



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS DELGADAS DE
ÓXIDO DE TITANIO AMORFO COLOCADAS SOBRE SUPERFICIES
DE ACERO INOXIDABLE DE GRADO MÉDICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JONATHAN ALFREDO AMEZCUA GARCÍA

MÉXICO, D.F.

2015.





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR EDUARDO BONILLA ESPINOSA

VOCAL: PROFESOR ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

SECRETARIO: PROFESORA ARGELIA ALMAGUER FLORES

1ER. SUPLENTE: PROFESOR JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

2° SUPLENTE: PROFESOR JAVIER FERNÁNDEZ TORRES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR Y BIOLOGÍA PERIODONTAL DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ARGELIA ALMAGUER FLORES

SUSTENTANTE:

AMEZCUA GARCÍA JONATHAN ALFREDO

“Investigación realizada gracias a los Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con claves: IG100113 “*Biofuncionalidad de películas delgadas de Óxido de Titanio*” IN118914 “*Biofuncionalidad de películas de Óxido de Titanio: Respuesta Biológica*”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	6
A. Antecedentes	6
Biomateriales	8
Clasificación de los biomateriales	10
Materiales metálicos utilizados en dispositivos biomédicos	12
i. Implantes de acero inoxidable	14
ii. Implantes de titanio	15
Modificaciones superficiales	17
Infecciones asociadas a dispositivos biomédicos	20
i. Papel de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	23
ii. Papel de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
iii. Microorganismos de la cavidad oral relacionados con la Periimplantitis	28
Adhesión y formación de biopelículas en superficies de dispositivos biomédicos	31
B. Objetivos	36
C. Planteamiento y justificación del problema	36
D. Hipótesis	37
II. MATERIALES Y MÉTODOS	38
A. Preparación de las superficies experimentales	38
B. Evaluaciones microbiológicas	39
Crecimiento y purificación de las cepas bacterianas	39
Ensayos de adhesión bacteriana	40
i. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayos de XTT.	42
ii. Microscopía Confocal	43
Ensayos de formación de biopelículas	44
i. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayos de XTT.	44
ii. Microscopía Confocal	45
C. Análisis estadístico de datos	45

III. RESULTADOS	46
A. Ensayos de adhesión bacteriana	46
i. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayos de XTT	46
ii. Microscopía Confocal	53
B. Ensayos de formación de biopelículas	57
i. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayos de XTT	57
ii. Microscopía Confocal	61
IV. DISCUSIÓN	65
V. CONCLUSIONES	71
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

I. INTRODUCCIÓN

A. Antecedentes

Los implantes ortopédicos han revolucionado el tratamiento de las fracturas óseas e incluso se han convertido en un componente esencial de la medicina moderna [1].

Se estima que tan sólo en los Estados Unidos, se realizan más de 200,000 reemplazos totales de cadera anualmente, con estadísticas epidemiológicas que indican que más de 4,4 millones de personas tienen al menos 1 dispositivo de fijación interna y más 1,3 millones tienen una articulación artificial [2]. Aunado a lo anterior, se prevé que a finales del 2030 la demanda de implantes de larga duración aumente, con un aproximado de 174% (572,000 procedimientos) para reemplazos totales de cadera y de 673% (3,48 millones de procedimientos) para artroplastias totales de rodilla [3].

En el campo de la Odontología, la utilización de implantes dentales también ha beneficiado a un gran número de pacientes en el tratamiento de la pérdida de piezas dentales y se estima que cerca de un millón de implantes dentales intraóseos se colocan cada año en todo el mundo [4]. Cabe resaltar que la tasa de éxito de estos dispositivos es excelente, ya que menos del 10% de los pacientes expuestos a este tipo de biomateriales experimentan complicaciones con su uso [5].

A pesar de esto, el fracaso de estos aditamentos puede ocurrir y una de las principales causas es la presencia de infecciones causadas por bacterias adheridas a la superficies de prótesis ortopédicas e implantes dentales, ocasionando la pérdida de hueso que rodea al implante y culminando con el retiro del biomaterial [6].

En este sentido, el primer paso para que se presente una infección en implantes dentales u ortopédicos es la adhesión bacteriana. Este evento va a dar origen al desarrollo de la biopelícula; la cual se describe como una comunidad de microorganismos bien organizada compuesta por células y microcolonias individuales, embebidas en una matriz de exopolisacáridos (predominantemente aniónicos) altamente hidratados y adheridos a una gran variedad de superficies naturales o artificiales que conforman una estructura tridimensional con una organización compleja [7]. Una vez que la biopelícula está formada, las células bacterianas se vuelven altamente resistentes a la acción de antibióticos debido a que el micro-ambiente de la biopelícula las protege tanto de las defensas del huésped como de la acción de los antibióticos, provocando que el tratamiento antimicrobiano sea difícil [8].

En la actualidad, el material de implante más utilizado es el titanio y sus aleaciones, debido a sus mejores propiedades físico-químicas y de biocompatibilidad en comparación con otros biomateriales metálicos como el acero inoxidable que ha quedado en desuso [9]. Sin embargo, un problema común que ocasiona el fracaso en la implantación de este tipo de materiales sigue siendo la infección bacteriana, por lo que se han buscado diferentes alternativas que disminuyan o eliminen el riesgo de infecciones durante la colocación del implante. Las estrategias, como el uso de antibióticos profilácticos durante la colocación del implante, aún son controvertidas [6]. Adicionalmente, se ha observado que realizando modificaciones en las superficies del biomaterial, se mejora la compatibilidad con los tejidos, así como la inhibición de la adhesión bacteriana y con esto la inhibición de la biopelícula [10].

Tomando en cuenta lo anterior, este proyecto de tesis pretende evaluar la respuesta biológica de una modificación superficial del acero inoxidable de grado

médico (SS 316L) con películas delgadas de óxido de titanio amorfo, depositadas por medio de la técnica de pulverización catódica “magnetron sputtering”. Nuestro interés principal es determinar si estas películas disminuyen la colonización bacteriana y la formación de biopelículas utilizando especies bacterianas implicadas en infecciones de implantes médico y odontológicos, comparadas con superficies de titanio comercialmente puro.

Biomateriales

Desde la antigüedad, la humanidad ha utilizado materiales para reparar funciones corporales dañadas. En un principio se utilizaron materiales naturales como la madera, con el fin de intentar reemplazar estructuralmente tejidos perdidos por enfermedad o trauma (Figura 1a). Históricamente, la selección de estos materiales se basaba en la disponibilidad del material, el ingenio del fabricante y en la aplicación que recibiría la prótesis. A principios del siglo XX, los materiales de origen natural comenzaron a ser desplazados por polímeros sintéticos, materiales cerámicos y aleaciones metálicas, los cuales en muchos casos, proporcionan un mejor rendimiento y una mayor funcionalidad en comparación de sus contrapartes de origen natural. Estos avances dieron como resultado millones de vidas salvadas o mejoradas por dispositivos tales como prótesis de cadera (Figura 1b), stents vasculares (Figura 1c), injertos óseos (Figura 1d), restauraciones dentales, y lentes contacto [11].



Figura 1. Evolución de los biomateriales (Tomado de: Huebsch, N. y Mooney D.J., 2009 [11]).

Los diversos materiales empleados para la fabricación de estos dispositivos se conocen como **biomateriales**, y se definen como: "*sustancias que han sido diseñadas para tener una forma que, solo o como parte de un sistema complejo, se utilizan para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en la medicina humana o veterinaria*" [12].

Cabe mencionar que el concepto de biomaterial ha ido evolucionando en el tiempo, de acuerdo a las necesidades y al entendimiento que se ha logrado de la interacción material-tejido vivo. A pesar de esta evolución en el concepto, los biomateriales surgen con el propósito básico de restaurar funciones perdidas en el organismo humano por trauma o enfermedad, previniendo el rechazo biológico. Hasta hace algunos años eran esencialmente materiales industriales seleccionados con el único criterio de que fueran biológicamente aceptables, es decir no tóxicos o "inertes",

los cuales no interactuaban con el ambiente biológico del organismo huésped (materiales de primera generación) [13, 14].

La revolución de la biología molecular de la década de los 70's y los avances de la genómica y la proteómica en las décadas de 1990s y 2000s, influyeron significativamente en la manera de diseñar y utilizar los biomateriales [15], a tal grado que en la actualidad los biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados pensando en la aplicación médica a la cual serán destinados (materiales de segunda generación). Los biomateriales deben ser bio-funcionales además de inertes, donde la funcionalidad se refiere a la habilidad del implante de realizar la función para la cual es diseñado dentro de un sistema biológico. Los requerimientos para este tipo de biomateriales son mayores e incluyen; i) ser biocompatibles (aceptados por el organismo sin causar rechazo, no ser tóxicos, ni carcinogénicos, entre otros), ii) ser químicamente estables e inertes, iii) tener buenas propiedades mecánicas, tales como resistencia y dureza iv) tener buena resistencia a la corrosión v) densidad y peso adecuado, y vi) estar diseñados adecuadamente y tener adaptabilidad [13].

Clasificación de los biomateriales

Existen diferentes maneras de clasificar a los biomateriales, una de ellas es en base al material con el que están formados (metálicos, cerámicos y polímeros). Obviamente cada una de estas categorías contiene una gran variedad de subdivisiones. Los materiales metálicos incluyen metales puros y aleaciones, los materiales cerámicos incluyen vidrios, cerámicas de vidrio y carbón, mientras que los polímeros termoestables incluyen, termoplásticos, elastómeros y textiles [12].

Otra manera de clasificarlos es en base a la respuesta biológica que generan al estar en contacto con los tejidos orgánicos, dicha clasificación es la siguiente:

Tóxicos: son materiales que causan la muerte del tejido circundante. Es importante mencionar que ningún biomaterial implantando debe provocar una respuesta tal que mate a las células de los tejidos circundantes o que liberen químicos que causen un daño sistémico de los tejidos [13, 14].

No- tóxicos y biológicamente inactivos: Estos biomateriales son normalmente llamados inertes. Esta propiedad se debe principalmente a que una vez colocado el implante en contacto con el cuerpo humano, se forma una cápsula de tejido fibroso no adherente de espesor variado alrededor del material de implante. Esta cápsula de tejido fibroso es un mecanismo de protección que aísla al implante del tejido circundante. Haciendo una comparación en el espesor de la cápsula de tejido fibroso entre los diversos biomateriales, podemos clasificar a los metales, cerámicos y la mayoría de los polímeros biocompatibles como materiales casi inertes. En materiales metálicos como las aleaciones de titanio, alumina o circonio la capa fibrosa que se forma es por lo general muy delgada, mientras que en materiales más reactivos como las aleaciones Co-Cr o en acero inoxidable se forman capas de mayor espesor. Este comportamiento se debe a la reactividad superficial (a una mayor reactividad, más tiempo le toma a la capa fibrosa lograr un equilibrio químico entre la superficie del implante y el tejido circundante) y al movimiento interfacial que a su vez depende del grado de anclaje en el que se encuentre el implante. Si el movimiento interfacial tejido-implante es mínimo, la respuesta fagocítica será transitoria y el espesor de la capa será más delgado. Mientras que si existe movimiento interfacial, se formará una cápsula completa con un mayor espesor [13, 14]. El grosor de la capa fibrosa influye

negativamente en la colocación del implante, pues a mayor espesor la posibilidad de que el implante se afloje a largo plazo aumenta, lo que puede producir la fractura del hueso que rodea al implante [16].

No-tóxicos y biológicamente activos: a este tipo de materiales se les conoce como biomateriales bioactivos, los cuales exhiben una reactividad química controlada que cambia con el tiempo y sufren reacciones químicas en la superficie que favorecen algún proceso biológico. Entre los materiales bioactivos se encuentran los vidrios cerámicos, la sílica meso-porosa y los fosfatos de calcio [17, 18].

Biodegradables: son materiales no tóxicos que se disuelven al colocarlos en el medio biológico. La composición de este tipo de materiales debe ser de tal manera que puedan ser disueltos químicamente por los fluidos fisiológicos, o bien degradados por los macrófagos. El diseño de estos materiales se basa en la degradación gradual del material para que puedan ser reemplazados por los tejidos naturales, por lo que se utilizan para inducir la regeneración del tejido en lugar de su sustitución. Ejemplos de estos materiales son polímeros y aleaciones de magnesio [19-21].

Materiales metálicos utilizados en dispositivos biomédicos

Los biomateriales metálicos se han utilizado como implantes desde hace más de 100 años; en el año de 1895 se reportó por primera vez la utilización de una placa de metal para la fijación de fracturas de hueso [11].

A pesar de que hoy en día la tecnología nos ha permitido la creación de nuevos biomateriales como polímeros o materiales biodegradables, los biomateriales metálicos siguen siendo los más utilizados para la fabricación de implantes, especialmente donde se requiere un gran soporte de carga (implantes dentales u ortopédicos) gracias a sus

propiedades mecánicas [22], resistencia a la corrosión en el entorno fisiológico, alta resistencia al desgaste, alta ductilidad y una buena biocompatibilidad [23].

Los biomateriales metálicos utilizados hoy día para aplicaciones biomédicas son los siguientes; titanio (Ti) y aleaciones de Ti, acero inoxidable de grado médico (SS 316L) y aleaciones de cromo cobalto. Siendo el titanio y sus aleaciones las más utilizadas para aplicaciones ortopédicas y dentales, gracias a que presentan una mayor biocompatibilidad, un módulo elástico semejante al del hueso en comparación con las otras aleaciones metálicas y una alta resistencia a la corrosión como consecuencia de la formación espontánea de la capa pasiva de óxido de titanio [13].

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de estos materiales son considerados como biomateriales casi inertes, esto es consecuencia del proceso de encapsulamiento que tienen lugar después de la implantación, a través del cual el metal queda rodeado y aislado del tejido circundante [16, 24]. El primer paso de este proceso, es el recubrimiento del implante por componentes sanguíneos como leucocitos, trombocitos y proteínas. El proceso quirúrgico para la colocación del implante dispara una reacción inflamatoria que ayuda a eliminar al tejido dañado, coágulos y microorganismos bacterianos. Las células inflamatorias (granulocitos, polimorfonucleares y monocitos) llegan a la zona dañada para expulsar residuos y materiales extraños. Posteriormente los monocitos se diferencian en macrófagos los cuales liberan sustancias que inducen a los fibroblastos (células propias del tejido conjuntivo o conectivo) a crear una cápsula fibrosa alrededor del implante [25]. Mientras se mantiene la activación fagocítica, la cápsula fibrosa se va haciendo cada vez más gruesa. Los materiales inertes quedan encapsulados por una capa delgada fibrosa alrededor del implante, lo cual es ideal para implantes en contacto o que

sustituyen tejidos suaves mientras que en implantes colocados en tejidos duros como el hueso, la capa fibrosa puede impedir la integración del implante al hueso, debilitando así la unión implante-hueso [13]. Por tanto, un implante “ideal” en hueso sería aquel que después de la reacción inflamatoria inicial, seguirá con una respuesta reparativa entre los 2 a 3 días después de colocado el implante, donde se formara una unión hueso-implante, en lugar de una cápsula fibrosa, este proceso es lo que Branemark definió como osteointegración [26]. Actualmente, el único material donde se ha observado una excelente osteointegración es en el titanio, ya que se establece una fijación rígida hueso-implante de manera progresiva a medida que se aplica carga al implante [27]. Este proceso no ocurre con los otros biomateriales metálicos de uso médico, ya que estos presentan una capa fibrosa entre el hueso y el implante lo que los hace “casi inertes”, pero no osteointegrables, aunque con excelentes propiedades mecánicas para soportar cargas como el SS 316L.

i. Implantes de acero inoxidable

El primer tipo de acero inoxidable de grado médico utilizado para la fabricación de implantes contenía aproximadamente 18% en peso de cromo (Cr) y 8% en peso de níquel (Ni) lo que hacía que este material fuera más fuerte que el acero y más resistente a la corrosión. Posteriormente la adición de molibdeno (Mo) mejoró aún más su resistencia a la corrosión, surgiendo así el acero inoxidable 316. Después de un tiempo el contenido de carbono (C) se redujo de 0,08% a 0,03% en peso lo que mejoró su resistencia a la corrosión en solución de cloruro y fue nombrado acero inoxidable 316L [28].

El SS 316L es empleado como biomaterial de uso médico, gracias a sus buenas propiedades mecánicas y su resistencia a la corrosión. Este tipo de biomaterial está compuesto por una aleación de: hierro (Fe), Cr (16 al 18 % en peso), Ni (10-14 % en peso); Mo (2-3% en peso), manganeso (Mn) (menos del 2%), silicio (Si) (menos del 2%) y C (menos del 0.03%) [24].

A pesar de que la aleación de acero inoxidable 316L presenta alta resistencia a la corrosión, se han identificado la liberación de elementos como Ni, Cr y Co en aleaciones de acero inoxidable y cromo cobalto (Co-Cr) debido a la corrosión que se presenta en el entorno fisiológico [29]. La liberación de estos compuestos resulta de notoria importancia ya que se han reportado enfermedades de la piel tales como dermatitis debido a la toxicidad del Ni [30] y numerosos estudios en animales han demostrado carcinogenicidad debido a la presencia de Co [31].

