



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ADHESIÓN BACTERIANA SOBRE SUPERFICIES DE
ACERO INOXIDABLE DE GRADO MÉDICO MODIFICADAS
CON PELÍCULAS DE CARBONO AMORFO Y
NANOPARTÍCULAS DE PLATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

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

P R E S E N T A:

MIGUEL SANTANA MARTÍNEZ

TUTORA: Dra. ARGELIA ALMAGUER FLORES



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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.

ÍNDICE

Resumen	1
I. Introducción.	2
1. Biomateriales.	3
1.1 Infecciones en aditamentos de uso biomédico.	7
2. Implantes Dentales.	8
2.1 Antecedentes históricos.	8
2.2 Modificaciones superficiales en implantes dentales.	10
2.3 Periimplantitis.	13
2.4 Microbiología asociada a la periimplantitis.	14
3. Adhesión bacteriana y formación de biopelículas en biomateriales.	16
3.1 Papel de <i>Staphylococcus aureus</i> en infecciones de aditamentos de uso biomédico y dental.	20
3.2 Papel de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en infecciones de aditamentos de uso biomédico y dental.	21
3.3 Papel de <i>Escherichia coli</i> en infecciones de aditamentos de uso biomédico y dental.	22
4. Uso de la Plata como agente antimicrobiano	23
II. Planteamiento del Problema y Justificación.	26
III. Hipótesis	26
IV. Objetivo general.	27
Objetivos específicos	27
V. Materiales y métodos.	28
Diseño experimental y preparación de las muestras.	28
Ensayos de adhesión bacteriana.	29
VI. Análisis estadístico.	31
VII. Resultados.	32
VIII. Discusión.	36
IX. Conclusiones.	39
X. Referencias bibliográficas.	41

RESUMEN.

Los implantes dentales son biomateriales que se utilizan para reemplazar dientes perdidos y que interactúan directamente con el ecosistema de la cavidad oral. Mediante la modificación de las superficies de los implantes dentales, se busca disminuir las infecciones asociadas y a tener una mayor integración del biomaterial con el huésped.

En este estudio se realizaron modificaciones superficiales a sustratos de acero inoxidable de grado médico 316L con diferentes concentraciones (2%, 5% y 7%) de nanopartículas de plata embebidas en una matriz de carbono amorfo con el fin de analizar la adhesión de los tres principales microorganismos asociados en las infecciones en aditamentos de uso biomédico como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Los resultados mostraron que la menor adhesión bacteriana se presentó sobre las superficies con mayor porcentaje de nanopartículas de plata en las tres especies bacterianas. En otro resultado más específico, se observó que *S. aureus* tuvo una menor adhesión a estas superficies, así como también una muy poca adhesión en la superficie de acero inoxidable de grado médico modificada con carbono amorfo. Lo cual significa que el carbono amorfo podría ayudar en la disminución de la adhesión de *S. aureus* específicamente, mientras que las superficies adicionadas con nanopartículas de plata fueron más efectivas para evitar la adhesión de *P. aeruginosa* y *E. coli*.

I. INTRODUCCIÓN

La utilización de metales en implantes biomédicos ortopédicos y odontológicos se basa fundamentalmente en las propiedades mecánicas y fisiológicas a los que estos puedan estar sometidos. Idealmente, un implante debería ser completamente inerte en el cuerpo humano, sin embargo, rara vez sucede así.

Los fluidos orgánicos son extremadamente hostiles sobre los implantes y estos de igual manera sobre los tejidos circundantes, es así que al sustituir un tejido dentario por un material restaurador o la colocación de una prótesis en la cavidad bucal, se establecen condiciones para que estas superficies al estar sumergidas en fluidos sean colonizadas por diferentes microorganismos. La superficie del material y su composición pueden influir en la capacidad de adhesión de los microorganismos y en la formación más o menos rápida de la placa bacteriana.

De esta manera existen diferentes tipos de biomateriales que en su inicio eran esencialmente materiales industriales seleccionados con el único criterio de que fueran biológicamente aceptables, es decir, no tóxicos.

Por otro lado, esto no termina aquí, existe el interés para que dichos materiales no solo no sean tóxicos e inertes, si no que sean biofuncionales y bioactivos, es decir, que se integren en su totalidad con las células del organismo y al mismo tiempo regeneren al tejido, y además que sean capaces de responder a las señales provenientes del medio fisiológico induciendo una respuesta específica de los tejidos circundantes.

Actualmente los biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados pensando en la aplicación médica a la cual serán destinados, es decir, biofuncionales.

1. BIOMATERIALES.

Los biomateriales son sustancias o combinaciones de sustancias, de origen natural o sintético que son diseñadas para interactuar con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del organismo humano. En la literatura inglesa, en lugar de “material de implantación” se utiliza el concepto de “biomaterial”. La Sociedad Europea de Biomateriales (1986) ha definido este concepto de la siguiente forma:

Los biomateriales son materiales no vitales que se utilizan en aplicaciones médicas (por ejemplo implante dental) con la finalidad de obtener una interacción con un determinado sistema biológico (Williams, 2009).

El uso de materiales no biológicos tiene sus primeros antecedentes documentables en el año 3000 a.C., en el antiguo Egipto. También durante las civilizaciones clásicas de Grecia y Roma (siglo VII a.C. a siglo IV d.c.) se usaron materiales no biológicos, en particular, metales y otros materiales naturales para el tratamiento de heridas y de algunas enfermedades (Friedman, 1992).

En la Europa del siglo XVI se empleó el oro y la plata para la reparación dental y más tarde hilos de hierro para la inmovilización de fracturas óseas. Los avances tecnológicos de fines del siglo XIX, en particular el desarrollo de la anestesia, de la cirugía en condiciones estériles y de los rayos X, dieron un fuerte impulso a la búsqueda de metales que pudieran ser utilizados en el interior del cuerpo. Pero a poco tiempo de la aplicación de metales a este fin, aparecieron inconvenientes causados por la corrosión o porque los metales carecían de las propiedades mecánicas necesarias para que el dispositivo cumpliera adecuadamente con la función para la que fue diseñado (Ratner, 1993).

La investigación sistemática y planificada de los materiales útiles para la fabricación de prótesis e implantes sólo surge después de la segunda Guerra Mundial como consecuencia del avance del conocimiento en ciencia y tecnología de materiales. Un factor que impulsó fuertemente el desarrollo de los biomateriales durante este siglo fue el enorme aumento de la demanda producida por la necesidad de rehabilitar a millones de inválidos de guerra. Este aumento ocurrió en paralelo con avances en otros terrenos que crearon condiciones favorables para obtener soluciones eficaces. Entre ellas cabe mencionar a la investigación y desarrollo en general de la disminución del riesgo de infecciones causadas por la aparición de los antibióticos eficaces y los adelantos en el conocimiento de los procesos biológicos desencadenados como consecuencia del contacto de la materia viva con el biomaterial. La observación clínica de que la inclusión de partículas metálicas en los cuerpos de los soldados heridos era bien tolerada, otorgó a los médicos un criterio empírico que justificó el uso de implantes metálicos para corregir daños en el cráneo o para la fijación interna de fracturas (Reichert et al., 2011).

Durante la década de los 60 se publicaron los primeros estudios sobre las lesiones provocadas por la presencia de un implante, e hizo su aparición el término biocompatibilidad para definir el grado de tolerancia del material por parte de la materia viva. La determinación de la biocompatibilidad para cada aplicación específica y para cada sistema formado por material y el medio biológico con el que estará en contacto. A finales de los años 60, los ingenieros ingresaron en los laboratorios de clínica médica, quirúrgica y dental, y sus contribuciones comenzaron a aparecer en la literatura biomédica. El primer simposio de Biomateriales que se celebró en la Universidad de Clemson, en 1969, marca el punto de partida de la necesaria integración de las disciplinas complementarias a la ingeniería y a la medicina para el

desarrollo de materiales biomédicos. La influencia del ingreso de la ingeniería al campo de los biomateriales se evidenció en la aplicación de técnicas para caracterizar la estructura y la superficie de los materiales, a los efectos de correlacionarlos con las respuestas biológicas observadas. La comunidad científica que desarrollaba tareas en este campo se agrupó en diversas sociedades, tales como la Sociedad de Biomateriales (EE.UU) fundada en 1974 y la Sociedad Europea de Biomateriales. En 1978 se efectuó el primer Congreso Internacional sobre Biomateriales y desde entonces se produjo un crecimiento notable en el número de trabajos presentados y el número y nivel de los recursos humanos formados en el área. La inocuidad local y general es un requisito indispensable que debe garantizarse para todos los biomateriales; es decir, no deben resultar tóxicos, cancerígenos, alergénicos ni tampoco radiactivos. Su utilidad como biomaterial se valora sobre la base de los siguientes criterios fundamentales.

