

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Microbiología I**



**Estudio de la adherencia bacteriana y formación de  
biopelículas en materiales de Ti-6Al-4V anodizado**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

María de la Concepción Pérez-Jorge Peremarch

Bajo la dirección del doctor

Jaime Esteban Moreno

**Madrid, 2014**

# **ESTUDIO DE ADHERENCIA BACTERIANA Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MATERIALES DE Ti-6Al-4V ANODIZADO**

---

Tesis Doctoral presentada por:

**MARÍA DE LA CONCEPCIÓN PÉREZ-JORGE PEREMARCH**

Director de la Tesis:

**Dr. JAIME ESTEBAN MORENO**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Microbiología I**





D. Jaime Esteban Moreno, Doctor en Medicina y Cirugía, especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, Grado de Doctor en Microbiología por la Universidad Complutense.

CERTIFICA:

Que María de la Concepción Pérez-Jorge Peremarch, Licenciada en Farmacia, especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, ha completado bajo su dirección los trabajos conducentes a la obtención de resultados para optar al título de DOCTOR por la Universidad Complutense de Madrid. Y en vista de lo adecuado de su desarrollo, se autoriza la presentación de esta Tesis Doctoral para su evaluación.

Y para que conste, se firma en Madrid, a 20 de agosto de 2013.

Fdo.: D. Jaime Esteban Moreno



# **ESTUDIO DE ADHERENCIA BACTERIANA Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MATERIALES DE Ti-6Al-4V ANODIZADO**

---

Tesis Doctoral presentada por:

**MARÍA DE LA CONCEPCIÓN PÉREZ-JORGE PEREMARCH**

Director de la Tesis:

**Dr. JAIME ESTEBAN MORENO**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Microbiología I**



## AGRADECIMIENTOS

El camino es largo hasta llegar hasta aquí, por ello quiero agradecer a mucha gente su ayuda, por acompañarme cada día y hacer que esto haya sido posible.

En primer lugar a mi marido, Luis De Miguel, que ha estado día y noche, durante estos 4 años, ayudándome y apoyándome de manera incondicional, pudiendo hacer posible este momento, la presentación de mi tesis doctoral.

En segundo lugar a mi director de tesis, Jaime Esteban, que desde el primer momento en que pise el laboratorio de investigación, como residente de primer año, ha hecho que cada día que pase me guste más la investigación. Una persona que me ha enseñado, entre muchas otras cosas, que uno de los principales objetivos de la investigación básica debe ser la aplicación clínica. Con el que he vivido momentos inolvidables para un investigador, la primera comunicación oral “en inglés”, la primera patente, el primer artículo publicado en una revista internacional, congresos e innumerables éxitos.

En tercer lugar, me gustaría agradecer al equipo con el que he trabajado estrechamente estos años, porque sin ellos no se habrían cultivado todos estos éxitos. Concretamente al equipo del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas, formado por Ana Conde Del Campo y M<sup>a</sup> Ángeles Arenas, por haber emprendido este camino juntos, años llenos de éxitos y que espero que continúen en un futuro.

En cuarto lugar, a una persona que creyó en mí y que me permitió emprender una rotación externa en el Centro de investigación en biopelículas más importante del mundo, el Center for Biofilm Engineering (CBE), el Dr J. William Costerton, que falleció el año pasado. Una persona cuya aportación a la ciencia, sobre la naturaleza de las biopelículas y su papel en infecciones bacterianas, tiene actualmente un valor incalculable.

No quiero olvidar tampoco el apoyo que recibí desde mi tutor en el CBE, Dr James Garth, con el que pusimos en marcha el trabajo sobre formación de biopelículas en

materiales anodizados con flúor y que me permitió trabajar en su departamento, tratándome como una más del equipo.

Una especial mención a mi familia, mi padre (José Manuel), mi madre (Macu) y mis dos hermanas (Elena y Blanca), por haber estado siempre ahí, apoyándome en todo momento incondicionalmente, sin ellos nada de esto podría haberse hecho realidad.

Y por último, pero no menos importante, agradecer la financiación recibida durante estos años de investigación, por una parte la ayuda recibida, para realizar la rotación externa en el CBE, por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), siendo beneficiaria de la beca “Ayuda a la Movilidad” del 2012. Por otra parte, la financiación recibida por el Programa CONSOLIDER-INGENIO 2010 del Ministerio de Ciencia e Innovación español, con título: “Funcionalización superficial de materiales para aplicaciones de alto valor añadido (FUNCOAT)”, un proyecto que lleva en activo desde el 2009 y que me ha permitido poder trabajar conjuntamente con el CENIM, poniendo los cimientos de un proyecto que ha tomado forma y que esperamos siga en desarrollo permitiendo el estudio de nuevos biomateriales.

Muchas gracias a todos, sin vosotros este trabajo no se hubiera llevado a cabo.

Madrid, 26 de agosto de 2013

**MARÍA DE LA CONCEPCIÓN PÉREZ-JORGE PEREMARCH**

# **PUBLICACIONES ORIGINALES Y PRESENTACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS**

## **PUBLICACIONES**

D. Lozano, J. M. Hernández-López, P. Esbrit, M.A. Arenas, E. Gómez-Barrena, J. de Damborenea, J. Esteban, **C. Pérez-Jorge**, R. Pérez-Tanoira, A. Conde. Multifunctional TiO<sub>2</sub> surfaces for medical implants. *Journal of materials Science: materials in medicine*. Under review. July 2013

Arenas MA, **Perez-Jorge C**, Conde A, Matykina E, Hernandez-Lopez JM, Perez-Tanoira R, De Damborenea J, Gómez-Barrena E, Esteban J. Doped TiO<sub>2</sub> anodic layers of enhanced antibacterial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013. Epub ahead of print. doi: 10-1016/j.colsurfb.2012.12.051. *Journal Impact Factor* (2011): 3.456. Q1 (Engineering, biomedical).

Perez-Tanoira R, **Perez-Jorge C**, Endrino JL, Gomez-Barrena E, Horwat D, Pierson JF, Esteban J. Bacterial adhesion on biomedical surfaces covered by micrometric silver islands. *Journal Biomedical Material Research A*. 2012. 100A: 1521–1528. *Journal Impact Factor*: 2.834. Q1 (Engineering, biomedical).

**Perez-Jorge C**, Conde A, Arenas MA, Perez-Tanoira R, Matykina E, de Damborenea JJ, Gomez-Barrena E, Esteban J. In vitro assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti-6Al-4V alloy. *Journal Biomedical Material Research A*. 2012. 100(7):1696-705. *Journal Impact Factor* (2011): 2.625. Q1 (Engineering, biomedical).

**Pérez-Jorge C**, Cordero J, Marín M, Esteban J. Prosthetic joint infection caused by *Helcococcus kunzii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012. 50(2): 528-530. *Journal Impact Factor*: 4.068. Q1 (Microbiology).

**C Pérez-Jorge Peremarch**, R Pérez Tanoira, MA Arenas, E Matykina, A Conde, JJ de Damborenea, E Gómez Barrena , J Esteban. “Bacterial adherence to anodized titanium alloy” Journal of Physics: Conference Series 252 (2010) 012011. Surface Modifications and Functionalization of Materials for Biomedical Applications.

R Pérez-Tanoira, **C Pérez-Jorge**, J L Endrino, E Gómez-Barrena, D Horwat, J F Pierson, J Esteban. Antibacterial properties of biomedical surfaces containing micrometric silver islands. Journal of Physics: Conference Series 252 (2010) 012015. Surface Modifications and Functionalization of Materials for Biomedical Applications.

### **CAPÍTULOS EN LIBROS**

Esteban J, **Pérez-Jorge C**, Pérez-Tanoira R, Gómez-Barrena E. Microbiological diagnosis of prosthetic joint infection. In Trebse R, ed. Infected Total Joint Arthroplasty. The Algorithmic Approach. Springer. Londres. 2012. pags. 165-180.

Esteban J, Pérez-Tanoira R, **Pérez-Jorge C**, Gómez-Barrena E. Bacterial adherence to biomaterials used in surgical procedures. In Kon K and Rai M eds. Microbiology for Surgical Infections: Diagnosis, Prognosis and Treatment. Elsevier. San Francisco. In press.

### **PATENTES**

#### **Patente nacional**

Título de la patente: Materiales de Titanio Anodizados con Flúor.

Número de la patente: P201030720.

Entidad titular: España. CSIC- IIS– Fundacion Jiménez Díaz.

Autores: Arenas MA, Conde A, Damborenea JJ, Matykina E, Esteban Moreno J, Gómez Barrena E, **Perez- Jorge Peremarch C**, Pérez Tanoira R.

#### **Patente internacional**

Título de la patente: Materiales de Titanio Anodizados con Flúor.

Número de la patente: PC T/ES2011/070342

Entidad titular: España. CSIC- IIS– Fundacion Jiménez Díaz.

Autores : Arenas MA, Conde A, Damborenea JJ, Matykina E, Esteban Moreno J, Gómez Barrena E, **Perez- Jorge Permarch C**, Pérez Tanoira R.

## **BECAS**

Beneficiaria de la Beca a la Formación 2012, otorgada por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, para realizar una estancia de tres meses en un centro de investigación extranjero. La estancia la realicé del 1 de agosto al 31 de octubre de 2012 en el Departamento biomédico del Center for Biofilm Engineering, Montana State University, EEUU. Trabajo dirigido por el Dr Garth James.

## **COMUNICACIONES ORALES EN CENTROS DE INVESTIGACIÓN Y CONGRESOS**

“Bacterial adhesion to fluorine modified surfaces of Ti6 Al 4V”. Ponente: Conchita Pérez-Jorge. Seminario impartido en el Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Montana, EEUU. Realizado el 27 de Septiembre del 2012 .

“Adhesión bacteriana a aleación de Ti6Al4V anodinada” Ponente: Conchita Pérez-Jorge. BIOCOAT, Work Package de biomateriales. Celebrado el 31 de Enero del 2012 en el Centro Nacional de Investigaciones metalúrgicas (CENIM), Madrid, España.

“*Staphylococcus spp* adhesion to barrier-layer modified titanium alloy”. Ponente: Conchita Pérez-Jorge. Congreso anual de la Sociedad Internacional de Tecnología en artroplastia (ISTA). Celebrado del 20 al 23 de Septiembre del 2011, Brujas, Bélgica.

“Bacterial adherence to anodized titanium alloy”. Ponente: Conchita Pérez-Jorge. BIOCOAT 2010 International Workshop. Celebrado el 24 de Junio del 2010, Zaragoza, España.

## **PRESENTACIONES DE PÓSTERS**

“*Staphylococcus spp* biofilm formation on modified surfaces of Ti6Al4V doped with fluorine”. Congreso internacional de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica e Infecciosas ( ESCMID). Celebrado del 27 al 30 de Abril del 2012, Berlín, Alemania.

“Estudio de adherencia bacteriana de *Staphylococcus spp* a discos de Ti6Al4V anodizado con flúor”. Congreso nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Celebrado el 9 de Mayo del 2012, Bilbao, España.