Aunado a esto, las aleaciones de acero inoxidable poseen un mayor módulo elástico (210 GPa) en comparación con el hueso (30 GPa), dando lugar a una insuficiente transferencia de estrés, que conduce a la resorción ósea y al aflojamiento del implante después de algunos años de la implantación [32]. Finalmente, como se mencionó anteriormente, este tipo de biomaterial no presenta una completa osteointegración debido a la formación de la cápsula fibrosa lo que lo reduce su biofuncionalidad [27].

ii. Implantes de titanio

El titanio como biomaterial comenzó a utilizarse a finales de 1930, cuando se descubrió que era bien tolerado en fémures de gatos, al igual que otros materiales de implante como el acero inoxidable y aleaciones de cromo-cobalto (Co-Cr). Desde

entonces el titanio comercialmente puro y la aleación Ti-6Al-4V son los biomateriales metálicos más utilizados en la fabricación de implantes ortopédicos. A pesar de que en un principio el Ti-6Al-4V fue desarrollado para aplicaciones aeroespaciales, su alta resistencia a la corrosión y su excelente biocompatibilidad llevaron a este material a ser ampliamente usado en la industria biomédica [9].

El rango de aplicación del titanio y sus aleaciones en el área médica es verdaderamente asombroso. Ejemplos de esto son; implantes dentales, piezas para cirugía de ortodoncia, piezas de recambio conjuntas para cadera, rodilla, hombro, columna vertebral, codo y muñeca, materiales de fijación de hueso como clavos, tornillos y placas, así como dispositivo de alojamiento para marcapasos y válvulas coronarias artificiales, instrumentos quirúrgicos y componentes para centrifugadoras de sangre de alta velocidad [9].

La amplia utilización del titanio y sus aleaciones entre los materiales disponibles para aplicaciones de implantes, se debe a la combinación de sus características sobresalientes, tales como alta resistencia a la corrosión gracias a la formación de la capa pasiva de óxido de titanio amorfo (α -TiO₂), baja densidad (55% menor que la del acero lo que le confiere una alta resistencia específica), una mayor biocompatibilidad, un módulo elástico bajo semejante al del hueso en comparación con otros biomateriales metálicos [33, 34].

Aunque el titanio y sus aleaciones principalmente TiAl₆V₄ tienen una excelente reputación por su resistencia a la corrosión y biocompatibilidad, el rendimiento a largo plazo de estas aleaciones ha generado algunas preocupaciones debido a la liberación de aluminio y vanadio de aleación TiAl₆V₄. Ambos iones de Al y V liberados de esta aleación se asocian con problemas de salud a largo plazo, como la enfermedad de

Alzheimer [35]. Aunado a esto, el titanio tiene pobre resistencia al corte, por lo que es menos deseable para la fabricación de tornillos óseos, placas y otras aplicaciones similares [9].

Modificaciones superficiales

La respuesta biológica de un biomaterial, está controlada principalmente por la rugosidad media y la química superficial, es por eso que la importancia de controlar propiedades físicas, químicas y topográficas de las superficies de los implantes es primordial. La importancia de controlar estas propiedades es tal, que en la actualidad se han desarrollado una gran cantidad de técnicas y metodologías de modificación superficial. Estas técnicas varían desde métodos específicos de limpieza hasta el depósito de películas delgadas sobre algún tipo de sustrato [13].

Las modificaciones superficiales pueden dividirse básicamente en tres clases:

a) Modificaciones superficiales topográficas, b) modificaciones superficiales de las propiedades bio-químicas de la superficie y c) modificación de las propiedades micro-mecánicas o viscoelásticas de las superficies [16].

a) Modificaciones superficiales topográficas: este tipo de modificaciones buscan controlar la topografía, esto porque se ha observado que la topografía a escala tanto micrométrica como nanométrica, tiene efectos relevantes en el comportamiento celular, desde la adhesión celular, la proliferación, diferenciación, morfología celular y su orientación espacial, así como en la organización del tejido formado, e incluso la selección celular [36, 37].

b) Modificaciones superficiales de las propiedades bio-químicas: el objetivo de este tipo de modificaciones superficiales es lograr una superficie activa que pueda

interactuar fuertemente con el tejido circundante. Un ejemplo de este tipo de materiales son los stents vasculares con recubrimientos que liberan fármacos de manera controlada directamente en el torrente sanguíneo para evitar la formación de coágulos [38].

c) Modificación de las propiedades micro-mecánicas o viscoelásticas de la superficies: lo que se pretende hacer con este tipo de modificaciones es aumentar el tiempo de vida de los implantes a través de mejorar la resistencia al desgaste, aunque también pueden mejorarse la funcionalidad del implante a través de una mejor distribución de los esfuerzos mecánicos [39].

Dentro las modificaciones superficiales topográficas, podemos encontrar las superficies nano-estructuradas. Esta modificación superficial es de gran importancia en el diseño de los biomateriales, ya que como se mencionó anteriormente la respuesta biológica a los materiales esta principalmente controlada por la estructura y la química superficial [13, 40]. Este tipo de modificaciones pueden ser químicas o físicas las cuales alteran la superficie del sustrato a través de una modificación de la química superficial como la nitruración, implantación iónica y funcionalización superficial así como el depósito de películas delgadas [15, 41]. Estas modificaciones deben de tener un espesor adecuado, ya que si la película es muy gruesa se podrían alterar las propiedades del sustrato, además recubrimientos muy gruesos tienden a delaminarse con facilidad. Por el contrario, una película extremadamente delgada puede erosionarse y no ser lateralmente uniforme [13]. Sea cual sea la modificación superficial, su objetivo primordial es mejorar las propiedades de resistencia a la corrosión, fatiga, biocompatibilidad e incluso evitar la adhesión bacteriana en las superficie de algún biomaterial. El interés científico por mejorar la calidad de vida de

pacientes que requieren algún tipo de implante, ha motivado el desarrollo de una gran cantidad de técnicas para realizar modificaciones superficiales. Ejemplos de estas técnicas son; pulido electrolítico, anodización, ataque químico con ácidos o bases, pasivación química, tratamientos térmicos en atmósferas controladas, implantación iónica o bien recubrimientos cerámicos de alta estabilidad química y resistencia a la corrosión. Algunas de las características de estas técnicas se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos de modificación superficial. (Basada en: Rodil, S.E., 2009 [13]).

<i>Método</i>	<i>Capa modificada</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Técnica</i>
Mecánicos	Modificación de la topografía a escala micrométrica	Diferentes rugosidades	Pulido, blasting, grinding
Litográficos	Modificación de la topografía a escala micro y manométrica	Diferentes rugosidades y patrones	Fotolitografía, láser, haz de electrones, capas coloidalales
Químicos	Alteración de la superficies químicamente Depósito de películas delgadas por sol-gel Depósito de películas delgadas por evaporación térmica Adsorción y autoensamblado de biomoléculas	Propiedades físico-químicas diferentes	Inmersión en ácidos, peróxidos, sol-gel CVD, PECVD Métodos bioquímicos
Físicos	Depósito de películas delgadas en forma de spray Depósito de películas delgadas por evaporación física Modificación de las capas superficiales Funcionalización	Películas porosas Películas densas, duras y resistentes al desgaste y corrosión Implantación iónica Grupos amino, hidroxilos, carboxilos o epóxicos	Spray térmico, flama, sónico Sputtering, arco catódico, evaporación, haz de iones Nitruración, iones de Ca, P, Na Descarga gaseosa.

Vale la pena mencionar que para este trabajo de tesis se evaluaron superficies de acero inoxidable de grado médico (SS 316L) modificadas con películas delgadas de óxido de titanio amorfo. La modificación superficial se realizó por evaporación catódica depositando películas delgadas, empleando la técnica de magnetrón sputtering. Siendo

la finalidad de esta modificación superficial disminuir la colonización bacteriana y la formación de biopelículas.

Infecciones asociadas a dispositivos biomédicos

El número de pacientes en edad avanzada y/o con traumatismos que requieren el reemplazo de articulaciones o el uso de algún dispositivos de fijación interna está aumentando constantemente. A pesar de los progresos en la prevención y tratamiento de infecciones asociadas a implantes, el número de pacientes con estas infecciones está aumentando debido a que existe un riesgo de por vida para la colonización bacteriana en el implante [42].

Es importante tener en cuenta que cuando se coloca algún tipo de implante ortopédico o dental en el cuerpo humano, existe una tasa de éxito que varía del 90% al 95%, lo que quiere decir que tan solo del 5% al 10% de los casos fracasan o tienen algún tipo de complicación que culmina en el retiro del implante [43]. En pacientes con reemplazo de cadera, la tasa de infección durante los primeros 2 años es aproximadamente de menos del 1%, y en aquellos con reemplazo de rodilla es menor del 2% [5]. En general podemos decir que aproximadamente el 5% de los dispositivos de fijación interna se infectan [44].

Las infecciones asociadas a implantes se pueden producir antes de la operación, durante la cirugía o inmediatamente después debido a la contaminación bacteriana de la zona quirúrgica, así como también puede tener su origen por vía hematológica gracias a la propagación microbiana a través de la sangre desde un foco de infección distante o de forma contigua por dispersión directa desde un lugar adyacente o traumatismo penetrante [45].

Este tipo de infecciones se pueden clasificar en dos grupos; las infecciones tempranas y las infecciones tardías. Las infecciones tempranas se definen como manifestaciones de la infección en el sitio del implante durante los primeros 3 meses posteriores a la cirugía. Este tipo de infecciones se produce antes de la cirugía y es causada generalmente por microorganismos virulentos (por ejemplo *Staphylococcus aureus* y bacilos Gram negativos). Los principales signos clínicos son dolor local persistente, eritema, edema, alteración de la cicatrización de heridas, hematoma y fiebre [46]. Las infecciones tardías a su vez se dividen en tempranas tardías y las tardías retardadas, donde las Infecciones tempranas tardías se define como la manifestación de la infección por los primeros 3 a 24 meses después de la cirugía. En la mayoría de estos casos, los responsables de este tipo de infecciones son microorganismos de baja virulencia como los estafilococos coagulasa-negativos. Las características de este tipo de infección son dolor articular persistente o creciente y aflojamiento del implante. Finalmente las infecciones tardías retardadas se definen como las manifestaciones de la infección posterior a los 2 años después de la cirugía [47].

Las infecciones asociadas a los implantes están relacionadas con la capacidad altamente adaptativa de las bacterias para colonizar las superficies de los biomateriales "inertes", además de esto las interacciones entre las bacterias y la superficie del biomaterial dependen de la estructura atómica cerca de la superficie y la composición de los biomateriales implantados [8]. Aunado a lo anterior, existe una competencia por colonizar la superficie entre las células del tejido tisular y las células bacterianas. Esta competencia es conocida como "la carrera por la superficie", donde si la carrera es

ganada por las células del huésped, la superficie estará ocupada y por lo tanto será menos susceptible a la colonización bacteriana [10].

La patogénesis de la infección en biomateriales ocurre por la colonización bacteriana mediante mecanismos de adhesión, esta colonización se lleva a cabo preferentemente en superficies que no están integradas a los tejidos. Las interacciones de factores físicos y biológicos favorecen la adhesión bacteriana, así las adhesinas protéicas (fimbrias en bacterias Gram-negativas), exopolisacáridos, sustancias de superficie y el medio interactúan para formar la biopelícula [43]. La biopelícula protege a los microorganismos de la acción de antibióticos y de la respuesta inmune, por lo que estas infecciones son difíciles de tratar y por lo general culminan con la pérdida del implante [10]. Por tanto, cualquier superficie de implante modificada que promueva el rápido establecimiento de las células del huésped disminuyendo la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas, puede ayudar a prevenir el fracaso en la implantación.

Los microorganismos más frecuentemente aislados de superficies de biomateriales ortopédicos infectados son *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*. Otros microorganismos con menor frecuencia incluyen a *Escherichia coli*, *Peptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, y *Streptococcus* del grupo beta hemolítico [43]. Con respecto a los implantes dentales los microorganismos aislados más frecuentemente son bacilos Gram negativos anaeróbicos, en particular, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, aunque también se han encontrado microorganismos poco comunes como *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos, coliformes y *Candida spp.* [49, 50].

i. Papel de *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis, es una bacteria Gram positiva, en forma de coco, facultativa y coagulasa negativo de aproximadamente un micrómetro de diámetro. Anteriormente era considerado como un microorganismo no patógeno, saprófito de la piel humana, pero actualmente se ha convertido en una causa frecuente de infecciones adquiridas en los hospitales, principalmente en infecciones de dispositivos médicos permanentes, en especial cuando la superficie del biomaterial es un polímero o cuando un polímero es un componente de un dispositivo complejo, como en lentes de contacto de uso extendido y las prótesis vasculares [51].

El carácter patogénico de *S. epidermidis* asociado con implantes, se debe a su capacidad de adherirse y proliferar sobre superficies inertes formando biopelículas [52] (Figura 2). La formación de la biopelícula se considera como un factor de virulencia importante, ya que las bacterias dentro de esta son resistentes a los antibióticos y la respuesta inmune del hospedero [53]. En la década de 1980 se observó que *S. epidermidis* podía recubrir biomateriales con una sustancia gelatinosa denominada limo [54]. Posteriormente, Baldassari et al. demostraron que el limo del estafilococo está compuesto de N-acetilglucosamina y actualmente sabemos que el limo está constituido por dos fracciones de polisacáridos que se denominan polisacáridos de adhesión intercelular (PAI). La síntesis de este polisacárido está catalizada por enzimas codificados en el operón *ica* y se ha demostrado que el PAI puede desempeñar un papel importante en la adherencia de la bacteria al material inerte [55, 56].

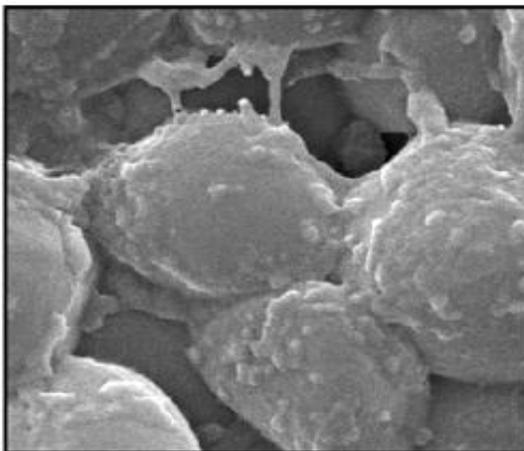


Figura 2. Biopelícula formada por *S. epidermidis* (Tomada de: Kristian, S.A., et al., [57])

La patogénesis de las infecciones por *S. epidermidis* relacionadas con biomateriales se efectúa en dos pasos. El primer paso ocurre cuando un pequeño número de bacterias que colonizan la piel, contamina el dispositivo o material durante su implantación (ejemplo de esto es la inserción de un catéter). La bacteria se adhiere al biomaterial a través de una combinación de interacciones no específicas (fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas). El segundo paso es la interacción específica a través de adhesinas. En los estafilococos, la interacción específica tiene lugar principalmente mediante proteínas expresadas en su superficie del microorganismo y la fibronectina que se deposita en el material [58, 59].

Mediante análisis genéticos se ha observado que la existencia de una deleción que afecte al gen *atlE* ocasiona que *S. epidermidis* sea incapaz de producir biopelículas. El gen *atlE* codifica a la proteína AtlE, la cual se une a la vitronectina, una proteína adhesiva presente en el plasma y relacionada con la hemostasia [60].

Se ha observado que los mutantes deficientes en AtlE son menos virulentos que las cepas silvestres en un modelo de infección asociada a catéteres en ratas [61].

Además de esto, en *S. epidermidis* se ha sugerido que el ácido teicoico interviene en la unión entre la bacteria y el fibrinógeno [62].

Por otra parte, existen una serie de adhesinas pertenecientes a la familia de las proteínas denominadas “*componentes de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz celular*” (MSCRAMM por sus siglas en inglés). Las MSCRAMM están por lo general unidas covalentemente al peptidoglicano de la pared celular y son en gran parte las que intervienen en la adhesión de *S. aureus* y *S. epidermidis*, aunque debemos resaltar que *S. epidermidis* produce menos proteínas MSCRAMM que *S. aureus* [63].

Se han descrito dos genes que codifican proteínas MSCRAMM en *S. epidermidis*: el gen *fbe*, que codifica una proteína de unión a fibrinógeno, y el gen *embp*, que codifica una proteína de unión a fibronectina [64]. La proteína Fbe (también denominada SdrG) tiene un importante papel en la infección asociada a catéteres, ya que se ha observado que mutantes de *S. epidermidis* deficientes en Fbe tiene menor probabilidad de ocasionar infecciones en catéteres que las cepas productoras de Fbe [65].

Otras proteínas que probablemente se encuentran asociadas con la adhesión de *S. epidermidis* son las proteínas SSP-1 y SSP-2, las cuales están implicadas en la adherencia de *S. epidermidis* al poliestireno formando una estructura similar a una fimbria [66].

Las principales adhesinas que favorecen la infección en biomateriales por parte de *S. epidermidis* se presentan en la Tabla 2.

ii. Papel de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, en forma de cocos, facultativa, coagulasa positivo de aproximadamente un micrómetro de diámetro. Este microorganismo es el principal patógeno implicado en infecciones de biomateriales metálicos [10] y principalmente se ha observado que presenta una gran afinidad a las superficies de titanio [67]. Al igual que *S. epidermidis*, la adhesión de *S. aureus* está dada en parte por adhesinas pertenecientes a la familia de las proteínas MSCRAMM [63] (Figura 3). Entre las proteínas MSCRAMM relacionadas con *S. aureus* se encuentran; la proteína A (FnBPA), que es una proteína de unión a la fibronectina, la proteína de unión al colágeno (Cna la proteína de factor aglutinante A y B (ClfA y ClfB), que también se une a la fibronectina. Estas proteínas poseen una región (LPXTG) que es digerida por un enzima (sortasa) que corta el péptido entre los aminoácidos treonina (T) y glicina (G), a continuación el grupo carboxilo de la treonina se une covalentemente al grupo carboxilo del radical peptídico del peptidoglicano, que en el caso de *S. aureus* es la secuencia de pentaglicinas, lo que da como resultado que las proteínas MSCRAMM se encuentren ancladas al peptidoglicano de la pared bacteriana.