Todo biomaterial debe producir una reacción lo más fisiológica posible con los tejidos que lo rodean como son hueso, tejido conjuntivo, epitelio y las interacciones entre estos tejidos, el medio periimplantario no deben provocar alteraciones secundarias en el organismo ni tampoco una inestabilidad biológica del implante como consecuencia de la corrosión, disolución o biodegradación de la superficie del implante. La biocompatibilidad de los materiales dentales se puede definir como: un material que se considera compatible cuando solo provoca reacciones deseadas o tolerables en el organismo vivo o un material de biocompatibilidad óptima no produce ninguna reacción tisular indeseable (Bhat and Kumar, 2013).

Según su origen, los biomateriales pueden ser (Williams, 2009):

- **NATURALES:** son materiales complejos, heterogéneos y difícilmente caracterizables y procesables. Algunos ejemplos son el colágeno purificado, fibras

proteicas (seda, lana), etc... Se incluyen todos aquellos implantes que deben tener un carácter permanente, como son los sistemas o dispositivos utilizados para sustituir parcial o totalmente a tejidos u órganos destruidos como consecuencia de una enfermedad o trauma.

- **SINTÉTICOS:** Los biomateriales sintéticos pueden ser metales, cerámicas o polímeros y comúnmente se denominan materiales biomédicos. Se incluyen los biomateriales degradables de aplicación temporal, es decir, aquellos que deben mantener una funcionalidad adecuada durante un periodo de tiempo limitado, ya que el organismo humano puede desarrollar mecanismos de curación y regeneración tisular para reparar la zona o el tejido afectado.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los diferentes Biomateriales (Williams, 2009).

MATERIALES	VENTAJAS	DESVENTAJAS	EJEMPLOS
Polímeros: silicón, teflón, dacrón, nylon.	Elásticos, fáciles de fabricar, baja densidad.	Mala resistencia mecánica, degradación con el tiempo.	Suturas, nariz, orejas.
Metales: titanio, aceros con bajo contenido de carbón.	Resistencia a esfuerzos de alto impacto, alta resistencia al desgaste.	Corrosión en medios fisiológicos, alta densidad, pérdida de propiedades mecánicas con tejidos conectivos suaves.	Fijación ortopédica: tornillos, clavos, alambres, implantes dentales.
Cerámicas: Óxidos de aluminio, aluminatos de calcio, óxidos de titanio, carbonos.	Inerte, resistencia a la alta corrosión.	Fractura ante esfuerzos de alto impacto, difícil fabricación, baja resistencia mecánica, no elásticos, alta densidad.	Prótesis de cadera, dispositivos transcutáneos.
Compuestos: Cerámica metal-carbono y otros materiales.	Buena compatibilidad, inerte, resistencia a la corrosión, alta resistencia a los esfuerzos	Carecen de consistencia en su fabricación.	Válvulas cardiacas, uniones óseas, marcapasos.

1.1 Infecciones en aditamentos de uso Biomédico.

Las infecciones en aditamentos de uso biomédico son causadas por la proliferación y colonización de microorganismos que se adhieren a un determinado tipo de biomaterial una vez que es colocado en el paciente. Estas infecciones inician con la entrada del patógeno al organismo y continúan con un periodo de incubación y proliferación en el biomaterial. A partir de entonces, el tipo de infección estará determinado por la cantidad del microorganismo, su capacidad de multiplicación y su toxicidad (Monteiro et al., 2009).

Además de esto depende de la interacción de 4 factores esenciales: el microorganismo, los mecanismos de defensa del huésped, el biomaterial y, en su caso, los agentes antimicrobianos. Durante muchas décadas al hablar de infecciones asociadas a los biomateriales, a este, se le concedía un papel secundario y pasivo; sin embargo, hoy en día se destaca la importancia de la naturaleza del biomaterial y qué papel tiene en la proliferación de estas infecciones (Donlan and Costerton, 2002).

Los principales microorganismos asociados a infecciones en aditamentos de uso biomédico son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Dhir, 2013).

2. IMPLANTES DENTALES.

3.1 Antecedentes Históricos.

La implantación se puede definir como el injerto de tejido no vital en un sistema biológico, mientras que el trasplante es el injerto de un tejido vital (Williams, 2009).

Actualmente se entiende por implantología dental el anclaje de material no biológico en los maxilares con objeto de crear elementos de soporte y sujeción que sustituyan las piezas dentales desaparecidas. Los hallazgos realizados durante las excavaciones históricas en Europa, Oriente y América central demuestran que la humanidad ya se ocupaba desde los primeros tiempos de remplazar los dientes desaparecidos por material homo o aloplástico (dientes humanos o de animales, huesos o trozos de marfil o nácar tallados). La finalidad de estas piezas sustitutivas de los dientes era la compensación estética de la pérdida dental, sin embargo, su función masticatoria era nula. El español Albucasim recomendó ya por primera vez el retrasplante y trasplante de los dientes hacia el año 1100 y señaló que éste constituía un método justificable desde el punto de vista médico para la sustitución de las piezas dentales desaparecidas. Este procedimiento se utilizó bastante a menudo durante muchos siglos. De hecho, en el siglo XVIII el trasplante dental de piezas previamente extraídas, mediante compensación, a sujetos jóvenes constituía toda una moda entre los círculos sociales más elevados de Francia y Gran Bretaña, sin embargo, los múltiples fracasos y el peligro de transmisión de ciertas enfermedades como la tuberculosis y la sífilis suscitaron una crítica cada vez mayor a este tipo de trasplantes dentales. (Rose, 2008).

Con el nacimiento de las ciencias naturales en los siglos XVIII y XIX y la aplicación de los conocimientos y métodos científicos al campo de la medicina se

iniciaron numerosas tentativas parar remplazar los dientes desaparecidos mediante el implante de material extraño en el maxilar. Así a finales del siglo XIX algunos autores habían propuesto la implantación de material aloplástico (caucho, oro, porcelana, marfil, etc.) en forma de raíces dentarias en alveolos creados artificialmente (Friedman, 1992).

La falta de entendimiento de la biología ósea llevo a muchos investigadores a intentar nuevas morfologías de los implantes, lo que en ocasiones parecía “arte barroco”. La idea fue que la morfología retentiva compleja llevaría a un anclaje suficiente por medio del crecimiento óseo en espacios plegados. Otros creían que la búsqueda de nuevos materiales biocompatibles ofrecía la solución apropiada. Por medio de una técnica de ensayo y error en los pacientes, se utilizaron aleaciones de metales “preciosos”, materiales de cerámica y carbonos. Aunque en definitiva había compatibilidad, no producía una aposición ósea íntima en la superficie del implante, así que la búsqueda siguió.

A finales de la década de los 50s, Per-Ingvar Branemark, un profesor sueco de anatomía que estudiaba la circulación sanguínea en los huesos y la medula espinal, logró por accidente un avance histórico en la medicina; obtuvo una aposición predecible íntima entre el hueso y el implante que ofrecía suficiente fuerza para tolerar la carga de transferencia y llamo a este fenómeno “oseointegración”. El primer paciente fue tratado por medio de esta técnica debido a una mandíbula inferior desdentada en 1965. Se insertó una serie de implantes comerciales de titanio puro en forma de tornillo en la sínfisis y se dejó cubierto durante varios meses. Entonces se volvieron a abrir los tejidos gingivales y mucosos y se colocaron pilares de titanio, encima de los cuales se podía atornillar una prótesis fija y hacia parecer que todos los implantes estaban anclados de manera firme. El hallazgo azaroso de Branemark consiste en que cuando

se prepara un agujero en el hueso sin sobre calentar o traumatizar los tejidos, se logra una aposición ósea íntima predecible de un dispositivo implantable y biocompatible, siempre y cuando se eviten los micromovimientos en la interfaz durante el periodo de cicatrización. Desde entonces, millones de pacientes de todo el mundo han sido tratados por medio de esta técnica y en distintas ocasiones los implantes utilizados tienen diferentes formas geométricas y características en la superficie (Laney et al., 1986).

2.2 Modificaciones superficiales para Implantes Dentales.

Basados en la importancia de incrementar y controlar las propiedades físicas, químicas y topográficas de las superficies de los implantes, se han desarrollado una gran cantidad de técnicas y metodologías de modificación superficial. Dichas técnicas varían desde métodos específicos de limpieza hasta el depósito de una película delgada sobre el material base, para así incrementar y reducir la adhesión bacteriana (Rodil, 2009).

