

# **Estudio de la interacción de bacterias implicadas en la formación de placa dento-bacterina con superficies de titanio comercialmente puro *in vitro* y su asociación con la peri-implantitis.**

Memoria de Tesis presentada por:

***MCO. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández***



Para optar por el grado de Doctor por la  
Universitat Politècnica de Catalunya

Dirigida por:

Dr. Francisco Javier Gil Mur  
Dra. Elisabeth Engel

Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica  
Universitat Politècnica de Catalunya

Barcelona

UPC

2009

# Capítulo

## 5.

**Daños ocasionados por los  
productos metabólicos  
bacterianos a la superficie del  
implante**

*Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.  
Isaac Newton (1643-1727)*

## 5.1. INTRODUCCIÓN

El titanio y sus aleaciones son ampliamente empleados como biomateriales debido a sus excelentes propiedades mecánicas y su biocompatibilidad, además de su excelente resistencia a la corrosión incluso en medio biológico [AGF03]. Sin embargo, en ocasiones se han detectado trazas de metales en tejidos circundantes alrededor de los implantes de titanio. Tradicionalmente este hecho ha estado asociado a la fricción y desgaste a los que pudo estar sometido, no siendo estos los únicos factores asociados con esta liberación, ya que en placas y tornillos de sujeción se ha observado el mismo comportamiento.

Los iones metálicos desprendidos pueden verse involucrados en diversos fenómenos: tales como: transportación, metabolismo, acumulación en órganos e incluso alergias o toxicidad, debido a que estos pueden combinarse con biomoléculas (algunas proteínas). [HAN04] [MKS00] [HAN99]

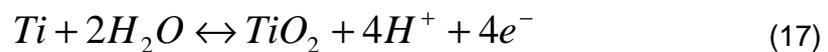
El uso de metales en odontología ya sea como material de restauración o protésico o implantes esta muy extendido en la actualidad, claros ejemplos de esto son los varios tipos de aceros inoxidable [Fe-Cr-(Ni)], aleaciones Cr-Co-Mo, titanio comercialmente puro, Ti-6Al-4V y aleaciones con memoria de forma Ti-Ni que son ampliamente usados como biomateriales; mientras que las aleaciones con base de metal noble (Oro, Plata, Paladio) son empleados como materiales dentales, por su alta resistencia a la corrosión. En los últimos años las aleaciones de Ti-6Al-7Nb y T-13Nb-13Zr han comenzado a utilizarse debido a su gran resistencia mecánica y ante la degradación química. La resistencia a la corrosión de estos materiales esta relacionada por la formación de una capa superficial de óxido que protege al metal del ataque corrosivo. [HAN04]

### 5.1.1. Superficies de biomateriales metálicos.

La resistencia a la corrosión de los biomateriales metálicos depende de su óxido superficial, es decir su capa pasiva. La pasivación, se refiere a la formación de una película relativamente inerte, sobre la superficie del material que lo enmascara en contra de la acción de agentes externos, sin embargo la pasivación no debe confundirse con inmunidad, en la cual el metal base es por sí mismo resistente a la acción de los medios corrosivos, por ejemplo el oro y el platino. En el caso del titanio la

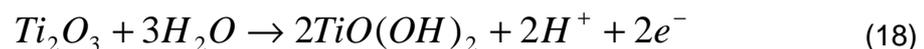
capa pasiva consiste de  $TiO_2$  no estequiométrico, adherente y no poroso, poco cristalizado de fácil y rápida regeneración incluso si es destruido. [HAN04] [MBJ06], la cual es que lo protege en condiciones ordinarias, logrando la corrosión sólo por la acción de ciertos agentes químicos o por un determinado sobrepotencial electroquímico. Esta capa usualmente cubre el material; la reacción de los materiales con los fluidos corporales se da por medio de estas interfases, donde la composición de la capa es importante para la biocompatibilidad.

El titanio generalmente se pasiva por la reacción con al agua presente en el medio ambiente de acuerdo con la siguiente ecuación:



Pero en el caso de que en el medio se encuentren disueltos otros iones, la capa pasivada tendrá incorporados estos iones. De acuerdo con Hanawa y colaboradores en estudios de repasivación del titanio en solución de Hank, [HAA98], la formación de una capa de óxido superficial en esta solución, esta envuelta en una reacción de los iones fosfato con los iones titanio además de la reacción normal con el agua. El proceso de oxidación por bivalencias y deshidratados, en el cual el titanio metálico forma la capa superficial de óxido sobre sí mismo no ha sido del todo elucidada. Sin embargo una gran cantidad de óxido de titanio permanece como  $Ti^{2+}$   $Ti^{3+}$  en la capa superficial regenerada. Como resultado, es posible que se forme  $TiO$ , e inmediatamente después se lleve a cabo un proceso de oxidación por trivalencias y deshidratación. Después que el  $Ti_2O_3$  se forma, su oxidación por tetravalencias produce  $TiO(OH)_2$  y el  $TiO_2$  se forma por la deshidratación del  $TiO(OH)_2$ , de acuerdo con la siguiente reacción.

En una solución ácida (18) las reacciones anódicas son:



(Oxidación por tetravalencia)



Y por otro lado, en una solución neutral (20) y básica (21), las reacciones anódicas son:

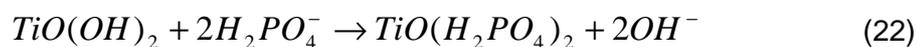


(Oxidación por tetravalencia)



Las capas superficiales regeneradas en la solución de Hank, están primordialmente compuestas tanto de  $\text{TiO}_2$  como  $\text{TiO}(\text{OH})_2$ , conteniendo agua adsorbida. De acuerdo con sus resultados los átomos de oxígeno en el grupo hidroxilo están localizados principalmente en la parte externa de la capa superficial incluso en condiciones de vacío, lo cual significa que el proceso de deshidratación continuara dentro de la superficie, al mismo tiempo que el proceso de deshidratación toma lugar sólo parcialmente para el óxido  $\text{Ti}^{4+}$ . [HAA98]

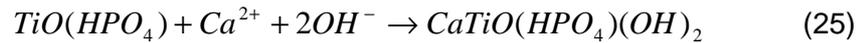
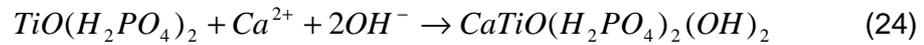
Sin embargo el último proceso de deshidratación es responsable de la reacción de los iones fosfato. Estos iones fosfato posiblemente colaboran con la deshidratación para la reacción anódica tetravalente superior. De acuerdo con los resultados de Hanawa, los iones fosfatos existen como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  dependiendo del pH de la solución, los cuales son descritos por las siguientes reacciones:



En la ecuación 22, el pH en la solución de Hank fue de 5,0 (simulando el pH del tejido duro circundante al material después de haber sido implantado) la cual existen más  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  que a un pH de 7,4 (ecuación 23) el cual es alcanzado después de 2 semanas de implantación. Este pH, también parece tener una influencia en el grosor de la capa regenerada ya que a pH de 5 el grosor alcanzado a 300 s de inmersión fue de 3,7 nm, mientras que a pH de 7,4 el grosor de esta capa fue de 4,3 nm. La regeneración de la capa finaliza en un periodo corto de tiempo y los iones de fosfato y calcio inmediatamente son absorbidos sobre la capa inicial de óxido de titanio formada. [HAA98]

Sobre la parte más externa de la superficie, la formación y crecimiento de los fosfatos de calcio se lleva a cabo por la absorción de iones de fosfato dihidratados

[ $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Eq. 24) y  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Eq. 25)] por el óxido superficial, la liberación de protones de los iones fosfato y la adsorción de iones calcio por los fosfatos, formando una capa de óxido de titanio conteniendo iones fosfato con fosfatos de calcio, la cual por si misma tendrá propiedades de superficie diferentes en comparación con la capa de óxido de titanio.



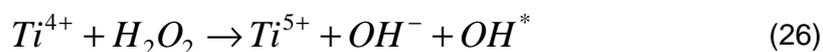
Como ejemplo, podemos mencionar las diferencias en cuanto a las propiedades electroquímicas de la capa regenerada de la capa superficial, las cuales dependiendo de su grosor e incluso composición, repercutiran en su estabilidad en un sistema biológico (ya que se verán directamente afectadas en el proceso de disolución de iones de en el medio y su posterior reprecipitación). Capas de óxido de titanio con la incorporación de iones fosfato o fosfatos de calcio tendran diferentes propiedades que una capa de óxido de titanio por si misma. [HAN91] [HAA98]

### 5.1.2. Desprendimiento de iones de la capa de óxido.

De acuerdo con la teoría de la pasivación, los biomateriales metálicos en soluciones acuosas son sistemas en las cuales las superficies activas y pasivas existen simultáneamente en contacto con electrolitos. Como consecuencia se cree que la capa de óxido superficial de los materiales repite continuamente, un proceso de disolución parcial y reprecipitación en soluciones acuosas. Si la velocidad de disolución es más larga que la velocidad de reprecipitación, habrá un desprendimiento de iones metálicos gradualmente (Figura 5.1). Este proceso se conoce como una disolución anódica. Si el potencial de un material cambia anódicamente, la velocidad de disolución anódica se incrementa. [HAA98] [HAN99]

No sólo la corrosión ha estado relacionada con la liberación de iones, ya que cuando un material es implantado, éste es reconocido como un agente extraño por el sistema inmunológico y por los macrófagos los cuales se adhieren a la superficie del material, produciendo algunos tipos de oxígeno activo para fagocitar las partículas. Cuando existe una disminución intracelular de  $\text{O}_2^-$  catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD por sus siglas en inglés) produce  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual tiene un tiempo de vida mucho más largo y una mayor permeabilidad contra la membrana celular que el

$O_2^-$ , por lo que el  $H_2O_2$  llega a la superficie donde se encuentran adheridos los macrófagos. La superficie del titanio es entonces hiperoxidada por  $H_2O_2$  lo que induce el desprendimiento de iones de titanio. El  $H_2O_2$  reacciona con la capa de óxido del titanio (26) [HAN04].



\*(Corresponde a un radical).

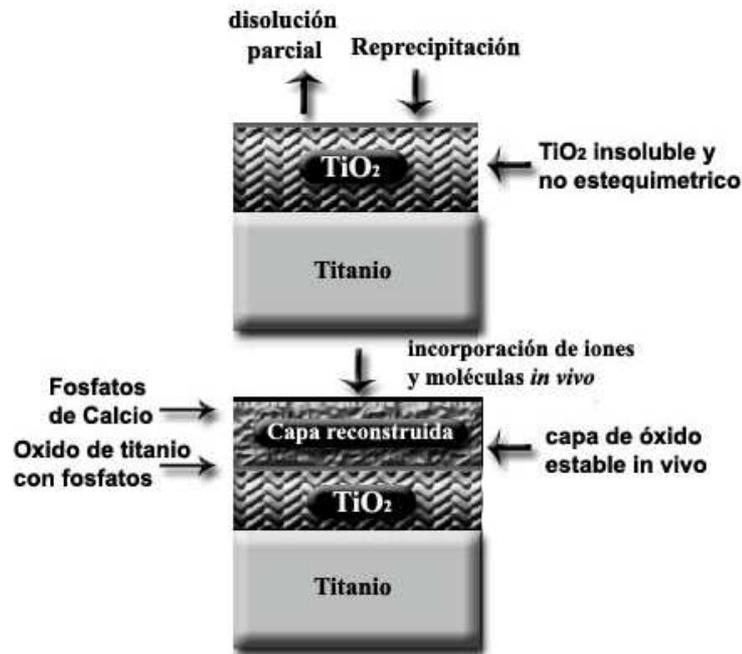
### 5.1.3. Resistencia a la corrosión del titanio comercialmente puro.

La corrosión biológica está definida como el deterioro del material a través de un proceso de corrosión dirigido directa o indirectamente por las actividades de supervivencia de los microorganismos. Las principales actividades del crecimiento de microorganismos sobre una superficie metálica, pueden influir en el proceso de corrosión varias formas:

- Influyendo en las reacciones catódicas y anódicas
- Por desestabilización de las capas protectoras
- Por la liberación de sustancias corrosivas
- Por la formación de depósitos

Algunos estudios comparativos con diversos metales y sus aleaciones, (utilizados regularmente en odontología) en contacto con medios corrosivos, se encontró que el titanio presentaba una tendencia baja a corroerse en medios representativos de las condiciones normales encontrados en la boca. [KAK98] [AGF03]

Sin embargo, en la boca humana el titanio puede estar en contacto con diversos iones, como el caso del flúor proveniente de pastas dentales, comida, agua o enjuagues bucales, con concentraciones de entre 0,1 a 1%. Además de este, el titanio puede estar en contacto con  $H_2O_2$  (producido por bacterias y leucocitos durante la respuesta inflamatoria), o con ácidos como el láctico (producido por bacterias) o el ácido fórmico, los cuales han sido citados como los causantes de la corrosión del titanio. [MBJ06]



**Figura 5.1.** Representación esquemática de la capa superficial de óxido de titanio y la reconstrucción de la misma *in vivo*, de acuerdo con los estudios realizados por Hanawa. [HAN99]

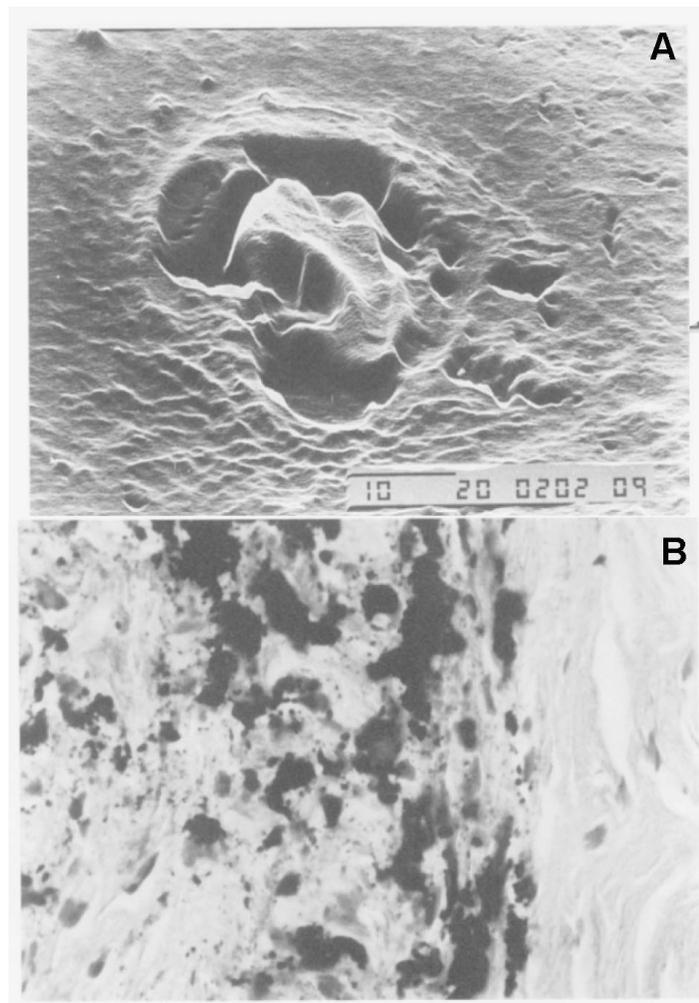
#### 5.1.4. Afección de los tejidos circundantes por la liberación de iones.