“Bacteria adhesion to anodized titanium alloy”. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Celebrado en mayo del 2010, Barcelona, España.

# ÍNDICE

RESUMEN EN INGLÉS	11
INTRODUCCIÓN	21
Infección de prótesis osteoarticulares	22
Introducción	22
Patogénesis de la infección	22
Etiopatogenia de la infección	23
Proceso de adherencia bacteriana y formación de la biopelícula sobre la superficie de biomateriales	24
Proceso de adherencia bacteriana	24
Mecanismo de adherencia bacteriana	24
Factores que influyen en la adherencia bacteriana	26
Proceso de formación de la biopelícula	28
La tecnología de biomateriales aplicada a la disminución de la adherencia bacteriana y formación de la biopelícula	31
Tipos de prótesis	31
Tipos de materiales empleados en las prótesis osteoarticulares	33
Actualidad en las modificaciones de biomateriales	35
Las propiedades antibacterianas del flúor	36
HIPÓTESIS DEL ESTUDIO	39
OBJETIVOS DEL ESTUDIO	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
Materiales metálicos de Ti-6Al-4V	44
Estudio de adherencia bacteriana	48
Estudio de formación de biopelículas	51
RESULTADOS	57
Estudio de adherencia bacteriana	58

Estudio de adherencia bacteriana para conocer cómo influye la presencia de nanoestructuras con flúor en la superficie del material	58
Resultados de adherencia bacteriana para las cepas de Colección	58
Resultados de adherencia bacteriana para las cepas de Clínicas	60
Estudios de adherencia bacteriana para conocer cómo influye la presencia de una capa barrera de flúor en la superficie del material	63
Resultados de adherencia bacteriana para las cepas de colección	63
Resultados de adherencia bacteriana para las cepas clínicas	64
Estudios de formación de biopelículas	66
Estudios de formación de biopelículas de grampositivos	66
Estudios de formación de biopelículas de gramnegativos	68
Estudio de formación de biopelícula de <i>C. albicans</i>	69
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	79
ACRÓNIMOS	81
REFERENCIAS	83
ARTÍCULOS PUBLICADOS	97

## **RESUMEN EN INGLÉS**

---

## 1. Introduction

Medical prosthetic devices, particularly joint replacement devices are a great advance in orthopedic surgery and an essential component of modern medical treatment. Beginning from the early 1950s, the number of hip and knee arthroplasties has been constantly increasing, with nearly 800,000 of such procedures performed in the United States during 2006 (1). It has been estimated that approximately four million hip and knee prosthesis will be implanted in the year 2030.

Biomaterials-related complications appear in almost 10% of the cases, the infections playing a major role because of significant clinical impairment, which entails a great cost to the public health system. Even though only a small percentage of the arthroplasties ends in infection (between 0.8% and 1.9% for knee and between 0.3% and 1.7% for hip), the severity of the problem and the prolonged and difficult management of the infected patients are of great relevance (2).

It is well known that most bacterial species can develop the complex structure that is known as a biofilm. It makes them less accessible to the host defense system and also decreases their antibiotic susceptibility. When the bacteria adhere to the surface before host cells do, they start to multiply and produce an extracellular matrix that constitutes the essential part of the biofilm which evolves into a clinical infection as the numbers of bacteria grow (3). So, in this phenomenon, bacterial adherence to the surfaces is the first and key step in biofilm development.

*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are frequently isolated as the leading cause of biomaterial related infections, and different authors explain this fact by the ability of these species to develop biofilms (4).

Preventing the adhesion of bacteria to the implant surfaces is a step forward in the pathogenesis of infection, because the bacteria that do not adhere are rapidly killed by the immune system (5). According to this fact, if bacterial adherence is avoided, infection will not develop in the patient. Traditionally, prevention of bacterial adhesion has been ensured through the chemoprophylactic use of antibiotic agents before surgery, mainly administered systemically, and in some cases, even released from the implanted biomaterial. However, this latter strategy has important limitations, such as the rapid

release of the adsorbed antibiotic, resistance development against the antibiotics, or systemic toxicity.

An interesting strategy for preventing the bacterial attachment and development of biofilm is altering the biomaterial surface properties. Surface modification techniques allow tailoring of the surface energy via surface chemistry and topography, showing important effects of the surface property changes on microbial colonization. Different methodologies have been used to change either the chemical composition or the microtopography of the surface and their impact on bacterial adhesion with different results (6).

Titanium and its alloys are widely used in technological applications due to their excellent mechanical properties, high corrosion resistance and biocompatibility. Broad functionality of titanium alloys is attributed to the presence of surface TiO<sub>2</sub> oxide layer which enhances their corrosion resistance and biological activity. Ti-6Al-4V joint replacement implants are a great advance in orthopaedic surgery and an essential component of uncemented current joint prosthesis. However bacterial colonization of surfaces compromises the effectiveness of the implanted materials and ultimately can result in difficult-to-treat infections (7).

Among the surface modification techniques, anodizing is a well known process that enables the growth of titanium oxide layer under controlled conditions. The structure of the anodic layer can be controlled by varying the electrolyte composition, the applied voltage, the time and the temperature. In general, anodic oxide layers grown in acidic, HF-containing baths have duplex structure comprising an outer nanoporous/nanotubular layer in contact with the electrolyte, and an inner compact layer (barrier layer) formed at the bottom of the nanotube/nanopore adjacent to the substrate. However, under certain conditions the growth of the nanostructured outer layer can be suppressed, promoting just the growth of the barrier layer.

There are several reports about the use of antibacterial coatings on titanium implants, but only a few studies make reference to fluorine-implanted surfaces. Zhao et al. (6) reviewed the state of the art about this topic and concluded that metallic doping ions compromise the physical properties of titanium, such as corrosion resistance, although they could have increasing antibacterial properties. The inhibition of bacterial growth by

the presence of fluoride has been demonstrated in detail in different studies of dental implants, whereas fluoride-modified materials increase their antibacterial properties. (8)

In addition, fluoride ions are known to induce formation of fluorapatite in the surrounding bone and thus to improve the bone anchorage to titanium implant. (9) In this work, the anodizing bath has been modified in order to enable the growth of fluoride-containing barrier layers -FBL- for the first time. The studies performed on non-nanostructured FBL have permitted to discriminate the effect of the fluoride from the effect of the surface nanostructure on bacterial adhesion.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Sample preparation

Ti-6Al-4V alloy specimens of ELI grade according to the standard ASTM F136-02 supplied by SURGIVAL were ground through successive grades of SiC paper to 1200 grade, degreased with a detergent and rinsed in tap water followed by deionised water. The specimens were then chemically polished (CP) in a mixture of HF (48 wt%):HNO<sub>3</sub> (70 wt %):H<sub>2</sub>O with volume ratio 1:4:5 for 5 min at room temperature under continuous agitation at 400 rpm, rinsed in distilled water, and dried in cold air. The disks were either CP or anodized only on one side, so the treated area in each case was 2.54 cm<sup>2</sup>. Nanoporous (NP)/nanotubular (NT) oxide films were formed in a two-electrode cell by anodizing the specimens at constant voltage controlled at 20 V in the electrolyte containing 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.15 wt % HF for 5 and 60 min, respectively, at 20°C according to the patent by Arenas et al. (10). Platinum mesh was used as a cathode.

Fluoride-free oxide films have been also produced by anodizing in 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 15 mA cm<sup>-2</sup> to 90 V. All the solutions used either for chemical polishing or anodizing treatments were prepared using reagent grade chemicals (Sigma)

Fluoride-TiO<sub>2</sub> barrier layers -FBL- were produced in a two-electrode cell by anodizing the specimens in 1 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0.15M NH<sub>4</sub>F solution at constant voltage controlled at 20V for 120min and at temperature controlled at 20°C

Fluoride-free TiO<sub>2</sub> barrier layers –BL- were also fabricated in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> electrolyte by anodizing the specimens at 15 mA cm<sup>-2</sup> to 90 V

## 2.2 Bacterial adhesion

Microbiology studies have been performed using two laboratory strains and six clinical strains of each species. The laboratory strains were *S. aureus* 15981 (11) and *S. epidermidis* ATCC 35984. The clinical strains for *S. epidermidis* were P6, P33, P53B, P55, P74, and P101, whereas for *S. aureus* were P1, P2, P4, P18, P61T3, and P95. The clinical strains have been isolated by a sonication procedure from patients who have had an orthopedic implant-related infection. (12)

These strains have been characterized by phenotypic and genetic methods regarding their ability to form biofilm in vitro in a previous study (13). The strains were isolated from hip prosthesis (P2, P4, P18, P33, P53B, P55, P74, and P101) and osteosynthesis implants (P1, P6, P61T3, and P95). All the strains were identified using conventional methods (coagulase test, API-Staph strips; BioM\_erieux, France). Genetic study showed that all strains except P33 and P101 have *icaA* and *icaD* genes. Strains P1, P95, P53B, P55, and P74 have also the regulatory gene *icaR*. Strain P33 is a heavy biofilm producer, P4 and P53B were moderate biofilm producers, and all other strains were low biofilm producers using Stepanovic test.

The experiments on staphylococcal adhesion of laboratory strains were performed in CP, NP, NT, and barrier layer (BL), whereas the study for clinical strains was performed in CP, NP, and NT. The experiments were performed following the protocol developed by Kinnari et al. (14) Bacteria were inoculated in tryptic soy broth (TSB; BioM\_erieux, Marcy L'Etoile, France) and incubated overnight at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After culture, bacteria were centrifuged for 10 min at 3500g at 22°C. Supernatant was then discarded, and the pellet was washed three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich Life Science). Bacteria were then suspended and diluted in PBS to obtain a 10<sup>8</sup> CFU/mL concentration; the bacterial concentration was determined by spectrophotometry using a visible spectrophotometer (Genesys 20, Thermo Scientific). Ten microliters of this solution was used to cover the specimens in the plates. This inoculum was incubated onto specimens of titanium alloy (Ti-6Al-4V) with different surface treatments for 90 min at 37°C to allow adhesion in a static model.

After incubation, the samples were washed three times with PBS to remove unattached bacteria. Finally, they were stained for 2 min with acridine orange (Beckton Dickinson and Company) and rinsed with sterile water. Eight photographs (40X magnification) by ultraviolet (UV) microscope for each sample were made.

### 2.3 Biofilms formation studies

Microbiology studies have been performed using five laboratory strains: *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 35984, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 70888, *Candida albicans* ATCC 10231.

According to the standard test method approved by ASTM (Designation: E2562-07) using the Rotating Disk Reactor, the biofilm formation studies were performed with minor modifications to the original protocol. It was incubated in batch mode for 2 hours, followed by operation with flow for another 24 hours. The experiments were repeated 5 times.

We tested 4 coupons of Ti-6Al-4V; a chemically polished (CP), a coupon with nanoporous (NP) and another with nanotubes (NT) structure containing fluorine, and a coupon with fluorine barrier layers (FBL).

We considered a p-value  $< 0.05$  for statistical significance (Kruskal- Wallis test).