De acuerdo con Kasemo y Gold (Kasemo and Gold, 1999) las modificaciones superficiales pueden dividirse en tres clases:

- a) Modificaciones topográficas: tales como tamaño y distribución de poros, rugosidad, etc. El cual busca controlar la topografía, ya que a escala tanto micrométrica como nanométrica, tiene efectos relevantes en el comportamiento celular, los cuales incluyen la adhesión celular, la proliferación, diferenciación, la morfología y su orientación espacial, la organización del tejido formado e incluso la selección celular.

- b) Modificación de las propiedades bioquímicas de la superficie: liberación de especies químicas (iones o medicamentos) adsorción de biomoléculas (proteínas o factores de crecimiento). El objetivo es lograr una superficie activa que interactúe fuertemente con el tejido circundante. Un ejemplo característico es el desarrollo de recubrimientos que liberan medicamentos de manera controlada, los cuales son inyectados directamente al torrente sanguíneo actuando como agente adelgazador el cual reduce la formación de coágulos.
- c) Modificación de las propiedades micro mecánicas o viscoelásticas de la superficie. Se busca aumentar el tiempo de vida de los implantes a través de mejorar la resistencia al desgaste, aunque también puede mejorarse la funcionalidad a través de una mejor distribución de los esfuerzos mecánicos.

Los fluidos orgánicos son extremadamente hostiles a los materiales metálicos, su efecto sobre los implantes y de éstos sobre los tejidos circundantes, es de fundamental importancia, tenerla tendencia termodinámica a corroerse, aunque sin embargo, poseen en común la formación de una película protectora que es capaz de mantener los niveles de corrosión en valores aceptables de manera que estos valores sean bajos para una aplicación concreta, puesto que los productos de corrosión pueden resultar tóxicos para los tejidos (Williams, 1971).

La eficacia de la película superficial depende de la resistencia de las capas de pasivación a la ruptura y de la capacidad de repasivación de los materiales bajo estudio en el medio de trabajo. El uso de metales está a su vez condicionado por la agresividad del medio fisiológico y puede originar la liberación de productos de degradación y/o desgaste no deseados en el organismo (Williams, 1971).

A pesar de los numerosos avances realizados, las soluciones aceptadas distan mucho de ser perfectas, en especial en cuanto al material se refiere. Así, los aceros inoxidable son mayoritariamente utilizados a nivel mundial en implantes temporales en casos de fracturas óseas (DeVasConCellos et al., 2012).

La necesidad de reducción de costos en los servicios de salud pública ha redundado en el uso masivo del acero inoxidable como la opción más económica dentro de las aleaciones metálicas usadas. Sin embargo, se han encontrado respuestas adversas en los tejidos circundantes al implante mostrando encapsulación y membranas fibrosas en el entorno de la prótesis, además de numerosas fallas en la zona cabeza cuello de las prótesis. Es importante destacar además, que la composición de los óxidos protectores se relaciona con el comportamiento a la corrosión de las aleaciones. Se requiere entonces, una caracterización detallada de estas superficies para optimizar la biocompatibilidad de las aleaciones de uso quirúrgico. El acero inoxidable es utilizado únicamente para implantes temporales debido a que se sabe que su resistencia a la corrosión en medio fisiológico no es tan buena como la de otras aleaciones. Sin embargo, el empleo de aleaciones de aceros inoxidables para implantes permanentes en países en vías de desarrollo es habitual. Por lo tanto, es necesario incrementar el conocimiento acerca del comportamiento frente a la corrosión de este material así como de las características de la capa superficial generada en medio fisiológico con el fin de poder controlar la toxicidad potencial de la liberación de iones metálicos en el organismo (Williams, 1971).

Otro tipo de recubrimiento cerámico que ha sido estudiado por una gran variedad de grupos alrededor del mundo son las películas de carbono amorfo (Roy and Lee, 2007).

El hecho de que la capa superficial del biomaterial esté compuesta de principalmente del componente elemental de los tejidos vivos es una razón bastante atractiva, además de inducir la proliferación y la diferenciación de osteoblastos, la biomineralización sobre estas mismas superficies, permite el crecimiento de la matriz extracelular y se analizan los procesos de diferenciación celular y señalamiento de proteínas asociadas al proceso de crecimiento de hueso (mineralización). Se ha demostrado que sobre el carbono amorfo las células se diferencian e inician el proceso de mineralización en mayor proporción que sobre el titanio o el acero, es decir, el carbono amorfo es osteoinductivo (Rodil et al., 2003).

2.3 Perimplantitis.

Se define como la pérdida ósea periimplantaria progresiva con inflamación asociada de las partes blandas (European Federation of Periodontology, Ittingen, 1993)

Lindhe en 1992 describe que las lesiones en los tejidos blandos alrededor de los implantes son potencialmente más peligrosas que con respecto a los dientes ya que tienden a extenderse apicalmente con mayor facilidad hacia el tejido óseo periimplantario, el fracaso de los implantes puede ocurrir en dos fases:

La primera fase o la pérdida prematura del implante se producirá cuando este aún no haya llegado a oseointegrarse a consecuencia de diferentes factores de riesgo tales como una pobre estabilidad primaria, contaminación bacteriana, enfermedades sistémicas, hábitos tabáquicos, mala técnica quirúrgica, mala calidad ósea, etc.

La segunda etapa en la que puede producirse la pérdida del implante es cuando éste ya está osteointegrado y en función. En esta segunda hablaríamos de perimplantitis y existen dos factores etiológicos que son la infección bacteriana y la sobrecarga oclusal o una combinación de ambos (Lindhe et al., 1992).

2.4 Microbiología asociada a la Periimplantitis.

La flora bacteriana en la cavidad oral antes de la colocación de implantes oseointegrados va a determinar la composición de la nueva microbiota que se va a formar alrededor de los mismos. Las bacterias de la cavidad oral se acumulan en los tejidos periimplantarios y desencadenan en ellos una reacción inflamatoria, provocando daño tisular mediante diversos mecanismos:

- Toxicidad de sus propios componentes: como las endotoxinas o los lipopolisacáridos, o con producción de sustancias nocivas como colagenasas, fosfatasas ácidas, fosfolipasas, fosfatasas alcalinas y proteasas.

- Estimulación de la inmunidad humoral y celular: activación de los macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, Linfocitos T y células plasmáticas que mediante la reacción inflamatoria estimulan procesos de destrucción de tejidos periimplantarios.

Como consecuencia del acúmulo de placa bacteriana tanto las bacterias como sus productos atraviesan la barrera mucosa que tiene función de sellado. A partir de este momento, se inicia el proceso inflamatorio que cursa con la destrucción del colágeno y el hueso alveolar. Los mecanismos de destrucción ósea se caracterizan por la inflamación y la actividad osteoclástica que va a provocar la reabsorción del hueso que se encuentra en contacto íntimo con el implante.

Existen 3 líneas de evidencia que soportan la idea del papel fundamental de los microorganismos en la etiología de la periimplantitis (Ata-Ali et al., 2011):

- 1.- Los depósitos de placa en implantes puede inducir mucositis periimplantaria, tal y como se demostró en el modelo clásico de gingivitis experimental descrito por Lee en 1965 que representa la prueba final de la relación causa efecto entre el acúmulo de

placa y la gingivitis. El resultado de acúmulo de placa se traduce en un aumento de la inflamación y de la profundidad del sondaje alrededor de los implantes, demostrando así la relación entre la del acúmulo de placa y el desarrollo de la periimplantitis.

2.- Factor de asociación a las situaciones de éxito y fracaso de implantes presentan diferencias marcadas en la composición de la flora asociada. La flora bacteriana que coloniza los implantes exitosos está constituida por cocos Gram positivos, mientras que en los casos de fracaso de implantes se encuentran bacterias Gram negativas anaerobias tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, fusobacterias y espiroquetas. Los estudios longitudinales han demostrado que la cantidad de bacterias presentes en los casos de éxito de implantes es baja y la composición de la flora no cambia respecto a la situación normal. Varios estudios microbiológicos indican una marcada diferencia en la composición de la flora periimplantaria entre implantes con surcos o bolsas profundas que aquellos que carezcan de ella y en los que la profundidad sea menor.

3.- Los pacientes con inadecuada técnica de higiene oral, presentan mayor reabsorción ósea alrededor de los implantes, implica el hecho de que un buen mantenimiento de los pacientes rehabilitados con implantes tiene como objetivo eliminar los depósitos bacterianos, evitar la colonización de la bacterias y alterar la ecología de la adhesión alrededor de los implantes de forma que se impida la multiplicación de los patógenos potenciales (Lee and Wang, 2010).