La presencia de pigmentaciones de titanio y su desprendimiento en los tejidos blandos circundantes adyacentes al implante (Figuras 5.2 y 5.3) [ACS99] [JME97] [KYL97] [LAF02] e incluso en la medula ósea o en los nódulos linfáticos regionales ha creado una división en cuanto al uso de este material. Con este antecedente, se ha sugerido la remoción de placas y tornillos en cirugía máxilofacial cuando su utilización sólo es de fijación o inmovilización de una fractura.

Pero al mismo tiempo se dice que no existe una evidencia de una disolución pasiva y progresiva del titanio; además de que estas pequeñas cantidades son consideradas como fragmentos provenientes del tratamiento de fabricación y/o acabado superficial que pudieron ser desprendidas durante el proceso de implantación quirúrgica. [MPB01]

Sin importar cual es el mecanismo de desprendimiento de partículas de la superficie de los biomateriales (metálicas, cerámicas, poliméricas o de materiales compuestos), si alguna partícula se desprende hacia los tejidos circundantes, puede interferir en ciertos procesos biológicos como una adecuada mineralización ósea o en la adhesión y diferenciación celular. [AGF03] [KAK98]

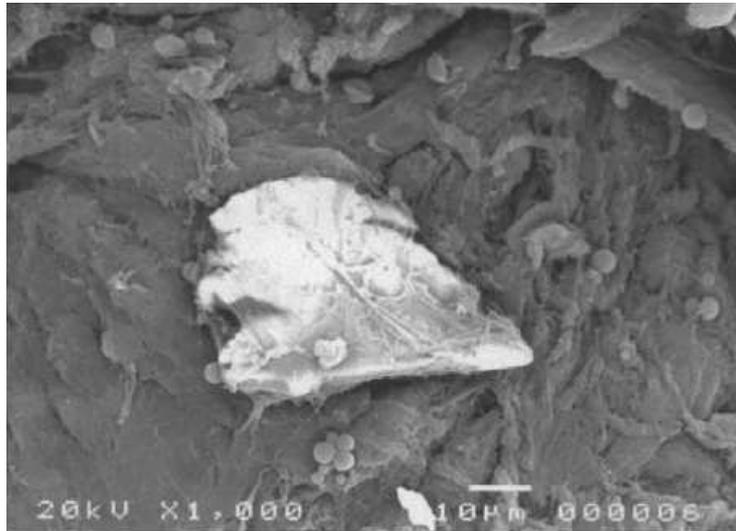
Uno de los problemas más conocidos del desprendimiento de partículas metálicas de los implantes a los tejidos circundantes es la metalosis (comúnmente asociada a prótesis de cadera), la cual es usualmente definida ya sea como una fibrosis aséptica con necrosis localizada, o como el aflojamiento de un aditamento secundario por corrosión y desprendimiento de partes metálicas asociadas a un proceso de abrasión y desgaste. [BSB90]



**Figura 5. 2.**Fotografía de MEB de una erosión observada sobre la superficie de una placa de titanio con un diámetro de 25  $\mu\text{m}$  (A), mientras que en B se observa una imagen de microscopía óptica de tejido blando circundante a una placa de titanio, la cual muestra depósitos granulares tanto intra como extracelulares (HE x 200). [ACS99]

En el caso de los fallos de los implantes dentales, en ocasiones han estado relacionados con la presencia de algún microorganismo bacteriano específico, ya que el tipo de bacteria que esta asociada con la enfermedad periodontal está presente muy frecuentemente alrededor de implantes fallados [MEF96] [NOR08] [SCL02]. Sin embargo, la presencia de bacteria periodontopatogénicas alrededor de estos implantes no es por sí mismo un indicador de peri-implantitis. La genética propia del paciente, así

como algunos otros factores ambientales determinan la severidad de la reacción del huésped (WOO04), donde una posible atrofia de los tejidos circundantes del implante dental asociados a la presencia de partículas desprendidas desde las superficies de los materiales puedan ser una de las causas posibles de la pérdida del sellado biológico y/o la posible pérdida del implante dental.



**Figura 5.3.** Depósito extracelular de titanio mostrado por Langford en tejido circundante a una placa de fijación. [LAF02]

## 5.2. OBJETIVOS

Conocer el daño causado al titanio ocasionado por la adhesión y colonización de las superficies de los implantes dentales por bacterias formadoras de placa dentobacteriana *in vitro*, para poder disminuir y/o evitar dicho proceso.

- Observación y análisis de los daños observados en las superficies de titanio posterior a la incubación con bacterias con *S. sanguinis* inoculada en saliva artificial.
- Cuantificación del titanio desprendido de la superficie de la muestra, por efecto de los productos metabólicos bacterianos.

### 5.3. MATERIALES Y METODOS

#### 5.3.1. Obtención de las muestras de titanio (para observar el daño superficial por MEB)

Las muestras analizadas en este capítulo son todas las que se emplearon en los capítulos 3 y 4 incubadas con los inóculos de bacterias, tanto en medio rutinario de cultivo (Todd-Hewitt y MRS broth) como en Saliva Artificial Modificada. Dependiendo lo que se deseaba estudiar se aislaron los respectivos discos o los medios en los cuales se encontraban inmersos.

Para la observación de los discos por microscopia electrónica de barrido, se emplearon las muestras que previamente fueron incubadas con bacterias, tanto en Todd-Hewitt broth, como en saliva artificial modificada (ver capítulos 3 y 4), inicialmente durante 2 y 24 horas.

Una vez pasado el tiempo de incubación se retiró el medio con bacterias. Posteriormente, se lavó el disco con PBS 1X dos veces y se adicionó Tetra óxido de Osmio ( $\text{OsO}_4$ ) durante 1,5 horas, luego se realizaron tres lavados con agua Milli Q 3, para seguir con el proceso de deshidratación con concentraciones de etanol desde el 30 % hasta el 100 % (para eliminar gradualmente el agua y evitar que las bacterias sufran alguna deformación o cambio estructural) y finalmente se depositó una delgada capa de oro sobre la superficie de las muestras para facilitar su interacción con el haz de electrones.

#### 5.3.2. Análisis cuantitativo de la liberación de titanio

Para la determinación de la liberación iónica de titanio se empleó el medio inoculado con *S. sanguinis* tanto en Todd-Hewitt broth como en MSAM, en el cual estuvieron inmersos los discos por espacio de 2 y 24 horas.

El primer paso, fue realizar un vórtice (agitación en rotatoria espiral con la creación de un flujo turbulento por medio de un agitador Vortex) a la muestra por espacio de 5 minutos dentro del Eppendorf® en el cual estuvo inmerso con el inóculo bacteriano (desprendiendo así todas las bacterias adheridas a la superficie) para finalmente retirar el disco.

Una vez obtenido el medio, se realizaron una primera medición de ICP-OES haciendo diluciones (1/50 y 1/20) en HNO<sub>3</sub>. Ya que con este primer paso no fue posible medir el titanio en el medio, se prosiguió a digerir las muestras par eliminar todo el material orgánico.

**Tabla 5.1.** Concentraciones de alcoholes y los tiempos de inmersión correspondiente, para la deshidratación de las bacterias para ser observadas por MEB.

<b>Etanol (concentraciones) %</b>	<b>Tiempo de deshidratación (minutos)</b>	<b>Cambios de Medio</b>
30	10	1
50	10	1
70	10	1
90	10	1
96	10	3
100	15	1
100	20	1
100	30	1

### 5.3.2.1. Digestión de las muestras.

Después de sacar el disco del Eppendorf®, el primer paso es limpiar los reactores de teflón en los cuales se realizará el proceso de digestión. La limpieza se realiza con 3 ml de HNO<sub>3</sub>, durante 1,5 horas a 90 °C. Pasado ese tiempo, se dejan enfriar a temperatura ambiente, se lavan con agua bidestilada (10 veces) y agua Milli Q (2 veces) previa extracción de HNO<sub>3</sub>. Una vez secos los reactores, se pesó la cantidad de muestra necesaria y se agregaron 2ml de HNO<sub>3</sub> 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0,2 ml de HF.

Se colocaron los reactores a 90 °C durante 12 horas aproximadamente, para que el proceso de digestión se llevase a cabo. Finalmente, se enrasaron los reactores con 15 ml de agua desionizada y se colocaron en tubos de ensayo de 10 ml. Es importante mencionar que las muestras deben ser almacenadas a 4 °C hasta que se realicen las mediciones.

#### 5.3.2.1.1. Digestión de los medios separando el precipitado y el sobrenadante.

Debido a que fue necesario digerir las muestras (eliminar el material orgánico) para poder detectar el titanio en el medio, se decidió separar el medio sólido y líquido, para analizarlos separadamente.

Una vez que fue retirado el disco de titanio del medio inoculado con bacterias, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos. Una vez separados el sólido y el sobrenadante, se colocó en un nuevo Eppendorf® el sobrenadante y se agregaron 200 µl al sólido de medio correspondiente (con la finalidad de resuspenderlos y poder extraerlos para su posterior digestión y análisis). El proceso de digestión para estas muestras fue el mismo que el citado anteriormente.

### **5.3.3. Preparación del pellet de bacterias para MEB**

Una vez pasado el tiempo de incubación (24 horas) de los discos de titanio con el inóculo bacteriano en Todd-Hewitt broth, se trató con un vortex de 5 minutos con el disco en el interior; se retiró la muestra y se realizaron dos lavados con PBS 1x del sólido. Las bacterias fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5 % por espacio de 30 minutos. Posteriormente, se deshidrataron las bacterias con soluciones de alcoholes desde el 30% hasta el 100 % (Tabla 5.1). Una vez deshidratadas las muestras fue necesario el separar el sólido del líquido, en este caso por filtración con un filtro de celulosa con un tamaño de poro de 0,22 µm de Millipore®.

La parte sólida obtenida se colocó sobre una cinta de carbón de dos caras soportada sobre un portamuestras de aluminio. Finalmente para poder ser observadas por MEB, se depositó una capa de oro.

### **5.3.4. Preparación del pellet de bacterias para Microscopía electrónica de transmisión (MET).**

Para la obtención de las muestras para TEM, una vez que el tiempo de incubación ha pasado (2 horas), se desprendieron todas las bacterias de la superficies del disco por medio de un vortex de 5 minutos, inmediatamente después se retiró el disco de titanio y se realizaron dos lavados con PBS 1X, después se realizó la fijación con glutaraldehído al 2,5 % durante 30 minutos, se dieron dos lavados con buffer de fosfatos 0,1M. Posteriormente se les colocó Tetra óxido de Osmio (OsO<sub>4</sub>) por espacio de 1,5 horas (para contrastar), se lavaron las muestras suavemente con agua desionizada 3 veces y se deshidrataron con soluciones de etanol desde el 50% hasta el 100 % (Tabla 5.2).

Una vez deshidratada la muestra se procedió a la infiltración de la resina Epon, para lo cual fue necesario preparar la resina agregando los componentes indicados en

la Tabla 5.2 en un recipiente de plástico con tapa y un agitador magnético por espacio de 1 hora.

Con esta resina base, se prepara una serie de disoluciones de resina/disolvente (que en este caso fue acetona) para realizar la infiltración (con agitación constante) gradualmente como se indica en la tabla 6.3.

**Tabla 5.2.** Concentraciones de acetona utilizadas para la deshidratación de las muestras para MET.

<b>Etanol (concentraciones) %</b>	<b>Tiempo de deshidratación (minutos)</b>	<b>Cambios de Medio</b>
50	10	1
70	10	1
90	10	1
96	10	3
100	15	1
100	20	1
100	30	1

**Tabla 5.3.** Componentes de la Resina Epon empleado para embeber las muestras para su posterior corte por ultramicrotomía.

Eponate	23,5 g
DDSA	12,5 g
NMA	14 g
DMP-30 (catalizador)	0,37 ml

**Tabla 5.4.** Disoluciones de resina empleadas para el proceso de infiltración con los respectivos tiempos. El catalizador se agrega en una mezcla nueva y se utiliza sólo en los últimos dos pasos del proceso.