## 3. Results

### 3.1. Bacterial adhesion studies

#### Bacterial adhesion studies on nanostructured surfaces of Ti-6Al-4V

The adhesion of both laboratory strains to the F-free surface treatment (CP and BL) and F-containing surfaces (NP and NT), expressed as mean percentage of surface coverage by bacteria.

The results disclosed lower adhesion of *S. aureus* than *S. epidermidis* to nanostructured materials NP and NT.

There were statistically significant differences between bacterial adhesion to NP and NT specimens and to the reference CP specimens. Compared with the CP surface, NP and NT surfaces both had  $p < 0.0001$  (Kruskal–Wallis test) for *S. aureus* and  $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$  (both by Kruskal–Wallis test), respectively, for *S. epidermidis*.

The difference in the adhesion of the two bacteria species to CP surface was not statistically significant ( $p < 0.13$ , Kruskal–Wallis test). However, there were statistically significant differences between the species with respect to NP ( $p < 0.0001$ , Kruskal–Wallis test) and NT surfaces ( $p < 0.0001$ , Kruskal–Wallis test).

The comparison of the adhesion results for the materials NP and BL surfaces disclosed statistically significant differences between them with respect to both *S. aureus* ( $p < 0.001$ , Kruskal–Wallis test) and *S. epidermidis* ( $p < 0.047$ , Kruskal–Wallis test). These results confirm that the BL surfaces do not have much potential in preventing bacterial adhesion and, therefore, they were not used in clinical strains tests.

There is variability in the results among the clinical strains of the same specie when comparing the adhesion of both *S. epidermidis* and *S. aureus* with CP and NP and NT. P61T3 and P95 strains of *S. aureus* showed greater adhesion variability when compared with the other strains. P1 and P2 strains exhibited lower adhesion to NP surface than to NT surface. The P1, P2, and P4 strains presented higher adhesion to NT surface than P18, P61T3, and P95 strains.

*S. epidermidis* showed a smaller but significant difference between the adhesion to nanostructured F-containing surfaces ( $p < 0.0001$ , Kruskal–Wallis test) but not to F-free surface—CP—surface ( $p = 0.12$  Kruskal–Wallis test) compared with *S. aureus*. The greatest difference in the adhesion of *S. epidermidis* was found for NP surface; P101 and P33 strains of *S. epidermidis* showed higher adhesion to the NT surface than to NP surface.

There are statically significant differences between the adhesion of the six clinical strains of *S. epidermidis* to the NP and CP surfaces ( $p = 0.0005$ , Kruskal–Wallis test) and to the NT and CP surfaces ( $p = 0.035$ , Kruskal–Wallis test). But no statistically significant differences were found between NP and NT surfaces ( $p = 0.174$ , Kruskal–Wallis test).

### Bacterial adhesion studies on Fluoride-TiO<sub>2</sub> barrier layers

The response of *S. aureus* and *S. epidermidis* laboratory strains reveals statistically significant differences ( $p < 0.0001$ , Kruskal -Wallis test) when comparing FBL with CP and BL specimens. The percentage of covered surface of FBL specimens is higher for *S. epidermidis* than for *S. aureus*. However, there is no statistically significant difference between the percentage of covered surface of BL and CP specimens ( $p > 0.0001$ , Kruskal-Wallis test).

As reference bacteria did not show statistically significant difference between CP and BL treatments, further comparison of the clinical strains response was performed using just CP and FBL specimens.

For P6.2, P33.1, and P74, *S. epidermidis* clinical strains, the results showed a statistically significant decrease in the percentage of covered surface of FBL compared with the CP.

Similarly, for most of the *S. aureus* clinical strains (P1, P2, P4, P18 and P61T3) the mean percentage of covered surface revealed a statistically significant decrease ( $p < 0.0001$ , Kruskal -Wallis test) on FBL specimens compared with CP specimens. On the other hand, the mean percentage of covered surface of the FBL specimens is lower for *S. aureus* than for *S. epidermidis* clinical strains

### Biofilm formation studies

There were no statistically significant differences when comparing the biofilm accumulation between *S. aureus* and *S. epidermidis* on the modified (NP, NT and FBL) and unmodified (CP) coupons. However, comparing each strain individually, the biofilm accumulation for *S. epidermidis* was greater for CP than for NP and NT coupons. Meanwhile, *S. aureus* did not present statistically significant differences when biofilm accumulation on the unmodified coupon (CP) and the modified coupons (NP, NT and FBL) were compared, although the biofilm accumulation for FBL was greater than for NT.

The results for gramnegative bacteria showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ , Kruskal -Wallis test) for *E.coli*, when comparing the biofilm accumulation on

the modified (NP, NT and FBL) with the unmodified (CP). The biofilm accumulation was greater for CP than NP, NT and FBL. However, there were no statistically significant differences for *P. aeruginosa* when comparing the biofilm accumulation between the modified (NP, NT and FBL) and unmodified (CP) coupons.

The results of biofilm accumulation for *C.albicans* showed that there were no statistically significant differences when comparing the modified (NP, NT and FBL) with unmodified (CP) coupons.

#### **4. Discussion**

This study takes particular interest in the prosthetic joint infections and fracture-fixation device-related infections, whereas titanium and titanium alloys are used as orthopedic implants. Titanium alloy with various surface treatments was studied in this work with the purpose of developing a new kind of prosthetic material, which could contribute to decrease of bacterial adherence.

Surface treatments generating NP or NT oxide films are of interest because they have revealed as an important factor influencing the biological response of the surfaces. There are evidences that a suitable surface roughness at nanoscopic and microscopic scale can lead to a successful osseointegration of titanium implants observed that the number of cells present on NT surfaces on NT increased up to 40% compared with flat titanium surface after 1 day of culture, and increase up to 65% after 7 days of culture. (15)

On the other hand, the growth of oxide layers with nanostructure tailored made is of great interest because it permits the possibility of filling such features pores/nanotubes with hydroxyapatites, antibiotics, and/or proteins not only to prevent bacterial adhesion but also to help to a faster recuperation of the zone affected by the surgery, thus inducing bone formation and assisting the healing process.

This study demonstrates a difference in the bacterial adhesion of clinical strains when comparing the results with those of laboratory strains. Moreover, variability in the

individual adhesion of the different clinical strains exists for both *S. epidermidis* and *S. aureus*

The results consistently obtained for the surface-treated specimens with fluorine either with the collection strains or the clinical strains, showed a decrease of bacterial adhesion in comparison with the CP and BL specimens. In addition, no statistically significant differences have been observed on the adhesion of bacteria between the nanostructured specimens (NP and NT), suggesting that this behavior is a result of the fluorine presence. On the other hand, the fact that no significant difference was observed between the bacterial adhesion to NP and NT surfaces correlates with the fact that solid/water interface energies for these specimens were very similar, despite the distinctly different microstructures. Hence, the observed decrease in bacterial adhesion can be attributed to the influence of fluorine.

The surface nanostructure and topography on the antibacterial properties of the anodic layer, suggesting that the reduction in the bacterial adhesion compared with the BL is solely due to the presence of fluoride in the layer. In addition, the higher F- content in FBL compared with the nanostructured F-containing TiO<sub>2</sub> layers (16) may be responsible for the enhanced antibacterial properties. The mechanism of the reduction of bacterial adhesion and the influence in the biofilm formation is thought to be related to the inhibition of their enzymatic activity by titanium-fluoride complexes, such as TiF<sub>4</sub>.

## **5. Conclusion**

The results obtained in this work suggest that anodized titanium alloy with fluorine is a potential candidate in the surface manufacturing of biomaterials. The decrease in the bacterial adhesion and biofilm formation exhibited by the fluoride-containing nanostructured surfaces in comparison with fluoride-free surfaces has proven statistically significant. A biomaterial, which decreases and perhaps even avoids bacterial adhesion, could be of importance for a better patient management, including a decrease in healthcare costs.

## INTRODUCCIÓN

---

## **1. Infección de prótesis osteoarticulares**

### **1.1. Introducción**

A nivel nacional, en España se realizaron entre 1997 y 2011 un total de 1.000.000 de artroplastias de cadera y rodilla, representando una media anual de 70.000 intervenciones, como reflejan los datos recientemente publicados por Gómez-Barrena y cols. (17). Aproximadamente el 0,5-2,5 % de estos pacientes (18) desarrollará una infección protésica, suponiendo unos 350-1.750 nuevos pacientes cada año, número que se estima que aumente, dado el incremento previsto en el uso de este tipo de implantes. La relevancia de la IPA se pone de manifiesto por la elevada repercusión que tienen tanto a nivel sanitario como económico (18) (19). Las complicaciones de este tipo de infecciones suponen en muchos casos, largos períodos de antibioterapia, incluyendo tratamientos supresores de por vida, y en algunos casos acompañados de nuevas intervenciones quirúrgicas. Todo ello hace que, a pesar de su relativamente baja incidencia, las IPAs tengan una gran relevancia clínica (20).

Son numerosos los factores de riesgo relacionados con las IPAs; cirugía previa en el mismo lugar de la prótesis, artritis reumatoide, inmunodepresión, estados de desnutrición, obesidad, psoriasis, la presencia de catéter urinario, la edad, infección por VIH, el lugar de la infección (21), reciente bacteriemia, terapia con glucocorticoides o diabetes mellitus (20). Sin embargo, la patogenia esencial radica en la relación que se establece entre el microorganismo y la superficie del implante.

### **1.2. Patogénesis de la infección**

Los microorganismos pueden acceder al implante a través de tres rutas (21): por inoculación directa en el momento del implante, por contigüidad, desde focos infecciosos cercanos, o vía hematogena, en el contexto de una bacteriemia o a partir de un foco infeccioso a distancia. En base a ello, las infecciones agudas suelen ser causadas por microorganismos con elevado potencial patogénico (*Staphylococcus aureus*, enterobacterias), mientras que las infecciones crónicas suelen relacionarse con la presencia de microorganismos con baja virulencia (*Staphylococcus epidermidis*) (22). En todos los casos, los microorganismos poseen capacidad para desarrollar biopelículas que les permiten sobrevivir en la superficie del biomaterial (20) (18) (21).

En las infecciones asociadas a biomateriales se establecen una serie de interrelaciones entre el tipo y propiedades del biomaterial, el tejido receptor, el estado inmune del huésped y los mecanismos de patogenicidad y virulencia del agente infeccioso. Un ejemplo de ello es el hecho de que las bacterias que no se adhieren rápidamente a la superficie son eliminadas por el sistema inmune del huésped (23) (5). Los biomateriales además, pueden dañar los tejidos circundantes originando intolerancia o rechazo del implante, en forma de reacción crónica granulomatosa a un cuerpo extraño por células multinucleadas, que fagocitan las partículas de estos biomateriales. La presencia de microorganismos en los biomateriales o en la interfase existente entre el propio material y el implantado, puede activar células proinflamatorias y mecanismos enzimáticos, que originan las manifestaciones clínicas de la infección (18).