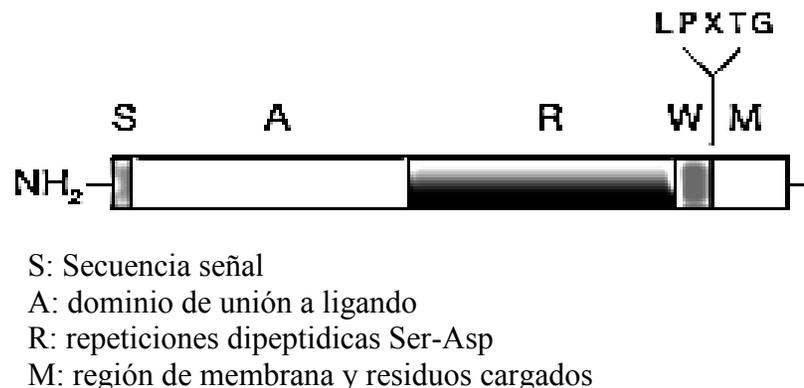


Figura 3. Estructura de las proteínas MSCRAMM (Tomada de: Toledo-Arana, A., et al., 2005 [63]).

Existen otras adhesinas relacionadas con *S. aureus* como la proteína que se une a la elastina (EbpS), la cual es una proteína que está integrada en la membrana citoplasmática de *S. aureus* y que está implicada en la adherencia a biomateriales recubiertos de elastina. Adicionalmente, proteínas que son excretadas al medio como la proteína de adherencia extracelular (EAP), pueden actuar como puente entre un ligando de la superficie y la bacteria, además se ha comprobado que la proteína Eap favorece la autoagregación de *S. aureus* facilitando la formación de la biopelícula [63, 68].

Por otra parte, los ácidos teicóicos también puede contribuir a la formación de la biopelícula, ya que aislados de *S. aureus* con mutaciones en el operón *dlfA* (responsable de la síntesis de enzimas que añaden alanina al ácido teicoico), son incapaces de unirse a superficies de poliestireno o vidrio, limitando la capacidad de producir una biopelícula [68].

Tabla 2. Principales adhesinas presentes en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*

Microorganismo	Adhesina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ácidos teicoicos MSCRAMM <ul style="list-style-type: none"> • FnBPA • Cna • ClfA y ClfB Ebps Proteínas de adhesión extracelular Bap
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AtIE Ácido teicoico MSCRAMM <ul style="list-style-type: none"> • Fbe (SdrG) • Embp SSP-1 y SSP-2

iii. Microorganismos de la cavidad oral relacionados con la Periimplantitis

Las biopelículas formadas sobre las superficies de los dientes son conocidas como placa dental. Las bacterias que proliferan en la placa dental forman los principales factores etiológicos para la mayoría de las dolencias dentales, por ejemplo, la caries, la gingivitis, periodontitis y en el caso de implantes dentales, la periimplantitis [69]. El término periimplantitis introducido en la década de 1980, describe un proceso inflamatorio destructivo que afecta a los tejidos blandos y duros alrededor de los implantes osteointegrados, que conduce a la formación de una bolsa peri-implante y la pérdida del hueso de soporte [50].

El ataque microbiano ha sido citado como la causa principal del fracaso en la colocación de implantes dentales [70]. Esto se debe en gran parte a que la formación de biopelículas es la responsable de alrededor del 65% de las enfermedades, incluyendo la periimplantitis y periodontitis [71].

La formación de biopelículas alrededor de los dientes naturales se produce en minutos y la colonización de especies específicas comienza en un intervalo de 2 a 6 horas. La razón de esto es atribuida al hecho de que las superficies de los dientes limpios son propensos a tener restos de microbiota que pueden multiplicarse inmediatamente y proporcionar una superficie favorable para la fijación de los colonizadores finales [72].

Por otra parte, las superficies vírgenes de los implantes carecen de la microbiota inicial y por ende exigen a los primeros colonizadores la preparación del escenario para las comunidades complejas de desarrollo [73]. La película adquirida

comienza a formarse en la superficie del implante en aproximadamente 30 minutos después de que el implante está expuesto en la cavidad oral [74].

La secuencia de colonización y formación de la placa dentobacteriana es un proceso orquestado y altamente ordenado [75]. Pocos minutos después de realizar una limpieza dental profesional, los primeros colonizadores, cocos y bacilos Gram-positivos principalmente de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*, se adhieren a la superficie dental por medio de moléculas específicas de adhesión bacteriana, las cuales interactúan con moléculas adheridas a la superficie dental derivadas de componentes salivales y del fluido crevicular [76-78]. Estos primeros colonizadores juegan un papel muy importante en la formación de la placa dentobacteriana, ya que tienen receptores específicos para las diferentes especies bacterianas que posteriormente se coagregarán a la estructura inicialmente formada [79, 80].

Los segundos colonizadores, también llamados colonizadores puente o secundarios, poseen mecanismos de adhesión tanto con los primeros colonizadores como con las especies que se coagregarán de forma tardía a la placa bacteriana. Este grupo de microorganismos está formado principalmente por especies pertenecientes a los géneros *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Fusobacterium* y *Prevotella* entre otros [78]. Finalmente, si la secuencia de colonización de la placa bacteriana no se ve interrumpida, un tercer grupo de microorganismos principalmente especies anaeróbicas Gram-negativas como especies de los géneros *Treponema* y *Porphyromonas* [81], se unen a la biopelícula dental.

Con el fin de ampliar y mejorar nuestro entendimiento sobre la composición y la asociación que existe entre las bacterias que conforman la placa dentobacteriana, se realizó un estudio en donde fueron analizadas muestras de placa dentobacteriana

subgingival provenientes de pacientes periodontalmente sanos y con enfermedad periodontal [82]. Las muestras fueron analizadas utilizando la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA [83], la cual permite la identificación simultánea de múltiples especies bacterianas en un gran número de muestras que contengan mezclas complejas de microorganismos [84]. A continuación se mencionan los cinco complejos bacterianos descritos en dicho estudio, las bacterias que conforman cada complejo se encuentran fuertemente asociadas entre sí. A estos complejos con fines prácticos les fueron asignados colores:

- **Complejo amarillo:** especies del género *Streptococcus* como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus intermedius*.
- **Complejo verde:** *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo a.
- **Complejo morado:** *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*.
- **Complejo naranja:** *Fusobacterium* sp. y subespecies, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum* y *Streptococcus constellatus*.
- **Complejo Rojo:** *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*.
- **Especies no agrupadas:** *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *Selenomonas noxia* y *Actinomyces viscosus*.

Por otra parte, la microbiota en los tejidos peri-implantares saludables es predominantemente cocos y bacilos Gram positivos facultativos [50]. La transición de la salud a la enfermedad (periimplantitis) provoca un desplazamiento de la microbiota de microorganismos Gram positivos a microorganismos Gram negativos. En esta microbiota predominan especies como *P.gingivalis*, *T. forsythia*, y *T. denticiola*, así como *F. nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Candida albicans* [85].

Se ha reportado que metales puros como el hierro, el titanio, el níquel y el oro, pueden exhibir propiedades bacteriostáticas en contra de especies como *S. sanguis*, *S. mitis*, *A. naeslundii* y *Fusobacterium* sp. [86].

Otro estudio *in vivo* realizado con discos de titanio con el fin de evaluar el efecto de la rugosidad de la superficie y colonización microbiana concluyó que una superficie de titanio con una rugosidad media $Ra < 0.08 \mu\text{m}$ puede inhibir la colonización y la maduración de la placa [87], por el contrario rugosidad superficial $Ra > 0.2 \mu\text{m}$ conduce a un aumento de la frecuencia de la formación de biopelículas y por lo tanto actúa como la etiología principal de la ruptura peri-implante [88].

Adhesión y formación de biopelículas en superficies de dispositivos biomédicos

La biopelícula se define como una comunidad de microorganismos compuesta por células y microcolonias individuales, embebidas en una matriz de exopolisacáridos (predominantemente aniónicos) altamente hidratados [7] y adheridos a una gran variedad de superficies naturales o artificiales que conforman una estructura tridimensional con una organización compleja. Una vez que la biopelícula está formada, las células bacterianas se vuelven altamente resistentes a la acción de antibióticos

debido a que el micro-ambiente de la biopelícula las protege tanto de las defensas del huésped como de la acción de los antibióticos, provocando que el tratamiento antimicrobiano sea difícil. [8].

Podemos distinguir cuatro pasos en la formación de las biopelículas:

a) Fijación inicial. Es una adhesión reversible no específica (fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas.) que depende de las características físicas generales de la bacteria, la interfaz de fluido, y el sustrato.

b) Adhesión irreversible específica. Se produce inmediatamente después de la unión inicial, y esta mediada por procesos químicos biosintéticos dependientes de las interacciones entre las adhesinas específicas y sus receptores, así como de la síntesis de polímeros de hidratos de carbono (producción de la matriz extracelular).

c) Agregación. Exopolisacáridos bacterianos se unen a la superficie y ayudan en la agregación de célula a célula, consolidando aún más la adhesión y la formación de microcolonias. Si las condiciones ambientales, tales como temperatura, nutrientes, antagonistas y el equilibrio de cationes son favorables, la propagación bacteriana se produce.

d) Desagregación o desprendimiento. Posterior a la agregación y la maduración de las colonias, las células en la periferia de la biomasa en expansión pueden desprenderse o disgregarse y dispersarse [10].

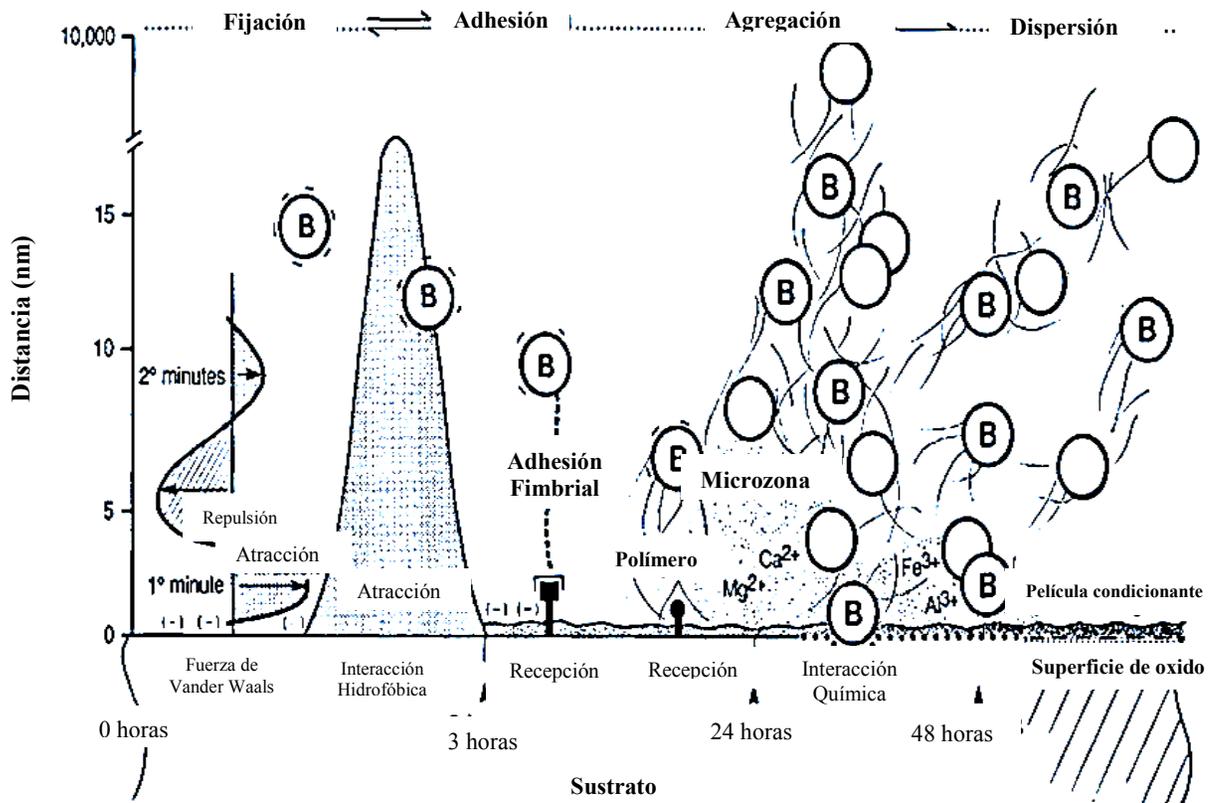


Figura 4. Secuencia molecular en bacteriana (B) de fijación, adhesión, agregación, y la dispersión en la superficie de sustrato. (Tomado y modificado de Gristina, A.G., 1987[10]).

Las bacterias pueden llegar al azar cerca de la superficie de un biomaterial, por contaminación directa, diseminación contigua (a partir de las células epiteliales adyacentes), o por siembra hematógica (por ejemplo, válvulas cardíacas, prótesis articulares) [10].

La carga neta de la superficie bacteriana es negativa, así como lo es la mayoría de las superficies de los biomateriales. Sin embargo, los puntos isoeléctricos de los materiales en la interfase líquido-superficie pueden variar con el pH, la inflamación y el daño tisular causado por la cirugía, trauma, e infección [10]. Las cargas comunes de la

superficie bacteriana y la superficie del biomaterial tienden a repelerse entre sí, pero las fuerzas de Van der Waals en el mínimo secundario (aproximadamente 10 nm) posicionan a la bacteria de manera efectiva cerca de la superficie. Los rangos más estrechos de repulsión se producen hasta que se llega al mínimo primario (menos de 2 a 3 nm) donde se produce la atracción [10] (Figura 4).

Los estudios indican que las fuerzas hidrófobas se ejercen a distancias tan grandes como 15 nm, y de 8 a 10 nm son de 10 a 100 veces tan grandes como las fuerzas de Van der Waals [89]. Cabe destacar que existe un cierto grado de hidrofobicidad entre muchas bacterias y la mayoría de las superficies. Dichas interacciones atractivas hidrofóbicas tienden a superar la repulsión de las bacterias y posicionarlas en el mínimo primario. Cuando una célula bacteriana se encuentra dentro de 1 nm o menos, las interacciones de corto alcance químicos (iónico, hidrógeno y unión covalente) se producen con restos extracelulares [10]. Posteriormente o conjuntamente con la unión inicial, las adhesinas fimbriales y los receptores específicos de sustrato pueden interactuar si están presentes en el sistema biológico particular para ayudar en la formación de la biopelícula.

Las superficies de biomateriales metálicos especialmente las de acero inoxidable, aleaciones de cromo-cobalto y aleaciones de titanio, son resistentes a la corrosión gracias a su composición elemental, homogeneidad cristalina, y óxidos superficiales que se forman espontáneamente o son creados por un proceso de pasivación con ácido nítrico durante su fabricación. Estos óxidos de superficie son los que forman la interfaz reactiva con glicoproteínas de las células bacterianas.

Aleaciones de Titanio y cromo-cobalto parecen permitir uniones más fuertes a células del tejido [90].

Observaciones basadas en el uso de biomateriales implantados en humanos, sugieren que la adhesión o los fenómenos de integración con las superficies de los biomateriales ya sean bacterianos o de células de los tejidos tisulares son críticos, y están relacionados entre sí por mecanismos moleculares similares. Se debe tener en cuenta que los biomateriales presentan enlaces de energía disponibles y receptores potenciales para la colonización bacteriana o tisular. Esto quiere decir que en el momento en que se implanta un biomaterial este representa una superficie lista para la colonización. En el caso de los metales o polímeros, si las células tisulares son las primeras colonizadoras y establecen una unión segura, esta superficie será básicamente resistente a la colonización bacteriana. Aunque debemos estar conscientes que *in vivo*, las bacterias pueden derrotar a las células del tejido huésped en la carrera por la superficie y por lo tanto causar la infección en lugar de la integración del tejido y una vez se ha producido la adhesión bacteriana, es poco probable que las células del tejido sean capaces de desplazar a estos colonizadores primarios para ocupar e integrar la superficie [10].

Por lo tanto, una superficie de biomaterial que favorezca la adhesión de las células del tejido y la rápida colonización integración celular o que inhiba la adhesión bacteriana puede ser la mejor estrategia para disminuir la colonización bacteriana.

B. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia médica y odontológica sobre superficies de acero inoxidable de grado médico 316L (SS 316L) modificadas con recubrimientos de películas delgadas de óxido de titanio amorfo.

Objetivos particulares

- Evaluar la adhesión bacteriana sobre las superficies de SS 316L modificadas con películas delgadas de óxido de titanio amorfo y compararla con la adhesión bacteriana sobre superficies de titanio comercialmente puro (SLA) y superficies de acero inoxidable de grado medico (SS 316L).
- Evaluar la formación de biopelículas sobre las superficies de SS 316L modificadas con películas delgadas de óxido de titanio amorfo y compararla con la adhesión bacteriana sobre superficies de titanio comercialmente puro (SLA) y superficies de acero inoxidable de grado medico (SS 316L).

C. Planteamiento y justificación del problema

Los implantes ortopédicos y dentales se han vuelto cada vez más comunes en el tratamiento de fracturas óseas y en la pérdida de piezas dentales. Sin embargo, el aumento en su utilización ha provocado que el número de fracasos aumente del mismo modo, siendo la infección bacteriana el principal factor que conlleva al fracaso en la colocación de implantes.