<b>Resina /disolvente</b>	<b>Tiempo de infiltración</b>
1:3	1 hora
2:2	1 hora
3:1	1 hora
EPON	1 hora
EPON	1 hora
EPON+CATALIZADOR	1 hora
EPON+CATALIZADOR	1 hora

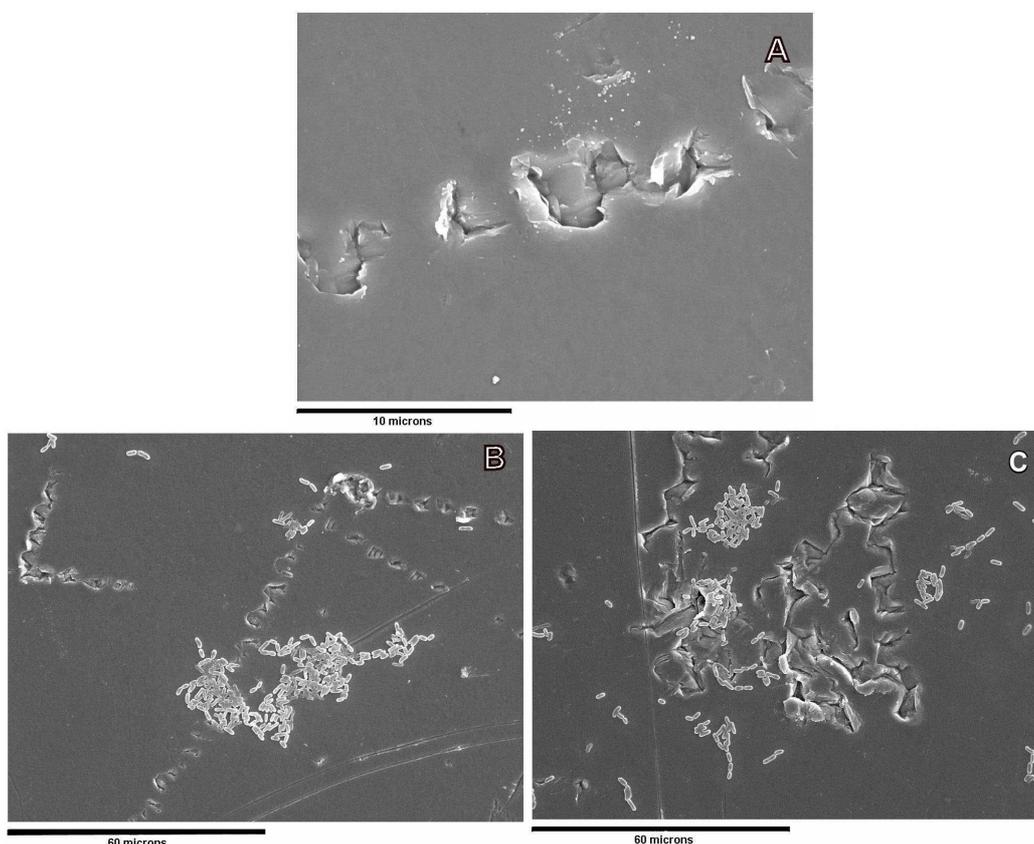
Finalmente, se colocan las muestras en los conformadores de teflón y se polimeriza a 60 °C por espacio de 6 horas (como mínimo).

El último paso en la preparación de las muestras, es la obtención de cortes ultrafinos por ultramicrotomía (de un espesor de 50-80 nm) con un ultramicrotomo **Ultracut E (Reichert-jung)** de Leica, para poder ser observados finalmente en un MET Jeol Modelo **JEM 1010** con cámara digitalizadora.

## 5.4. RESULTADOS

### 5.4.1. Observación de los discos de titanio por MEB.

En las imágenes presentadas en el capítulo 3 y 4 de las muestras de titanio en contacto con cultivos bacterianos obtenidas mediante MEB, se observó la presencia de agujeros sobre las superficies de las muestras Smooth (donde fue más fácil y evidente observar el daño). La figura 5.4 muestra dichas superficies después de estar en contacto tanto con *S. sanguinis* (A) como con *L. salivarius* (B y C), en estos últimos la presencia de colonias bacterianas sobre dicho daño hace pensar en la posibilidad de que productos metabólicos y/o la producción de ácido láctico (acidificando el medio) sean la causa de este.

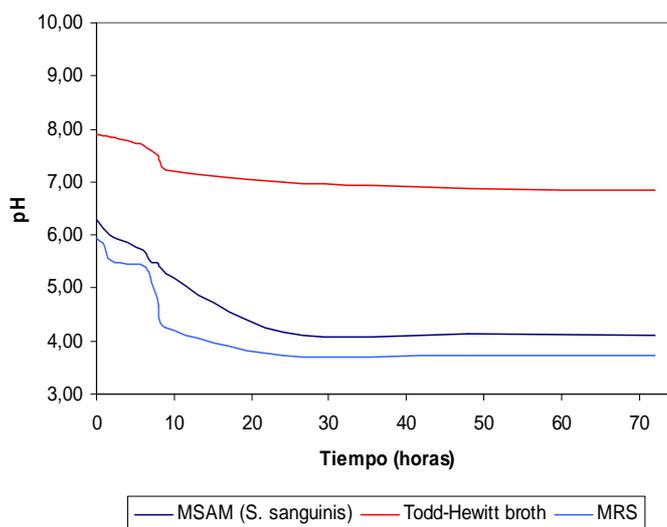


**Figura 5.4.** Discos de titanio Smooth después de 2 (A) y 24 horas (B y C) de incubación. En la microfotografía (A), la muestra fue incubada con *S. sanguinis*, mientras que en caso de B y C los discos estuvieron incubados con *L. salivarius*.

### 5.4.2. Variaciones en el pH en los medios de cultivo

Con estas primeras observaciones, el siguiente paso, fue observar como variaba el pH en los diferentes medios a lo largo de todo el cultivo (72 horas) tanto en

Todd-Hewitt, MRS broth como en Saliva Artificial con *S. sanguinis*. La figura 5.5 muestra los resultados, en donde se puede ver que para todos los medios existe una caída importante en el pH alrededor de 9 horas. En el caso de Todd-Hewitt la caída en el pH es menor, comparado con MRS y MSAM donde el descenso es más drástico, además de que la variación en estos dos últimos medios se prolonga hasta las primeras 24 horas, a partir de donde se mantienen aproximadamente constante hasta las 72 horas.



**Figura 5.5.** Variación del pH en los medios de cultivo Todd-Hewitt, MRS y MSAM (con *S. sanguinis*).

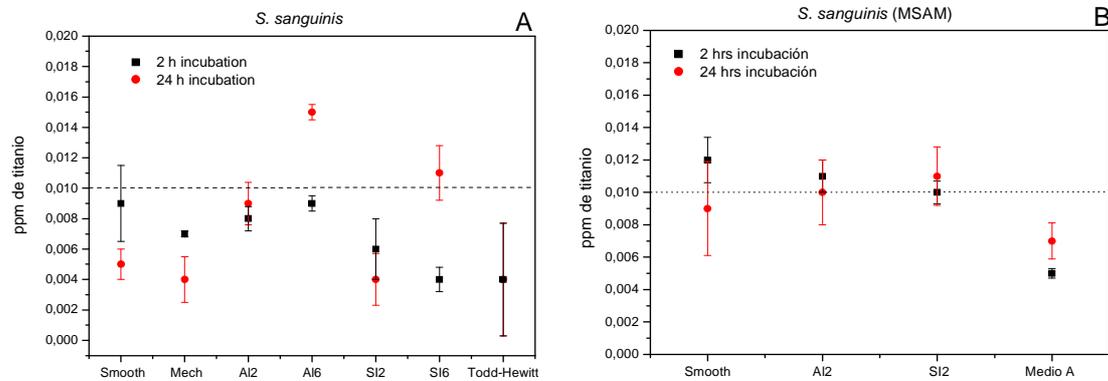
#### 5.4.3. Análisis cuantitativo de la liberación de titanio.

Dada la pérdida de material de la superficie de las muestras (observada por MEB) y acidificación del medio, evidenciada por la caída en el pH durante el cultivo, se pensó en una posible corrosión del material producida por los productos metabólicos. Se utilizó entonces la técnica ICP-OES para cuantificar la cantidad de titanio desprendido de la superficie en los medios de cultivo. Las primeras mediciones se realizaron haciendo diluciones con  $\text{HNO}_3$  y agua de las muestras (medios de cultivo), pero no se obtuvo ningún tipo de señal, por lo que fue necesario hacer la digestión del material orgánico para poder cuantificar el titanio.

#### 5.4.4. Análisis cuantitativo de titanio en muestras digeridas.

En el caso *S. sanguinis* en el medio rutinario de cultivo (Todd-Hewitt), se analizaron los 6 tipos de muestras (Figura 5.6). Los resultados muestran que sólo Al6 y Si6 a 24 horas para *S. sanguinis* presentaron valores por encima del límite de detección (indicado con una línea punteada). Es importante mencionar que para estos

ensayos (tanto en medios rutinarios de cultivo como en MSAM) se preparó el medio completo (una vez desprendidas todas las bacterias y retirado el disco de titanio del medio), es decir, tanto el sólido (pellet) como el líquido (sobrenadante) fueron analizados como una sola muestra.



**Figura 5.6.** Cuantificaciones de P.D. de titanio en los medios posterior a la incubación con *S. sanguinis* tanto en Todd-Hewitt broth (A) como en MSAM (B), a 2 horas de incubación (negro) y 24 horas (rojo)

Al mismo tiempo, los resultados obtenidos en MSAM (Figura 5.6-B) mostraron que tanto a 2h como a 24 h, los resultados obtenidos se encontraban de igual forma en el límite de detección de la técnica de ICP-OES.

Debido a que la señal obtenida fue similar al límite de detección en varias de las muestras y que uno de los objetivos de este trabajo es aproximar los ensayos in vitro de adhesión bacteriana a las condiciones reales de la cavidad oral humana, se decidió por un lado, incrementar la concentración de iones (duplicando el número de muestras y por tanto el medio) y por otro lado, analizar por separado el sólido (pellet) y el líquido (sobrenadante), después de desprender todas las bacterias adheridas a la superficie del disco por medio de un vortex vigoroso (5 minutos) y haber retirado la muestra, por lo que estas mediciones se realizaron sólo en las muestras más representativas de cada tipo (Smooth, AI2 y SI2) en contacto con MSAM haciendo un seguimiento durante 72 horas.

En la figura 5.7 se muestran los resultados obtenidos, donde se notan diferencias importantes entre los tres tipos de muestras. Para el caso de Smooth, la cantidad de ppm total (la suma de la cantidad obtenida en el pellet y el sobrenadante) presenta una media de 0,06 ppm a las 3 horas de incubación, y posteriormente disminuye hasta convertirse en un valor constante a partir de las 10 horas de incubación, además de presentar una relación igual y equilibrada entre la cantidad de ppm de titanio en el medio (sobrenadante) y los ppm de titanio en la parte sólida

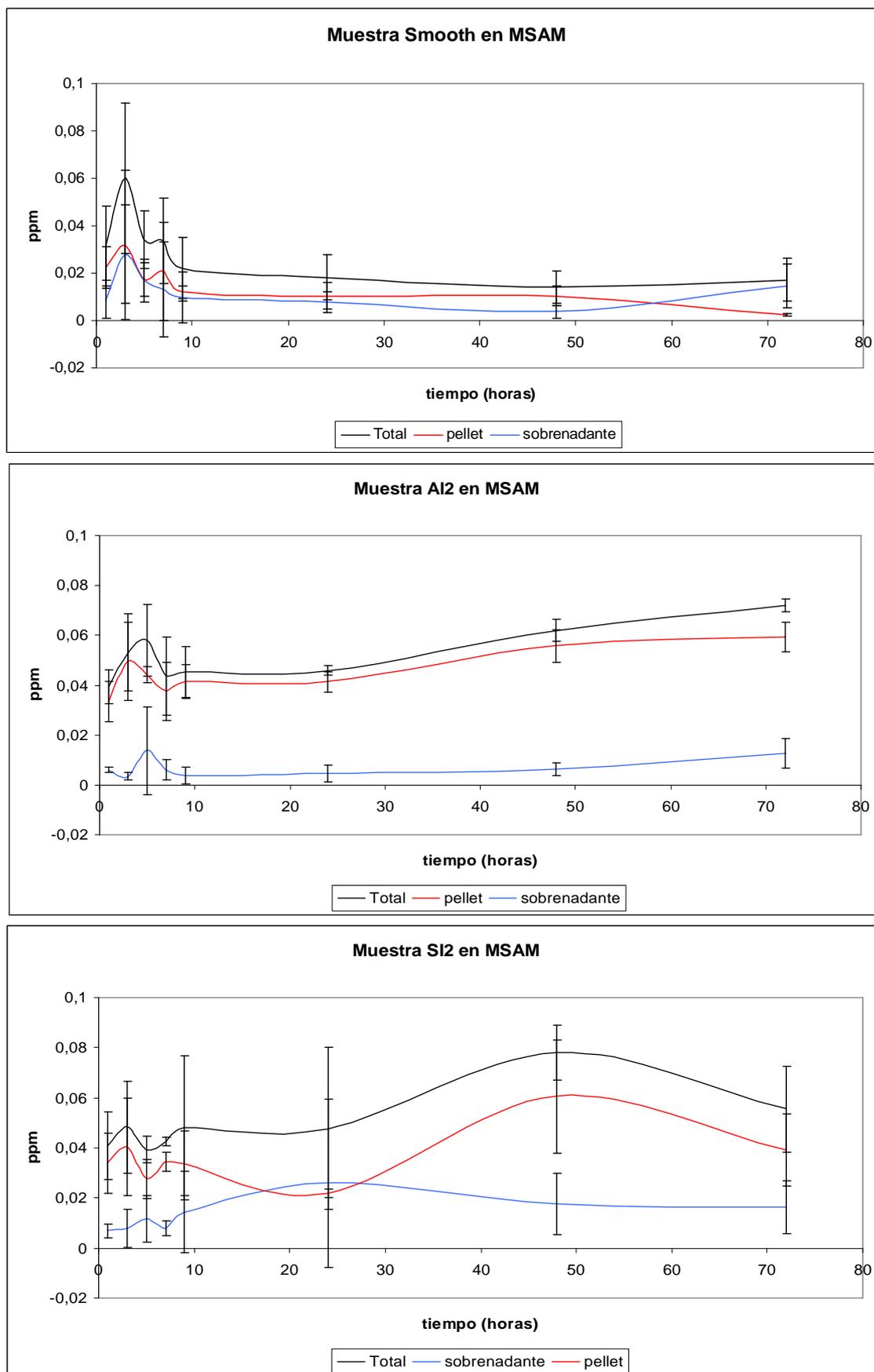
(pellet). Al mismo tiempo, en la muestra AI2 la máxima cantidad de ppm totales en el medio se da a las 5 horas de incubación, a partir de este punto, la cantidad de titanio disminuye ligeramente hasta las 24 horas y a partir de este punto va incrementado lentamente, alcanzando los mismos valores que a las 5 horas. Es importante enfatizar que en este caso, la mayor cantidad de ppm de titanio se encontró en la fase sólida o pellet. Finalmente en la muestra SI2, se observó un comportamiento totalmente distinto ya que la mayor cantidad total de ppm de titanio se observó a las 48 horas, tiempo en el cual el número de viables disminuye considerablemente en el cultivo (Figura 5.7) Además en este caso en particular, la relación de ppm en el pellet y en el sobrenadante no presenta la misma tendencia como en AI2 e incluso en Smooth, ya que durante las primeras 10 horas la mayor cantidad de titanio se localiza en el pellet, a las 24 horas disminuye, incrementando de nuevo a las 48 horas y volviendo a disminuir a las 72 horas. (Figura 5.7)