### 1.3. Etiopatogenía de la infección

Cualquier microorganismo puede causar IPA, aunque las IPAs suelen estar relacionadas con microorganismos considerados flora saprófita de la piel, como *Staphylococcus spp*, *Corynebacterium spp* o *Propionibacterium spp*. El tipo de microorganismo puede estar relacionado con el tipo y localización de la prótesis, del tiempo transcurrido desde la cirugía y de los factores de riesgo del paciente (22). *S. aureus* y los bacilos gramnegativos (BGN) (24), suelen relacionarse con infecciones posquirúrgicas precoces, mientras que en las posquirúrgicas tardías predominan microorganismos poco virulentos, como SCN y *P. acnes* (24). Por otra parte, en las infecciones vía hematogena son frecuentes *S. aureus* y *S. agalactiae* (25).

*S. aureus* y *S. epidermidis*, son los principales agentes etiológicos en las IPAs, representando alrededor del 70 % de los aislamientos microbiológicos, relacionándose con infecciones tanto agudas como crónicas (18, 21) (4, 26-28). Los SCN representan del 30-40 % de los aislamientos mientras que *S. aureus* el 12-23 % (22) (25), sin embargo hay revisiones que sugieren que *S. aureus* presenta una mayor prevalencia, seguida de cerca por *S. epidermidis* (29). Es importante destacar los recientes aislamientos de *S. aureus* variante de colonia pequeña (SCV) (30) (21) (31), cuyas características de pigmentación y hemólisis están alteradas debido a la dificultad para sintetizar ciertos nutrientes, dificultando a su vez el aislamiento en los laboratorios de microbiología (32). La presencia de SCV parece estar relacionada con la diferenciación de las células bacterianas dentro de la biopelícula a células planctónicas (33) y su

aislamiento se relaciona con infecciones recurrentes y persistentes, debido a la resistencia que presentan frente a antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana o aminoglucósidos, contribuyendo a una mayor virulencia (34) (35). *S. aureus* meticilin resistente (SAMR) también tiene un papel creciente en este tipo de infecciones, suponiendo en algún caso hasta el 50% de los aislamientos de *S. aureus*, y relacionándose con un mayor fracaso terapéutico al compararlo con IPAs causadas por *S. aureus* meticilin sensible (SAMS) (20, 36) (37), su aislamiento está relacionado con reintervenciones o ingresos prolongados al considerarse, en la mayoría de los casos, un patógeno nosocomial (22).

En las IPAs pueden aparecer otros microorganismos procedentes, por ejemplo, del medio ambiente al tratarse fracturas abiertas, tales como BGN no fermentadores, micobacterias atípicas, etc. (22). También se pueden aislar microorganismos de origen nosomial como *Pseudomonas aeruginosa* (38) o *Acinetobacter spp*, BGN aislados desde un foco urinario (21), como enterobacterias donde destaca *Escherichia coli* (33) o enterococos (39), representando el 10% de los casos (22). En los últimos años se describen con mayor frecuencia IPAs por anaerobios como *P. acnes* 2-4% (25). Incluso se han descrito aislamientos de microorganismos relacionados con manipulaciones bucodentales (*Streptococcus viridans* o *Peptostreptococcus sp.*). Entre el 10-20% de la IPAs son polimicrobianas (24), mientras que el 7% de los casos son cultivos negativos (1) (20) (25). El 5% de las infecciones están producidas por diversas bacterias gramnegativas (33), y las IPAs producidas por especies del género *Candida* o micobacterias son inusuales (40) (18) (21).

## **2. Proceso de adherencia bacteriana y formación de la biopelícula sobre superficies de biomateriales**

### **2.1. Proceso de adherencia bacteriana**

#### *2.1.1. Mecanismo de adherencia bacteriana*

La adherencia bacteriana se considera el primer paso en la formación de la biopelícula (41).

Dos fases describen el mecanismo de adherencia bacteriana a la superficie del biomaterial (5) (42).

La primera fase es reversible e instantánea, y predominan las interacciones físico-químicas entre la bacteria y la superficie del biomaterial. Esta fase comienza con una atracción de las células bacterianas a la superficie, seguida de una adsorción y adherencia a ésta. Diferentes tipos de fuerzas físico-químicas tienen relevancia en esta primera fase, facilitando la adherencia de bacterias a la superficie del material: fuerzas de Van der Waals, movimientos Brownianos, fuerzas gravitacionales, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, y la carga electrostática de la superficie son las que permiten a la bacteria moverse hacia la superficie. El movimiento bacteriano puede ser dirigido, a su vez, por un gradiente de concentración (quimiotaxis) o un enlace a la superficie por motilidad direccional (haptotaxis). Una de las principales explicaciones de que se produzca la adhesión bacteriana a la superficie es la preferencia de las bacterias a crecer en superficies cuando se encuentran en ambientes acuosos (5) (42), pudiendo considerarse un mecanismo de supervivencia de las mismas (41), ya que los nutrientes en ambientes acuosos suelen acumularse en las superficies (43). Las atracciones físico-químicas que caracterizan esta primera fase en la adhesión bacteriana, pueden actuar como fuerzas de atracción o de repulsión. Han sido descritas diferentes teorías aplicadas a las interacciones entre partículas, como el modelo DLVO, con el objetivo de comprender las fuerzas y el número de éstas implicadas en la interacción de las bacterias con la superficie del material (5).

La segunda fase se caracteriza por ser tiempo dependiente e irreversible, ya que en ella predominan interacciones celulares y moleculares entre estructuras en la superficie de la bacteria y superficie del biomaterial (5). Diferentes estructuras poliméricas de la superficie bacteriana; tales como cápsula, fimbrias, pili y *slime* son las que se ven relacionadas con la adhesión de la bacteria a la superficie del biomaterial. Las formas como se implican estas estructuras con una mayor adhesión bacteriana a la superficie son diferentes, y principalmente se relacionan por un lado con el incremento de hidrofobicidad que suponen para las bacterias, y por otra parte, con la presencia de adhesinas en las fimbrias (F71, F8 y F13) (42). Las adhesinas representan un importante factor de virulencia en la adhesión de células bacterianas a células del hospedador, permitiendo un firme anclaje a la superficie, ya que se enlazan a las proteínas del huésped adheridas a la superficie del biomaterial (29). La naturaleza de las adhesinas de *S. aureus* y *S. epidermidis*, es la más conocida.

En el caso de *S. epidermidis*, destacan numerosas adhesinas polisacáridas; **PS/A** (adhesina rica en galactosa de la cápsula polisacárida compuesto de  $\beta$ -1,6 enlazada a N-acetil glucosamina), **SAA** (antígeno asociado a slime compuesto de N-acetilglucosamina), **PIA** (polisacárido compuesto de N-acetil glucosamina con residuos desacetilados), **AAP** (acumulación asociada a proteínas). Mientras que **PS/A** y **SAA** tienen relevancia en las interacciones entre la bacteria y el material, **PIA** y **AAP** lo hacen en la interacción célula a célula (5). En el caso de *S. aureus*, son numerosas las adhesinas involucradas en las interacciones con las células del hospedador y su matriz extracelular. Se han adjudicado diferentes actividades a las adhesinas de *S. aureus*, desde actuar en las primeras fases de la adherencia bacteriana, facilitando la adhesión a las células del hospedador, hasta la posibilidad de actuar como invasinas, facilitando la internalización de las bacterias en las células del hospedador (29). Dentro del grupo de adhesinas de *S. aureus* destacan: moléculas ancladas a la superficie de la bacteria que reconocen moléculas de la matriz de la célula, y una serie de sustancias secretables unidas tanto iónicamente como covalentemente a la superficie de la bacteria. Estas adhesinas permiten reconocer diferentes ligandos de la matriz protéica extracelular, favoreciendo la invasión de las células del hospedador, el acúmulo de bacterias y formación de la biopelícula (29).

### 2.1.2. Factores que influyen en la adherencia bacteriana

Varios factores influyen en el proceso de adherencia bacteriana, desde características de la bacteria y, de la superficie del biomaterial, a las características del medio que les rodea (5, 42), por lo que las modificaciones de estos factores supondrían cambios en el proceso de adherencia bacteriana.

El diferente comportamiento entre especies, e incluso entre cepas bacterianas, en su unión a la superficie de biomateriales, está relacionado con las propias características de la superficie de las bacterias. Entre dichas características destaca la hidrofobicidad, que a su vez está relacionada con el medio de cultivo, la fase de crecimiento y la estructura de la superficie bacteriana (42). El principio de hidrofobicidad pone de manifiesto que las bacterias con propiedades hidrofóbicas tienen preferencia por superficies hidrofóbicas, y que las bacterias con propiedades hidrofílicas tienen preferencia por superficies hidrofílicas (5). Esta capacidad, a su vez está relacionada con el flujo de agitación al que puede estar sometida en el medio que la rodea (44). Sin embargo, los

estudios demuestran que la hidrofobicidad bacteriana juega un papel más importante en la adherencia bacteriana que las propiedades de hidrofobicidad de la superficie de la bacteria con flujos de agitación superiores a 15 dyn/cm<sup>2</sup>.

Aunque no está clara la relación entre la carga que presenta la superficie bacteriana y la adherencia bacteriana, los estudios demuestran que la superficie bacteriana en medio acuoso suele tener una carga negativa. Sin embargo este valor puede variar entre especies bacterianas y está relacionado con el medio de cultivo y el pH del medio (5) (42) (45).

Las proteínas, tanto séricas como de los tejidos, son otro factor que influye en la adherencia bacteriana, de tal modo que la presencia de albúmina, fibronectina, fibrinógeno, laminina y colágeno desnaturalizado, pueden llegar a favorecer, o incluso inhibir, la adherencia bacteriana a la superficie del biomaterial. Los estudios con fibronectina (46), fibrinógeno (47) y trombina (48) han demostrado que favorecen la adhesión de bacterias como *S. aureus*, mientras que la presencia de albúmina la disminuye (47).

Hay diferentes características del medio que rodea al biomaterial, que tienen relevancia en el proceso de adherencia bacteriana: la temperatura, tiempo de exposición, concentración bacteriana, composición química, la presencia de antibióticos y las condiciones de flujo. Las condiciones de flujo son el factor determinante en relación con el número de bacterias adheridas a la superficie del biomaterial que dará lugar al biopelícula. Cuanto mayor sea el número de enlaces entre la bacteria y la superficie del biomaterial, mayor resistencia presentaran las bacterias a ser despegadas de la superficie, por lo que una elevada agitación puede favorecer que las bacterias de la superficie se despeguen (5).

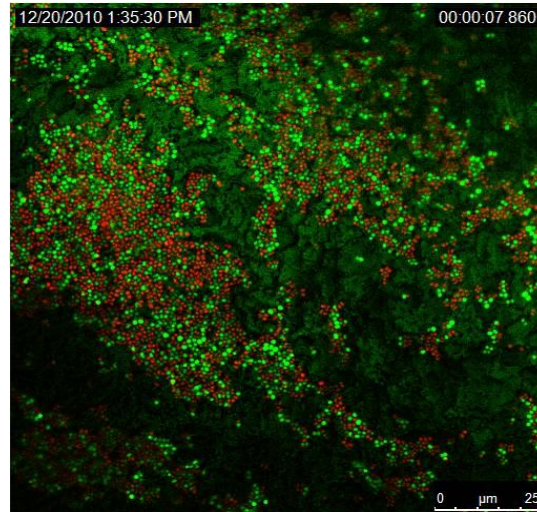
La incapacidad de modificar en la práctica clínica las características bacterianas y del medio pone de manifiesto la importante relevancia de realizar modificaciones sobre la superficie del biomaterial (42).