Recordemos que las infecciones bacterianas relacionadas con biomateriales son provocadas principalmente por la formación de biopelículas, lo cual resulta ser un gran problema de salud pública ya que el tratamiento de estas es difícil y normalmente requiere la extracción del biomaterial.

Una opción viable para enfrentar este problema es modificar superficialmente un biomaterial con el fin de que sea capaz de disminuir la formación de biopelículas y con esto disminuir el fracaso en la colocación de implantes a causa de infecciones bacterianas. Por lo tanto este proyecto de tesis pretende evaluar la adhesión bacteriana y formación de biopelículas en superficies que han sido modificadas superficialmente mediante un recubrimiento de óxido de titanio amorfo colocadas sobre sustratos de acero inoxidable de grado medico 316L con el fin de observar si existe una disminución en la colonización bacteriana.

D. Hipótesis

Las superficies de acero inoxidable de grado medico 316L modificadas superficialmente con recubrimientos de películas delgadas de óxido de titanio amorfo presentaran una menor adhesión bacteriana y formación de biopelículas en comparación con superficies de titanio comercialmente puro y superficies de acero inoxidable de grado medico 316L sin recubrir.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Preparación de las superficies experimentales

Todas las muestras experimentales y depósitos de películas delgadas fueron preparadas en el laboratorio de Materia Condensada y Criogenia del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM. Las características de las superficies experimentales se describen en la **Tabla 3**. El depósito de las películas delgadas óxido de Titanio (TiO_2) se realizó sobre los sustratos de acero inoxidable de grado médico 316L (SS 316L) previamente tratadas para obtener una rugosidad media (R_a) entre 2-4 μm . Para lograr este diseño topográfico, se realizó un arenado con dióxido de silicio, con un tamaño de partícula de $\sim 300 \mu\text{m}$ y un grabado con ácido sulfúrico durante 90 segundos.

Las películas delgadas de óxido de Titanio (TiO_2) fueron depositadas sobre los sustratos de SS 316L mediante el sistema de evaporación catódica (magnetron sputtering) de forma reactiva, utilizando un blanco de titanio de alta pureza (99.99%) y trabajando en atmósfera de argón y oxígeno (Ar/O 8:2) empleando una potencia de 200W y con un total de 1800 segundos de tiempo de depósito a temperatura ambiente.

Antes de ser utilizadas en los ensayos biológicos, todas las superficies fueron esterilizadas por autoclave (120°C a 20 lb/in^2 (psi) de presión durante 20 minutos).

Tabla 3. Superficies experimentales.

Superficie experimental	Sustrato	Abreviación	R_a (μm)	Espesor (nm)
Películas delgadas de óxido de titanio amorfo.	Acero inoxidable de grado médico 316 L.	a- TiO_2	2.9	75
Titanio.	Titanio comercialmente puro (casa comercial Straumann®)	SLA	3.4	--
Acero inoxidable de grado médico.	Acero inoxidable de grado médico 316 L.	SS	3.14	--

B. Evaluaciones microbiológicas

Todas las evaluaciones microbiológicas fueron realizadas en el laboratorio de Biología Periodontal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. Nueve cepas de bacterias bucales de referencia y dos especies aeróbicas implicadas en infecciones de biomateriales fueron utilizadas para los ensayos de adhesión bacteriana y formación *in vitro* de las biopelículas (Tabla 4).

Tabla 4. Especies bacterianas empleadas en las evaluaciones microbiológicas.

Espece	ATCC*	Relacionado con infecciones en:
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	Dispositivos orales (bacterias anaerobias)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotipo b</i>	43718	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	
<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	25586	
<i>Parvimonas micra</i>	33270	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	
<i>Prevotella intermedia</i>	25611	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	25175	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Dispositivos ortopédicos (bacterias aerobias)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14990	

* American Type Culture Collection, Rockville, MD

Crecimiento y purificación de las cepas bacterianas

Las especies **aerobias** fueron descongeladas y sembradas por técnica de sembrado masivo en placas de agar enriquecido TSA (Agar Soya Trypticasa, (Bioxon, Becton Dickinson®), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona (vitamina K, Sigma-Aldrich®) y 5 µg/mL de hemina) y fueron incubadas en una incubadora Felisa® a 35° C ± 2° C, durante 24 horas para su posterior resembrado mediante la técnica de siembra en triple (cuadrante radial), con un periodo de incubación de 24 horas en las

condiciones antes mencionadas. Una vez que se obtuvieron colonias aisladas, se evaluó su pureza por medio de tinción de Gram y una vez confirmada su pureza, se utilizaron en los diferentes ensayos microbiológicos.

Las especies bacterianas **anaerobias** fueron descongeladas y sembradas por técnica de sembrado masivo en placas de agar enriquecido HK (Agar Soya Trypticase (Bioxon, Becton Dickinson®), agar cerebro-corazón (BBL™) y extracto de levadura (Becton Dickinson®), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona, 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich®) y 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab)) y fueron incubadas a 35° C ± 2° C en una cámara de anaerobiosis en condiciones atmosféricas de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂, durante 5 días, para su posterior resembrado mediante la técnica de siembra en triple (cuadrante radial), con un periodo de incubación de 7 días en las condiciones antes mencionadas. Una vez que se obtuvieron colonias aisladas, se evaluó su pureza por medio de tinción de Gram y finalmente se utilizaron en los diferentes ensayos.

Ensayos de adhesión bacteriana

Bacterias aerobias

Una vez que las superficies fueron esterilizadas se colocaron individualmente en placas de 24 pozos, donde se les adicionó 100 µL de suspensión bacteriana de cada especie, ajustada a una densidad óptica igual a uno (DO=1) medida a una longitud de onda de 600nm (BioPhotometer Eppendorf®), más 900 µL de medio TSB enriquecido (Trypticase Soy Broth, BBL, Becton Dickinson®), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina), para obtener un volumen total de 1000 µL.

Posteriormente, las placas con las superficies experimentales y la suspensión bacteriana fueron incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.

Bacterias anaerobias.

Para las bacterias anaerobias se preparó una mezcla de las nueve bacterias empleadas (Tabla 4). Esta mezcla se preparó adicionando 100 μL de suspensión bacteriana de cada especie ajustada a una $\text{DO}=1$ para las bacterias con un diámetro mayor de 2 μm y a una $\text{DO}= 0.8$ para las baterías con un diámetro menor a 2 μm medidas a una longitud de onda de 600nm; esto con el objetivo de agregar una cantidad proporcional de cada bacteria a la suspensión. Una vez que las superficies fueron esterilizadas se colocaron individualmente en placas de 24 pozos, donde se les adicionó 100 μL de la suspensión bacteriana compuesta por la mezcla de bacterias antes preparada, más 900 μL de caldo *Mycoplasma* enriquecido (*Mycoplasma* broth base (Becton Dickinson®) suplementado con 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de menadiona , 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemina) para obtener un volumen total de 1000 μL . Posteriormente las placas con las superficies experimentales y la suspensión bacteriana fueron incubadas en una cámara de anaerobiosis a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.

Tanto para las bacterias aerobias como para las anaerobias, tras 24 horas de incubación, la viabilidad de las células bacterianas adheridas a cada una de las superficies fue analizada *in situ* utilizando los kits *In Vitro Toxicology Assay, XTT based*® y *LIVE/DEAD*® *BacLight*TM (Tabla 5).

Tabla 5. Reactivos empleados para las evaluaciones de adhesión bacteriana y formación de biopelículas.

Reactivos	Descripción	Marca
In Vitro Toxicology Assay, XTT based® Kit	Permite observar la viabilidad de las células bacterianas (a mayor densidad óptica mayor es el número de bacterias metabólicamente activas).	Sigma-Aldrich®
LIVE/DEAD® BacLight™ Kit	Detectar y cuantificar las bacterias adheridas a cada sustrato. Además puede discriminar entre bacterias vivas y muertas.	Invitrogen®

i. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayos de XTT

Después de la incubación, se hicieron 3 lavados a las superficies experimentales utilizando caldo TSB enriquecido para las bacterias aerobias y caldo *Mycoplasma* enriquecido para las anaerobias. Posteriormente, las superficies se cambiaron a pozos de cultivo nuevos y se incubaron (en condiciones aerobias o anaerobiosis dependiendo de las bacterias que se emplearan) con 1 mL de caldo TSB enriquecido para las bacterias aerobias y caldo *Mycoplasma* enriquecido para las anaerobias con 50 µL de la solución de XTT al 5% durante 2 horas con agitación constante. Pasado el tiempo de incubación, se tomaron 100 µL del sobrenadante de cada uno de los pozos y se transfirieron a una placa de 96 pozos, la cual fue leída a una longitud de onda de 450 nm utilizando un multilector FilterMax F5. Todos los ensayos de viabilidad bacteriana se llevaron a cabo por triplicado.

El reactivo XTT está compuesto por una sal de tetrazolio (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) que permite cuantificar las bacterias metabólicamente activa, gracias a que es capaz de medir la actividad respiratoria asociada a la cadena transportadora de electrones. La sal de tetrazolio es reducida

por la mayoría de los sistemas de deshidrogenasas a formazan el cual en el caso del XTT cambia a un color rojizo que absorbe luz a una longitud de onda de 450 nm.

Curva de calibración.

Con el fin de relacionar los valores de absorbancia con el número de bacterias/mL presentes en la muestra se realizaron curvas de calibración. Para la curva de calibración, experimentos previos mostraron que a una DO=1 medida a 600 nm, se encuentran aproximadamente 1.09×10^{12} bacterias/mL tanto de *S. aureus* como de *S. epidermidis* y 1.0×10^8 bacterias/mL en el pool de bacterias anaerobias. Por tanto la curva de calibración se realizó obteniendo en primer lugar una suspensión bacteriana ajustada a una DO=1, posteriormente se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10, en tercer lugar se adicionaron 50 μ L de la solución de XTT al 5%, se incubaron durante 2 horas con agitación constante, y finalmente pasado el tiempo de incubación se determinó el valor de absorbancia para cada punto de dilución a una longitud de onda de 450 nm, lo cual nos dio como resultado una curva que relaciona el número de bacterias/mL con valores de absorbancia medidos a 450 nm empleando el kit XTT.

ii. Microscopía Confocal

La adhesión de las bacterias sobre las superficies fue analizada por microscopía confocal utilizando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen). Este consiste en una solución de Ioduro de propidio (el cual penetra sólo en células no viables o con superficies dañadas y emite una fluorescencia roja) y una solución de SYTO9 (un compuesto lipofílico que se une al DNA y que puede atravesar superficies intactas o

dañadas. El SYTO9 emite fluorescencia color verde y en presencia de yoduro de propidio su fluorescencia es reducida).

Después de la incubación con la suspensión de bacterias, las superficies fueron lavadas tres veces (utilizando caldo TSB enriquecido para las bacterias aerobias y caldo *Mycoplasma* enriquecido para las anaerobias) y posteriormente fueron colocadas en un portaobjetos, donde se les adicionaron 4 µL de la solución stock del LIVE/DEAD® BacLight™ en una relación 1:1. Posteriormente las superficies fueron incubadas durante 30 minutos en una cámara oscura con humedad al 90 %. Finalizado el tiempo de incubación se procedió a lavar las superficies con agua desionizada hasta retirar el exceso de reactivo. Las superficies fueron observadas en un microscopio confocal laser (Nikon®) con una longitud de onda de excitación de 490 nm y una lectura de emisión de 522 nm para SYTO9 y 635 nm para yoduro de propidio. El análisis se realizó determinando la proporción (porcentaje %) de bacterias viables y no viables *in situ*.

Ensayos de formación de biopelículas

Los ensayos de formación de biopelículas en las diferentes superficies tanto de bacterias aerobias como anaerobias, se llevaron a cabo de manera similar que para los ensayos de adhesión. Los tiempos de incubación para las bacterias aerobias fueron de 1 y 3 días, mientras que para las bacterias anaerobias fueron de 1, 3 y 7 días.

i. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayos de XTT

La determinación de la viabilidad en las biopelículas utilizando el kit XTT, se realizó del mismo modo que en los ensayos de adhesión bacteriana. Pero esta vez

para los diferentes días de incubación (1 y 3 días para las bacterias aerobias y 1, 3 y 7 días para las bacterias anaerobias).

ii. Microscopía Confocal

La determinación de la viabilidad de las bacterias formadoras de las biopelículas en las tres diferentes superficies utilizando microscopia Confocal se realizó del mismo modo que en los ensayos de adhesión bacteriana. Pero esta vez las determinaciones se realizaron en los diferentes días de incubación (1 y 3 días para las bacterias aerobias y 1, 3 y 7 días para las bacterias anaerobias)

C. Análisis estadístico de datos

Los resultados de la adhesión de bacterias entre las diferentes superficies se presentan como la media (ME) \pm el error estándar de la media (EEM). Los análisis que determinaron las diferencias en la cantidad de 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.

III. RESULTADOS

A. Ensayos de adhesión bacteriana

i. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayos de XTT.

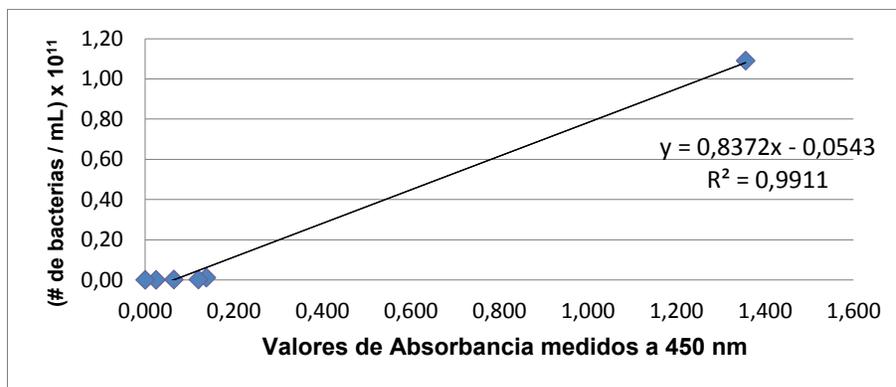
Staphylococcus aureus.

La Tabla 6 muestra el número de células de *S. aureus* por mL obtenido a partir de los valores de absorbancia empleando el kit XTT. Estos valores permitieron generar una curva de calibración que relaciona el número de bacterias/mL con los valores de absorbancia obtenidos de los ensayos de adhesión y formación de biopelículas (**Figura 5**).

Tabla 6. Valores para la determinación de la curva de calibración de *S. aureus* empleando el kit XTT (viabilidad bacteriana).

Valor de absorbancia (450 nm)	Numero de bacterias/mL
1.357	1.09×10^{11}
0.138	1.09×10^9
0.121	1.09×10^8
0.065	1.09×10^7
0.025	1.09×10^6
0.000	0.000

Figura 5. Curva de calibración para *S. aureus* (Viabilidad bacteriana con XTT).



Los valores de esta curva se analizaron estadísticamente por regresión lineal, dando como resultado la siguiente ecuación de la recta:

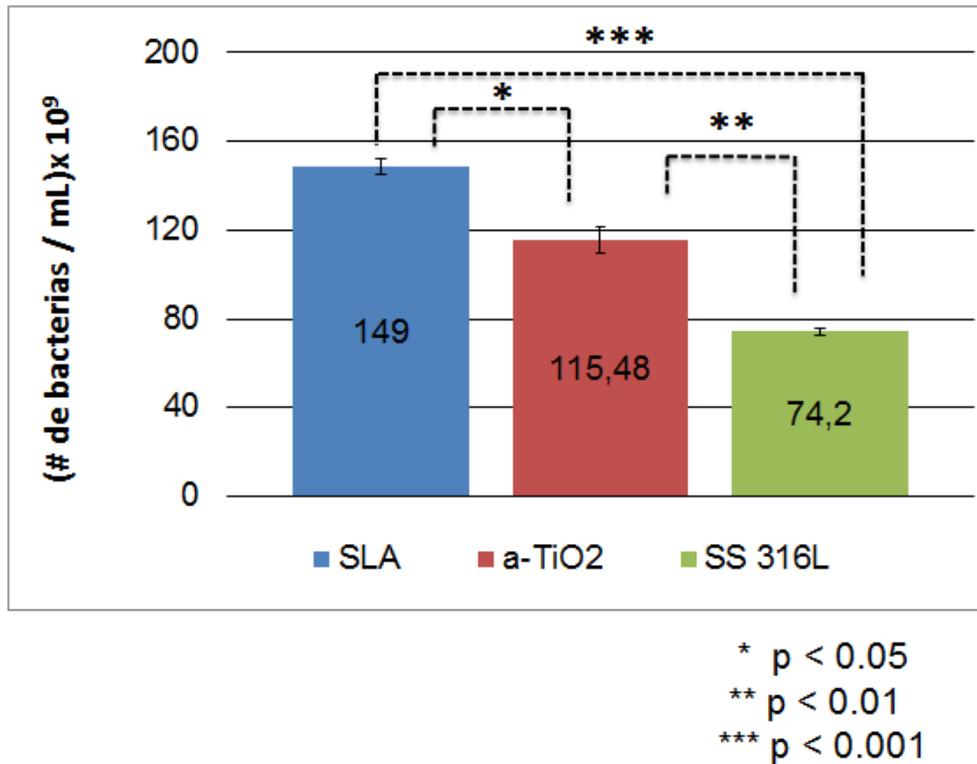
Ecuación 1

$$\# \text{ de Bacterias } S.aureus / mL = 8 \times 10^{10} (\text{valor de Absorbancia de XTT a } 450\text{nm}) - 5 \times 10^9$$

Como podemos observar en la ecuación 1, la variable a medir experimentalmente fue el valor de absorbancia a 450 nm empleando el kit XTT. Una vez medido este valor y sustituyendo en la ecuación se obtuvo el número de bacterias *S. aureus*/mL. Cabe mencionar que la curva de calibración muestra una buena linealidad ya que el valor de R² es de 0.9911.