#### **5.4.5. Observación del pellet por MEB**

Debido a que en las muestras AI2 y SI2 la mayor cantidad de titanio cuantificado se encontraba en el pellet, se preparó la parte sólida del cultivo para su observación por MEB. En las imágenes (Figura 5.8) que se obtuvieron se pudieron observar a las bacterias y partículas irregulares mezcladas entre ellas, tanto para AI2 como para SI2. Para conocer su composición se realizó un análisis de EDS (Electron Diffraction Spectroscopy), el cual mostró que en ambos casos la composición de dichas partículas era principalmente  $\text{Na}^+$ , C,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , P (flechas rojas), además para la muestra SI2 se encontraron otro tipo de partículas de forma más regular (flechas blancas) cuya composición fue Si y C.

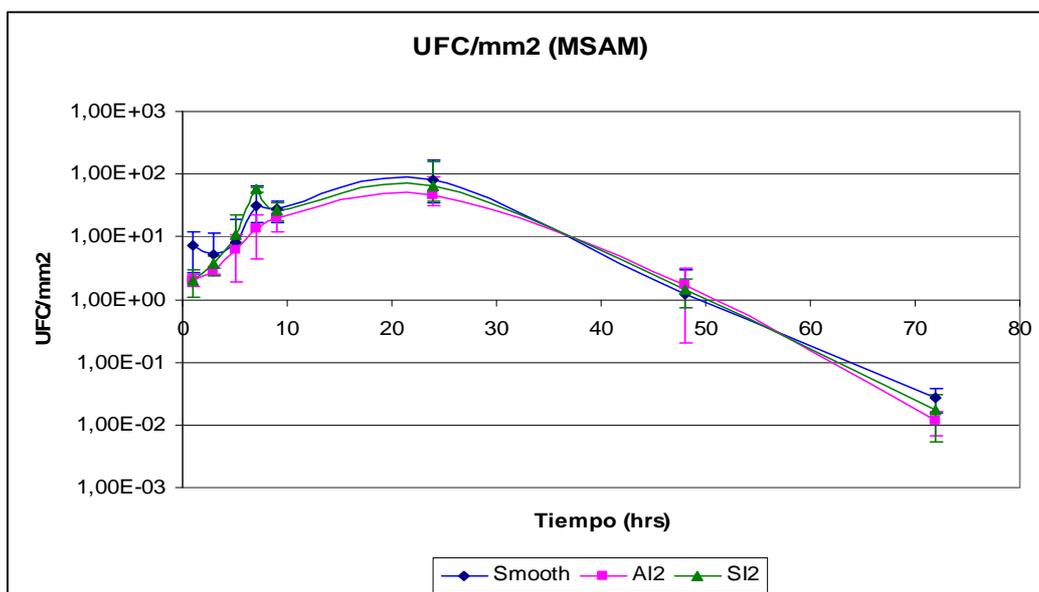
#### **5.4.6. Observación del pellet por MET**

Ya que las observaciones por MEB no mostraron la presencia de titanio (ya fuese como un precipitado o como partículas de gran tamaño desprendidas de la superficie de los discos), como se evidenció en los resultados de ICP-OES tanto en AI2 como en SI2, se decidió a observar el pellet de las muestras que fueron incubadas con *S. sanguinis* en MSAM por MET.

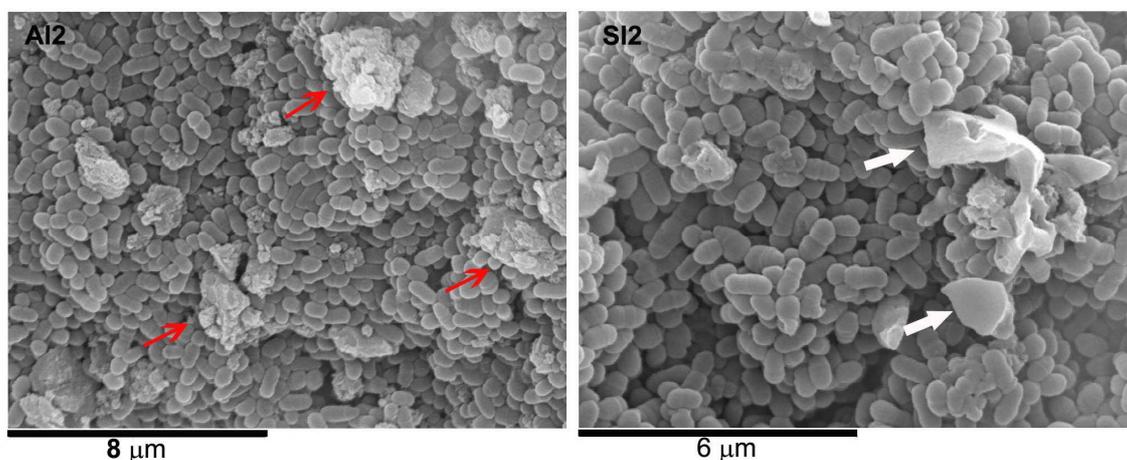


**Figura 5.7.** Cuantificaciones de titanio (ppm) desprendido de las superficies de los discos Smooth, AI2 y SI2, durante el ciclo de crecimiento de *S. sanguinis* en MSAM.

Las imágenes obtenidas, mostradas en la figura 5.10 en B (AI2) y C (SI2), zonas electrodensas (indicadas con flechas rojas) las cuales fueron comparadas con cultivos que no estuvieron en contacto con titanio (Figura 5.10-A). En estas últimas no se apreció ninguna zona similar a las observadas en AI2 y SI2.

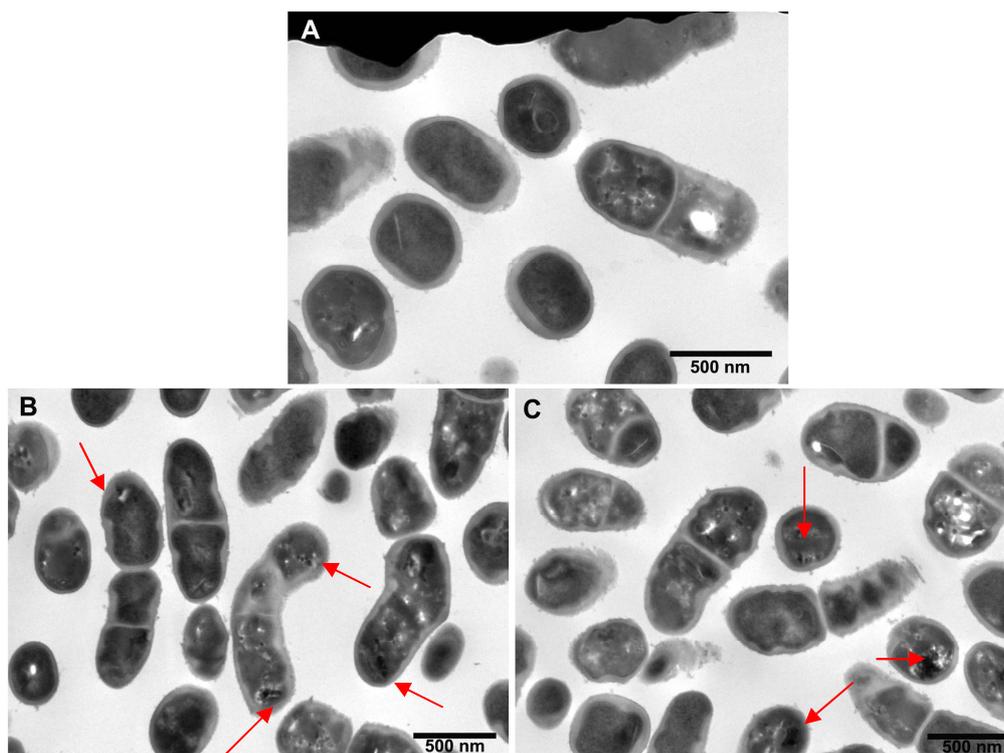


**Figura 5.8.** Seguimiento de adhesión de *S. sanguinis* inoculada en MSAM, el número de bacterias por unidad de área fue prácticamente igual para todos los casos.

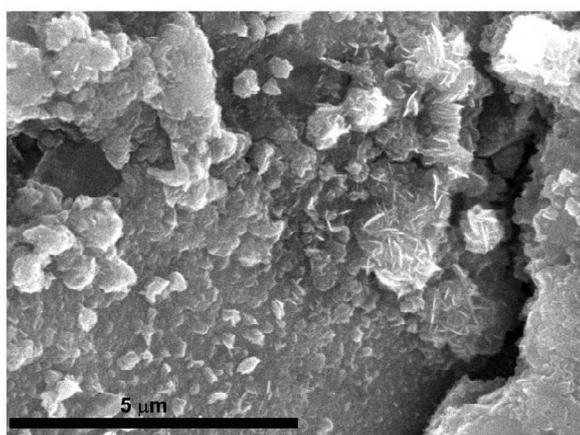


**Figura 5.9.** Imagen de MEB, donde se puede apreciar a las bacterias *S. sanguinis* después de un periodo de incubación de 24 horas con superficies de Titanio en MSAM. Las imágenes muestran partículas las cuales fueron analizadas por EDS y en el caso de la muestra AI2 (indicados con las flechas rojas) los elementos encontrados fueron Na, P, y  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que en la muestra SI2 (indicados con flechas blancas), los elementos encontrados fueron Si y C además de Na, P y Ca. En ninguno de los dos casos se encontró vestigio de titanio.

Estas partículas (o precipitados) observados en el interior de la célula presentan un tamaño inferior a los 100 nm, presentando un contraste mucho mayor que el resto del interior de la bacteria.



**Figura 5.10.** Imágenes de MET de *S. sanguinis* inoculada en MSAM. En B (Al2) y C (Si2) es posible observar zonas electrodensas dentro del citoplasma bacteriano (flechas rojas), el cual puede estar asociado a pequeñas acumulaciones de titanio en el interior de la bacteria, ya que estas zonas no fueron observadas en la muestra que no estuvo en contacto con superficies de titanio (A).



Element	Weight %	Atomic%
C	38.78+/-0.38	59.78
O	20.89+/-0.47	24.16
Al	0.47+/-0.06	0.32
P	0.58+/-0.06	0.34
S	0.32+/-0.06	0.18
Cl	1.20+/-0.07	0.65
Ca	1.20+/-0.08	0.55
Ti	36.58+/-0.37	14.05
Totals	100	100

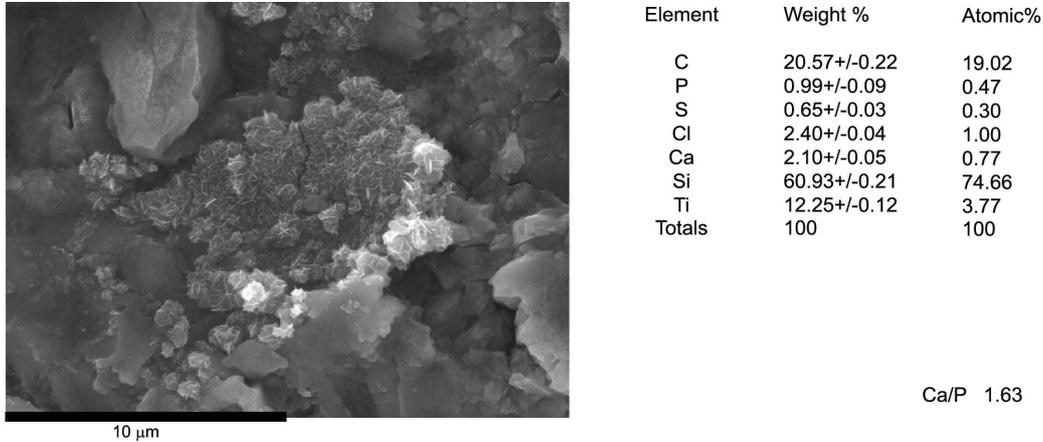
Ca/P 1.61

**Figura 5.11.** Formación de cristales sobre la superficie de la muestra Al2 y los resultados de EDS, donde la relación Ca/P fue de 1.61.