3. ADHESIÓN BACTERIANA Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN BIOMATERIALES.

La adhesión bacteriana es la interacción inicial entre la bacteria y la superficie la cual implica fuerzas físico químicas no específicas tales como fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y polaridad. La superficie bacteriana es compleja y en ellas se encuentran tanto residuos cargados como residuos hidrofóbicos. Sin embargo, los materiales inertes insertados en el huésped pueden quedar rápidamente recubiertos por proteínas o glucoproteínas procedentes del mismo huésped. Así pues, la adherencia inicial sobre material protésico puede ocurrir sobre material virgen o sobre materiales recubiertos con macromoléculas derivadas del huésped (Gristina, 1987).

Cuando la bacteria alcanza la piel o las mucosas deben disponer de mecanismos de adherencia para poder colonizarla. Este aspecto es especialmente importante en áreas como la boca, el intestino y las vías urinarias donde las mucosas están sometidas a un flujo de líquidos que tienden a arrastrar las bacterias no adheridas. En estas áreas, sólo las bacterias con capacidad para fijarse a la superficie permanecerán en ellas. De manera genérica las estructuras bacterianas que median este proceso de adherencia reciben el nombre de adhesinas. Probablemente, el mecanismo de adherencia bacteriana que presenta la mayoría de bacterias Gram negativas y que está mediado por unas estructuras denominadas fimbrias o pilis. A través de ella la bacteria contacta con la superficie del biomaterial. Normalmente, la proteína localizada en el extremo de la fimbria es la adhesina propiamente dicha que se adhiere a un receptor de la célula huésped constituido por regla general por residuos de hidratos de carbono de glucoproteínas o glucolípidos. Ocasionalmente, la propia proteína mayoritaria de la fimbria actúa como adhesina. El ensamblaje de la fimbria en

la pared celular es un proceso complejo en el cual intervienen una serie de proteínas auxiliares. Se observa la síntesis y ensamblaje de la fimbria, necesaria para la colonización. La adhesina es la proteína que primero es transportada al exterior y, posteriormente, se establece el cuerpo de la fimbria por adición secuencial de la proteína mayoritaria. Ciertas bacterias Gram negativas poseen proteínas localizadas en la membrana externa que tienen un papel importante en la adherencia, se trata de las denominadas adhesinas afimbriadas. La adherencia a se produce en dos pasos. En el primer paso la interacción se realiza mediante la fimbria, y en un segundo paso tiene lugar una unión más intensa en la que intervienen las adhesinas afimbriadas (Lasa et al., 2005).

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento de las biopelículas representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Un ejemplo cotidiano de las biopelículas lo constituye la placa dental, cada día nos esforzamos por combatir la película de bacterias que recubre la superficie de los dientes para evitar un desarrollo excesivo de microorganismos que puede provocar un deterioro del esmalte dental (Donlan, 2001).

La capacidad de formación de biopelícula no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biopelícula.

Aunque la composición de la biopelícula es variable en función del sistema, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se

encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Vila et al., 2008).

La biología de la biopelícula se centra en su ciclo vital e interacciones con el medio ambiente. El ciclo vital es un proceso dinámico que puede ser dividido en 3 partes: adhesión, crecimiento y separación o desprendimiento. Durante la primera fase, el substrato tiene que ser adecuado para la adsorción reversible y finalmente, la adhesión irreversible de la bacteria a la superficie. Las bacterias una vez que perciba una superficie, proceden a formar una unión activa como fimbrias, flagelos o pili. Las fimbrias, probablemente luego de superar la barrera de repulsión electrostática inicial que existe entre el germen y el sustrato, contribuyen a la adhesión bacteriana (Lasa et al., 2005).

La motilidad, otorgada por flagelos, ayudara a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente. Sin embargo, la motilidad no parecería ser un requisito esencial, puesto que bacterias Gram positivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y micobacterias, también poseen la capacidad de formar biofilm. En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito, en esta primera etapa, la participación de proteínas de superficie (Vila et al., 2008).

La adhesión de bacterias a una superficie ocurrirá más fácilmente en aquellas más ásperas, más hidrofóbicas y más recubiertas. Se ha descrito que la colonización microbiana parece incrementar a medida que aumenta la aspereza de la superficie. Esto sería debido a que están reducidas las fuerzas de deslizamiento, y el área de superficie se torna mayor (Katsikogianni and Missirlis, 2004).

Las propiedades físico-químicas de la superficie también pueden ejercer una fuerte influencia en el grado y extensión de la formación. Se ha encontrado que los

gérmenes se forman más rápidamente sobre superficies hidrofóbicas, no polarizadas, como lo es el teflón y otros plásticos, en comparación con materiales hidrofílicos, como vidrio o metales. Aparentemente se produciría algún tipo de interacción hidrofóbica entre la superficie celular y la del sustrato que permitirían a la bacteria superar las activas fuerzas de rechazo a cierta distancia de la superficie del sustrato, y lograr adherirse irreversiblemente (Keatch et al., 2012).

Durante la segunda fase o de crecimiento, la bacteria, una vez adherida, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia, similar al proceso de formación de colonias en placas de agar. A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, las bacterias comienzan a elaborar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula y éste comienza a desplegarse en una formación tridimensional, generando estructuras similares a setas.

Finalmente, en la tercera etapa, luego que la biopelícula ha alcanzado la madurez, algunas células, ya sea aisladamente o en conglomerados bacterianos, se liberan de la matriz para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de formación y desarrollo. El desprendimiento puede ser resultado de fuerzas externas a la biopelícula o de procesos activos inducidos por éste. La separación proporcionaría un mecanismo para que las bacterias migren desde zonas densamente colonizadas a áreas que podrían favorecer mejor su desarrollo, logrando así formar nuevas biopelículas en sitios distantes (Donlan, 2002).

3.1 Papel de *Staphylococcus aureus* en el desarrollo de infecciones en aditamentos de uso biomédico y dental.

Los biomateriales implantados son susceptibles a infecciones bacterianas. La sepsis no sólo puede resultar en el desprendimiento y posterior fracaso de un dispositivo implantado (por ejemplo, un conjunto de prótesis), pero también pueden causar morbilidad significativa, incluyendo drenaje crónico, dolor y pérdida de función, la amputación y la muerte.

Las cepas de *S. aureus* representan una proporción significativa aproximadamente el 35.5% de todos los patógenos que causan infecciones asociadas a implantes y el enlace a tejidos del huésped y las proteínas del plasma es de fundamental importancia en el desarrollo de infecciones en el sitio de implante. La adsorción de la bacteria a un implante depende de características de biomaterial incluyendo rigidez, topografía, hidrofobicidad, carga, estructura y composición de la superficie. Estas características de los biomateriales son probablemente más relevantes a la probabilidad de deposición de bacterias en el material (Gristina, 1987).

El tipo de adhesión inicial en el material inerte es reversible si no se sigue de un segundo paso de adherencia específica, adhesina-receptor; *S. aureus* expresa adhesinas específicas que reconocen algunas proteínas del huésped. Las proteínas humanas que pueden servir de receptor para estas bacterias son proteínas y glucoproteínas del plasma y del tejido conectivo, especialmente fibronectina, fibrinógeno y fibrina, sin embargo, tiene menor capacidad de adherencia a biomateriales recubiertos de glucoproteínas humanas y su interacción con los plásticos parece estar mediada en mayor medida por interacciones hidrofóbicas. De hecho, la adherencia de *S. aureus* a fibrinógeno está mediada por una proteína de unión al

fibrinógeno. El dominio de fibronectina que actúa como receptor está situado cerca del dominio de unión de la heparina, lo que explica parcialmente la disminución de la adherencia de *S. aureus* en presencia de la misma. La fibronectina no promueve la adherencia de esta bacteria o catéteres intravasculares *in vitro*. En el curso de la colonización de los catéteres, los estafilococos producen grandes cantidades de una sustancia mucosa que cubre a las bacterias y las protege frente a los mecanismos de defensa y los antimicrobianos, constituyendo lo que se denomina una biocapa (Vila et al., 2008).

3.2 Papel de *Pseudomonas aeruginosa* en el desarrollo de infecciones en aditamentos de uso biomédico y dental.

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram-negativo ambiental común que actúa como un patógeno oportunista en varias circunstancias. La presencia ubicua de *P. aeruginosa* en el medio ambiente (Green et al., 1974) ,se debe a varios factores, incluyendo su capacidad para colonizar varios nichos ambientales y para utilizar muchos compuestos ambientales como fuentes de energía.