En la figura 6 se muestran los valores promedio de la adhesión de *S. aureus* a las tres diferentes superficies experimentales. El mayor número de bacterias se encontró en la superficie SLA ($149.0 \pm 3.6 \times 10^9$ bacterias/mL), mientras que en las superficies modificadas con a-TiO₂ se encontraron $115.0 \pm 5.81 \times 10^9$ bacterias/mL. Las superficies de SS 316L fueron las que presentaron el menor número de bacterias adheridas con conteos de $74.2 \pm 1.61 \times 10^9$ bacterias/mL. Las diferencias significativas se encontraron entre SLA vs. a-TiO₂ (p < 0.05), SLA vs. SS 316L (p < 0.001) y a-TiO₂ vs. SS 316L (p < 0.001).

Figura 6. Adhesión de *S. aureus* a las diferentes superficies experimentales



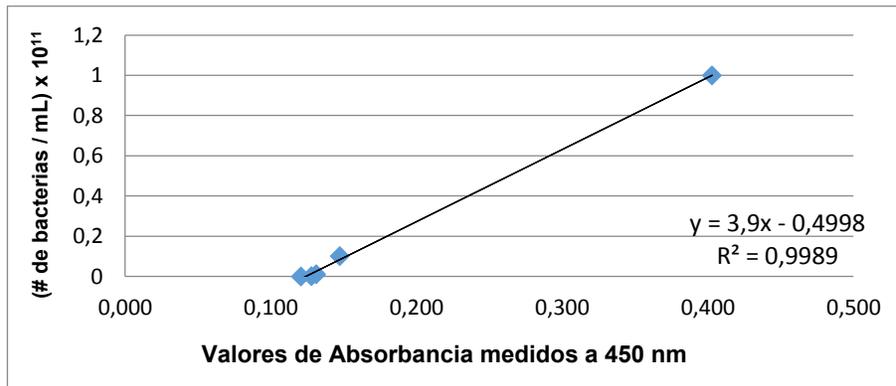
Staphylococcus epidermidis.

La Tabla 7 muestra el número de células de *S. epidermidis* por mL que permitieron generar una curva de calibración que relaciona el número de bacterias/mL con los valores de absorbancia obtenidos de los ensayos de adhesión y formación de biopelículas (Figura 7).

Tabla 7. Valores para la determinación de la curva de calibración de *S. epidermidis* (viabilidad bacteriana con XTT).

Valor de Absorbancia empleado el kit XTT (medidos a 450 nm) para la curva de calibración.	Numero de Bacterias <i>S. epidermidis</i> /mL presentes en la suspensión bacteriana.
0.403	1.09×10^{11}
0.147	1.09×10^{10}
0.131	1.09×10^9
0.128	1.09×10^8
0.121	0.000

Figura 7. Curvas de calibración para *S. epidermidis* (Viabilidad bacteriana con XTT).



Los valores de esta curva también fueron analizados estadísticamente por regresión lineal, dando como resultado la siguiente ecuación de la recta:

Ecuación 2

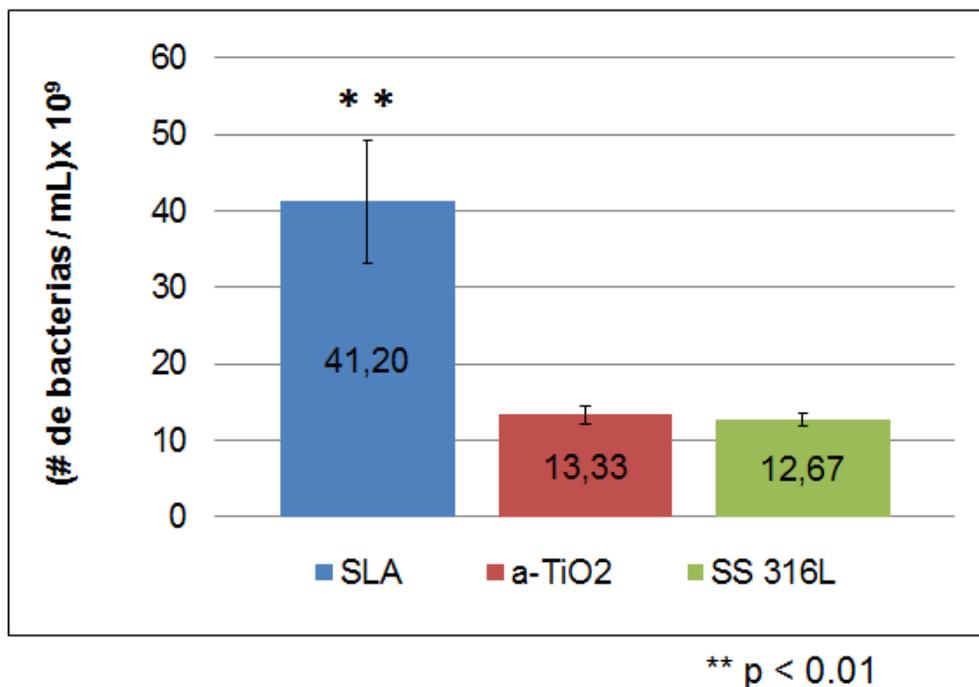
$$\# \text{ de Bacterias } S. epidermidis /_{mL} = 4 \times 10^{11} (\text{valor de Absorbancia de XTT a } 450 \text{ nm}) - 5 \times 10^{10}$$

Como anteriormente ocurrió para el caso de *S. aureus*, en la ecuación 2, la variable a medir experimentalmente fue el valor de Absorbancia a 450 nm empleando el kit XTT. Una vez medido este valor y sustituyendo en la ecuación se obtuvo el número de bacterias *S. epidermidis*/mL. En este caso la linealidad de la curva de

calibración fue mejor a la obtenida para *S. aureus*, ya que muestra un valor de R^2 igual a 0.9984

En la figura 8 se muestran los valores promedio de la adhesión de *S. epidermidis* a las tres diferentes superficies experimentales. En este caso, el acero inoxidable mostró una menor adhesión bacteriana ($12.7 \pm 1.19 \times 10^9$ bacterias/mL) en comparación con las superficies modificadas con $\alpha\text{-TiO}_2$ ($13.3 \pm 0.81 \times 10^9$ bacterias/mL). Sin embargo, las superficies SLA fueron las que mostraron mayor cantidad de bacterias adheridas a su superficie con un valor de $41.2 \pm 8.04 \times 10^9$ bacterias/mL con una diferencia estadísticamente significativa tanto para las superficies $\alpha\text{-TiO}_2$ como para las superficies SS 316L de $p < 0.01$.

Figura 8. Número de bacteria *S. epidermidis* / mL adheridas a las diferentes superficies experimentales (viabilidad bacteriana con XTT).



Bacterias anaerobias

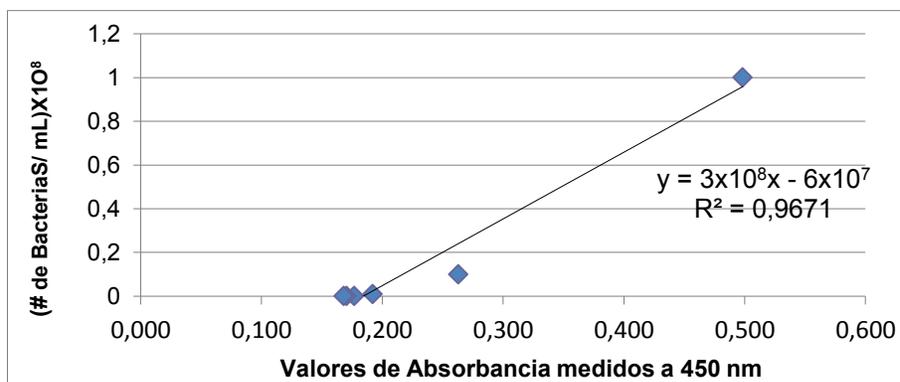
A continuación se presentan los resultados obtenidos cuando se utilizó la mezcla de nueve bacterias anaeróbicas representativas de la placa dentobacteriana subgingival (Tabla 4).

Tabla 8. Valores para la determinación de la curva de calibración para las determinaciones de las bacterias anaerobias (viabilidad bacteriana con XTT).

Valor de Absorbancia empleado el kit XTT (medidos a 450 nm) para la curva de calibración.	Numero de Bacterias <i>anaerobias</i> /mL presentes en la suspensión bacteriana.
0.498	$1,00 \times 10^8$
0.263	$1,00 \times 10^7$
0.192	$1,00 \times 10^6$
0.177	$1,00 \times 10^5$
0.170	$1,00 \times 10^4$
0.168	0,000

La Tabla 8 muestra el número de células de *anaerobias* por mL que permitieron generar una curva de calibración que relaciona el número de bacterias/mL con los valores de absorbancia obtenidos de los ensayos de adhesión y formación de biopelículas (Figura 9)

Figura 9. Curvas de calibración para las bacterias anaerobias (Viabilidad bacteriana con XTT).



Los valores de esta curva también fueron analizados estadísticamente por regresión lineal, dando como resultado la siguiente ecuación de la recta:

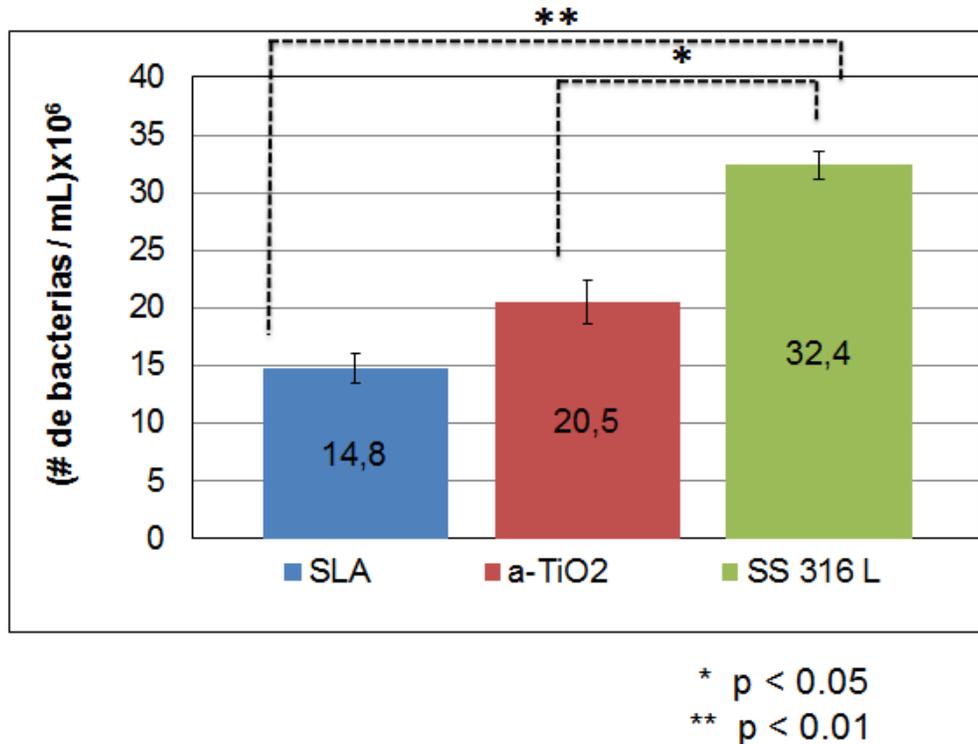
Ecuación 3

$$\# \text{ de Bacterias } S. \text{epidermidis} / \text{mL} = 3 \times 10^8 (\text{valor de Absorbancia de XTT a } 450 \text{nm}) - 6 \times 10^7$$

En la ecuación 3, al igual que para *S. aureus* y *S. epidermidis*, la variable a medir experimentalmente fue el valor de Absorbancia a 450 nm empleando el kit XTT. Una vez medido este valor y sustituyendo en la ecuación se obtuvo el número de bacterias anaerobias/mL. En este caso la linealidad de la curva de calibración muestra un valor de R^2 igual a 0.9671.

En la figura 10 se muestran los valores promedio de la adhesión de las bacterias anaerobias a las tres diferentes superficies experimentales. Las superficies que menor adhesión bacteriana mostraron fueron las de titanio comercialmente puro SLA con un valor de $14.8 \pm 1.3 \times 10^6$ bacterias/mL, seguidas de las superficies modificadas con α -TiO₂ con un valor de $20.5 \pm 1.90 \times 10^6$ bacterias/mL. Por el contrario las superficies con mayor adhesión bacteriana fueron las superficies SS 316L con $32.4 \pm 1.20 \times 10^6$ bacterias/mL con una diferencia estadísticamente significativa con las superficies SLA ($p < 0.001$) y entre las superficies α -TiO₂ ($p < 0.01$).

Figura 10. Número de bacterias anaerobias / mL adheridas a las diferentes superficies experimentales (viabilidad bacteriana con XTT).



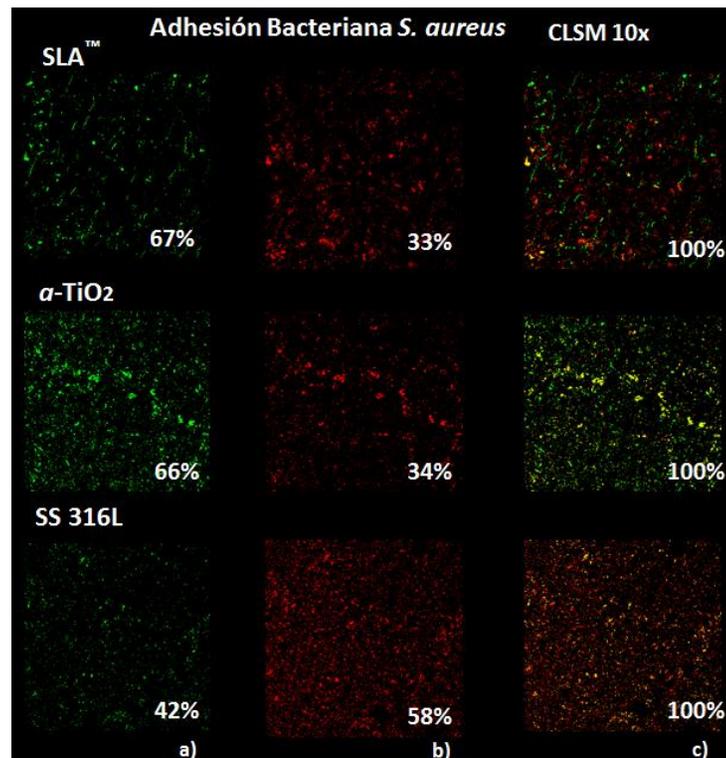
II. Microscopía Confocal

Staphylococcus aureus.

En la Figura 11 se pueden observar las imágenes de *S. aureus* con Microscopía Confocal utilizando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ adheridas a las tres diferentes superficies experimentales. Donde; a) Muestra el canal de las bacterias vivas que emiten una fluorescencia color verde (fluorocromo Syto 9), b) Muestra el canal de las bacterias muertas que emiten una fluorescencia color rojo (fluorocromo ioduro de propidio) y c) Muestra el empalme de ambos canales (verde y rojo). Los porcentajes indican la proporción de la intensidad de la fluorescencia de las bacterias vivas así como de las bacterias muertas en cada superficie experimental.

Para las superficies SLA se observó que del total de las células de *S. aureus* adheridas a la superficie, el 67 % (canal verde) eran bacterias viables, en el caso de las superficies modificadas α -TiO₂ se observó un comportamiento similar donde el 66 % de las bacterias adheridas se encontraban viables. Finalmente las superficies SS 316L fueron las que mostraron una menor viabilidad bacteriana, con un de 58 % de células marcadas con verde. Estos resultados muestran la misma tendencia que los resultados obtenidos de los ensayos con XTT.

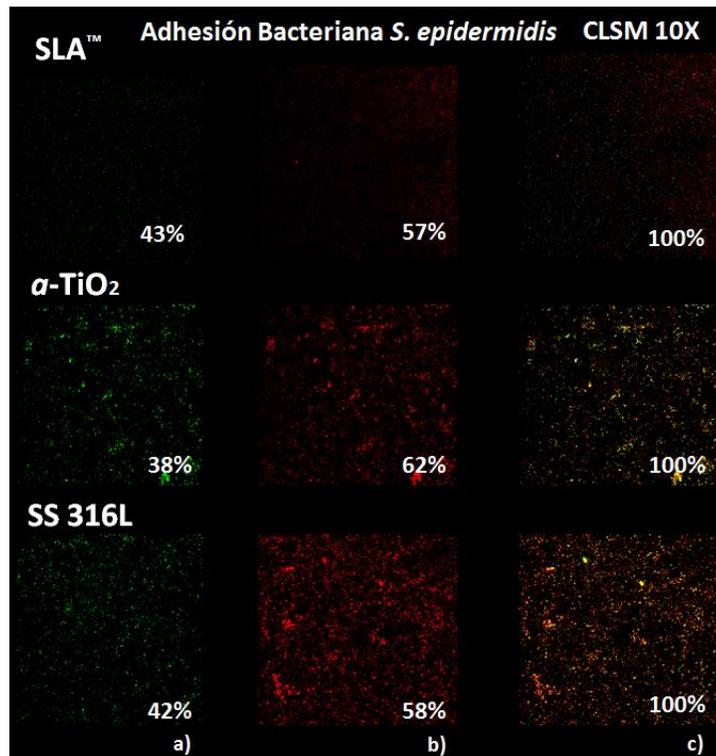
Figura 11. Bacterias *S. aureus* adheridas a las diferentes superficies experimentales empleando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Microscopia Confocal)



***Staphylococcus epidermidis*.**

En la Figura 12 se pueden observar las imágenes de *S. epidermidis* con Microscopia Confocal utilizando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ adheridas a las tres diferentes superficies experimentales. En este caso, se observó que en las superficies SLA, el 43% (canal verde) eran bacterias viables. Para las superficies modificadas α -TiO₂ se observó una ligera disminución en el porcentaje de bacterias viables adheridas a esta superficie, con un valor del 38%. Finalmente, las superficies SS 316L mostraron un comportamiento similar a las superficies SLA con un 42 % de bacterias viables adheridas a la superficie.