#### 5.4.7. Observación de las superficies de titanio posterior a la incubación con bacterias.

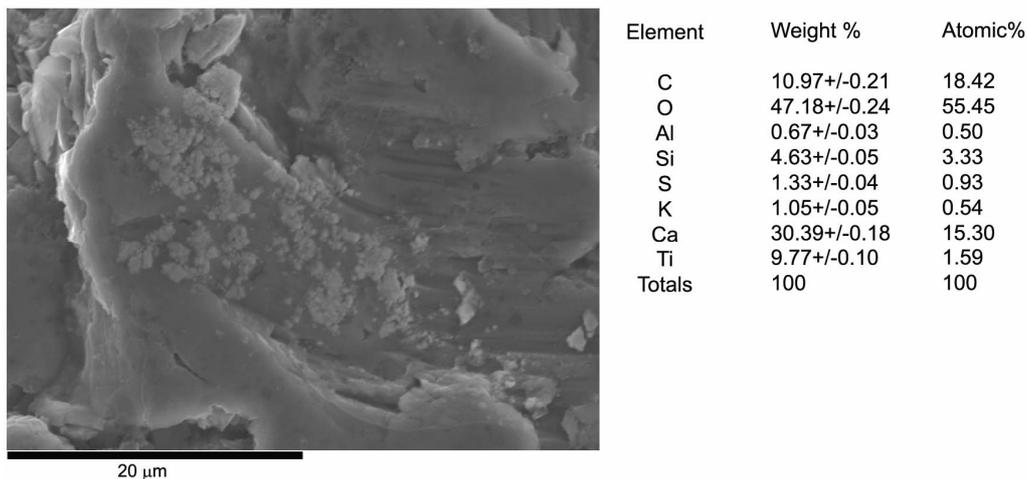
Finalmente, se hizo una observación por MEB de las superficies en contacto con bacterias y observamos la formación de cristales sobre las superficies tanto a 2 como a 24 horas, especialmente en las superficies Al2 (Figura 5.11) y Si2 (Figura

5.12). En ambos casos se realizó un análisis de EDS y se observó la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y P, entre otros elementos; se analizó la relación Ca/P en ambos casos y se obtuvo una Ca/P de 1.61 sobre la superficie Al2, mientras que en la superficie Si2 esta relación fue de 1.63, lo que nos indica que se trata de un fosfato de calcio.



**Figura 5.12.** Cristales observados sobre la superficie Si2, previamente incubada con *S. sanguinis* en MSAM por 24 horas, en este caso la relación Ca/P es de 1.63.

Finalmente, se observaron superficies a 2 y 24 horas de incubación tanto de Smooth, Al2 y Si2 y al mismo tiempo se compararon con superficies que fueron incubadas durante los mismos periodos de tiempo, pero sin bacterias. Las imágenes que se obtuvieron (Figura 5.14), incubadas tanto con bacterias como si ellas, muestran la diferencia en cuanto a la forma, de los precipitados sobre las superficies de titanio, especialmente en las superficies Al2 y Si2 (Figura 5.13).



**Figura 5.13.** Precipitados observados sobre la superficie Si2 después de 24 hrs. en contacto con MSAM sin bacterias.

En este caso los elementos encontrados en el análisis revelan la presencia de diversos iones entre los cuales se encuentra el  $\text{Ca}^{2+}$ , pero en este caso no fue encontrado el P.

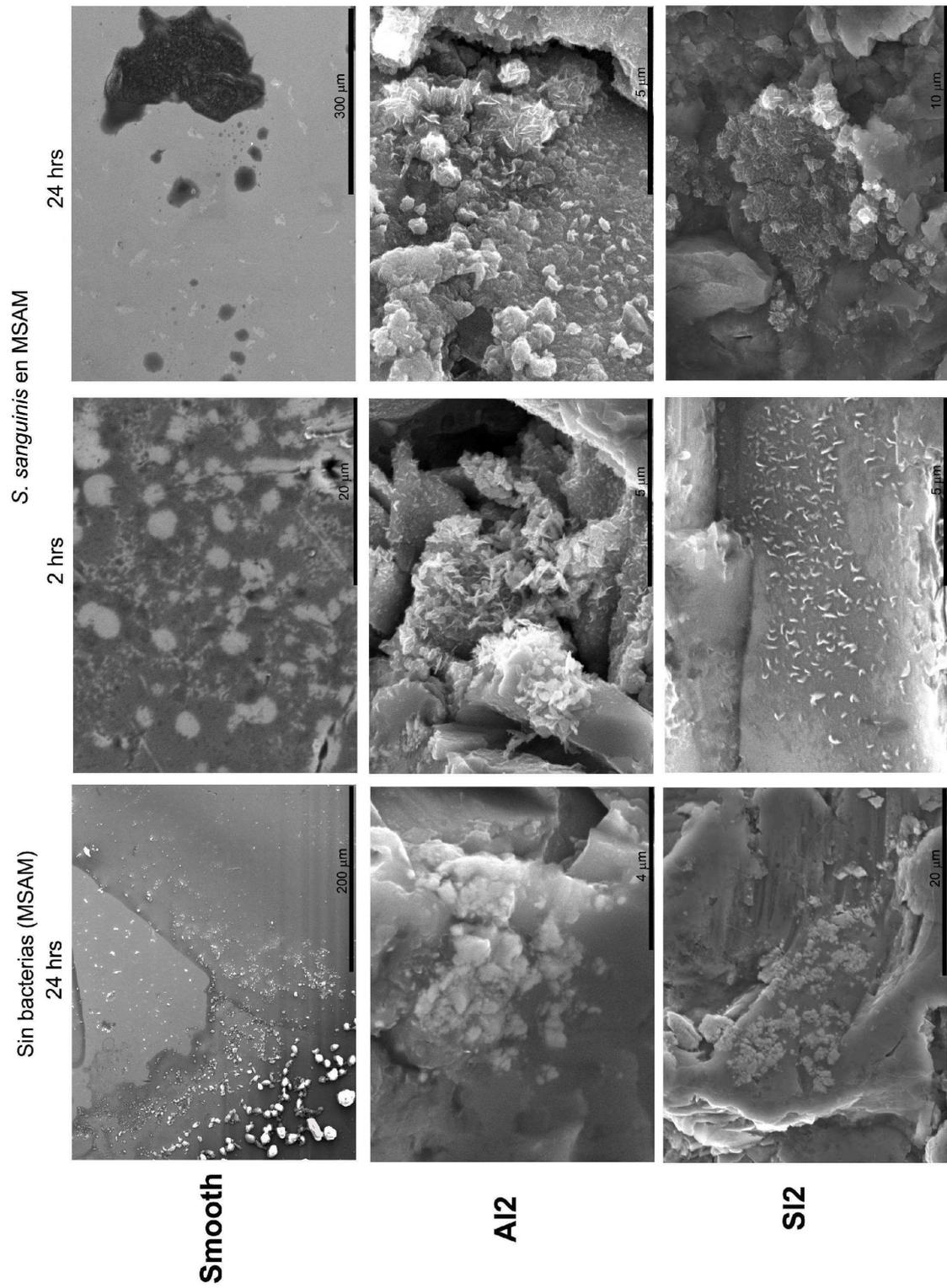


Figura 5.14. Superficies de titanio posteriores a la incubación tanto con MSAM como con *S. sanguinis* inoculada en MSAM.

## 5.5. DISCUSION

Al observar las imágenes de MEB (Figura 5.4), la primer pregunta que nos formulamos fue si realmente las bacterias, tanto *S. sanguinis* como *L. salivarius* eran capaces de causar el daño presente sobre el titanio, aun a pocas horas de incubación (en el caso de *S. sanguinis* se pudo observar un daño importante a 2 horas), ya que el conocimiento general acerca de la resistencia a la corrosión del titanio es totalmente contraria con nuestras observaciones. El primer punto a ser evaluado era el pH del medio y los resultados mostraron que *L. salivarius* en MRS presentó los valores más bajos de pH a las 24 horas, alcanzando el valor más bajo (pH ~4). Mientras que *S. sanguinis* en MSAM presentó un comportamiento muy similar a *L. salivarius*, el pH de *S. sanguinis* en Todd-Hewitt broth no presentó una variación tan marcada.

Aunque la variación en el pH de los medios de cultivo fue realmente drástico, en el caso de *S. sanguinis* inoculada en MSAM así como *L. salivarius* inoculada en MRS, estos datos no fueron por si solos un indicativo de la posible causa del daño observado sobre las superficies Smooth de titanio (es importante mencionar que sobre éstas superficies era más fácil de identificar, ya que en el caso de las muestras rugosas debido a la topografía no era fácil distinguirla), fue necesario el buscar un método cuantitativo elemental, por lo que se considero el utilizar ICP-EOS para dicho estudio.

Las primeras mediciones que se realizaron no arrojaron valores detectables (datos no mostrados en este trabajo), por lo que se decidió realizar un proceso de digestión de las muestras con los medios (ya que de acuerdo con las especificaciones de la técnica, es necesario que exista un menos del 2% de material orgánico en el medio para evitar que exista algún tipo de interferencia), con lo cual fue posible obtener los primeros datos cuantificables de la cantidad de titanio desprendida de las superficies.

En estos resultados fue posible observar que las muestras con mayor rugosidad (A16 y S16) presentaron las mayores cuantificaciones de titanio en el medio (ppm) al estar en contacto con *S. sanguinis* inoculada en Todd-Hewitt broth, lo que parece lógico ya que son las superficies con mayor área, mientras que el resto de superficies se encuentran por debajo del límite de detección del equipo.

Por otro lado las cuantificaciones de titanio de *S. sanguinis* en MSAM, presentaron valores a 2 y 24 horas prácticamente iguales, en los tres tipos de muestras (Smooth, AI2 y SI2), lo que en un principio nos hizo pensar en una posible saturación del medio de iones de titanio alcanzada a las 2 horas en la saliva artificial modificada, igualmente estos valores estuvieron dentro de los límites de detección de la técnica.

Con estos resultados, surgieron dos nuevas incógnitas:

1. ¿Cuál es la cinética de disolución del titanio en contacto con bacterias? (ya que en saliva artificial, los valores a 2 y 24 horas eran prácticamente iguales).
2. ¿Cómo y donde se encuentra el titanio en el medio con bacterias? (debido a la necesidad de digerir el material orgánico, para poder cuantificarlo).

Con estas dos cuestiones, decidimos analizar en primer lugar la cinética de liberación de titanio a partir de las superficies de las muestras (previa separación en pellet y sobrenadante) y en segundo lugar, localizar físicamente el titanio. En ambos casos se decidió realizar los siguientes ensayos sólo con *S. sanguinis* por ser la bacteria implicada directamente en la formación de placa dento-bacteriana y el medio seleccionado fue MSAM, como una mejor aproximación a las condiciones de la cavidad oral humana y al mismo tiempo como una continuidad con los resultados obtenidos en el capítulo 4 (utilizando las muestras Smooth, AI2 y SI2).

Nuestros resultados muestran una cinética de liberación de titanio en la cual para la muestra Smooth, existe una mayor cantidad de titanio liberado en las primeras horas con una caída importante a partir de 3 horas de incubación, hasta alcanzar los 0,02 ppm a las 10 horas, y manteniendo un valor constante hasta el final del ensayo (72 horas). De igual forma AI2 presentó una liberación importante en las primeras horas (alcanzando los valores más altos a las 5 horas, a partir de ahí una ligera caída hasta las 10 horas y pasado este tiempo existe un incremento paulatino de la cantidad de iones en la parte sólida alcanzado los mismos valores obtenidos inicialmente a 72 horas, aún cuando las bacterias han dejado de ser viables (ver capítulo 4 sección de resultados para más detalles). Finalmente los resultados de SI2 presentaron una tendencia similar a las muestras anteriores en su fase inicial pero con mayor variabilidad en la cantidad de titanio en el medio, presentado los valores más altos a

las 48 horas, punto en el cual el número de viables ha disminuido considerablemente en el medio (ver capítulo 4 sección de resultados para mayor detalle). Al mismo tiempo, es importante remarcar la relación entre el titanio en el sólido y el titanio en el líquido, ya que tanto en Smooth como en AI2 mantiene una relación constante a lo largo de todo el ensayo, mientras que en SI2 no existe este mismo comportamiento, lo cual corrobora que el tipo de tratamiento realizado para la obtención de la rugosidad (en este caso en particular, el tipo de partícula) no sólo tiene influencia en la respuesta de adhesión de estas bacterias a las superficies de los implantes, si no que a su vez, el tipo de tratamiento influirá en el mecanismo de reprecipitación de la capa de óxido de titanio en medios biológicos, el cual ha sido ampliamente descrito por Hanawa y colaboradores [HAN99] [HAA98] [HAN04].

De acuerdo con nuestros resultados, en una superficie lisa la reprecipitación del titanio en el medio se lleva a cabo de manera más rápida y eficiente en comparación con las otras dos superficies (AI2 y SI2), es decir una superficie que no ha sido granallada, presenta un mejor comportamiento en cuanto a la liberación de iones de titanio desde su superficie y al mismo tiempo la reprecipitación de esta capa, ya que si no se encuentran ni en el medio (supernadante) o en el pellet rastros de titanio, el único donde puede encontrarse estos iones es sobre la superficie de las muestras. En cuanto a las dos muestras granalladas estudiadas, podemos decir que AI2 presenta mejores resultados comparada con SI2, aunque en los dos tipos de muestras hubo una pérdida de titanio de las superficies, AI2 presentó valores ligeramente menores que SI2.

