS Lett **15**(3): 232-236.
- Vitorino, R., M. J. Calheiros-Lobo, J. Williams, A. J. Ferrer-Correia, K. B. Tomer, J. A. Duarte, P. M. Domingues and F. M. Amado (2007). "Peptidomic analysis of human acquired enamel pellicle." Biomed Chromatogr **21**(11): 1107-17.
- Vroman, L. and A. L. Adams (1969). "Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces." Surf. Sci **16**: 438-446.
- Weber, H. P. and N. P. Lang (1991). "The use of dental implants in comprehensive therapy." Curr Opin Dent **1**(1): 104-10.

- Weiger, R, Decker, E.M.. and M. Brex (1999). "Deposition and retention of vital and dead Streptococcus sanguinis cells on glass surfaces in a flow-chamber system." Arch Oral Biol **44**(1): 621-8.
- Wertz, C. F. and M. M. Santore (2001). "Effect of surface hydrophobicity on adsorption and relaxation kinetics of albumin and fibrinogen: single-species and competitive behaviour." Langmuir **17**: 3006-16.
- Wong, R. S., T. Hofmann and A. Bennick (1979). "The complete primary structure of a proline-rich phosphoprotein from human saliva." J Biol Chem **254**(11): 4800-8.
- Yao, Y., M. S. Lamkin and F. G. Oppenheim (1999). "Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase." J Dent Res **78**(11): 1696-703.
- Yao, Y., M. S. Lamkin and F. G. Oppenheim (2000). "Pellicle precursor protein crosslinking characterization of an adduct between acidic proline-rich protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase." J Dent Res **79**(4): 930-8.
- Yin, A., H. C. Margolis, J. Grogan, Y. Yao, R. F. Troxler and F. G. Oppenheim (2003). "Physical parameters of hydroxyapatite adsorption and effect on candidacidal activity of histatins." Arch Oral Biol **48**(5): 361-8.
- Yoshinari , M. Oda, Y. Kato, T. Okuda, K. and A. Hirayama (2000). "Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro." J Biomedical Mat Res **52**(2): 388-4.