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* pueden estar asociadas con el compromiso de defensa del huésped, mientras que muchos casos de infección puede atribuirse a la inmunosupresión general como en pacientes con SIDA (Franzetti et al., 1992) y en pacientes neutropénicos que reciben quimioterapia (Bendig et al., 1987), estas situaciones predisponen al huésped a una variedad de infecciones bacterianas y fúngicas, y por lo tanto no proporcionar información que es específica a la patogénesis de *P. aeruginosa*. Tres de las enfermedades humanas más causadas por *P. aeruginosa* son: 1) la bacteriemia en víctimas de quemaduras graves, 2) la infección

pulmonar crónica en los pacientes con fibrosis quística, y 3) la queratitis ulcerativa aguda en el uso prolongado de lentes de contacto. Observaciones y evaluación experimental de diversos factores de virulencia bacterianos han arrojado que *P. aeruginosa* es capaz de causar enfermedades en una amplia variedad de órganos, secundaria a la interrupción de la función fisiológica normal. Estas ideas proporcionan una comprensión a nivel molecular y celular de cómo y por qué *P. aeruginosa* se ha convertido en un patógeno tan importante en la infección humana (Lyczak et al., 2000).

3.3 Papel de *Escherichia coli* en el desarrollo de infecciones en aditamentos de uso biomédico y dental.

Este organismo causa entre el 70 y el 95% de las infecciones. Estas infecciones son especialmente frecuentes debido a la adherencia del microorganismo sobre la superficie. Se ha observado que la movilidad flagelar tienen un papel importante en la colonización, se identificó la fimbria como una estructura necesaria para que se produzca la adherencia de *E. coli* a superficies inertes. En condiciones de crecimiento estático, la fimbria permite una interacción estable entre la bacteria y diversas superficies. La adherencia estable es un requisito para la formación de biocapas en estas superficies.

La cinética de la adherencia de diferentes microorganismos a catéteres hechos de distintos materiales puede variar. Comparando la adherencia de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* a catéteres hechos de PVC, teflón, latex siliconizado y poliuretano demostraron que el PVC era el material en el que estos microorganismos presentaban mayor adherencia, mientras que los estafilococos presentaban una menor adherencia sobre los poliuretanos (Widmer et al., 1991).

4. USO DE LA PLATA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

Los antimicrobianos son sustancias naturales o sintéticas, orgánicas e inorgánicas que inhiben el crecimiento de los microorganismos (bacterias y hongos y levaduras, virus, protozoos). Su eficacia depende de parámetros como su concentración, tipo de microorganismo y de sustrato, además de temperatura, pH, humedad y niveles de oxígeno. Para ser eficaces, los iones de plata deben interactuar con el microorganismo y penetrar en él (Bhat and Kumar, 2013).

La plata es un material usado desde la antigüedad por sus propiedades antimicrobianas. Hipócrates, el padre de la medicina moderna, escribió la plata tenía curación y las propiedades beneficiosas contra la enfermedad. Los fenicios almacenaban agua, vino y vinagre en frascos de plata para evitar que se deterioraran.

A principios de 1800, los médicos utilizan suturas de plata en las heridas quirúrgicas con resultados muy exitosos. En Estados Unidos descubrieron que si colocaban monedas de plata o de cobre en sus barriles de agua potable, mantenían el agua libre de bacterias, algas, etc. A principios de 1900 personas ponían dólares de plata en botellas de leche para prolongar la frescura de la misma. Compuestos de plata fueron utilizados con éxito para prevenir la infección en la I Guerra Mundial (antes de la era de los antibióticos). En 1940 había aproximadamente cuatro docenas diferentes compuestos de plata en el mercado se utiliza para tratar todas las enfermedades infecciosas conocidas (Klasen, 2000a).

Las acciones antibacteriales y antivirales de la plata, el ión de plata y compuestos de plata no han sido muy investigados. Sin embargo, se sabe que en concentraciones pequeñas la plata no es tóxica para las células humanas.

La oxidación catalítica por reacción probablemente contribuye a su efecto bactericida. Los microorganismos son poco probable que desarrollen resistencia contra la plata, como lo hacen contra antibióticos convencionales, porque el metal ataca a una amplia gama de objetivos en los microorganismos, lo que significa que tendrían que desarrollar una serie de mutaciones simultáneamente para protegerse. Así, los iones de plata han sido usados como un componente antibacteriano en composites de resina dental, en zeolitas sintéticas y en revestimientos de dispositivos médicos (Klasen, 2000b). Literatura reciente informa resultados alentadores acerca de la actividad bactericida de nanopartículas de plata en contra de bacterias Gram-negativas (Zheng et al., 2012).

Los iones de plata actúan interfiriendo en la permeabilidad gaseosa de la membrana (respiración celular) y una vez en el interior de la célula, alteran su sistema enzimático, inhibiendo su metabolismo y producción de energía y modificando su material genético. El resultado es que el microorganismo pierde rápidamente toda capacidad de crecer y reproducirse. Una de las virtudes de la plata es que constituye un antimicrobiano de amplio espectro, la plata iónica destruye las bacterias, hongos, virus y protozoos, aunque es menos activa frente a microorganismos más resistentes, como las esporas. Además, los estudios revelan que es muy poco probable que los microorganismos desarrollen algún tipo de resistencia al tratamiento. Son ecológicos, permanentes y no contaminantes. Los iones de plata quedan atrapados en un sustrato matriz o film protector desde donde actúan. A diferencia de otros productos desinfectantes químicos, su actividad es continua y duradera, no eliminándose a través de la limpieza del producto tratado, además, su efecto es limpio e inocuo para otros seres vivos (Baker et al., 2005).

Las nanopartículas de plata son atractivas porque no son tóxicos para el ser humano a concentraciones bajas y tienen acciones antibacterianas de amplio espectro. Se sabe que los híbridos de nanopartículas de plata utilizados en el tratamiento de tejidos humanos aumentan la proliferación de los linfocitos, presumiblemente debido a la activación de las células inmunes (Lara et al., 2010). La creciente proliferación de los linfocitos también aumenta el proceso inflamatorio in situ, contribuyendo en las heridas. El desarrollo del proceso inflamatorio en el tejido ayuda a activación de defensas contra la invasión de microorganismos (Tian et al., 2007).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Ante la necesidad de mejorar las propiedades mecánicas y biológicas de los implantes dentales, se ha experimentado con diferentes materiales con la finalidad de no solo sustituir el órgano dentario sino también de brindar un material con excelentes características biocompatibles y que no sean fácilmente colonizados por bacterias que puedan causar infecciones y la pérdida prematura del implante.

Con los diferentes biomateriales diseñados para la realización de implantes dentales, se ha descubierto que la plata ha sido un material usado para detener la proliferación de la infecciones en diferentes partes del cuerpo. Por lo que en este estudio pretendemos observar el efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata sobre superficies de acero inoxidable de grado medico 316L.

III. HIPÓTESIS

La adición de nanopartículas de plata a películas de carbono amorfo depositadas sobre superficies de acero inoxidable de grado médico (316L), disminuirá la adhesión y proliferación de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la adhesión de bacterias implicadas en infecciones de aditamentos de uso biomédico sobre superficies de acero inoxidable de grado medico 316L modificadas con nanopartículas de plata embebidas en una matriz de carbono amorfo.

Objetivos específicos.

- Determinar la adhesión de *Escherichia coli* sobre las superficies modificadas con tres diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en una matriz de carbono amorfo.
- Determinar la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* sobre las superficies modificadas con tres diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en una matriz de carbono amorfo.
- Determinar la adhesión de *Staphylococcus aureus* sobre las superficies modificadas con tres diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en una matriz de carbono amorfo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y preparación de las muestras.

Las muestras experimentales fueron preparadas en el Laboratorio de Materia Condensada y Criogenia del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Las superficies experimentales están descritas en la Tabla 2. Las superficies rugosas con películas de carbono amorfo (a-C) se depositaron sobre discos de acero inoxidable de grado médico AISI 316L (SS) de 15 mm de diámetro con una rugosidad promedio de 0.02 μm .

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

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

Las películas de a-C adicionadas con nanopartículas de plata fueron producidas utilizando la misma técnica de magnetron sputtering, con la diferencia de que el blanco utilizado fue un cátodo de grafito de 4 pulgadas de alta pureza al que se le adiciono un fragmento de plata pura. Las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata adicionadas a las películas de carbono amorfo, fueron obtenidas mediante modificaciones en las condiciones de depósito como tiempo y potencia.