Finalmente, tratando de resolver la segunda incógnita el primer indicio de la posible localización e incluso la forma del titanio desprendido lo dieron las imágenes de MEB, observadas tanto con *S. sanguinis* como con *L. salivarius*, en las cuales se observaron una gran cantidad de hoyos de un tamaño mayor al de las bacterias), similares a las observadas por Langford y Frame en 2002 [LAF02] o Kim y colaboradores en 97 [KYL97] y que en cierta forma quedaba reforzado por los resultados de ICP-OES, en las cuales tanto en las muestras AI2 como SI2, la mayor cantidad de titanio se encontró siempre en el pellet, nos hizo pensar que el titanio podría encontrarse en forma de precipitados o partículas de gran tamaño.

Pero en nuestras observaciones por MEB del pellet, no fue posible observar ninguna partícula de titanio e incluso tampoco fue posible detectar señal de este elemento por EDS, sin embargo en el caso de las bacterias en contacto con la muestra

SI2 restos de carburo de silicio fueron encontrados, dejando nuevamente la incógnita abierta.

Finalmente se decidió observar tanto el interior de las bacterias que estuvieron en contacto con superficies de titanio, pensando que las bacterias hubiesen “fagocitado” o “interiorizado” dichas partículas (tomando en cuenta la necesidad previa de digerir las muestras, con la finalidad de detectar el titanio en solución para los análisis de ICP-OES); como la superficie de las muestras de titanio.

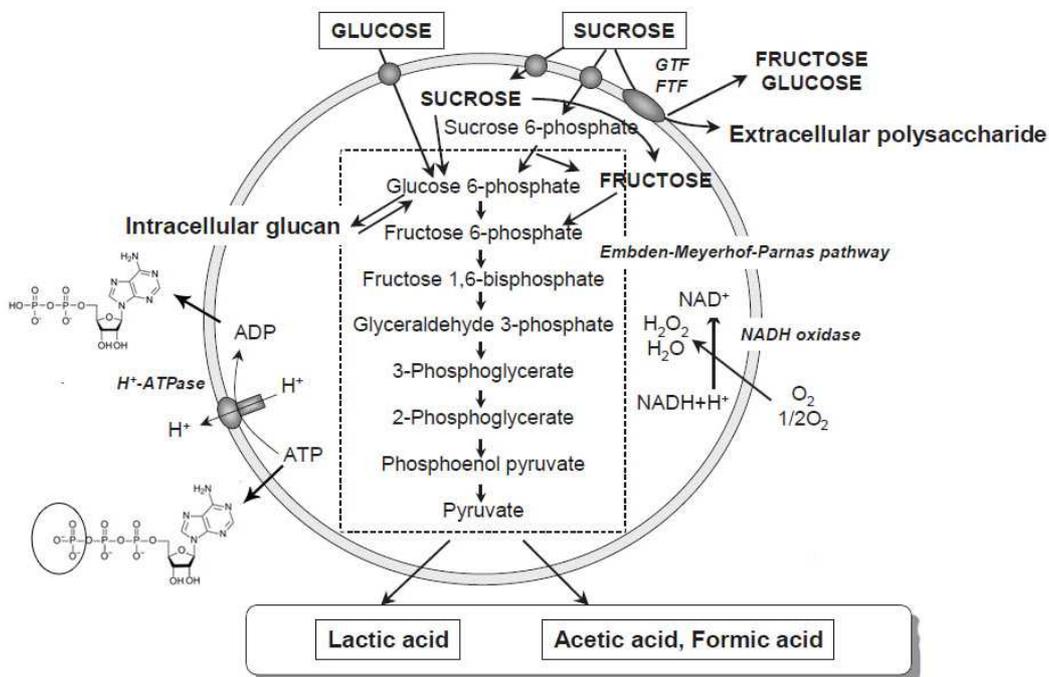
Las microfotografías de MET mostraron fue zonas electrodensas en el interior de las bacterias que estuvieron en contacto con discos de titanio (AI2 y SI2) previamente inoculadas en MSAM, comparadas con una muestra que no estuvo en contacto con titanio, en las cuales estas zonas (o partículas) no son visibles. Aunque no fue posible identificar la composición de los precipitados intracelulares debido al tamaño nanométrico que presentaban por un lado y por otro el daño causado por el haz de electrones a la muestra (su grosor es de entre 80 y 50nm y al material de inclusión es rápidamente destruido por el haz de electrones). Es importante enfatizar que estos se observaron en las muestras de bacterias que estuvieron en contacto con superficies de titanio, lo que nos hace suponer que podrían ser partículas de dicho metal.

En el caso de las superficies de titanio, pudo observarse la formación de precipitados, los cuales al ser analizados por EDS, mostraron la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y P en su composición (entre otros elementos) y la relación Ca/P estuvo entre 1.61 y 1.63 (relación que corresponde con varios fosfatos de calcio). De acuerdo con Hanawa y colaboradores la disolución de la capa superficial de titanio y su reprecipitación en un medio biológico formara inicialmente una capa oxidada con iones de fosfato incorporados a la capa más superficial, con la posterior formación de un fosfato de calcio o un fosfato de calcio-titanio.

Cuando observamos el pellet por MEB (Figura 5.9) se detecta la presencia de precipitados, que al ser analizados muestran una composición que incluye  $\text{Na}^+$ , P y  $\text{Ca}^{2+}$  (los cuales pueden provenir de la superficie de la muestra) pero no fue posible identificar la presencia de titanio, quizás debido a la baja cantidad cuantificada por ICP-OES.

La formación de estos fosfatos parece similar a la formación de lo denominado como calculo dental (sarro), estudiado ampliamente y que se ha demostrado que su composición es una fase mineral, donde se han encontrado desde fosfato octacalcico, whitlockita hasta brucita. [TPM76]

Al analizar la composición de la saliva artificial se observo que el calcio se encontraba entre la composición base del medio, no así el fosfato. Sin embargo, el fósforo juega un papel muy importante en el metabolismo de las células (ya sea eucariotas o procariotas), ya que es la parte estructural de una variedad muy amplia de arreglos de moléculas biológicas, incluyendo los fosfolípidos de la membrana celular y de los organelos intracelulares, los ácidos nucleicos, enzimas, etc. Por otro lado, la fosforilación y desfosforilación induce cambios dramáticos en la actividad de muchas enzimas. Compuestos organofosfatados como el adenosintrifosfato (ATP), creatinina fosfato y difosfoglicerato almacenan energía en sus enlaces fosfatos. La hidrólisis de la ATP provee de mucha energía a la célula (Figura 5.15), por ejemplo la captación de glucosa, la producción de lactato y los niveles de ATP varían directamente con la concentración intracelular de fosfatos. El nivel intracelular de fosfatos también regula la actividad enzimática.



**Figura 5.15.** Metabolismo de los carbohidratos en los estreptococos. [TAK05]

La concentración inorgánica de fosfatos intracelulares es similar a la concentración en el fluido extracelular (1-1,3mmol/L), pero estos valores no son debidos sólo a un simple mecanismo de equilibrio. El potencial eléctrico de las células en relación a los

fluidos extracelulares indica que hay un potencial negativo a través de la membrana con la tendencia a repeler los iones fosfatos del citoplasma, es decir que hay un proceso activo de bomba de iones fosfato dentro de la célula contra el potencial de membrana, para mantener las concentraciones citoplasmáticas de fosfatos.

Con esto la presencia de los precipitados observados sobre la superficie de titanio, pueden deberse por un lado a la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio y por otro lado a la presencia en el medio de los fosfatos provenientes del metabolismo de la glucosa, que por afinidad entre ellos se atraen y depositan.

## 5.6. CONCLUSIONES

De esta sección podemos concluir dos cosas:

- Las bacterias (o más específicamente) sus productos metabólicos (además de los productos producidos por las células involucradas en la respuesta inflamatoria y/o inmunológica) son capaces de causar un daño importante sobre las superficies del titanio. Este problema puede ser un factor clave en la peri-implantitis, ya que la presencia de partículas en los tejidos circundantes puede incrementar de manera importante la respuesta inflamatoria en el tejido gingival aunada a la respuesta dada por la presencia de placa dento-bacteriana.
- Y aunque, el daño es más fácil de observar en las muestras Smooth, las superficies con más pérdida de material, fueron los discos granallados. Pero al mismo tiempo, el tipo de partícula tiene un efecto en la respuesta observada, donde las superficies granalladas con  $Al_2O_3$ , presentan una mejor respuesta al daño causado por las bacterias, corroborando los resultados anteriores (capítulos 3 y 4), que indican que la superficie Al2 pudiese ser utilizada en las zonas que estarán más cercanas a la cavidad oral para incrementar el área de contacto entre el tejido gingival formando un mejor sellado biológico.

---

---

## 5.7. REFERENCIAS

- [ACS99] Acero J., Calderón J., Salmerón J.I., Verdaguer J.J., Concejo C., Somacarrera M.L., *The behaviour of titanium as a biomaterial microscopy study of plates and surrounding tissues in facial osteosynthesis*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 27 (1999) 117-123.
- [AGF03] Aparicio C., Gil F.J., Fonseca C., Barbosa M., Planell J. *Corrosion behaviour of commercial pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications*. Biomaterials 24 (2003) 263-273.
- [BSB90] Black J., Sherk H., Bonini J., Rostoker S., W. R., Schajowicz F., Galante J.O., *Metallosis associated with a stable titanium-alloy femoral component in total hip replacement*. Journal of bone and joint surgery. 72 (1990) 126-130.
- [BRU88] Bruneel N., Helsen J.A., *In vitro simulation of biocompatibility of Ti-Al-V*. Journal of biomedical Materials Research 22 (1988) 203-214.
- [HAA98] Hanawa T., Asami K., Asaoka K., *Repasivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated bioliquid*. Journal of Biomedical Materials Research, 40 (1998) 530-538.
- [HAN91] Hanawa T. and Ota M., *Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution*. Biomaterials, 12 (1991) 767-774.
- [HAN99] Hanawa T. *In vivo metallic biomaterials and surface modification*. Materials Science and Engineering A267 (1999) 260-266.
- [HAN04] Hanawa T., *Metal ion release from metal implants*. Materials Science and Engineering C 24 (2004) 745-752
- [JME97] Jorgenson D.S., Mayer M.H., Ellenbogen R.G., Centeno J.A., Johnson F.B., Mullick F.G., Manson P.N., *Detection of titanium in human tissues after craniofacial surgery*. Plastic and Reconstructive Surgery 99 (1997) 976-979.
- [KAK98] Kedici S., Aksut., Kilicarslan M., Bayramoglu G., Gokdemir K., *Corrosion behaviour of dental metals and alloys in different media*. Journal Oral Rehabilitation 25 (1998) 800-808.
- [KYL97] Kim Y.K., Yeo H.H., Lim S.C., *Tissue response to titanium plates: a transmitted electron microscopic study*. Journal of Oral Maxillofacial Surgery 55 (1997) 322-326.
- [LAF02] Langford R. and Frame J.W., *Tissue changes adjacent to titanium plates in patients*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 30 (2002) 103-107.
- [MAR08] Marshall W., Bangert S.K. Clinical Biochemistry, metabolic and clinical aspects. 2<sup>nd</sup> Edition. USA. Pp 78-82.
- [MEF96] Meffert .M., *Periodontitis vs Peri-implantitis: The same disease? The same treatment?* Critical Review in Oral Biology and Medicine, 7 (1996) 278-291.
- [MSK00] Mu Y., Kobayashi T., Sumita M., Yamamoto A., Hanawa T., *Metal ion release from titanium with active oxygen species generated by rat macrophages in vitro*. Journal of Biomedical Materials Research 49 (2000) 238-243.
- [MPB01] Meningaud J.-P., Poupon J., Bertrand J.-Ch., Chenevier C., Galliot-Guilley M., Guilbert F., *Dynamic study about metal release from titanium miniplates in maxillofacial surgery*. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 30 (2001) 185-188.

[NOR08] Norowsky P. Andrew., Bumgardner Joel D., *Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review*, Journal of Biomedical Materials Research. Part B. Applied Biomaterials Published Online: 12 August, 2008.

[PAN09] Pantazopoulos G and Vazduirvanidis A. *Microbiologically influenced corrosion in water pipes: A morphological study*. Microscopy and Analysis, 118 (2009) 5-10.

[SCL02] Santos M., Campos M., Line S., *Early dental implant failure: a review of the literature*. Brazilian Journal Oral Science. 1 (2002) 103-111.

[TAK05] Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. International Congress Series 1284 (2005) 103-112.

[WOO04] Wood Melanie R. and Vermilyea Stanley G., *A review of selected dental literature on evidence-based treatment planning for dental implants: Report of the Committee on research in fixed prosthodontics of the academy of fixed prosthodontics*. Journal of Prosthetic Dentistry 92 (2004)447-462.