Figura 12. Bacterias *S. epidermidis* adheridas a las diferentes superficies experimentales empleando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Microscopia Confocal).

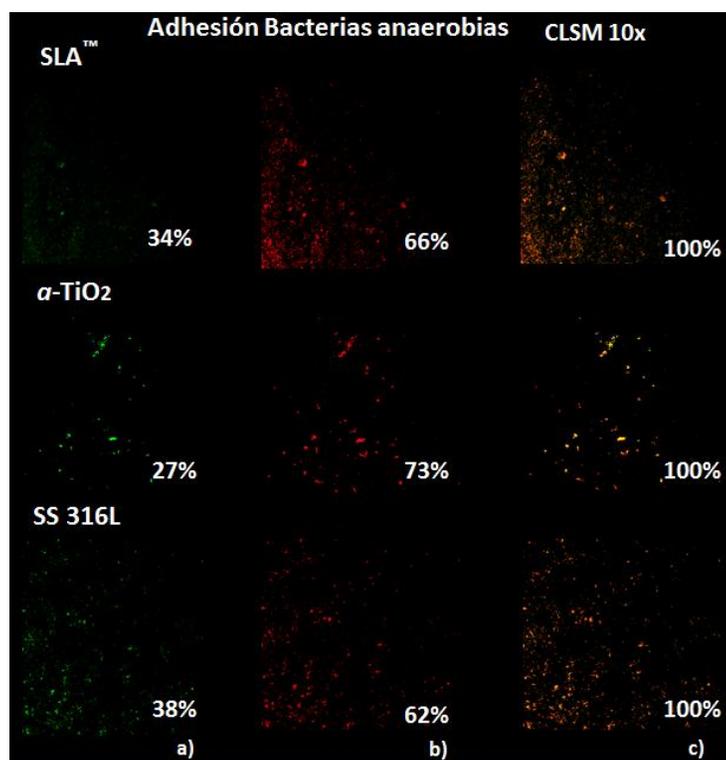


Bacterias anaerobias.

En la Figura 13 se pueden observar las imágenes por Microscopia Confocal utilizando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ de las bacterias anaerobias adheridas a las tres diferentes superficies experimentales.

Para las superficies SLA se observó que del total de bacterias anaerobias adheridas a la superficie, solamente el 34 % eran bacterias viables, en el caso de las superficies modificadas α -TiO₂ se observó tan sólo el 27 % de bacterias adheridas viables y finalmente las superficies SS 316L fueron las que mostraron una mayor viabilidad bacteriana, con un valor de 38%. Estos resultados mostraron que las superficies modificadas con α -TiO₂ tuvieron una menor adhesión de bacterias viables en comparación con las otras dos superficies.

Figura 13. Bacterias anaerobias adheridas a las diferentes superficies experimentales empleando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Microscopia Confocal)



B. Ensayos de formación de biopelículas

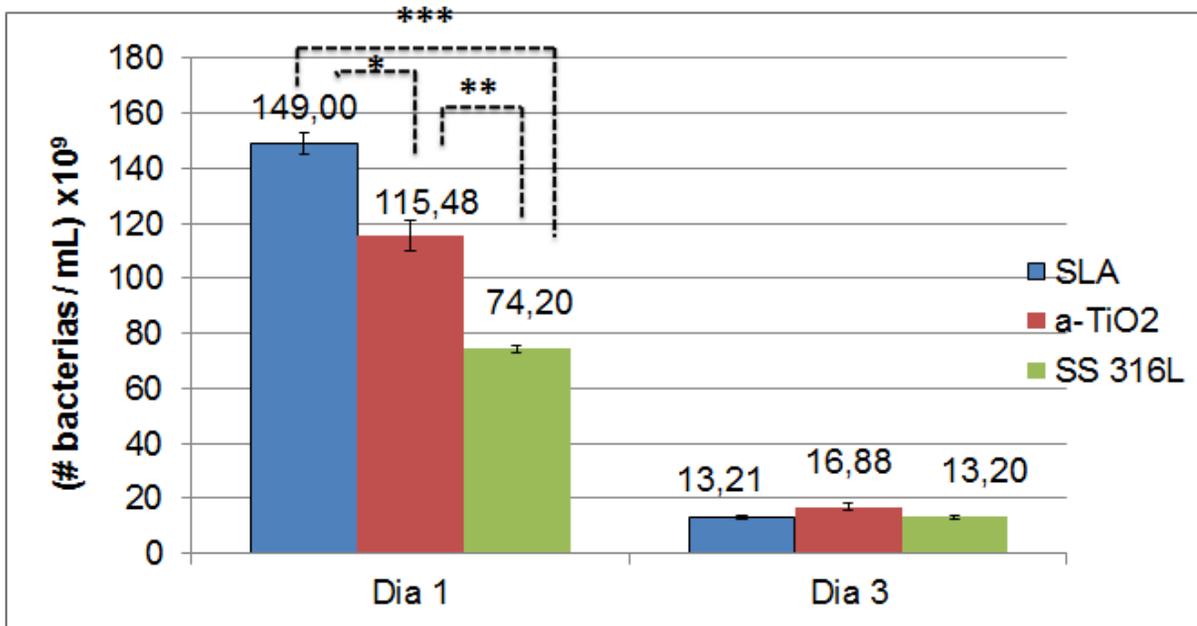
i. Determinación de la viabilidad bacteriana mediante ensayos de XTT

Staphylococcus aureus.

La Figura 14 muestra el número de bacterias en las biopelículas formadas por *S. aureus* sobre las tres diferentes superficies experimentales durante 1 y 3 días de incubación.

Las superficies SLA mostraron una disminución en la viabilidad de las biopelículas de $149.0 \pm 3.6 \times 10^9$ bacterias/mL en el primer día a $13.2 \pm 0.7 \times 10^9$ bacterias/mL en el tercer día, esta disminución representa un 91.1% de reducción en la cantidad de células viables dentro de las biopelículas. Para el caso de las superficies modificadas con α -TiO₂, la disminución en la formación de las biopelículas fue de $115.5 \pm 5.81 \times 10^9$ bacterias/mL en el primer día a $16.9 \pm 1.34 \times 10^9$ bacterias/mL en el tercer día, representando una disminución del 85.7%. Finalmente para el caso de las superficies SS 316L la disminución fue de $74.2 \pm 1.61 \times 10^9$ bacterias/mL en el primer día a $13.1 \pm 0.6 \times 10^9$ bacterias/mL en el tercer día, lo que representó una disminución del 82.3%. Las diferencias estadísticamente significativas entre las superficies se encontraron únicamente en el día 1; con diferencias entre las superficies SLA vs. α -TiO₂ ($p < 0.5$), SLA vs. SS 316L ($p < 0.001$) y α -TiO₂ vs. SS 316L ($p < 0.01$).

Figura 14. Formación de biopelículas para *S aureus* a 1 y 3 días. (Viabilidad bacteriana con XTT).



* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

Staphylococcus epidermidis.

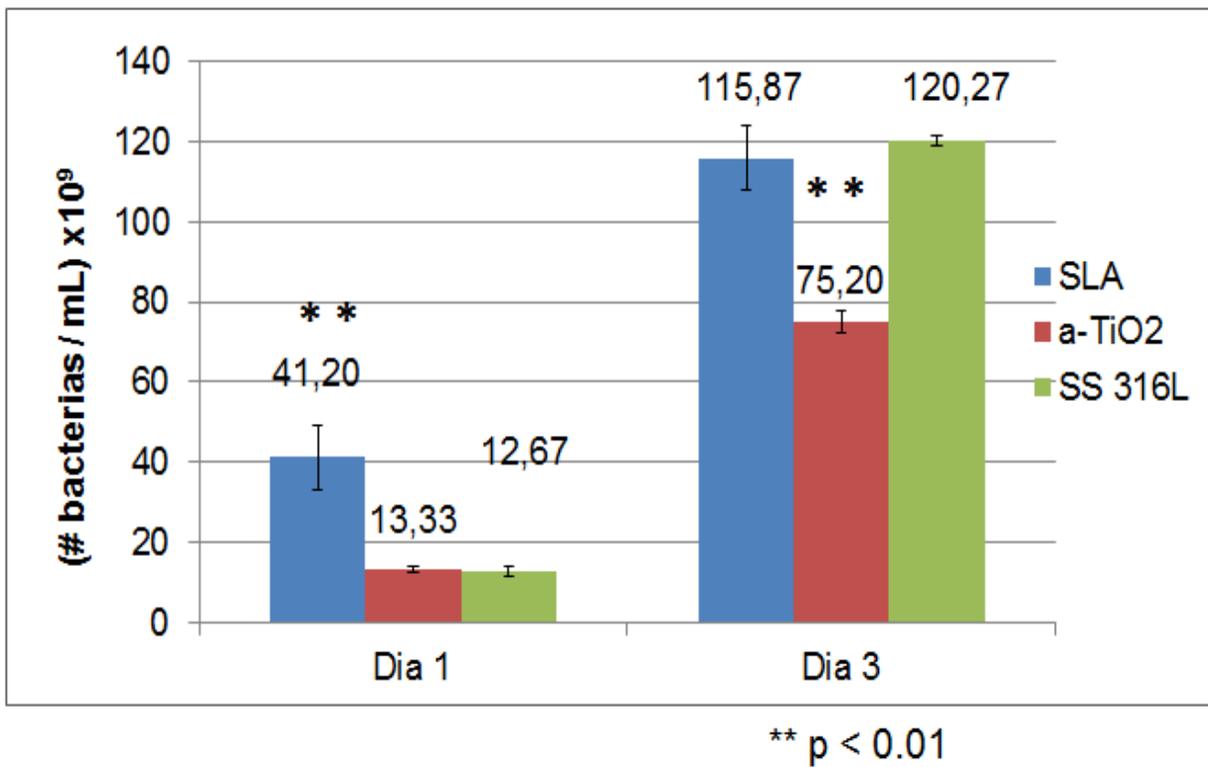
La Figura 15 muestra el comportamiento de las biopelículas formadas por *S. epidermidis* sobre las tres diferentes superficies experimentales. A diferencia de las biopelículas formadas por *S. aureus*, las biopelículas formadas por *S. epidermidis* mostraron un aumento en del día uno al día tres.

Las superficies SLA mostraron un aumento de $41.2 \pm 8.04 \times 10^9$ bacterias/mL en el primer día a $116.0 \pm 5.09 \times 10^9$ bacterias/mL en el tercer día, aumentando un 64.5 % en la formación de las biopelículas. Para el caso de las superficies modificadas con a-TiO₂ el aumento en la formación de la biopelícula fue de $13.3 \pm 0.8 \times 10^9$ bacterias/mL en el primer día a $75.2 \pm 2.66 \times 10^9$ bacterias/mL en el tercer día, representando un aumento del 82.3%. Y para el caso de las superficies SS 316L el

aumento fue de $12.7 \pm 1.19 \times 10^9$ bacterias/mL en el primer día a $120.0 \pm 5.17 \times 10^9$ bacterias/mL en el tercer día, lo que representó un aumento del 89.4 %.

Estos resultados indican que la formación de biopelículas de *S. epidermidis* al tercer día fue menor en las superficies modificadas con a-TiO₂, en comparación con las superficies de titanio y acero inoxidable. En contraste la superficie que mostró una mayor formación de biopelículas de *S. epidermidis* al tercer día fue la superficie SS 316L. Las diferencias significativas se encontraron al día 1 entre la superficie SLA vs. a-TiO₂ y SS 316L ($p < 0.01$); mientras que en el día 3, las diferencias significativas fueron entre la superficie a-TiO₂ vs. SLA y SS 316L ($p < 0.01$).

Figura 15. Formación de biopelículas para *S epidermidis* a 1 y 3 días. (Viabilidad bacteriana con XTT).



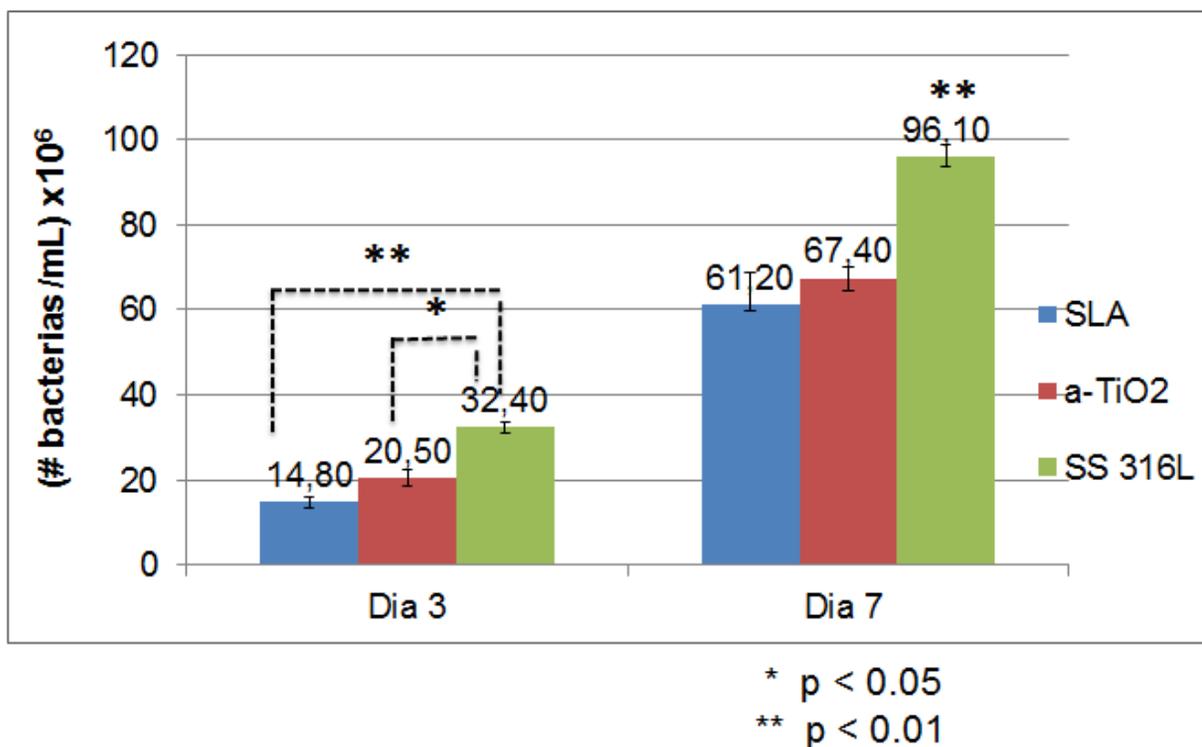
Bacterias anaerobias.

La figura 16 muestra el comportamiento de las biopelículas formadas por las bacterias anaerobias sobre las tres diferentes superficies experimentales. De manera similar que para *S. epidermidis*, se observó un aumento en la cantidad de las bacterias dentro de las biopelículas del día tres al día siete.

Las superficies SLA mostraron un aumento de $14.8 \pm 1.3 \times 10^6$ bacterias/mL en el tercer día a $61.2 \pm 7.4 \times 10^6$ bacterias/mL en el séptimo día, lo que nos da un aumento del 75.8 % en la formación de la biopelícula. Para el caso de las superficies modificadas con $\alpha\text{-TiO}_2$ el aumento en la formación de la biopelícula fue de $20.5 \pm 1.9 \times 10^6$ bacterias/mL en el tercer día a $67.4 \pm 2.8 \times 10^6$ bacterias/mL en el séptimo día, lo que representa un aumento del 69.6 %. Mientras que las superficies SS 316L mostraron un aumento de $32.4 \pm 1.2 \times 10^6$ bacterias/mL en el tercer día a $96.1 \pm 2.6 \times 10^6$ bacterias/mL en el séptimo día, lo que representa un aumento del 63.3 %.

Las diferencias estadísticamente significativas en el día tres de incubación se encontraron entre las superficies SLA vs. SS 316L ($p < 0.01$) y $\alpha\text{-TiO}_2$ vs. SS 316L ($p < 0.05$). En el día 7 de incubación sólo las superficies SS 316L mostraron un aumento estadísticamente significativo en comparación con las otras dos superficies ($p < 0.01$).

Figura 16. Formación de biopelículas (bacterias anaerobias) a 3 y 7 días. (Viabilidad bacteriana con XTT).