Tabla 2. Superficies Experimentales

Código	Superficies
a-C	Película con carbono amorfo
a-C:Ag1	Película con carbono amorfo y 7 % nanopartículas de plata
a-C:Ag2	Película con carbono amorfo y 5 % nanopartículas de plata
a-C:Ag3	Película con carbono amorfo y 2 % nanopartículas de plata

Ensayos de adhesión bacteriana.

Todos los experimentos de adhesión bacteriana y formación de biopelículas fueron realizados en el Laboratorio de Biología Periodontal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Tres cepas bacterianas de referencia fueron utilizadas para los experimentos de adhesión bacteriana y formación *in vitro* de las biopelículas (Tabla 3).

Las especies se cultivaron en agar enriquecido TSA (Trypticase Soy Agar, Bioxon, Becton Dickinson), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina, en una incubadora Felisa a 34° C, durante 24 a 48 horas. Cada una de las cepas fue propagada y transferida hasta obtener cultivos puros.

Tabla 3. Especies bacterianas de referencia utilizadas.

Especie	ATCC
<i>Escherichiacoli</i>	11775
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	10752

Las superficies experimentales fueron colocadas en pozos de cultivo individuales y se agregó 1800 μL de TSB (Trypticase Soy Broth, BBL, Becton Dickinson). Se rasparon las placas de cada uno de los microorganismos para obtener una suspensión bacteriana ajustada a una densidad óptica de uno a 600 nm ($\text{OD}=1$) de cada una de las cepas. Después se colocaron 200 μL de la cepa correspondiente en los pozos de cultivo con las superficies y una vez sembradas las bacterias en todas las superficies, se metieron en la incubadora durante 24 horas a 37°C .

Posteriormente, se sacaron las muestras de la incubadora y se realizaron tres lavados a las muestras con 1000 μL de TSB. Después de los lavados, las superficies utilizadas para hacer el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs) fueron transferidas a una nueva caja de pozos de cultivo y se colocaron 1000 μL de TSB en cada uno de los pozos para ser sonicadas.

Se procedió a realizar la sonicación de las muestras en 5 periodos de 15 segundos cada uno y se transfirieron 100 μL del sobrenadante de la muestra sonicada a tubos eppendorf previamente marcados y pipeteados con TSB de acuerdo con las diluciones correspondientes (-1 (900 μL), -3 (990 μL), -4 (900 μL), -5 (900 μL)) para realizar diluciones seriadas.

De los tubos con cada una de las diluciones se tomaron 100 μL para colocarlos de manera individual en las cajas petri con TSA previamente marcadas. La suspensión colocada se extendió sobre toda la superficie con ayuda de una pipeta pasteur estéril con ángulo de 90° y posteriormente se colocaron las cajas en la incubadora por 24 horas a 37°C .

Después de la incubación, se procedió a hacer el conteo de las UFCs por visualización directa y se registraron los resultados en una hoja de excel para posteriormente ser analizados.

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

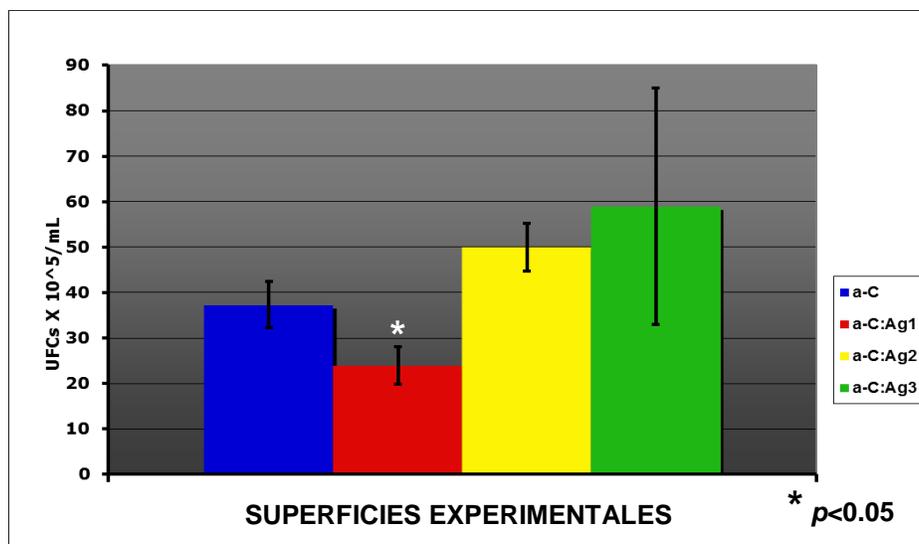
Los datos microbiológicos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (EEM) del número de unidades formadoras de colonias (UFCs) $\times 10^5$. Los análisis para determinar las diferencias en la cantidad de bacterias adheridas entre cada una de las superficies analizadas se llevaron a cabo mediante la prueba ANOVA.

VII. RESULTADOS.

En este estudio se analizó la adhesión bacteriana a superficies de acero inoxidable de grado medico modificadas con carbono amorfo y adicionadas con nanopartículas de plata.

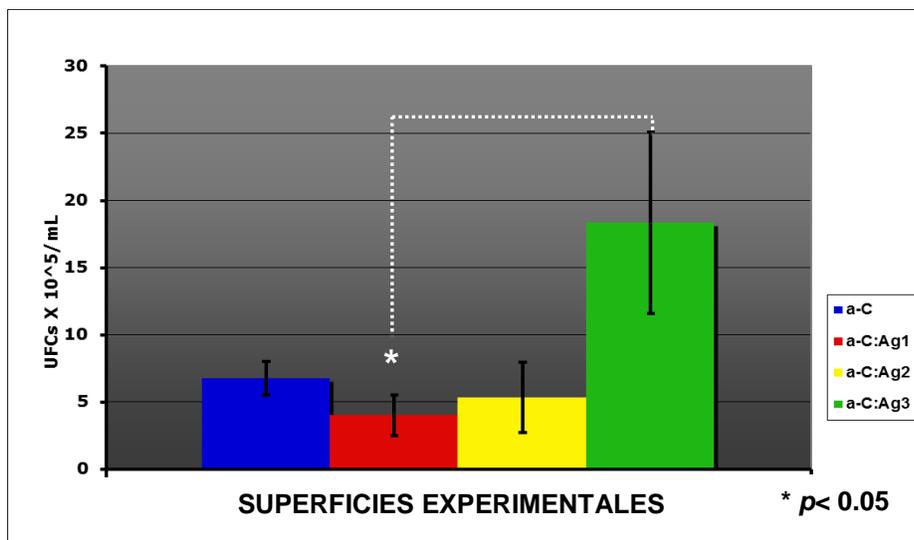
En la figura 1 se muestra la adhesión bacteriana de *E. coli* en las superficies de carbono amorfo (a-C) y las superficies de carbono amorfo adicionadas con diferentes concentraciones de plata. Como se puede observar, el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) de *E. coli* fue significativamente menor en la superficie a-C:Ag1 ($p < 0.05$) que es la superficie de carbono amorfo adicionada con nanopartículas de plata al 7% (24.0×10^5), en comparación con las detectadas en la superficie a-C:Ag2 adicionada con nanopartículas de plata al 5% (50.0×10^5) y a-C:Ag3 adicionada con nanopartículas de plata al 2% (59.0×10^5). La superficie a-C, presentó un número de 37.3×10^5 . Las diferencias encontradas reflejan que a mayor concentración de nanopartículas de plata, fue menor la adhesión bacteriana.

Figura 1. Adhesión bacteriana de *E. coli*.