## 6. FIGURAS Y TABLAS

- *Figura 1.1. Implante dental de Titanio (A) y una esquematización de la interacción de las partes que lo componen con los tejidos circundantes (B).* ..... 13
- *Figura 1.2. Implante dental y su estrecha relación con el hueso circundante [TAE03]...* 14
- *Figura 1.3. Epitelio de unión (JE) lo que corresponde al sellado biológico (formado por queratinocitos) y su tejido conectivo adyacente (CT), donde las células precursoras son los fibroblastos. La zona oscura de la izquierda corresponde al cuerpo del implante. [LLS91].....* 15
- *Figura 1.4. Tipos de implantes donde se puede apreciar diversas superficies, especialmente a nivel del cuello. Como ejemplo tenemos dos empresas dedicadas a la fabricación de implantes dentales.* ..... 16
- *Figura 1.5. Porción apical del epitelio peri-implantar con anticuerpos (a) o sin anticuerpos (b) observado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión. En donde claramente pueden identificarse los hemidesmosomas (HD) en la capa íntima de el epitelio peri-implantar (PIE). [AYY0].....* 18
- *Figura 1.6 Representación esquemática de la evolución de la peri-implantitis. Primero se observa la correcta interrelación del implante con el tejido circundante (A). La formación inicial de una bolsa periodontal (B) con la subsecuente migración del tejido alrededor del implante (C) y la pérdida de tejido óseo de soporte (D), puede culminar en el fallo del tratamiento.* ..... 19
- *Figura 1.7 En la imagen A se observa la pérdida del soporte dental por enfermedad periodontal y en B se observa la imagen radiográfica, donde se aprecia la pérdida ósea causada por periodontitis [LSK05].....* 20
- *Tabla 1.1. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales, endodónticas y caries según Wade W.G.y colaboradores. [WML05].....* 20
- *Figura 1.8 Modificación de la imagen de Katsikogianni and Missirlis, representando la adhesión inicial de bacterias sobre la superficie de los implantes dentales. Este proceso puede estar dado por dos vías; una con interacción directa sobre dicha superficie por mecanismos físico-químicos y otra por la presencia de una capa de proteínas adsorbidas sobre la superficie. [KAM04].....* 22
- *Figura 1.9 Imagen de una infección crónica alrededor de un implante dental. Además puede observarse una fístula en el fondo de saco (indicado por una flecha).....* 23
- *Figura 2.1. Representación esquemática de la interacción de un diente (lado izquierdo) con los tejidos circundantes, la profundidad del surco gingival y las proporciones correspondientes a la unión con el tejido epitelial y el tejido conectivo que en conjunto forman el espacio biológico. Mientras que del lado derecho, se esquematiza la similitud en la interacción del implante dental con los tejidos de soporte (modelo explicado por Berglundh y colaboradores [BLE91]).* ..... 34
- *Figura 2.2. Clasificación de las diferentes metodologías que se pueden emplear para la caracterización de la topografía de una superficie (en color verde se encuentra indicadas las técnicas que se utilizaron en este trabajo de Tesis).....* 35
- *Figura 2.3. Representación del funcionamiento de un microscopio interferométrico, donde básicamente se puede apreciar el complejo sistema de iluminación empleado para la obtención de la rugosidad de una superficie [BWM88].....* 36
- *Figura 2.4. Representación de las fases líquido 1-líquido 2- vapor o líquido-sólido-vapor, para la medición del ángulo de contacto por técnicas goniométricas. [DAT].....* 38
- *Figura 2. 5 Forma de las dos diferentes posibilidades de gotas y la respectiva ecuación que se emplea para el estudio en ADSA-D del radio ecuatorial (a) o del área de contacto (b) cuando estas no cumplen los parámetros laplacianos. [DEL97].....* 39
- *Tabla 2.1. Nomenclatura de las rugosidades seleccionadas para este trabajo.* ..... 49
- *Figura 2.6. Representación gráfica de la colocación de la muestra y la aguja para poder crecer la gota sobre la superficie.....* 52

- *Figura 2.7. Representación esquemática de la colocación de la muestra sobre un soporte de teflón en el contenedor de vidrio, donde el medio de inmersión es agua y se midió el ángulo formado por la superficie de titanio y una línea tangente a la superficie de la burbuja.*.....52
- *Tabla 2.2. Valores de energía superficial, constante dispersiva y polar de los líquidos empleados para el cálculo de la energía de superficie del sólido.* .....53
- *Figura 2.8. Observación de los discos de Titanio por MEB, donde se pueden apreciar, las imperfecciones en la superficie Smooth (en la cual fue necesario llegar a mayores aumentos para poder observar estos detalles sobre la superficie) y los anillos concéntricos obtenidos por el mecanismo de corte en las muestras Mech.*.....55
- *Figura 2.9. Imágenes de MEB de las muestras obtenidas por granallado con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y SiC. La presencia de restos de partículas en la superficie se puede apreciar en las imágenes Al6 y Al2 (flechas).*.....56
- *Tabla 2.3. Valor de la media de la rugosidad obtenida de las diferentes superficies (alúmina y carburo de silicio).*.....56
- *Tal y como en el caso de la Ra, los valores aumentaban en cuanto al tamaño de la partícula (sin considerar la diferente naturaleza química), los valores de Rq y Rt también aumentan de la misma manera, como se puede apreciar en la Tabla 2.4.* .....57
- *Tabla 2.4. Tabla comparativa entre los diferentes datos de la rugosidad aportados por el programa Vision 32 a partir de las imágenes obtenidas con el interferómetro.*.....57
- *Figura 2.10. Ejemplo de las imágenes obtenidas con el microscopio interferométrico, donde se puede apreciar con mayor detalle la topografía de las superficies para cada tipo, las cuales fueron utilizadas para obtener los valores de Ra.*.....58
- *Tabla 2.5. Valores de área real de los discos de titanio. Es claramente visible como aumenta el área total casi al doble en las muestras granalladas con partículas de mayor tamaño (Al6 y Si6).* .....59
- *Figura 2.11. Variaciones del ángulo de contacto para las diversas superficies de titanio.* 59
- *Figura 2.12. Formas de las gotas de agua sobre las diferentes superficies de Ti-cp vistas desde una perspectiva cenital, donde se aprecia claramente la forma no laplaciana de las mismas especialmente sobre la muestra Mech. Por otro lado sobre las muestras Smooth y Al2 se ve claramente las variaciones que puede presentar una gota con el mismo volumen sobre la misma superficie.*.....60
- *Figura 2.13. Valores de ángulo de contacto obtenidos del modo convencional (ADSA-P ó perfil) y desde cenital (ADSA-D), los cuales muestran valores de media iguales a los obtenidos desde perfil, (Smooth y Mech presentan una mayor barra de error desde perfil).*.....61
- *Figura 2.14. Comparación de la rugosidad (Ra) de los discos de titanio y la mojabilidad de las superficies. Aunque el ángulo de contacto aumenta en las superficies de mayor Ra, la naturaleza química de la partícula empleada para el granallado parece tener una influencia en la mojabilidad (en esta grafica sólo están representados los valores de la media de cada medición y se encuentran ordenados de menor a mayor rugosidad).*.....61
- *Figura 2.15. Seguimiento del avance y retroceso de la gota de agua sobre la superficie de Titanio Al2. En este caso, el área de contacto cambia conforme la gota aumenta de tamaño (A, B y C) alcanzando su máxima área (D) cuando se ha dejado de inyectar agua y mantiene esta área hasta el final de la extracción del agua. Al mismo tiempo se puede apreciar la evolución de del ángulo de contacto durante todo el procedimiento...*62
- *Figura 2.16. Ángulo de contacto y radio de contacto del ensayo de avance de la gota.* 64
- .....64
- *Figura 2.17. Tendencia del ángulo de avance en todas las muestras. De manera general se puede observar el mismo comportamiento en todas las muestras excepto en Mech.*.....64
- *Figura 2.18. Avance de la burbuja de aire en agua, donde se puede apreciar como el área de contacto se mantiene constante.*.....65
- *Figura 2.19. Ángulo de contacto y radio de contacto del ensayo de avance de la burbuja (retroceso de la gota).*.....67

- *Figura 2.20. Ángulo de retroceso (avance de la burbuja) en función del tiempo..... 67*
- *Tabla 2.6. Valores de mojabilidad (determinada por el ángulo de contacto) de las superficies de titanio con agua, obtenidos con por las diferentes técnicas..... 68*
- *Figura 2.21. Valores de ángulo de contacto obtenidos en los ensayos de avance y retroceso (Media y su desviación estandar) graficados contra la rugosidad..... 68*
- *Tabla 2.7. Ángulos de contacto aparentes (calculados con la ecuación de Wenzel) de los tres líquidos utilizados para el cálculo de la energía superficial..... 69*
- *Tabla 2.8. Valores de energía superficial (SE) de las diferentes muestras empleadas en este trabajo de tesis con su componente polar ( $\sigma_s^p$ ) y dispersiva ( $\sigma_s^d$ )..... 69*
- *Figura 2.22. Grafica componente polar vs componente dispersiva de las diferentes superficies de titanio..... 69*
- *Tabla 2.9. Porcentaje de área cubierta por fibroblastos sobre las diversas superficies de titanio. Estos resultados se obtuvieron a partir del contraste entre las zonas fluorescentes y el resto de la superficie con el software ImageJ®..... 74*
- *Figura 2.26. Análisis semicuantitativo del porcentaje de células adheridas sobre las seis diferentes superficies de titanio sin pre-tratamiento vs Rugosidad (A), energía superficial (B), constante dispersiva (C) y constante polar (D)..... 75*
- *Figura 2.27. Análisis semicuantitativo del porcentaje de células adheridas sobre las seis diferentes superficies de titanio (previo tratamiento con Suero) vs Rugosidad (A), energía superficial (B), constante dispersiva (C) y constante polar (D)..... 76*
- *Figura 2.28. Análisis semicuantitativo del porcentaje de células adheridas sobre las seis diferentes superficies de titanio (previo tratamiento con Fibronectina) vs Rugosidad (A), energía superficial (B), constante dispersiva (C) y constante polar (D)..... 77*
- *Figura 3.1. Fotografía de la acumulación de placa dento-bacteriana en la región mandibular, en la cual se puede apreciar una encía inflamada, eritematosa..... 93*
- *Figura 3.2. Representación grafica de las cuatro fases presentes durante un cultivo bacteriano, donde la fase estacionaria esta directamente relacionada con el periodo de producción de metabolitos o toxinas que tendrán influencia en infecciones o intoxicaciones. [SIW96]..... 99*
- *Tabla 3.1. Superficies de titanio empleadas en los ensayos de adhesión bacteriana.. 102*
- *Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo Todd-Hewitt de Scharlau ® (composición en g/L). El agar se agrega sólo en el caso de trabajar con medio sólido..... 102*
- *Tabla 3.3. Composición del medio de cultivo MRS de Scharlau ® (Composición en g/L). El agar se agrega sólo en el caso de trabajar con medio sólido..... 102*
- *Tabla 3.4. Tiempos de deshidratación, para la posterior observación de las muestras por MEB. La solución de alcohol se hizo con agua Milli-Q..... 104*
- *Figura 3.3. Curva de crecimiento de S. sanguinis, donde se representan por un lado, el número de células viables hasta 72 horas (número de ufc/ml) y por otro lado el crecimiento celular medido por la turbidez del medio (densidad óptica observada a 600nm)..... 106*
- *Figura 3.4. Curva de crecimiento de L. salivarius, del lado izquierdo (color azul) se representa el crecimiento de las células, observado por la turbidez del medio y del lado derecho (en negro) el recuento de células viables (cuantificado a partir de diluciones del inoculo original, sembrado en medio sólido e incubado a 37 °C por 48 horas)..... 107*
- *Figura 3.5. Porcentajes de adhesión bacteriana a diferentes solventes (Cloroformo, Dietil-eter y hexano para ambas cepas (S. sanguinis y L. salivarius)..... 107*
- *Figura 3.6. Primeras observaciones por microscopia de fluorescencia de las muestras de Titanio, posteriores a la incubación (2 horas) con bacterias. Es evidente la dificultad para cuantificar el número de bacterias por área, ya que la distribución no es uniforme. Por otro lado la profundidad de campo del microscopio aunado a la gran rugosidad dificultaba el enfoque de todas las bacterias presentes en cada superficie, además de que los programas de análisis de imagen consideraban en la cuantificación por área las zonas brillantes (indicadas con flechas en A12, S12 y S16). ..... 109*
- *Figura 3.7. Superficies de titanio con bacterias (S. sanguinis) después de 2 horas de incubación en Todd-Hewitt a 37°C. Es posible observar por un lado la forma de las*