Diferentes características de la superficie del biomaterial pueden influir sobre la adherencia bacteriana; composición química, la carga, la hidrofobicidad, rugosidad y configuración de la superficie (6, 49-51). Por una parte, la presencia de diferentes grupos funcionales influye en la hidrofobicidad y carga de la superficie. Por otra parte,

la presencia de irregularidades en la superficie incrementa la rugosidad, favoreciendo la adherencia bacteriana y formación de la biopelícula. El incremento de rugosidad está relacionado con el incremento del área de superficie, ya que el área de superficie disponible para ser colonizada aumenta (5). En la literatura hay trabajos que concluyen que la presencia de poros en la superficie del material puede suponer una mayor colonización bacteriana al incrementar el área de superficie, siempre que exista una similitud en tamaño, por ello los tamaños de poro inferiores al bacteriano suponen en realidad una reducción del área de contacto. Otra característica del material que puede influir en la adherencia bacteriana es la composición química de éste, encontrando afirmaciones como la de Gristina y cols. (52), que sugieren que *S. epidermidis* se adhiere mayoritariamente a polímeros, mientras que *S. aureus* lo hace a superficies metálicas.

## **2.2. Proceso de formación de la biopelícula**

La biopelícula bacteriana es una comunidad bacteriana estructurada, embebida en una matriz extracelular y adherida a una superficie inerte o viva, representando una manera de crecimiento y supervivencia de las bacterias en diferentes entornos (53). Dentro de la compleja estructura de la biopelícula, existen canales, por los que los nutrientes pueden circular, así como células con diferente expresión génica (53). Las células bacterianas se encuentran en dos estados en relación con el medio que las rodea: células en estado planctónico, que flotan libremente en el medio, permitiendo de esta manera la propagación de las bacterias a otras superficies, y células incluidas en la biopelícula, que reciben el nombre de sésiles, y están pegadas a la superficie (43). Desde la biopelícula pueden desprenderse células sésiles, convirtiéndose en células planctónicas, caracterizadas por una rápida dispersión y multiplicación.

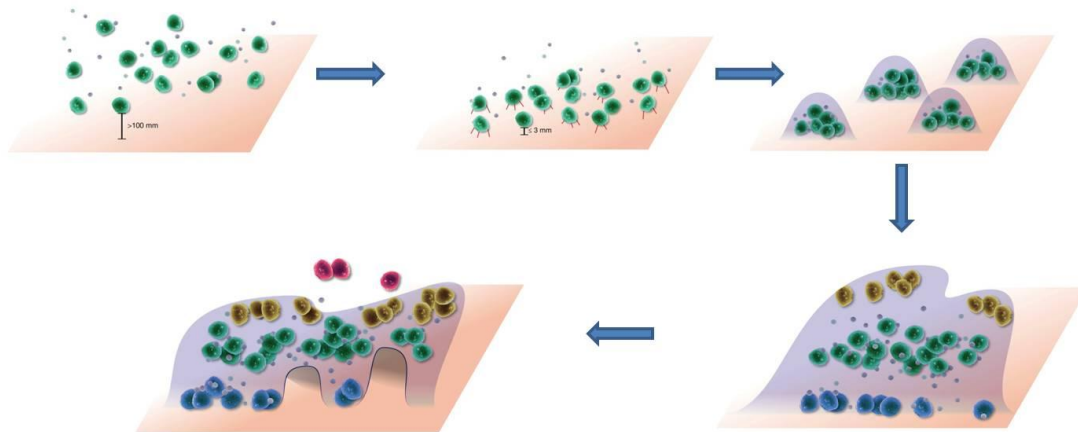


**Figura 1.** Biopelícula de *S. aureus* sobre material de Ti-6Al-4V.

La formación de la biopelícula comienza con la acción de las adhesinas bacterianas y posterior colonización de la superficie del biomaterial. De forma inmediata tras la adherencia, las bacterias producen una matriz extracelular formada por proteínas, polisacáridos, y DNA extracelular, principal componente del glicocálix de la biopelícula (43, 53).

La formación de la biopelícula se puede describir en 4 pasos (29) (53);

1. Las bacterias se adhieren a la superficie del biomaterial.
2. Las bacterias se van acumulando en diferentes capas.
3. Se produce la maduración de la biopelícula.
4. Las bacterias se despegan de la estructura de la biopelícula, en estado planctónico, para comenzar un nuevo ciclo en otra superficie.



**Figura 2.** Esquema que representa la formación de la biopelícula.

La patogenicidad y desarrollo de la biopelícula es controlada por un sistema de comunicaciones entre células bacterianas, conocido como *quórum sensing* (54) (55). Este sistema de comunicación parece estar relacionado en las bacterias grampositivas con el fenotipo y expresión del gen *agr*, influyendo de diferentes maneras en el comportamiento de la biopelícula, tanto en el enlace de la bacteria a la superficie del biomaterial, como en el proceso de desprendimiento y dispersión de bacterias desde la propia estructura, e incluso se le relaciona con la cronicidad de las infecciones asociadas a biomateriales. El sistema de *quórum sensing* mediado por el gen *agr*, activa la transcripción de proteínas secretadas en fase exponencial tardía, regulando a la baja de la expresión de proteínas de adhesión (55) (56).

Las bacterias embebidas en la biopelícula encuentran varias ventajas para sobrevivir en esta estructura (56) (57).

La primera ventaja, estaría relacionada con la capacidad de la matriz extracelular de crecer y acumular nutrientes, como carbón, nitrógeno y fósforo.

La segunda se relaciona con la resistencia de los microorganismos a ser eliminados, ya sea por su innata resistencia a factores antimicrobianos, por su resistencia a flujos de agitación, por su resistencia a la acción fagocítica, a la acción de los radicales libres de oxígeno o a la acción de proteasas. La presencia de una matriz de polisacárido se ha relacionado con la dificultad en la entrada de antibióticos a las capas más profundas de la biopelícula, retardando la difusión de antibióticos y solutos en general. Una segunda hipótesis, probablemente de mayor importancia, que apoya la escasa actividad de los

antibióticos en la biopelícula es la presencia de células dentro de la misma con un crecimiento muy lento o incluso sin crecimiento, células sésiles con límite nutricional (53, 58).

La tercera ventaja sería la capacidad de dispersión, al liberarse bacterias desde la propia estructura de la biopelícula por la acción mecánica de los fluidos, colonizando de esta manera otras superficies.

La IPA representa la situación idónea para desarrollar una infección bacteriana relacionada con el desarrollo de biopelículas, siendo éste favorecido por la propia incisión realizada durante la intervención y por la presencia de la amplia superficie del biomaterial.

### **3. La tecnología de biomateriales aplicada a la disminución de la adherencia bacteriana y formación de biopelículas**

#### **3.1. Tipos de prótesis**

Las artroplastias de prótesis de cadera y rodilla, tienen una mayor predominio que otras prótesis, como las de codo y hombro, dado su mayor desarrollo (25).

##### *3.1.1. Prótesis de rodilla*

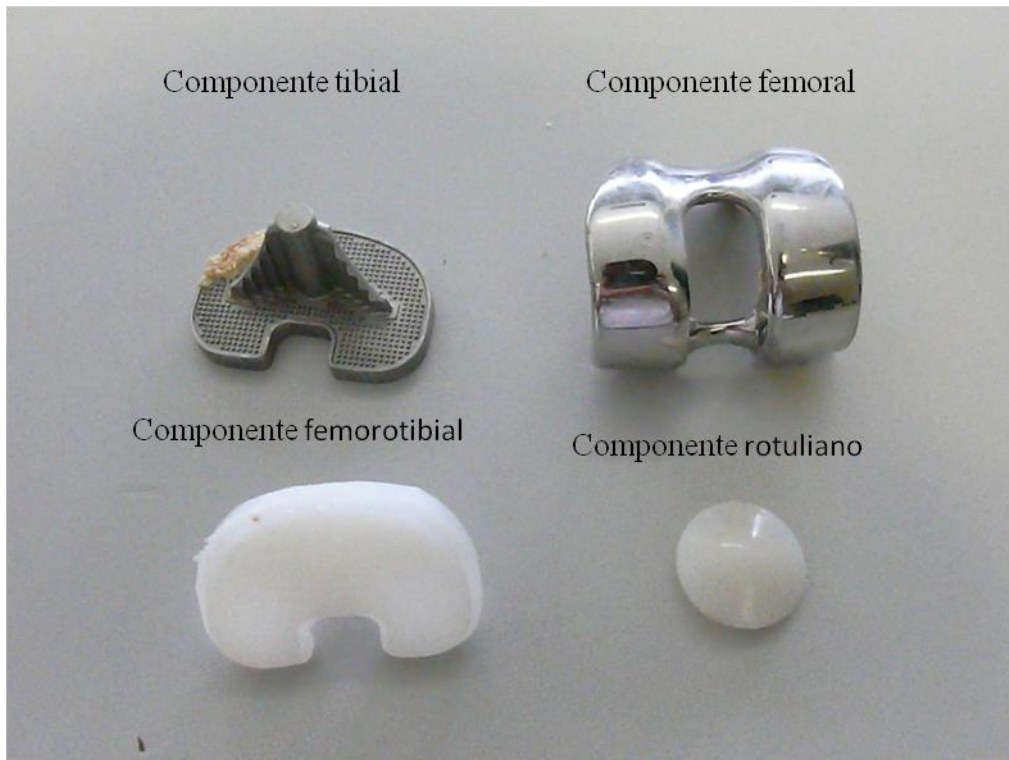
Las prótesis de rodillas suelen estar formadas por tres/cuatro componentes (59):

Componente femoral: es redondeado, con una forma que simula los cóndilos femorales. Esta parte es la que se ancla al fémur. Cuando se trate de una prótesis total tendrá forma bilobulada. En el caso de que reemplace parcialmente alguna zona dañada, tendrá forma lobular de un solo lóbulo.

Componente tibial: es plano, simulando el platillo tibial, con una ligera concavidad. Es el componente que se une a la tibia mediante un módulo metálico, anclado a su vez a un platillo de polietileno, que estará en contacto con la superficie metálica del componente femoral.

Componente femorotibial: Polietileno anclado a su vez al componente tibial, estará en contacto con la superficie metálica del componente femoral.

Componente rotuliano o patelar: el componente rotuliano tendrá por un lado una vertiente metálica, que es la que queda en contacto con el hueso de la rótula, mientras que en la vertiente opuesta presentara polietileno con una superficie muy lisa, que con el fin de favorecer el deslizamiento contactará con el componente femoral.