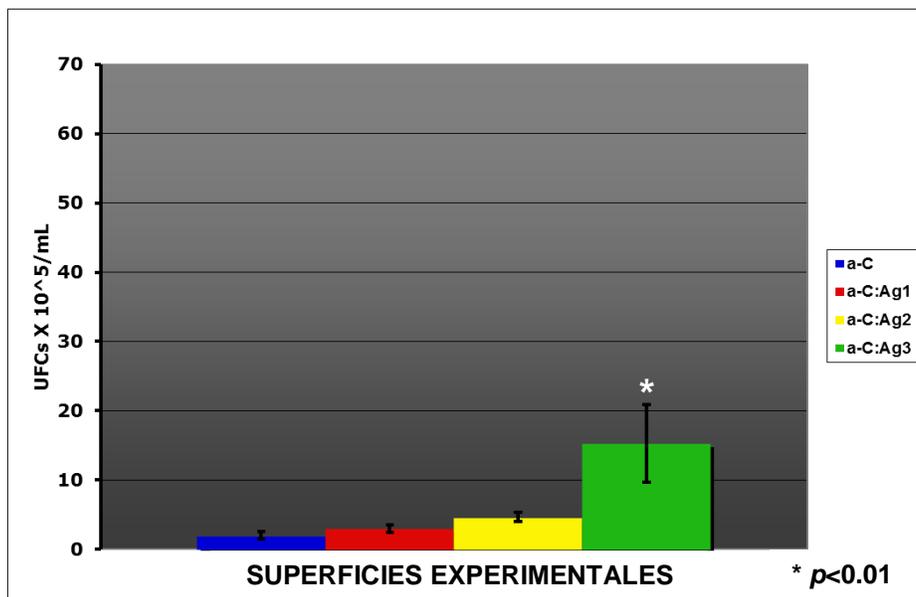
En la figura 2 se observa el número de UFCs de *P. aeruginosa* detectadas en las superficies experimentales. De igual manera, se encontró un menor número de bacterias en la superficie adicionada con nanopartículas de plata al 7% (4.0×10^5) y una mayor adhesión bacteriana en las superficies adicionadas con nanopartículas de plata al 5% (5.3×10^5) y al 2% (18.0×10^5). Aunque hubo una menor adhesión de *P. aeruginosa* sobre las superficies a-C:Ag1, a-C:Ag2 y a-C comparándolo con el número de UFCs encontrado en la superficie a-C:Ag3, la única diferencia estadísticamente significativa se encontró entre las superficies a-C:Ag1 y a-C:Ag3 ($p < 0.05$).

Figura 2. Adhesión Bacteriana de *P. aeruginosa*.



En la figura 3 se observa que *S. aureus* tuvo una menor adhesión en la superficie modificada sólo con carbono amorfo con un número de UFCs de 2.0×10^5 y en las superficies adicionadas con nanopartículas de plata al 7% con 3.0×10^5 , 5 % con 4.7×10^5 y 2 % con 15.3×10^5 . Se encontraron diferencias significativas entre las superficies a-C, a-C:Ag1 y a-C:Ag2 contra la superficie a-C:Ag3. *S. aureus* parece tener muy poca adhesión bacteriana a las superficies modificadas con carbono amorfo y carbono amorfo con plata por lo menos en las primeras 24 horas, sin embargo, en la superficie adicionada con nanopartículas de plata al 2% presentó una mayor adhesión bacteriana.

Figura 3. Adhesión Bacteriana de *S. aureus*.



En base a las gráficas obtenidas de adhesión bacteriana a las superficies experimentales se determinó en primer lugar que *E. coli* se adhirió en mayor proporción a las superficies experimentales en comparación de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

En un resultado mucho más específico, en la adhesión de estas tres bacterias a las superficies experimentales, se observó que se tienen una mayor resistencia a la adhesión en las superficies de a-C:Ag al 7% sobre *E. coli* y *P. aeruginosa*, a diferencia de las superficies de a-C:Ag al 2%, lo cual se esperaba ya que tienen una mayor concentración de nanopartículas de plata.

Otro resultado interesante fue que *S. aureus* presentó menos adhesión sobre la superficie modificada con carbono amorfo y mucho más adhesión sobre la superficie adicionada con nanopartículas de plata al 2 % durante las primeras 24 horas de incubación.

VIII. DISCUSIÓN.

Existen diversas investigaciones realizadas sobre la prevención de infecciones asociadas a los implantes dentales, y aunque hay muchos recubrimientos antimicrobianos que han sido estudiados, la mayoría de ellos son propensos a degradarse rápidamente en el entorno físico, además muchos recubrimientos dependen también de la liberación de agentes antimicrobianos como los antibióticos, que pueden causar problemas de seguridad con respecto a las tasas de liberación y resistencia a los antibióticos. (Wang et al., 2004).

Las limitaciones en el uso de técnicas quirúrgicas y antibióticos profilácticos en implantes dentales para penetrar en el hueso y en la encía, implican que el implante puede ser un importante portal de entrada microbiana. Por lo tanto las superficies de los implantes idealmente deben tener propiedades antimicrobianas sin liberar agentes antibióticos a un ritmo demasiado rápido, así como también deben tener beneficios para la osteogénesis, como lo es el Carbono, ya que es el elemento principal de los tejidos vivos (Wang et al., 2004).

Se ha estudiado la biocompatibilidad de las diferentes formas de carbono, demostrando un gran potencial como una modificación superficial para implantes de uso biomédico, además de que las células se diferencian e inician el proceso de mineralización en mayor proporción que sobre el titanio o el acero, lo que indica que es un gran osteoinductivo (Rodil et al., 2003).

Es así que este estudio buscó analizar la adhesión bacteriana sobre superficies de carbono amorfo y por otra parte el efecto que tuvo la adición de nanopartículas de plata en la colonización bacteriana de tres especies relacionadas con infecciones en dispositivos biomédicos.

Un estudio compara la adhesión de bacterias propias del medio oral en superficies de carbono amorfo y superficies de titanio (Almaguer-Flores et al., 2010). En este estudio concluyen que las superficies de titanio presentan menor adhesión cuando las diferentes especies bacterianas del medio oral son probadas en conjunto, en comparación de carbono amorfo e incluso que el acero inoxidable de grado médico. Otro resultado interesante fue que al analizar por separado la adhesión de diferentes especies encontró que dependiendo de la cepa bacteriana, el carbono amorfo tenía menor adhesión en comparación con las superficies de titanio. En comparación con nuestro estudio el cual analizo tres diferentes especies bacterianas representativas de las infecciones sobre dispositivos de uso biomédico, se observó que las especies bacterianas *E. coli* y *P. aeruginosa* tuvieron una menor adhesión a las superficies con mayor concentración de nanopartículas de plata, además que *S. aureus* presento una menor adhesión sobre la superficie de carbono amorfo.

Otro estudio comparó la adhesión bacteriana de siete especies diferentes (entre ellas estafilococos, pseudomonas y estreptococos) en superficies de acero inoxidable y carbono amorfo, los autores concluyen que no había diferencias significativas de la adhesión bacteriana entre las dos superficies probadas, más aún, en el análisis particular de cada especie bacteriana, encontraron que las especies de *Staphylococcus* tuvieron mayor afinidad a las dos superficies, en comparación con las especies de *Pseudomonas* y *Streptococcus* (Soininen et al., 2009). En relación con este estudio, se observó que *S. aureus* tuvo una menor afinidad a las superficies carbono amorfo, al menos durante las primeras 24 horas.

Otro estudio encontró que la actividad antibacteriana de la plata contra *E. coli* fue más alta que contra *S. aureus*, lo cual atribuyen a que las bacterias Gram negativas tienen paredes celulares más delgadas y por lo tanto son más propensas a la

destrucción física (Liu et al., 2010). En comparación con nuestro estudio se observó que *S. aureus* presentó menor adhesión a las superficies adicionadas con nanopartículas en comparación de *E. coli* y *P. aeruginosa*, lo cual indicó que a mayor concentración de nanopartículas de plata menor fue su adhesión sobre las superficies, pero más aún se observó que *S. aureus* presentó menor adhesión sobre las superficies de carbono amorfo en comparación con de plata.

Las nanopartículas de plata se consideran más activas debido a su gran relación con la superficie, se ha indicado que las nanopartículas de plata incrustadas en titanio pueden ser altamente eficaces en la inhibición de *S. aureus* y *E. coli* (Cao et al., 2011). En comparación en nuestro estudio, se observó que *S. aureus* tiene una menor afinidad que *E. coli* y *P. aeruginosa*, por las superficies de carbono amorfo. Además se observó que a mayor concentración de nanopartículas de plata menor era la adhesión a estas superficies.

Otro ensayo un poco más específico al medio oral, mostró que el 93.9% de *S. mutans*, el 93.5% de *P. gingivalis* y el 89.7 % de *C. albicans* no se adhirieron en superficies de titanio modificadas con plata. Estas superficies adicionadas con plata, mostraron buenas propiedades antimicrobianas, reduciendo la adhesión de los microorganismos y más aún, mostraron efectos osteogénicos (Zheng et al., 2012). Es así que nuestro estudio buscó determinar si la adición de diferentes materiales como el carbono amorfo y la plata, ayudaban a disminuir la adhesión bacteriana y por consiguiente la posterior formación de biopelículas, las cuales se sabe que son la principal causa de las infecciones presentes en aditamentos de uso biomédico como los implantes dentales.