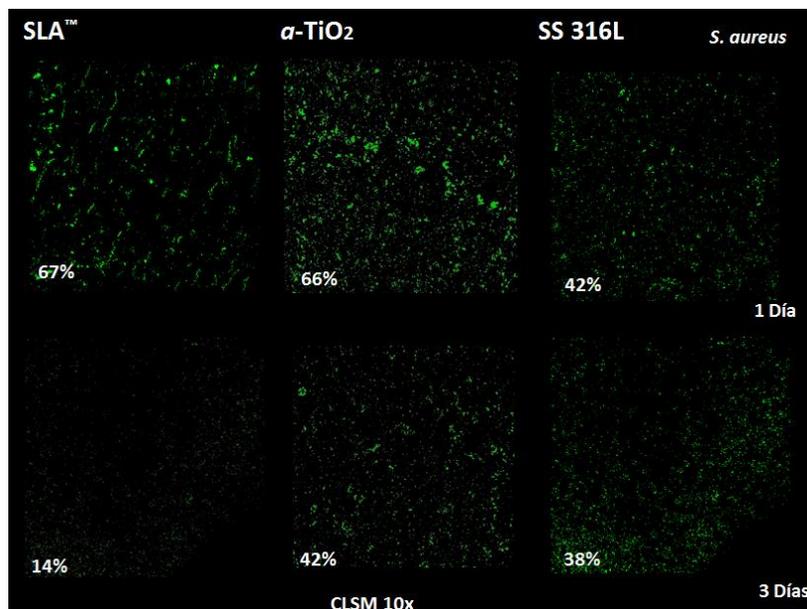


ii. Microscopía Confocal

Staphylococcus aureus.

La Figura 17 muestra únicamente las imágenes de Microscopia Confocal del canal verde (bacterias vivas). Se puede observar una disminución en la formación de biopelículas del día uno al día tres, lo cual se relaciona con lo observado en los ensayos con XTT. La superficie que presenta la mayor disminución es la SLA, con una disminución que va de 67 % de bacterias viables en el día uno al 14 % de bacterias viables en el día tres. Seguido de esta, se encuentra la superficie SS 316L con una disminución del 42 % al 38 %, mientras que las superficies modificadas con a-TiO₂ mostraron una disminución de 66 % al 42 %.

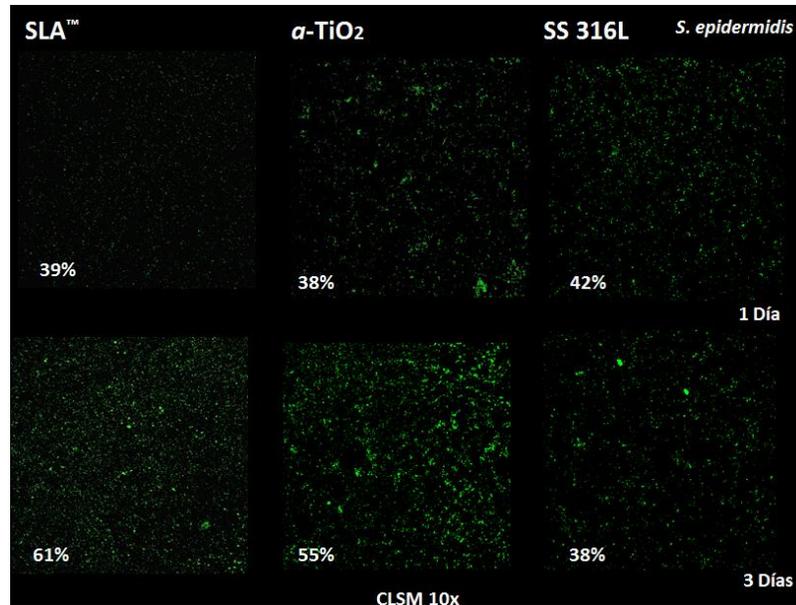
Figura 17. Bacterias *S. aureus* formadoras de biopelículas en las diferentes superficies experimentales empleando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Microscopia Confocal)



Staphylococcus epidermidis.

La Figura 18 al igual que para el caso de *S. aureus*, muestra únicamente las imágenes de Microscopia Confocal del canal verde. En este caso se observa una tendencia a aumentar la formación de la biopelícula, lo cual también se relaciona con lo observado en los ensayos de XTT. La superficie que presentó el mayor aumento es la SLA, con un aumento que va de 30 % de bacterias viables en el día uno al 61 % de bacterias viables en el día tres. Para el caso de las superficies modificadas con α-TiO₂ el aumento va de 38% a 55 %. Finalmente las superficies SS 316L mostraron un comportamiento contrario, ya que mostraron una disminución del 42 % al 38 % en la formación de biopelículas del día uno al día tres.

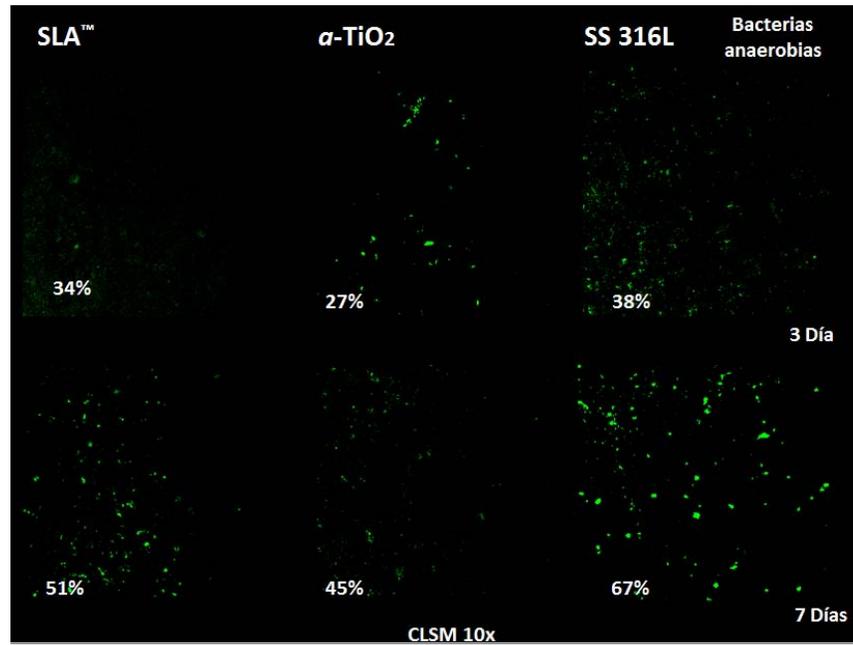
Figura 18. Bacterias *S. epidermidis* formadoras de biopelículas en las diferentes superficies experimentales empleando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Microscopia Confocal)



Bacterias anaerobias.

La figura 19 al igual que para el caso de *S. aureus* y *S. epidermidis* muestra únicamente las imágenes de Microscopia Confocal del canal verde. En este caso también se observa una tendencia de la biopelícula a aumentar del día tres al día siete, lo cual también se complementa con los resultados obtenidos de los ensayos con XTT. La superficie que presentó el mayor aumento en la viabilidad de las biopelículas fue la SS 316L, con un aumento que va del 38 % en el día tres hasta el 67 % en el día siete, este comportamiento también se observó en los ensayos con XTT. Para el caso de las superficies modificadas con α -TiO₂ el aumento va del 27% de células viables en el día tres al 45 % en el día siete. Finalmente las superficies SS 316L mostraron un comportamiento contrario, ya que mostraron una disminución del 42 % al 38 % en la formación de biopelículas en los días tres y siete, respectivamente.

Figura 19. Bacterias anaerobias formadoras de biopelículas en las diferentes superficies experimentales empleando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Microscopia Confocal)



IV. DISCUSIÓN

Bacterias aerobias

Staphylococcus aureus

Los ensayos de adhesión bacteriana de *S. aureus* empleando el kit XTT (Figura 6) mostraron que las superficies SS 316L tuvieron el menor número de bacterias viables adheridas a sus superficies, seguidas de las superficies modificadas con α -TiO₂, mientras que las superficies de titanio (SLA), fueron las que mostraron una mayor adhesión de *S. aureus*. Los resultados anteriores coincidieron con lo reportado en la bibliografía, donde se ha observado que *S. aureus* tiene gran afinidad por las superficies de titanio [67]. Estas bacterias logran adherirse y proliferar fácilmente en las superficies de titanio ya que posee una gran variedad de mecanismos de adhesión, tales como las MSCRAMM que le permiten adherirse a las superficies de diferentes biomateriales y a las proteínas de la matriz extracelular (ECM) depositadas sobre la superficie del mismo [91]. Esto ha conducido a que gran parte de las infecciones relacionadas con implantes estén causadas por estafilococos (aproximadamente cuatro de cada cinco), donde *S. aureus* y *S. epidermidis* están implicados en dos de cada tres aislamientos de infección [92].

Por otro lado, se debe recordar que en la actualidad el material más utilizado es el titanio comercialmente puro (SLA) y sus aleaciones, debido a sus mejores propiedades físico-químicas y sobre todo de biocompatibilidad en comparación con otros biomateriales metálicos y que el acero inoxidable de grado médico (SS 316L) como material de implante ha quedado en desuso [9]. Por tanto los resultados obtenidos en este estudio, donde las superficies modificadas con α -TiO₂ obtuvieron una

disminución estadísticamente significativa de la adhesión bacteriana en comparación con las superficies SLA resulta ser de importante relevancia ya que la adhesión inicial de las bacterias a las superficies del biomaterial es el evento crítico en la patogénesis de las infecciones relacionadas con biomateriales [67]. Los resultados obtenidos empleado el kit XTT soportan los resultados obtenidos con microscopía confocal, donde se observó que las superficies SS mostraban el menor porcentaje de bacteria viables adheridas a su superficie en comparación con las superficies α -TiO₂ y SLA.

Los ensayos de formación de biopelículas de *S. aureus* empleando el kit XTT, mostraron una disminución de la viabilidad bacteriana del día uno al día tres para las tres diferentes superficies experimentales (Figura 14). Un comportamiento similar se observó en las imágenes de microscopía Confocal (Figura 17). Estos resultados contrastan con lo reportado en la literatura, donde se menciona que *S. aureus* posee una gran cantidad de mecanismos de adhesión (Tabla 2) que le permiten adherirse fuertemente a la superficies de biomateriales metálicos, facilitando su proliferación y la formación de la biopelícula bacteriana [10, 63]. Aunado a esto, más del 90% de las cepas de importancia clínicas de *S. aureus* han mostrado poseer polisacáridos capsulares. Lo cual favorece la formación de biopelículas [93] e incluso se han reportado estudios de adhesión y formación de biopelículas empleando superficies de titanio donde se han obtenido biopelículas de *S. aureus* hasta en un periodo de 72 horas [94]. Por lo que una de las posibles explicaciones de los resultados obtenidos puede ser que los nutrientes disponibles durante el experimento no fueron suficientes para mantener la fase exponencial del desarrollo bacteriano, llevando a la bacteria a un estado estacionario corto y posteriormente entrar a un estado de muerte bacteriana lo

que pudo provocar que en el día tres las bacterias metabólicamente activas disminuyeran abruptamente [95].

Staphylococcus epidermidis

Los ensayos de adhesión bacteriana de *S. epidermidis* empleando el kit XTT (Figura 8), mostraron que las superficies SLA obtuvieron la mayor adhesión bacteriana en comparación con las superficies α -TiO₂ y SS 316L. Lo anterior fue confirmado con los resultados obtenidos por microscopia confocal (Figura 12). Cabe mencionar que las pruebas por microscopia con focal fueron semi-cuantitativas y solo mostraron proporciones, por tanto la cantidad real de bacterias adheridas a las superficies solo se observa en las pruebas por XTT.

Estos resultados son consistentes con lo descrito en la literatura donde se ha reportado que *Staphylococcus epidermidis*, es uno de los patógenos bacterianos más comúnmente aislados en infecciones relacionadas con biomateriales, gracias a su capacidad de adherirse en la superficie de estos materiales con el fin de formar biopelículas [96, 97]. Esta capacidad de adherirse a la superficie de biomateriales es gracias a los diversos mecanismos de adhesión con los que cuenta esta bacteria [54]. Especialmente las investigaciones han demostrado que los polisacáridos de adhesión intercelular-polimérica N-acetil- β (1,6) -glucosamina (PIA/PNAG) juegan un papel importante no sólo en la formación de biopelículas, sino también en la adhesión bacteriana [59, 97, 98]. Sin embargo, el mecanismo exacto de adhesión aún no se ha determinado debido a la compleja combinación de muchos otros factores relacionados con la propia bacteria, el entorno y los diferentes biomateriales [99].

La capacidad de adherirse y proliferar en las superficies inertes formando biopelículas, es lo que le da el carácter patogénico a *S. epidermidis* [52]. Estas características se observaron claramente en los ensayos de formación de biopelículas empleando el Kit XTT (Figura 15), donde se obtuvo un aumento en la cantidad de bacterias metabólicamente activas del día uno al día tres, siendo las superficies modificadas α -TiO₂ las que mostraron la mayor inhibición en la formación de biopelículas, en comparación con las superficies SLA y SS 316L. Los resultados que se obtuvieron por microscopia confocal (Figura 18) mostraron una tendencia similar a los resultados obtenidos en los ensayos por XTT, a excepción de las superficies SS 316L, donde se observó una ligera disminución.

Estudios previos han mostrado que diferentes rugosidades a escala nanométrica tienen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad total de bacterias viables adheridas a superficies de Ti-6Al-4V y SS 316L entre el grupo fino (<10nm) y el grupo grueso (> 10nm). La investigación ha puesto de manifiesto una correlación particularmente positiva entre la adhesión bacteriana temprana y rugosidad de la superficie, donde a mayor rugosidad media, existe una mayor adhesión temprana [100, 101]. Esto gracias a que la rugosidad de la superficie no sólo aumenta el área de superficie para la adhesión bacteriana, sino también proporcionar un andamio que facilita la adhesión bacteriana [102]. A pesar de esto, otros estudios indican que el nivel mínimo de rugosidad requerido para que *S. epidermidis* se adhiera difiere según el tipo de biomaterial utilizado, y que la adhesión es un proceso multi-factorial que no se puede explicar con una sola característica superficial. Incluso se ha reportado que superficies de aleaciones de titanio y acero inoxidable de grado médico con rugosidades medias (Ra) similares, no presentan diferencias significativas en cuanto a

la adhesión bacteriana y formación de biopelículas [99]. Esto último coincidió con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que las superficies de acero inoxidable no presentaron diferencias significativas en los ensayos de formación de biopelículas en comparación con las superficies de titanio SLA.

Los resultados obtenidos para la adhesión bacteriana y formación de biopelículas, mostraron que las superficies modificadas a-TiO₂ presentaron una mejor inhibición bacteriana en comparación con las superficies de titanio comercialmente puro SLA, por tanto la modificación superficial del acero inoxidable de grado medico 316L por recubrimientos de películas delgadas de óxido de titanio amorfo puede ser una buena alternativa para la fabricación de implantes ortopédicos, cabe señalar que aún faltan realizar ensayos que demuestren la buena biocompatibilidad y osteointegración con los tejidos tisulares.

Bacterias anaerobias

Para el caso de las bacterias anaerobias, debemos recordar que el inóculo fue una mezcla de 9 bacterias representativas de la placa dentobacteriana subgingival, algunas de ellas implicadas en infecciones periodontales y periimplantitis [84, 103]. Los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión bacteriana empleando kit XTT (Figura 10), mostraron que las superficies SLA y las superficies modificadas con a-TiO₂ fueron las que obtuvieron el menor número de bacterias viables adheridas a sus superficies. De manera similar, los resultados obtenidos en los ensayos de microscopia Confocal (Figura 13) indicaron que las superficies a-TiO₂ mostraron la menor intensidad de fluorescencia de bacterias viables adheridas a sus superficies.

Estos resultados coinciden con lo descrito en la literatura donde se ha informado que metales puros, como el hierro, el titanio y el níquel, pueden exhibir propiedades bacteriostáticas [86]. Por otra parte, se ha reportado que una superficie de titanio con una $Ra < 0.08 \mu\text{m}$ puede inhibir la adhesión bacteriana y la maduración de la placa, mientras que una rugosidad superficial $Ra > 0.2 \mu\text{m}$ conduce a un aumento de la frecuencia de la formación de biopelículas [87, 88]. Aunque otros estudios indican que el nivel mínimo de rugosidad requerido para que se lleve a cabo la adhesión bacteriana depende del tipo de biomaterial utilizado, ya que la adhesión es un proceso multifactorial que no se puede explicar con tan solo la rugosidad media del material [99]. Esto último ayuda a explicar los resultados obtenidos en esta investigación, ya que las superficies utilizadas en este estudio fueron preparadas para tener una Ra muy similares (SLA, $3.4 \mu\text{m}$, $\alpha\text{-TiO}_2$, $3.9 \mu\text{m}$ y SS 316L, $3.1 \mu\text{m}$), con el fin de que la rugosidad no fuera un factor determinante en el comportamiento antibacteriano de las diferentes superficies.

Por tanto, se puede decir que la rugosidad media de las diferentes superficies no afectó la adhesión bacteriana, ya que en los ensayos con XTT, se observa una gran cantidad de bacterias metabólicamente activas adheridas a las diferentes superficies. Una posible explicación en cuanto a por qué las superficies SLA y las superficies $\alpha\text{-TiO}_2$ mostraron una menor cantidad de bacterias adheridas en comparación con las superficies SS 316L; es que las superficies de titanio presentaron un efecto bacteriostático, lo cual ha sido reportado en la literatura anteriormente [86].

Dicho efecto bacteriostático, también se pudo observar en los ensayos de formación de biopelículas utilizando el kit XTT (Figura 16), donde las superficies SLA y $\alpha\text{-TiO}_2$ no mostraron diferencias significativas en el número de bacterias

metabólicamente activas formadoras de la biopelículas , mientras que las superficies SS 316L mostraron la mayor cantidad de bacterias formadores de la biopelícula. Esto se corrobora con los ensayos por microscopia confocal (Figura 19).