**Figura 3.** Componentes de una prótesis de rodilla

### 3.1.2. Prótesis de cadera

Las prótesis de cadera suelen estar formadas por tres componentes:

Componente femoral: es un vástago que se introduce en el interior del canal medular. Será de un material metálico, como el acero o el titanio. Un material especialmente resistente, ya que es el encargado de transmitir todo el peso del cuerpo al fémur.

Cabeza o componente cefálico: es una esfera que se acopla al vástago. En las prótesis de cadera, el vástago y la cabeza pueden ser una misma pieza. Los materiales que se suelen utilizar son la cerámica, el acero y el polietileno de alta densidad.

Componente acetabular: es el que sustituye la parte de la articulación de la cadera unida a la pelvis. Es una esfera hueca que se adapta perfectamente a la cabeza o componente

cefálico, suele tener dos vertientes, la parte que se une al hueso, que generalmente es metálica para ofrecer una buena resistencia a la transmisión de las cargas: acero, titanio, tantalio, etc... y la parte que está en contacto con la cabeza, que deberá ser lisa y ofrecer una mínima fricción y resistencia al desgaste, que suele ser de material cerámico o de polietileno.



**Figura 4.** Componentes de una prótesis de cadera.

### **3.2. Tipos de biomateriales empleados en las prótesis osteoarticulares**

Los biomateriales utilizados en cirugía ortopédica diseñados para reemplazar hueso cartílago, ligamentos o tendones deben cumplir diferentes características de biocompatibilidad, funcionalidad y unas adecuadas propiedades mecánicas y de resistencia a la corrosión (60).

Los materiales más utilizados en el desarrollo de prótesis ortopédicas son; titanio y aleaciones de éste, acero inoxidable, aleaciones de Cr-Co, cerámicas, hidroxiapatita, varios polímeros incluyendo polietilenos de ultra-alto molecular. Todos ellos difieren en sus características mecánicas y químicas, lo que les permite ser apropiados para el desarrollo de una parte específica de la prótesis (61).

Se pueden definir tres generaciones en la evolución de los biomateriales.

### *3.2.1. Materiales de primera generación*

Son materiales bioinertes. Durante esta generación se buscó una combinación entre obtener unas adecuadas propiedades físicas y disminuyendo los efectos tóxicos lo máximo posible.

#### 3.2.1.1. Materiales cerámicos

Una de las principales aplicaciones de estos materiales, es reemplazar la cabeza femoral de una prótesis total de cadera, por materiales como la alúmina de elevada densidad. También han sido utilizados en el diseño del componente acetabular, demostrando una excelente resistencia a la corrosión y biocompatibilidad. Los materiales utilizados en el diseño de biocerámicas son alúmina y zirconio, que pueden ser utilizados con un material espumante de  $\text{CaCO}_3$ , que genera poros al producir gases. Debido a la elevada superficie que presentan estos materiales porosos, la fuerza del material puede ir disminuyendo con la edad.

#### 3.2.1.2. Polímeros

Dentro de esta categoría encontramos: las gomas de silicona, PE, resinas acrílicas y polietilenos de elevado peso molecular (UHMWPE). Los PE y UHMWPE se utilizan por sus excelentes propiedades de resistencia a la abrasión, biocompatibilidad y bioestabilidad, como parte del componente acetabular en prótesis total de cadera y en el componente femorotibial y patelar de una prótesis de rodilla.

#### 3.2.1.3. Metales

Durante el siglo XX fueron utilizados materiales de acero inoxidable, Ti y sus aleaciones, y aleaciones de Co-Cr, presentando estos dos últimos, mejores condiciones mecánicas y de corrosión.

Las prótesis metal – metal, con acero inoxidable se encuentran en desuso por la elevada fricción que presentaban, provocando la liberación de partículas y ocasionando aflojamientos asepticos. Sin embargo, las aleaciones Co-Cr en combinación con polietilenos se encuentra actualmente en uso por su elevada resistencia a la corrosión.

El Ti y aleaciones de éste, gracias a sus excelentes propiedades de elasticidad, resistencia a la corrosión y osteointegración, son buenos candidatos para la fabricación de prótesis, permitiendo que éstas se mantengan inalteradas durante largos periodos de tiempo, disminuyendo así los aflojamientos asépticos (60) (62, 63).

Las diferentes formas que se pueden encontrar a nivel comercial para el titanio son: titanio puro comercial (CP Ti) con una elevada concentración de oxígeno, grado 4 (según norma ASTM F67) y Ti-6Al-4V (según norma ASTM F136). La resistencia de estos materiales a la corrosión se debe principalmente a la barrera de TiO<sub>2</sub> que se forma en su superficie. El CP Ti se utiliza principalmente en implantes dentales, mientras que el Ti6Al4V se utiliza para implantes ortopédicos.

### 3.2.2. *Materiales de segunda generación: bioactivos y biodegradables*

Aparecen entre 1980-2000, y esta generación se caracteriza por el desarrollo de biomateriales bioactivos, con capacidad para interactuar con proteínas del medio que rodean al material, permitiendo una integración del tejido en la superficie del material. Ninguno de los metales utilizados en el diseño de prótesis son bioactivos *per se*. Actualmente es un campo que se encuentra en constante innovación. Dentro de esta segunda generación destacan metales con superficies recubiertas con cerámicas bioactivas y las modificaciones en la superficie para inducir la adhesión de proteínas.

### 3.2.3. *Materiales de tercera generación*

Son materiales diseñados para estimular una determinada actividad celular, caracterizándose por ser materiales bioactivos y biodegradables a la vez.

En los materiales metálicos, principalmente en Ti y aleaciones de Ti, esta tercera generación se manifiesta por el desarrollo de estructuras porosas que permitan la integración de las células óseas.

## 3.3. **Actualidad en las modificaciones de biomateriales**

La modificación de la superficie del biomaterial representa actualmente uno de los principales campos de investigación en cirugía ortopédica, dirigidos a actuar sobre la adherencia bacteriana y formación de la biopelícula.

El principal interés está puesto en estudiar sustancias que sean capaces de ser liberadas desde la superficie del biomaterial, como derivados de metales, uso de antibióticos, compuestos naturales antibacterianos, tales como péptidos antimicrobianos, inhibidores del *quorum sensing*, aceites esenciales o enzimas, que creen una barrera en la superficie del biomaterial (64).

Otras estrategias van dirigidas a la posibilidad de modificar y controlar las propiedades de la superficie del biomaterial a un nivel micro y nano, facilitando la interacción del biomaterial con el medio que le rodea (60). Partiendo del hecho de que la adhesión bacteriana está influenciada por la topografía del material, uno de los parámetros a destacar es la rugosidad de la superficie. Diferentes trabajos en la literatura han puesto de manifiesto que la rugosidad de la superficie puede influir en la adhesión de proteínas y por lo tanto influir en la adhesión bacteriana (64). Otros destacan que la presencia de nanoestructuras en superficies de titanio modifica propiedades como la rugosidad e hidrofobicidad, favoreciendo la interacción con células del huésped y su proliferación (65).

Zhao y cols(6) hacen una completa revisión de las modificaciones en superficies de titanio y aleaciones de titanio existentes hasta el momento, donde señalan que el dopaje de biomateriales con sustancias inorgánicas es una estrategia con mucho futuro. Este tipo de dopaje presenta diferentes ventajas, tales como buena actividad antibacteriana, biocompatibilidad y estabilidad. Se han estudiado distintas sustancias inorgánicas en este campo; plata (66-69), sulfuro (70), cobre(71), zinc(72), flúor (8, 16, 73-75), calcio y nitrógeno, y entre ellas la más conocida es la plata (6).

### **3.4. Las propiedades antibacterianas del flúor**

Las propiedades antibacterianas del flúor son ampliamente conocidas por su acción anticaries, en el campo de la odontología (71). Ésta acción está relacionada con la liberación de iones de flúor desde el compuesto fluorado, actuando sobre el metabolismo bacteriano, concretamente en la actividad enzimática.

Varios son los mecanismos de actuación sobre la actividad enzimática:

La inhibición de la enolasa, especialmente sensible a la acción del flúor, reduce los suplementos de fosfoenol piruvato, lo que hace que no pueda ser utilizado por el sistema

de fosfotransferasas, disminuyendo así la captación de glucosa y la glicólisis. Inhibe la glucogénesis y la actividad peroxidasa (76).

El movimiento del flúor al interior de la célula es en forma de HF. Una vez dentro de la célula el F<sup>-</sup> actuará como un inhibidor enzimático, mientras que el H<sup>+</sup> actuará acidificando el citoplasma. Esta diferencia de pH es la que permite que el F entre en la célula. El flúor provoca un incremento de la conductividad de protones a la membrana celular, provocando cambios de pH, acidificando el medio y dando lugar a un citoplasma relativamente alcalino. La actividad del flúor a este nivel también está relacionada con la inhibición de la translocación de protones de F-ATPasas a la membrana celular, mimetizando al fosfato para formar complejos ADP con el objetivo de interactuar con el centro de la enzima (76).

Yoshinari y cols. (8), concluyen en su trabajo con implantes de titanio modificados con flúor, que éste actúa sobre la actividad enzimática de la bacteria una vez está adherida a la superficie del material.

Las modificaciones con flúor en superficie de titanio suponen además una mayor integración ósea, al inducir la formación de hidroxiapatita en los alrededores del hueso, e incrementar el anclaje al mismo de los implantes (77) (9, 77-79). Estas modificaciones generan cambios en la topografía de la superficie del material, al formarse estructuras micro/nano y un incremento del flúor (80).



## HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

---

Se establecen dos hipótesis para la realización de este estudio sobre adherencia bacteriana y formación de biopelículas en materiales de Ti-6Al-4V anodizados con flúor.

1. Los cambios en la morfología de la superficie, debidos a la presencia de nanoporos y nanotubos en la superficie de la aleación de Ti-6Al-4V, producirían una disminución en la adherencia bacteriana y formación de biopelículas.
2. La presencia de flúor en la superficie de la aleación de Ti-6Al-4V afectaría, asimismo, la adherencia bacteriana y la formación de biopelículas, independientemente de la estructura de la superficie.