IX. CONCLUSIONES.

- Las superficies modificadas sólo con carbono amorfo disminuyeron la adhesión de *S. aureus*, mientras que las superficies adicionadas con nanopartículas de plata fueron más efectivas para evitar la adhesión de *P. aeruginosa* y *E. coli*. Lo cual significa que el carbono amorfo podría ayudar en la disminución de la adhesión de *S. aureus* específicamente.
- Entre más concentración de nanopartículas de plata, menor era la adhesión bacteriana sobre las superficies experimentales, lo cual indica que la plata sí mostró un efecto antibacteriano y puede ayudar a que diversas especies bacterianas no se adhieran tan rápido.
- Todos nuestros resultados se obtuvieron en las primeras 24 horas, que es el tiempo principal de colonización sobre cualquier tipo de material. Se observó que *E. coli* se adhirió mucho más rápido en este tiempo sobre las superficies experimentales comparándola con *P. aeruginosa* y *S. aureus* por lo que podemos concluir que no todas las especies bacterianas responden de la misma manera sobre los diferentes materiales.

Aún falta mucho por hacer y estudiar, para la mejora de los diferentes dispositivos biomédicos como los implantes dentales. Se necesitan realizar estudios que incluyan especies bacterianas representativas del medio oral ya que como sabemos existen más de 600 especies bacterianas en este medio, y como se ha descrito en este estudio las bacterias no siempre se adhieren de igual manera a un mismo material. También faltaría saber qué es lo que pasaría en los tiempos

posteriores, ya que en el medio oral siempre habrá especies bacterianas dispuestas a colonizar cualquier tipo de material y/o tejido.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Almaguer-Flores, A., Ximenez-Fyvie, L. A. & Rodil, S. E. (2010) Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **92**, 196-204. doi:[10.1002/jbm.b.31506](https://doi.org/10.1002/jbm.b.31506).
- Ata-Ali, J., Candel-Marti, M. E., Flichy-Fernandez, A. J., Penarrocha-Oltra, D., Balaguer-Martinez, J. F. & Penarrocha Diago, M. (2011) Peri-implantitis: associated microbiota and treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **16**, e937-943.
- Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D. J. & Shah, S. I. (2005) Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* **5**, 244-249.
- Bendig, J. W., Kyle, P. W., Giangrande, P. L., Samson, D. M. & Azadian, B. S. (1987) Two neutropenic patients with multiple resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia treated with ciprofloxacin. *J R Soc Med* **80**, 316-317.
- Bhat, S. & Kumar, A. (2013) Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter* **3**.
- Cao, H., Liu, X., Meng, F. & Chu, P. K. (2011) Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials* **32**, 693-705. doi:[10.1016/j.biomaterials.2010.09.066](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.066).
- DeVasConCellos, P., Bose, S., Beyenal, H., Bandyopadhyay, A. & Zirkle, L. G. (2012) Antimicrobial particulate silver coatings on stainless steel implants for fracture management. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **32**, 1112-1120.
- Dhir, S. (2013) Biofilm and dental implant: The microbial link. *J Indian Soc Periodontol* **17**, 5-11. doi:[10.4103/0972-124X.107466](https://doi.org/10.4103/0972-124X.107466).
- Donlan, R. M. (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 277-281.
- Donlan, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**, 881-890.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 167-+.
- Franzetti, F., Cernuschi, M., Esposito, R. & Moroni, M. (1992) *Pseudomonas* infections in patients with AIDS and AIDS-related complex. *J Intern Med* **231**, 437-443.
- Friedman, R. J. (1992) Advances in biomaterials and factors affecting implant fixation. *Instr Course Lect* **41**, 127-136.
- Green, S. K., Schroth, M. N., Cho, J. J., Kominos, S. K. & Vitanza-jack, V. B. (1974) Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* **28**, 987-991.
- Gristina, A. G. (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* **237**, 1588-1595.
- Kasemo, B. & Gold, J. (1999) Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res* **13**, 8-20.

- Katsikogianni, M. & Missirlis, Y. F. (2004) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater* **8**, 37-57. doi:vol008a05 [pii].
- Keatch, R. P., Schor, A. M., Vorstius, J. B. & Schor, S. L. (2012) Biomaterials in regenerative medicine: engineering to recapitulate the natural. *Curr Opin Biotechnol*. doi:S0958-1669(12)00032-8 [pii]
10.1016/j.copbio.2012.01.017.
- Klasen, H. J. (2000a) Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* **26**, 117-130. doi:S0305417999001084 [pii].
- Klasen, H. J. (2000b) A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* **26**, 131-138. doi:S0305417999001163 [pii].
- Laney, W. R., Tolman, D. E., Keller, E. E., Desjardins, R. P., Van Roekel, N. B. & Branemark, P. I. (1986) Dental implants: tissue-integrated prosthesis utilizing the osseointegration concept. *Mayo Clin Proc* **61**, 91-97.
- Lara, H. H., Ixtepan-Turrent, L., Garza-Trevino, E. N. & Rodriguez-Padilla, C. (2010) PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *J Nanobiotechnology* **8**, 15. doi:10.1186/1477-3155-8-15.
- Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penades, J. R. & Leiva, J. (2005) [Bacterial biofilms and infection]. *An Sist Sanit Navar* **28**, 163-175.
- Lee, A. & Wang, H. L. (2010) Biofilm related to dental implants. *Implant Dent* **19**, 387-393. doi:10.1097/ID.0b013e3181effa53.
- Lindhe, J., Berglundh, T., Ericsson, I., Liljenberg, B. & Marinello, C. (1992) Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* **3**, 9-16.
- Liu, H. L., Dai, S. A., Fu, K. Y. & Hsu, S. H. (2010) Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. *International Journal of Nanomedicine* **5**, 1017-1028.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**, 1051-1060.
- Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Takamiya, A. S., Ruvollo, A. C., Camargo, E. R. & Barbosa, D. B. (2009) The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents* **34**, 103-110.
- Ratner, B. D. (1993) New ideas in biomaterials science--a path to engineered biomaterials. *J Biomed Mater Res* **27**, 837-850. doi:10.1002/jbm.820270702.
- Reichert, W. M., Ratner, B. D., Anderson, J., Coury, A., Hoffman, A. S., Laurencin, C. T. & Tirrell, D. (2011) 2010 Panel on the biomaterials grand challenges. *J Biomed Mater Res A* **96**, 275-287. doi:10.1002/jbm.a.32969.
- Rodil, S. E. (2009) Modificación Superficial de Biomateriales. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* **29**, 67-83.

- Rodil, S. E., Olivares, R., Arzate, H. & Muhl, S. (2003) Properties of carbon films and their biocompatibility using in-vitro tests. *Diamond and Related Materials* **12**, 931-937. doi:Pii S0925-9635(02)00217-0.
- Rose, L. F. (2008) Dental implants. *Compend Contin Educ Dent* **29**, 193.
- Roy, R. K. & Lee, K. R. (2007) Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **83B**, 72-84. doi:Doi 10.1002/Jbm.B.30768.
- Soininen, A., Tiainen, V. M., Konttinen, Y. T., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. & Sharma, P. K. (2009) Bacterial Adhesion to Diamond-like Carbon as Compared to Stainless Steel. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **90B**, 882-885.
- Tian, J., Wong, K. K., Ho, C. M., Lok, C. N., Yu, W. Y., Che, C. M., Chiu, J. F. & Tam, P. K. (2007) Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem* **2**, 129-136. doi:10.1002/cmdc.200600171.
- Vila, J., Soriano, A. & Mensa, J. (2008) [Molecular basis of microbial adherence to prosthetic materials. Role of biofilms in prosthesis-associated infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26**, 48-54; quiz 55.
- Wang, J., Huang, N., Yang, P., Leng, Y., Sun, H., Liu, Z. Y. & Chu, P. K. (2004) The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion. *Biomaterials* **25**, 3163-3170. doi:Doi 10.1016/J.Biomaterials.2003.10.010.
- Widmer, A. F., Wiestner, A., Frei, R. & Zimmerli, W. (1991) Killing of nongrowing and adherent Escherichia coli determines drug efficacy in device-related infections. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 741-746.
- Williams, D. F. (1971) A new design concept for corrosion-resistant orthopaedic implants. *Br J Surg* **58**, 860.
- Williams, D. F. (2009) On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **30**, 5897-5909. doi:S0142-9612(09)00726-1 [pii] 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- Zheng, Y., Li, J., Liu, X. & Sun, J. (2012) Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface. *Int J Nanomedicine* **7**, 875-884. doi:10.2147/IJN.S28450.