- células y por otro su organización. Además la distribución de las células no parece tener predilección por una zona específica ya que se pueden encontrar adheridas tanto en las partes más elevadas de las muestras rugosas (SI2) como en las partes más profundas de las mismas (SI6)..... 110
- *Figura 3.8. Observación en MEB de las diferentes superficies de Titanio después de 2 horas de incubación con L. salivarius en su medio de cultivo (MRS). En el caso de esta bacteria, es posible observar una distribución en cúmulos en todas las superficies, además de observar algunos agujeros sobre la superficie de titanio en la muestra Smooth con la presencia de bacterias alrededor y sobre estos defectos. Por otro lado, la presencia de una capa cubriendo la superficie de las muestras y en algunos casos sobre las bacterias, es más evidente en las muestras rugosas (AI2, AI6, SI2 y SI6)..... 111*
  - *Figura 3.9. Resultados de la cuantificación de bacterias (S. sanguinis) por unidad de área (UFC/mm<sup>2</sup>) sobre las diferentes superficies estudiadas, donde se puede apreciar claramente que el grupo de muestras granalladas con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, presenta un menor número de bacterias por milímetro cuadrado, e incluso la muestra AI2, presentó los mejores resultados incluso que las muestras de menor rugosidad Smooth y Mech. .... 112*
  - *Figura 3.10. Cuantificación de bacterias (L. salivarius) por unidad de área (UFC/mm<sup>2</sup>), donde las muestras granalladas con Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> presentaron un menor número de bacterias por milímetro cuadrado comparadas con las granalladas con SIC. Pero en este caso, la muestra Smooth (Ra ~100 nm) presentó un menor número de bacterias. .... 112*
  - *Figura 3.11. Comparación entre el número de UFC/mm<sup>2</sup> entre el titanio y la alúmina. 113*
  - *Estos datos se representaron en función de la Rugosidad (Ra), Energía superficial (total y sus componentes polar y dispersiva) tanto para S. sanguinis como para L. salivarius. En la figura 3.12 se representaron en A, el número de bacterias cuantificadas para cada una de las superficies y en B se muestran los resultados del número de bacterias por unidad de área..... 113*
  - *Figura 3.12. Cantidad de bacterias (S. sanguinis) adheridas sobre las diferentes superficies de titanio graficados contra la rugosidad. En A están representadas (en el eje y) el número total de bacterias cuantificadas sobre los discos de titanio, mientras que en B, esta representado el número de UFC/mm<sup>2</sup> ..... 114*
  - *Figura 3.13. Número de UFC/mm<sup>2</sup> (S. sanguinis) sobre las superficies de titanio, en este caso se representaron vs la energía superficial total (A), su componente dispersiva (B) y su componente polar (C)..... 115*
  - *Figura 3.14. Cantidad de bacterias (L. salivarius) adheridas sobre las diferentes superficies de titanio graficados contra la rugosidad. En A están representadas (en el eje y) el número total de bacterias cuantificadas sobre los discos de titanio, mientras que en B, esta representado el número de UFC/mm<sup>2</sup> ..... 115*
  - *Figura 3.17. Esquematación de los pasos implicados en la colonización bacteriana.121*
  - *Figura 4.1. Fotografías mostrando el impacto clínico de la rugosidad y la energía superficial (SFE) sobre la formación de placa dento-bacteriana. En la cual dos pequeñas bandas fueron pegadas sobre los incisivos centrales superiores de un paciente que elimino su higiene oral por tres días. Cada banda fue dividida en dos mitades: una región rugosa (R<sub>a</sub> 2 μm) localizada mesialmente y una región suave (R<sub>a</sub> 0.1 μm) localizada distalmente. La banda del lado derecho, fue un acetato (con una SFE: 58 erg/cm<sup>2</sup>) y la del lado izquierdo era Teflon (con una SFE: 20 erg/cm<sup>2</sup>). Para observar la placa dento-bacteriana presente, se tiñó con una solución de rojo neutro al 0,5 %. La región más suave mostró una disminución en la formación del biofilm debido a una baja SFE, mientras que la región rugosa demostró el predominio de la rugosidad superficial, es decir más placa dento-bacteriana sin diferencias entre los dos materiales. [TVS06]129*
  - *Figura 4.2. Representación esquemática de la agregación bacteriana en la placa dental, donde los colonizadores primarios se adhieren a la película adquirida, ya sea por algún receptor específico, o por adhesión inespecífica, facilitando la adhesión de los colonizadores secundarios, entre los cuales se encuentran F. nucleatum, P. gingivalis y A. actinomycetemcomitans. [KOL93]..... 131*
  - *Figura 4.3. Placa dento-bacteriana teñida sobre una lamina de resina Epon® adaptada al contorno de un diente y colocada en boca por dos días. La banda negra (en la parte inferior de la imagen) corresponde a la película adquirida. [LMT75] ..... 134*

- *Tabla 4.1. Composición del MSAM (Medio Saliva Artificial Modificada), las cantidades están expresada en g/L), los componentes marcados con (\*) fueron agregados para favorecer el crecimiento de las bacterias. .... 137*
- *Tabla 4.2. Tiempos de deshidratación, para la posterior observación de las muestras por MEB..... 138*
- *Figura 4.4. Crecimiento de S. sanguinis en MSAM, donde se muestran el número de viables y la densidad óptica del medio (medida a 600 nm)..... 140*
- *Figura 4.5. Crecimiento de L. salivarius en MSAM. Se muestran el número de viables en el medio y la densidad óptica (medida a 600 nm)..... 141*
- *Figura 4.6. Imágenes de MEB de S. sanguinis (CECT 480) inoculada en MSAM, después de 2 horas de incubación a 37°C sobre las muestras de ti-cp..... 141*
- *Figura 4.7. Imágenes de MEB de L. salivarius (CECT 4063) inoculada en MSAM, después de 2 horas de incubación a 37°C sobre las muestras de ti-cp..... 142*
- *Figura 4.8. Cuantificación de bacterias (S. sanguinis) por unidad de área inoculada en MSAM. Los resultados muestran un menor número de bacterias por unidad de área adheridas sobre la AI2..... 143*
- *Figura 4.9. Cuantificación de bacterias (L. salivarius) por unidad de área, previamente inoculada en MSAM. Donde se aprecia un menor número de bacterias por unidad de área tanto en AI2 como en SI2, comparadas con Smooth. .... 143*
- *Figura 4.10. Cantidad de bacterias (S. sanguinis inoculadas previamente en saliva artificial modificada) adheridas sobre las diferentes superficies de titanio graficados contra la rugosidad. En A están representadas (en el eje y) el número total de bacterias cuantificadas sobre los discos de titanio, mientras que en B, esta representado el número de UFC/mm<sup>2</sup> denotando la misma tendencia..... 144*
- *Figura 4.11. Número de UFC/mm<sup>2</sup> (S. sanguinis previamente inoculada en MSAM) adheridas sobre las superficies de titanio, en este caso se representaron vs la energía superficial total (A), su componente dispersiva (B) y su componente polar (C)..... 145*
- *Figura 4. 12 Ampliación de la curva de No. de bacterias (S. sanguinis inoculado en MSAM) vs rugosidad. .... 146*
- *Figura 5.1. Representación esquemática de la capa superficial de óxido de titanio y la reconstrucción de la misma in vivo, de acuerdo con los estudios realizados por Hanawa. [HAN99]..... 161*
- *Figura 5. 2.Fotografía de MEB de una erosión observada sobre la superficie de una placa de titanio con un diámetro de 25 μm (A), mientras que en B se observa una imagen de microscopia óptica de tejido blando circundante a una placa de titanio, la cual muestra depósitos granulares tanto intra como extracelulares (HE x 200). [ACS99]..... 162*
- *Figura 5.3. Depósito extracelular de titanio mostrado por Langford em tejido circundante a una placa de fijación. [LAF02]..... 163*
- *Tabla 5.1. Concentraciones de alcoholes y los tiempos de inmersión correspondiente, para la deshidratación de las bacterias para ser observadas por MEB. .... 166*
- *Tabla 5.2. Concentraciones de acetona utilizadas para la deshidratación de las muestras para MET. .... 168*
- *Tabla 5.3. Componentes de la Resina Epon empleado para embeber las muestras para su posterior corte por ultramicrotomía. .... 168*
- *Tabla 5.4. Disoluciones de resina empleadas para el proceso de infiltración con los respectivos tiempos. El catalizador se agrega en una mezcla nueva y se utiliza sólo en los últimos dos pasos del proceso..... 168*
- *Figura 5.4. Discos de titanio Smooth después de 2 (A) y 24 horas (B y C) de incubación. En la microfotografía (A), la muestra fue incubada con S. sanguinis, mientras que en caso de B y C los discos estuvieron incubados con L. salivarius..... 169*
- *Figura 5.5. Variación del pH en los medios de cultivo Todd-Hewitt, MRS y MSAM (con S. sanguinis). .... 170*
- *Dada la pérdida de material de la superficie de las muestras (observada por MEB) y acidificación del medio, evidenciada por la caída en el pH durante el cultivo, se pensó en una posible corrosión del material producida por los productos metabólicos. Se utilizó*

- entonces la técnica ICP-OES para cuantificar la cantidad de titanio desprendido de la superficie en los medios de cultivo. Las primeras mediciones se realizaron haciendo diluciones con  $\text{HNO}_3$  y agua de las muestras (medios de cultivo), pero no se obtuvo ningún tipo de señal, por lo que fue necesario hacer la digestión del material orgánico para poder cuantificar el titanio..... 170
- *Figura 5.6. Cuantificaciones de P.D. de titanio en los medios posterior a la incubación con S. sanguinis tanto en Todd-Hewitt broth (A) como en MSAM (B), a 2 horas de incubación (negro) y 24 horas (rojo)..... 171*
  - *Figura 5.7. Cuantificaciones de titanio (ppm) desprendido de las superficies de los discos Smooth, AI2 y SI2, durante el ciclo de crecimiento de S. sanguinis en MSAM... 173*
  - *Figura 5.8. Seguimiento de adhesión de S. sanguinis inoculada en MSAM, el número de bacterias por unidad de área fue prácticamente igual para todos los casos. .... 174*
  - *Figura 5.9. Imagen de MEB, donde se puede apreciar a las bacterias S. sanguinis después de un periodo de incubación de 24 horas con superficies de Titanio en MSAM. Las imágenes muestran partículas las cuales fueron analizadas por EDS y en el caso de la muestra AI2 (indicados con las flechas rojas) los elementos encontrados fueron Na, P, y Ca, mientras que en la muestra SI2 (indicados con flechas blancas), los elementos encontrados fueron Si y C además de Na, P y Ca. En ninguno de los dos casos se encontró vestigio de titanio. .... 174*
  - *Figura 5.10. Imágenes de MET de S. sanguinis inoculada en MSAM. En B (AI2) y C (SI2) es posible observar zonas electrodensas dentro del citoplasma bacteriano (flechas rojas), el cual puede estar asociado a pequeñas acumulaciones de titanio en el interior de la bacteria, ya que estas zonas no fueron observadas en la muestra que no estuvo en contacto con superficies de titanio (A)..... 175*
  - *Figura 5.11. Formación de cristales sobre la superficie de la muestra AI2 y los resultados de EDS, donde la relación Ca/P fue de 1.61..... 175*
  - *Figura 5.12. Cristales observados sobre la superficie SI2, previamente incubada con S. sanguinis en MSAM por 24 horas, en este caso la relación Ca/P es de 1.63. .... 176*
  - *Figura 5.13. Precipitados observados sobre la superficie SI2 después de 24 hrs. en contacto con MSAM sin bacterias. .... 176*
  - *Figura 5.15. Metabolismo de los carbohidratos en los estreptococos. [TAK05]..... 182*

## 7. GLOSARIO

- **Autoclisis:** Mecanismo de autolimpieza en la cavidad oral, debido a los movimientos de la lengua, músculos de la boca y a la saliva.
- **Célula viable:** Se definen como aquella que es capaz de dividirse y formar una colonia en el medio de cultivo.
- **EDS:** (siglas en inglés) Espectroscopia de dispersión de electrones.
- **Hemidesmosoma:** Tipo de unión intercelular que ancla a la célula a la lámina basal.
- **MATS:** (siglas en inglés) Adhesión microbiana a solventes.
- **MEB:** Microscopia Electrónica de Barrido.
- **MET:** Microscopia Electrónica de Transmisión.
- **MOE:** Microscopia Óptica de Epifluorescencia.
- **ROG:** Regeneración ósea guiada. Procedimiento quirúrgico encargado de la restauración y restitución del hueso alveolar perdido alrededor ya sea de un diente o un implante dental, según sea el caso.
- **RTG:** Regeneración tisular guiada. Procedimiento empleado para la restitución de los tejidos blandos parodontales y la re inserción del epitelio de unión.
- **UFC:** Unidad Formadora de Colonias.
- **Xerostomía:** Síntoma asociado con algunas padecimientos crónicos y autoinmunes, tales como el síndrome de Sjögren, que se define como sequedad bucal debido a un mal funcionamiento de las glándulas salivales.

**PRESENTACIONES DEL TRABAJO EN CONGRESOS.**

- Rodríguez A., Engel E., Juárez A. and F.J., Gil, Bacterial response to different Cp-Ti surfaces (Abstract). *Journal of Clinical Periodontology* 36 (2009), 78.
- Rodríguez-Hernández A. G., Engel E., Gil F.J, Bacterias y su implicación en el fallo de implantes de Titanio. *Biomecánica*, 17 (2009) 36-39.
- Analysis of Cp-Ti surfaces to enhance the biological sealing. **21 st European Conference on Biomaterials** Brighton UK. 9-13<sup>th</sup> September 2007. Oral Presentation
- **Alumina shot-blasted particles on rough cp-Ti surfaces prevents bacterial attachment** World Biomaterials Congress 2008, **Amsterdam, The Netherlands, 28<sup>th</sup> May to 1<sup>st</sup> June 2008. Poster**
- Bacterial behaviour on different rough cp-Ti surfaces: an approach to oral environment **SIBB BioBCN 2008**, Barcelona España, 17-19<sup>th</sup> September 2008. Oral Presentation.
- Bacterial interaction to different commercial pure titanium surfaces in modified artificial saliva. **2nd IBEC Symposium**, Barcelona España 14 y 15<sup>th</sup> April 2009. Poster.
- Bacterial response to different cp-Ti surfaces. **Europerio 6**, Stockholm Sweden, 4-6<sup>th</sup> June 2009. Poster.

## **ESTUDIOS FUTUROS**

Dado que este trabajo de tesis, es un trabajo preliminar en cuanto al estudio de la interacción de superficies de implantes de titanio con bacterias, existe una gran cantidad de posibles campos de investigación en esta área, de los cuales podemos mencionar los siguientes:

1. Modificación superficial de los implantes con materiales antimicrobianos (ya sea bacteriostático o bactericida).
2. Diseño de sistemas complejos bacterianos in vitro, imitando la organización intracelular y funcional de la placa dento-bacteriana.
3. El diseño y elaboración de un sistema continuo de cultivo de bacterias, para estudios a tiempos más largos tanto de la formación de placa dento-bacteriana como de su repercusión sobre los materiales utilizados dentro de la cavidad oral.