## **OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

---

1. Estudiar si existen diferencias en la adherencia bacteriana de cepas de colección de *S. aureus* y *S. epidermidis* en materiales de Ti-6Al-4V con diferentes superficies, tanto no modificadas nanoestructuralmente (CP, BL), como modificadas (NP, NT, FBL).
2. Estudiar si existe la misma diferencia en la adherencia bacteriana de cepas clínicas *S. aureus* y *S. epidermidis* en materiales de Ti-6Al-4V con superficies modificadas (NP, NT) al compararla con materiales no modificados (CP).
3. Estudiar si la disminución en la adherencia bacteriana de cepas colección y cepas clínicas de *S. aureus* y *S. epidermidis* en aleación de Ti-6Al-4V con superficies modificadas (NP, NT) se debe a la presencia de nanoestructuras o a la presencia de flúor. Para ello se estudiará la adherencia bacteriana en aleación de Ti-6Al-4V, que presenta una capa barrera de flúor en su superficie (FBL), y se compara la adherencia bacteriana con el resto de modificaciones de la aleación de Ti-6Al-4V (CP, NP y NT).
4. Estudiar si existen diferencias en la adherencia bacteriana de cepas clínicas (*S. aureus* y *S. epidermidis*) en el material con capa barrera de flúor (FBL), comparándolo con la adherencia bacteriana que presentan CP, NP y NT.
5. Estudiar la influencia de diferentes superficies de Ti-6Al-4V modificadas NP, NT y FBL y no modificadas CP, en la formación de biopelículas de bacterias grampositivas, gramnegativas y hongos levaduriformes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 1. Materiales metálicos de Ti-6Al-4V

La fabricación de los discos de Ti-6Al-4V anodizados con flúor se realizó partiendo de una aleación de Ti-6Al-4V grade ELI de acuerdo con la norma ASTM F136-02. Se estudiaron 5 discos de Ti-6Al-4V que presentaban diferentes modificaciones en la superficie. A continuación se detalla cada uno de los materiales utilizados en el estudio y su fabricación:

### A. Pulido químico (CP)

Material producido en una mezcla de HF (48 wt.):HNO<sub>3</sub>(70 wt.):H<sub>2</sub>O con un volumen ratio 1:4:5 durante 5 minutos a temperatura ambiente y bajo condiciones de agitación a 400 rpm, lavado posteriormente con agua destilada y secado con aire frío.

### B. Capas de TiO<sub>2</sub> sin flúor (BL)

Material producido por anodización a una corriente constante de 15 mA cm<sup>-2</sup> en una solución 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una temperatura de 20°C. El proceso finaliza al alcanzar el voltaje recogido un valor de 90 V.

### C. Capas barrera con flúor (FBL)

Material producido mediante un proceso de anodizado a un voltaje constante de 20 V en una solución de 1M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0.15 M NH<sub>4</sub>F (pH=5) durante 120 minutos a una temperatura de 20°C.

### D. Ti-6Al-4V anodizados con flúor con estructura Nanoporos (NP)

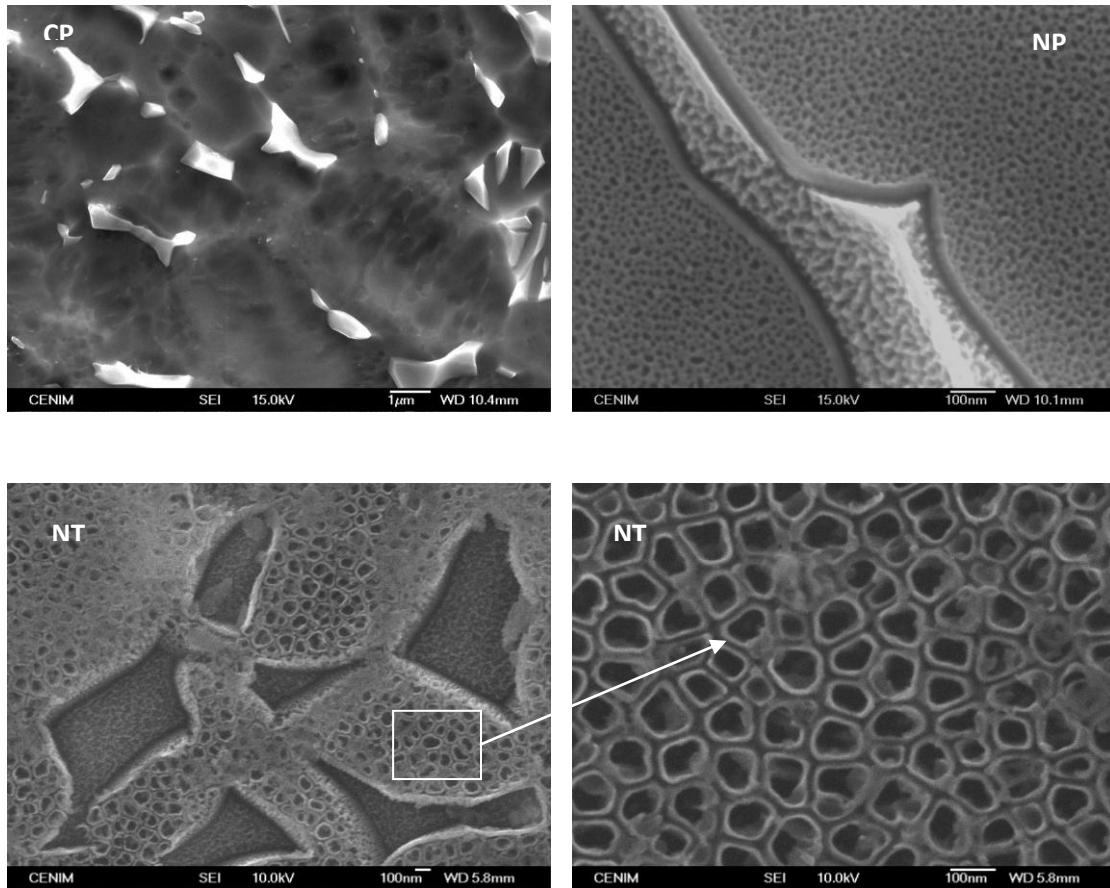
Material fabricado por un proceso de anodización a un voltaje constante de 20 V en una solución 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> +0.15 wt.% HF durante 5 minutos a una temperatura de 20°C.

### E. Ti-6Al-4V anodizados con flúor con estructura Nanotubos (NT)

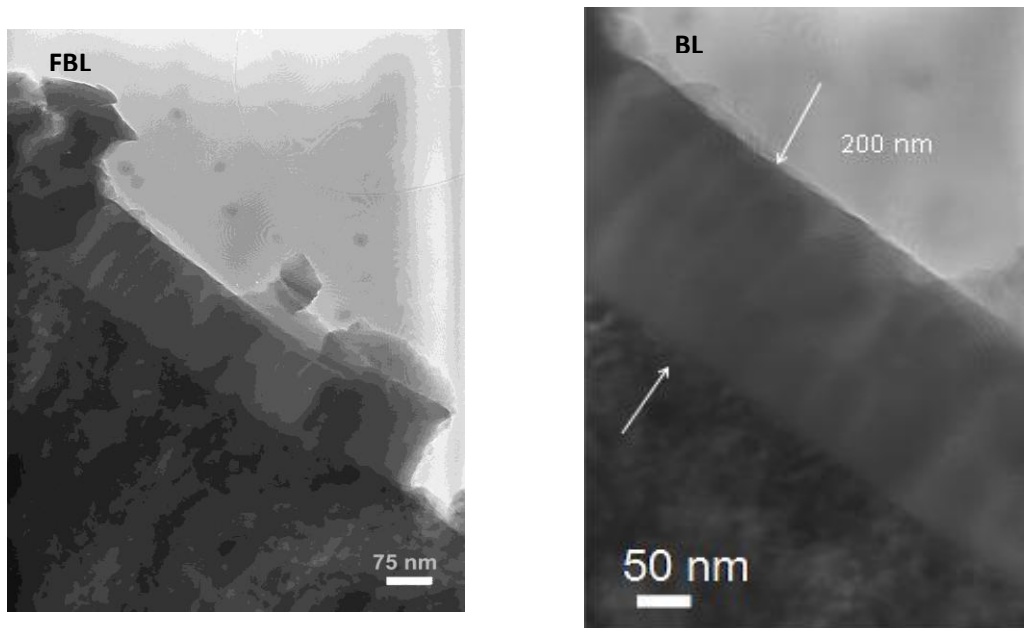
Material fabricado mediante anodizado a un voltaje constante de 20 V en una solución 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> +0.15 wt.% HF durante 60 minutos a una temperatura de 20°C.

Tratamiento de la capa		Designación	Electrolitos/condiciones de tratamiento de la superficie	Espesor de la capa anódica (nm)	Contenido en flúor (at. %)
Pulido químico	Tratamiento libre de flúor	CP	HF(40wt %):HNO <sub>3</sub> (70 wt%):H <sub>2</sub> O 1:4:5 ración 5 min	No tiene	<0.5
Capa barrera	Tratamiento libre de flúor	BL	1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anodizado a 15mA/cm <sup>2</sup> hasta alcanzar 90V	200	<0.3
Nanoporos	Tratamiento conteniendo flúor	NP	1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /0.15 wt % HF anodizado a 20 V 5 min	110	6.4
Nanotubular	Tratamiento conteniendo flúor	NT	1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /0.15 wt % HF anodizado a 20 V 60 min	300	4.2
Capa barrera fluorada	Tratamiento conteniendo flúor	FBL	1M NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 0.15M NH <sub>4</sub> F, pH=5 anodizado a 20V, 120min	150	12

**Tabla 1.** Condiciones de tratamiento y características de la capa de óxido








**Figura 5.** Se presenta el aspecto superficial de las muestras CP, NP y NT.



**Figura 6.** Micrografías electrónicas de transmisión de los cortes transversales de las muestras FBL y BL.

Superficie	Ra(nm)	Ángulo de contacto	
		Agua	Diyodometano
CP	73,9 ± 3,8	52,1 ± 3,7	29,1 ± 1,61
BL	53,2 ± 2,1	57,5 ± 0,16	27,5 ± 1,08
NP	178,9 ± 8,7	29,9 ± 1,8	22,4 ± 2,11
NT	160,8 ± 11,6	7,5 ± 1,58	3,98 ± 0,83
FBL	130,4 ± 7,2	21,36 ± 5,18	26,16 ± 5,35

**Tabla 2.** Medidas de rugosidad y ángulo de contacto para cada uno de los materiales estudiados.

Designación de las muestras	Fotos de los discos de Ti-6Al-4V tras los diferentes tratamientos
CP	
BL	
NP	
NT	
FBL	

**Figura 7.** Fotografías de los discos empleados para los diferentes estudios. Discos con 1,8 cm de diámetro y 2 mm de espesor.

## 2. Estudios de adherencia bacteriana

Los estudios de adherencia bacteriana sobre superficies modificadas y sin modificar de Ti-6Al-4V, se llevaron a cabo utilizando 2 cepas de colección y 6 cepas clínicas para cada una de las especies.

### Cepas de colección

*S. aureus* 15981 (11).

*S. epidermidis* ATCC 35984.

### Cepas clínicas

Las cepas clínicas fueron aisladas de implantes ortopédicos de pacientes con infección osteoarticular, utilizando un procedimiento de sonicación (12). Cada una de las cepas clínicas había sido caracterizada previamente, tanto fenotípicamente como genéticamente, estudiando su capacidad para formar biopelículas *in vitro* (81). Para la identificación se utilizaron métodos convencionales como la prueba de la coagulasa y galerías de API-Staph de BioMérieux, Francia.