Por otra parte, las superficies modificadas a-TiO₂ no mostraron diferencias significativas en la formación de biopelículas comparándolas con las superficies de titanio comercialmente puro, por tanto la modificación superficial del acero inoxidable de grado médico 316L por recubrimientos de películas delgadas de óxido de titanio amorfo puede ser una buena alternativa para la fabricación de implantes dentales, aunque cabe señalar que aún faltan realizar ensayos que demuestren la buena biocompatibilidad y osteointegración con los tejidos tisulares de la cavidad oral.

V. CONCLUSIONES

Las superficies modificadas mediante recubrimientos de óxido de titanio amorfo colocados sobre sustratos de acero inoxidable de grado medico 316L, mostraron una mejor inhibición de la adhesión bacteriana de *S. aureus* en comparación con las superficies de titanio comercialmente puro SLA. En cuanto a la formación de biopelículas se observó una disminución en el número de bacterias metabólicamente activas adheridas a las tres diferentes superficies y no se encontraron diferencias significativas entre ellas.

Las superficies modificadas mediante recubrimientos de óxido de titanio amorfo colocados sobre sustratos de acero inoxidable de grado medico 316L, mostraron una mejor inhibición de la adhesión bacteriana y formación de biopelículas de *S. epidermidis* en comparación con las superficies de titanio comercialmente puro SLA y acero inoxidable de grado médico.

En los ensayos empleados bacterias anaerobias de importancia odontológica, las superficies modificadas no mostraron diferencias significativas en la adhesión y formación de biopelículas comparándolas con las superficies de titanio SLA.

Perspectivas del trabajo.

Por tanto la modificación superficial del acero inoxidable de grado médico 316L por recubrimientos de películas delgadas de óxido de titanio amorfo puede ser una buena alternativa para la fabricación de implantes dentales y ortopédicos. Cabe señalar que aún falta realizar ensayos que demuestren la buena biocompatibilidad y osteointegración con los tejidos del huésped, sin embargo la mejor inhibición de la colonización bacteriana por parte de las superficies modificadas con recubrimientos de películas delgadas de óxido de titanio amorfo comparadas con el titanio comercialmente puro es una base sólida que nos indica que este tipo de modificación puede ser una opción viable para la fabricación de implantes dentales y ortopédicos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Connaughton, A., et al., *Biofilm disrupting technology for orthopedic implants: what's on the horizon?* Frontiers in Medicine, 2014. **1**(22).
2. Piscitelli, P., et al., *Socioeconomic burden of total joint arthroplasty for symptomatic hip and knee osteoarthritis in the Italian population: a 5-year analysis based on hospitalization records.* Arthritis Care Res (Hoboken), 2012. **64**(9): p. 1320-7.
3. Kurtz, S., et al., *Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030.* J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(4): p. 780-5.
4. Jokstad, A., et al., *Quality of dental implants.* Int Dent J, 2003. **53**(6 Suppl 2): p. 409-43.
5. Widmer, A.F., *New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants.* Clinical Infectious Diseases, 2001. **33**: p. S94-S106.
6. Pye, A.D., et al., *A review of dental implants and infection.* Journal of Hospital Infection, 2009. **72**(2): p. 104-110.
7. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.* Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
8. Costerton, J.W., *Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections.* Clin Orthop Relat Res, 2005(437): p. 7-11.
9. Geetha, M., et al., *Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review.* Progress in Materials Science, 2009. **54**(3): p. 397-425.
10. Gristina, A.G., *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration.* Science, 1987. **237**(4822): p. 1588-95.
11. Huebsch, N. and D.J. Mooney, *Inspiration and application in the evolution of biomaterials.* Nature, 2009. **462**(7272): p. 426-32.
12. Williams, D.F., *On the nature of biomaterials.* Biomaterials, 2009. **30**(30): p. 5897-909.
13. Rodil, S.E., *Modificación Superficial de Biomateriales.* Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 2009. **29**(2): p. 67-83.
14. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials.* Seminars in Immunology, 2008. **20**(2): p. 86-100.
15. Ratner, B.D. and S.J. Bryant, *Biomaterials: where we have been and where we are going.* Annu Rev Biomed Eng, 2004. **6**: p. 41-75.
16. Kasemo, B. and J. Gold, *Implant surfaces and interface processes.* Adv Dent Res, 1999. **13**: p. 8-20.
17. Hubbell, J.A., *Bioactive biomaterials.* Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(2): p. 123-9.
18. Kim, H.W., J.H. Song, and H.E. Kim, *Bioactive glass nanofiber-collagen nanocomposite as a novel bone regeneration matrix.* J Biomed Mater Res A, 2006. **79**(3): p. 698-705.
19. Timbart, L. and B.G. Amsden, *Functionalizable Biodegradable Photocrosslinked Elastomers Based on 2-Oxepane-1,5-dione.* Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 2008. **46**(24): p. 8191-8199.
20. Wei, J., et al., *Preliminary investigation of bioactivity of nano biocomposite.* Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2007. **18**(3): p. 529-533.

21. Bhardwaj, R. and A.K. Mohanty, *Advances in the properties of polylactides based materials: A review*. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2007. **1**(2): p. 191-209.
22. Burg, K.J., S. Porter, and J.F. Kellam, *Biomaterial developments for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2347-59.
23. Long, M. and H.J. Rack, *Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective*. Biomaterials, 1998. **19**(18): p. 1621-39.
24. Navarro, M., et al., *Biomaterials in orthopaedics*. J R Soc Interface, 2008. **5**(27): p. 1137-58.
25. Klement, P., et al., *Blood-compatible biomaterials by surface coating with a novel antithrombin-heparin covalent complex*. Biomaterials, 2002. **23**(2): p. 527-35.
26. Branemark, P.I., *Osseointegration and its experimental background*. J Prosthet Dent, 1983. **50**(3): p. 399-410.
27. Larsson, C., et al., *Bone response to surface modified titanium implants - studies on the tissue response after 1 year to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses*. J Mater Sci Mater Med, 1997. **8**(12): p. 721-9.
28. Brandes, E.A. and G.B. Brook, *Smithells Metals Reference Book*. Seventh ed. 1992, Oxford: Butterw orth-Heinemann.
29. Virtanen, S., et al., *Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions*. Acta Biomater, 2008. **4**(3): p. 468-76.
30. Wapner, K.L., *Implications of metallic corrosion in total knee arthroplasty*. Clin Orthop Relat Res, 1991(271): p. 12-20.
31. Magaye, R., et al., *Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles*. Exp Ther Med, 2012. **4**(4): p. 551-561.
32. Teoh, S.H., *Fatigue of biomaterials: a review*. International Journal of Fatigue, 2000. **22**(10): p. 825-837.
33. Nag, S., et al., *Comparison of microstructural evolution in Ti-Mo-Zr-Fe and Ti-15Mo biocompatible alloys*. J Mater Sci Mater Med, 2005. **16**(7): p. 679-85.
34. Kirby, R.S., et al., *Use of the Asi Titanium Stent in the Management of Bladder Outflow Obstruction Due to Benign Prostatic Hyperplasia*. Journal of Urology, 1992. **148**(4): p. 1195-1197.
35. Gomes, C.C., et al., *Assessment of the genetic risks of a metallic alloy used in medical implants*. Genetics and Molecular Biology, 2011. **34**(1): p. 116-121.
36. Gallant, N.D., et al., *Micro- and nano-patterned substrates to manipulate cell adhesion*. J Nanosci Nanotechnol, 2007. **7**(3): p. 803-7.
37. Jager, M., et al., *Significance of nano- and microtopography for cell-surface interactions in orthopaedic implants*. J Biomed Biotechnol, 2007. **2007**(8): p. 69036.
38. Lao, L.L. and S.S. Venkatraman, *Adjustable paclitaxel release kinetics and its efficacy to inhibit smooth muscle cells proliferation*. J Control Release, 2008. **130**(1): p. 9-14.
39. Raimondi, M.T., P. Vena, and R. Pietrabissa, *Quantitative evaluation of the prosthetic head damage induced by microscopic third-body particles in total hip replacement*. J Biomed Mater Res, 2001. **58**(4): p. 436-48.

40. Chu, P.K., *Plasma-treated biomaterials*. IEEE Transactions on Plasma Science, 2007. **35**(2): p. 181-187.
41. Liu, X.M., et al., *Surface characteristics, biocompatibility, and mechanical properties of nickel-titanium plasma-implanted with nitrogen at different implantation voltages*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. **82A**(2): p. 469-478.
42. Zimmerli, W., A. Trampuz, and P.E. Ochsner, *Prosthetic-joint infections*. N Engl J Med, 2004. **351**(16): p. 1645-54.
43. Dickinson, G.M. and A.L. Bisno, *Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations*. Int J Artif Organs, 1993. **16**(11): p. 749-54.
44. Darouiche, R.O., *Treatment of infections associated with surgical implants*. N Engl J Med, 2004. **350**(14): p. 1422-9.
45. Zimmerli, W. and P.E. Ochsner, *Management of infection associated with prosthetic joints*. Infection, 2003. **31**(2): p. 99-108.
46. Kaandorp, C.J.E., et al., *Incidence and sources of native and prosthetic joint infection: a community based prospective survey*. Annals of the Rheumatic Diseases, 1997. **56**(8): p. 470-475.
47. Esposito, M., et al., *Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: a review of the literature*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999. **14**(4): p. 473-90.
48. Tsuang, Y.H., et al., *Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles*. Artificial Organs, 2008. **32**(2): p. 167-174.
49. Alcoforado, G.A., et al., *Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans*. J Parodontol, 1991. **10**(1): p. 11-8.
50. Mombelli, A., et al., *The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants*. Oral Microbiol Immunol, 1987. **2**(4): p. 145-51.
51. Riool, M., et al., *Staphylococcus epidermidis originating from titanium implants infects surrounding tissue and immune cells*. Acta Biomater, 2014. **10**(12): p. 5202-12.
52. Huebner, J. and D.A. Goldmann, *Coagulase-negative staphylococci: Role as pathogens*. Annual Review of Medicine, 1999. **50**: p. 223-236.
53. Stewart, P.S. and J.W. Costerton, *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. Lancet, 2001. **358**(9276): p. 135-8.
54. Christensen, G.D., et al., *Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices*. J Clin Microbiol, 1985. **22**(6): p. 996-1006.
55. Baldassarri, L., et al., *Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among Staphylococcus epidermidis clinical isolates*. Infection and Immunity, 1996. **64**(8): p. 3410-3415.
56. Mack, D., N. Siemssen, and R. Laufs, *Parallel Induction by Glucose of Adherence and a Polysaccharide Antigen Specific for Plastic-Adherent Staphylococcus-Epidermidis - Evidence for Functional Relation to Intercellular-Adhesion*. Infection and Immunity, 1992. **60**(5): p. 2048-2057.
57. Kristian, S.A., et al., *Biofilm formation induces C3a release and protects Staphylococcus epidermidis from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing*. Journal of Infectious Diseases, 2008. **197**(7): p. 1028-1035.

58. Heilmann, C., et al., *Characterization of Tn917 insertion mutants of Staphylococcus epidermidis affected in biofilm formation*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 277-82.
59. Heilmann, C., et al., *Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol, 1996. **20**(5): p. 1083-91.
60. Xu, L., et al., *Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun, 2006. **74**(1): p. 488-96.
61. Toledo-Arana, A., et al., *Staphylococcus aureus develops an alternative, ica-independent biofilm in the absence of the arlRS two-component system*. J Bacteriol, 2005. **187**(15): p. 5318-29.
62. Hussain, M., et al., *Teichoic acid enhances adhesion of Staphylococcus epidermidis to immobilized fibronectin*. Microb Pathog, 2001. **31**(6): p. 261-70.
63. Foster, T.J. and M. Hook, *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology, 1998. **6**(12): p. 484-488.
64. Williams, R.J., et al., *Identification of a fibronectin-binding protein from Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6805-10.
65. Guo, B.N., et al., *Pathogenic implication of a fibrinogen-binding protein of Staphylococcus epidermidis in a rat model of intravascular-catheter-associated infection*. Infection and Immunity, 2007. **75**(6): p. 2991-2995.
66. Otto, M., *Staphylococcal biofilms*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **322**: p. 207-28.
67. Harris, L.G. and R.G. Richards, *Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces*. J Mater Sci Mater Med, 2004. **15**(4): p. 311-4.
68. Peschel, A., et al., *Inactivation of the dlt operon in Staphylococcus aureus confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8405-10.
69. Lindhe, J., J. Meyle, and E.W. Periodontology, *Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology*. Journal of Clinical Periodontology, 2008. **35**: p. 282-285.
70. Paquette, D.W., N. Brodala, and R.C. Williams, *Risk factors for endosseous dental implant failure*. Dent Clin North Am, 2006. **50**(3): p. 361-74, vi.
71. Lambrecht, J.T., et al., *Long-term evaluation of submerged and nonsubmerged ITI solid-screw titanium implants: A 10-year life table analysis of 468 implants*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 2003. **18**(6): p. 826-834.
72. Tanner, A., et al., *Dental implant infections*. Clinical Infectious Diseases, 1997. **25**: p. S213-S217.
73. Li, J., et al., *Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm*. J Appl Microbiol, 2004. **97**(6): p. 1311-8.
74. Furst, M.M., et al., *Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants*. Clin Oral Implants Res, 2007. **18**(4): p. 501-8.
75. Xie, H., et al., *Intergeneric communication in dental plaque biofilms*. J Bacteriol, 2000. **182**(24): p. 7067-9.
76. Gibbons, R.J., et al., *Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of Actinomyces viscosus T14V-J1 on apatitic surfaces*. Infect Immun, 1988. **56**(11): p. 2990-3.

77. Gibbons, R.J., D.I. Hay, and D.H. Schlesinger, *Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of Streptococcus gordonii to apatitic surfaces*. Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 2948-54.
78. Kolenbrander, P.E., et al., *Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession*, in *Dental Plaque Revisited: Oral biofilms in Health and Disease*, N.H. Newman and M. Wilson, Editors. 1999, Eastman Dental Institute, University College London: London. p. 171-186.
79. Gibbons, R. and M. Nygaard, *Interbacterial aggregation of plaque bacteria*. Arch Oral Biol, 1970. **15**(12): p. 1397-400.
80. Cook, G.S., J.W. Costerton, and R.J. Lamont, *Biofilm formation by Porphyromonas gingivalis and Streptococcus gordonii*. J Periodontal Res, 1998. **33**(6): p. 323-7.
81. Listgarten, M., *Formation of dental plaque and other oral biofilms*. In: Newman HN & Wilson M, ed. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*. Eastman Dental Institute, University College London, 1999: p. 187-210.
82. Socransky, S.S., et al., *Microbial complexes in subgingival plaque*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(2): p. 134-44.
83. Socransky, S.S., et al., *"Checkerboard" DNA-DNA hybridization*. Biotechniques, 1994. **17**(4): p. 788-92.
84. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *Periodontal microbial ecology*. Periodontol 2000, 2005. **38**: p. 135-87.
85. Mombelli, A., et al., *The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease*. J Clin Periodontol, 1995. **22**(2): p. 124-30.
86. Dhir, S., *Biofilm and dental implant: The microbial link*. J Indian Soc Periodontol, 2013. **17**(1): p. 5-11.
87. Rimondini, L., et al., *The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium*. J Periodontol, 1997. **68**(6): p. 556-62.
88. Bollen, C.M., et al., *The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis*. Clin Oral Implants Res, 1996. **7**(3): p. 201-11.
89. Meyer, E.E., et al., *Origin of the long-range attraction between surfactant-coated surfaces*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(19): p. 6839-6842.
90. Catauro, M., et al., *Corrosion behavior and mechanical properties of bioactive sol-gel coatings on titanium implants*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **43**: p. 375-82.
91. Herrmann, M., et al., *Adhesion of Staphylococcus aureus to surface-bound platelets: role of fibrinogen/fibrin and platelet integrins*. J Infect Dis, 1993. **167**(2): p. 312-22.
92. Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance*. Biomaterials, 2006. **27**(11): p. 2331-2339.
93. O'Riordan, K. and J.C. Lee, *Staphylococcus aureus capsular polysaccharides*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(1): p. 218-34.
94. Gorth, D.J., et al., *Decreased bacteria activity on Si3N4 surfaces compared with PEEK or titanium*. International Journal of Nanomedicine, 2012. **7**: p. 4829-4840.

95. Harris, L.G., S.J. Foster, and R.G. Richards, *An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review*. Eur Cell Mater, 2002. **4**: p. 39-60.
96. Mack, D., et al., *Microbial interactions in Staphylococcus epidermidis biofilms*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**(2): p. 399-408.
97. Gotz, F., *Staphylococcus and biofilms*. Molecular Microbiology, 2002. **43**(6): p. 1367-1378.
98. Fluckiger, U., et al., *Biofilm formation, icaADBC transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1811-9.
99. Yoda, I., et al., *Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion*. BMC Microbiology, 2014. **14**.
100. Scheuerman, T.R., A.K. Camper, and M.A. Hamilton, *Effects of substratum topography on bacterial adhesion*. Journal of Colloid and Interface Science, 1998. **208**(1): p. 23-33.
101. Subramani, K., et al., *Biofilm on dental implants: a review of the literature*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2009. **24**(4): p. 616-26.
102. Taylor, R.L., et al., *The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate*. J Mater Sci Mater Med, 1998. **9**(1): p. 17-22.
103. Mombelli, A., *Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis*. Periodontol 2000, 2002. **28**: p. 177-89.