Se estudiaron las siguientes cepas clínicas:

- *S. epidermidis*: P6, P33, P53B, P55, P74 y P101
- *S. aureus*: P1, P2, P4, P18, P61T3, y P95

Las cepas fueron aisladas de distintos tipos de implantes ortopédicos (13):

- Prótesis de cadera: P2, P4, P18, P33, P53B, P55, P74, y P101
- Material de osteosíntesis: P1, P6, P61T3 y P95

El estudio genético previo, mostró que todas las cepas excepto P33 y P101 tenían genes *icaA* e *icaD*. Las cepas P1, P95, P53B, P55 y P74 también presentaban el gen regulador *icaR*. Los genes *icaABC* están relacionados con la síntesis del polisacárido intracelular de adhesina (PIA), ampliamente estudiado por su relación estrecha en la formación de la biopelícula, facilitando la adhesión de la célula bacteriana.

Utilizando la prueba de Stepanovic, se caracterizó la capacidad de desarrollar biopelículas para cada una de las capas clínicas. Los resultados mostraron que P33 era un productor de biopelícula pesado, que P4 y P53B eran productores de biopelículas moderados, y que todas las demás cepas fueron bajos productores de biopelículas.

### **Desarrollo de los estudios de adherencia bacteriana**

#### A. Experimentos de adherencia bacteriana con cepas de colección

Se realizaron en los discos CP, BL, FBL, NP y NT.

#### B. Experimentos de adherencia bacteriana con cepas clínicas

Se realizaron en los discos CP, FBL, NP y NT. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo desarrollado por Kinnari y cols. (14). A continuación, se esquematizan los pasos seguidos durante los experimentos de adhesión bacteriana, que se realizaron por triplicado para cada una de las cepas:

- Las bacterias se inocularon en caldo de triptona soja (TSB de BioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) que se incubó durante la noche a 37 ° C con 5% de CO<sub>2</sub>.
- El caldo de cultivo se centrifugó durante 10 min a 3500 g en 22°C, desechando el sobrenadante.
- El sedimento se lavó tres veces con tampón fosfato estéril (PBS, Sigma-Aldrich).
- Posteriormente las bacterias se suspendieron y diluyeron en PBS hasta obtener una concentración de 10<sup>8</sup> UFC / ml. La concentración bacteriana fue determinada por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro visible (Genesys 20, Thermo Científico).
- Cada uno de los discos de titanio (Ti-6Al-4V) fue inoculado con 10 ml de solución bacteriana, incubándose durante 90 min a 37 °C en un modelo estático.
- Después de la incubación, las muestras se lavaron tres veces con PBS para eliminar las bacterias no adheridas a la superficie del material.

- Tras la incubación, se realizó una tinción durante 2 minutos con naranja de acridina ((BD, Franklin Lakes, NJ). Tras 2 minutos se retiró el naranja de acridina con agua estéril.
- La adhesión bacteriana se estudió en cada uno de los discos realizando ocho fotografías a 400X aumentos, utilizando un microscopio de luz ultravioleta (UV). La superficie fotografiada para cada imagen fue de aproximadamente 24000  $\mu\text{m}^2$ .
- El porcentaje de superficie cubierta por bacteria se calculó utilizando el software ImageJ (Nacional Instituto de Salud, Bethesda, MD).
- El análisis estadístico se realizó usando EPI-INFO, versión del software 3.5.1 (CDC, Atlanta, GA).

En primer lugar, comparamos los materiales de forma global mediante la prueba de Kruskal-Wallis. La prueba de Kruskal-Wallis (de William Kruskal y W. Allen Wallis) es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Ya que es una prueba no paramétrica, la prueba de Kruskal-Wallis no asume normalidad en los datos. Para valores de  $p$  inferiores a 0,05 existen diferencias entre los distintos materiales.

En segundo lugar, se compararon los materiales de forma global en cada una de las bacterias mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

En tercer lugar, comparamos dos a dos los materiales para cada una de las bacterias, aplicando la prueba de Wilcoxon. En estadística la prueba U de Mann-Whitney (también llamada de Mann-Whitney-Wilcoxon) es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independiente

La expresión de resultados de adherencia bacteriana se presenta comparando la media del porcentaje de superficie cubierta del material sin modificar (CP), con las medias de porcentaje de superficie cubierta para los materiales modificados con flúor.

### 3. Estudios de formación de biopelículas

Los estudios de formación de biopelículas sobre superficies de materiales con diferentes modificaciones en la superficie, se llevaron a cabo utilizando 5 cepas de colección:

- *S. epidermidis* ATCC 35984
- *S. aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 70888
- *Candida albicans* ATCC 10231

#### Desarrollo de los estudios de formación de biopelículas

Los estudios se llevaron a cabo en los discos sin modificación de la superficie (CP), y con modificaciones en la superficie (FBL, NP y NT), realizándose cada experimento 5 veces.

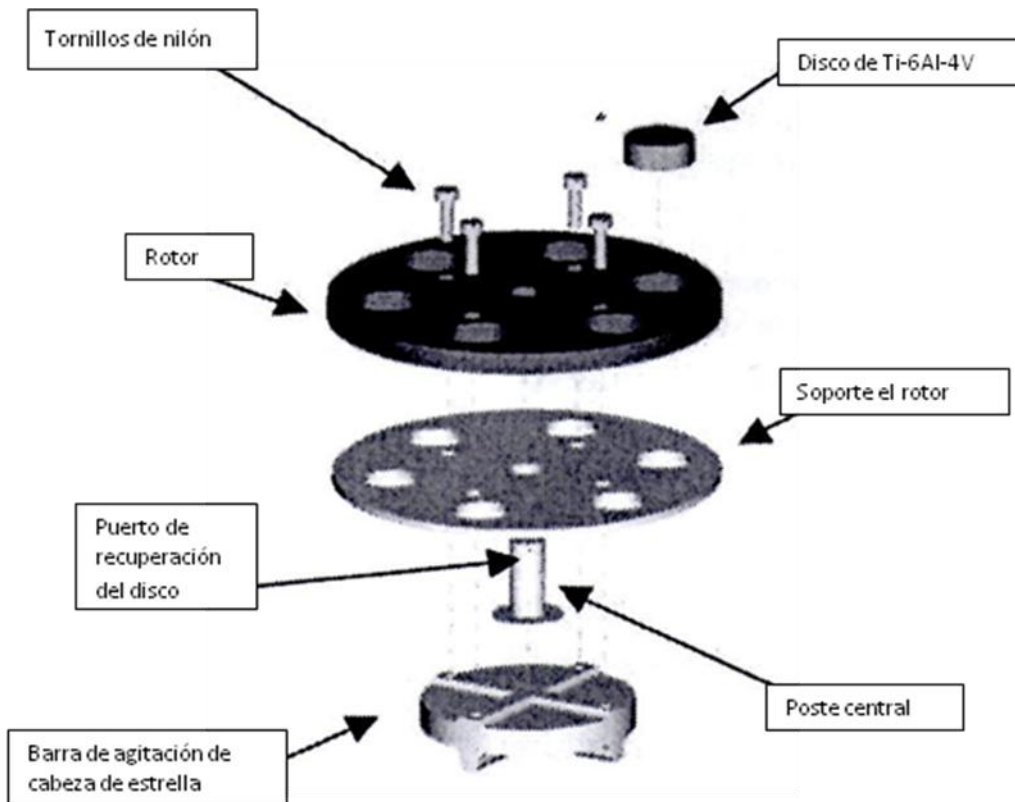
Los estudios de formación de biopelículas se realizaron introduciendo pequeños cambios en el protocolo original para cuantificar de la biopelícula de *P. aeruginosa* en condiciones de agitación y flujo continuo, usando el Rotating Disk Reactor (RDR). Dicho método está aprobado por la American Society for Testing and Materials (ASTM) con el código: E2196-12 (82)

El uso del RDR permite desarrollar un estudio de biopelículas dinámico. Los discos se encuentran en agitación continua, ya que están fijados en el rotor. El rotor contiene un imán, y al estar situado el vaso de precipitados sobre un agitador, los discos se encuentran en rotación continua.

Las bacterias se inocularon en caldo corazón cerebro (BHI) que se incubó durante la noche a 37° C en atmósfera sin CO<sub>2</sub>, a diferencia de la preparación del inóculo de *C. albicans* que se incubó en caldo Sabouraud dextrosa (SDB) al 50% + sacarosa al 1%.

### Preparación del reactor

Cada disco (CP, FBL, NP y NT) se coloca en uno de los agujeros del rotor, y posteriormente el rotor es introducido en el vaso de precipitados. Colocados los filtros de aire y los tubos que proporcionarían el flujo continuo, el reactor se esteriliza en el autoclave.



**Figura 8.** Estructura de las piezas que forman el RDR.

Cada experimento constaba de dos fases, ambas fases se realizaron en agitación continua.

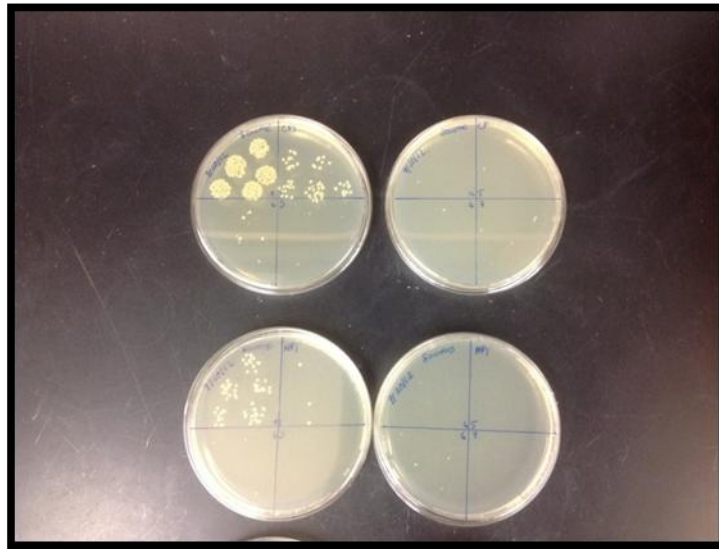
- Durante la primera fase: FASE DE BAÑO. Se realizó una incubación de 2 horas a 37°C en atmósfera sin CO<sub>2</sub>, de los discos a estudiar (CP, FBL, NP y NT) con una solución bacteriana, que se preparó de la siguiente manera: inoculando 1 ml de la solución bacteriana en 250 ml de caldo corazón cerebro al 1%+ suero bovino fetal al 0,03%. El caldo donde se inoculó 1 ml de *C. albicans* presenta algunas diferencias, y es que se utilizó caldo Sabouraud dextrosa (SDB) al 1% + suero bovino fetal al 0,03%.

- Tras finalizar las dos horas de la primera fase, se conectó el flujo continuo, comenzando con la segunda fase: FASE DE FLUJO CONTINUO. Dicha fase tuvo una duración de 24 horas, a partir de la cual los discos fueron retirados del rotor y lavados tres veces con tampón fosfato estéril, retirando las células bacterianas en estado planctónico. La biopelícula formada sobre la superficie de los diferentes discos fue retirada por la técnica de “scraping”, haciendo uso de un stick de teflón introducido en 10 ml de tampón fosfato (PBS) y repitiendo el proceso de “scraping” 3-4 veces para cada disco. Posteriormente, cada tubo conteniendo 10 ml de solución bacteriana fue vorteadado durante 30 segundos, sonificado durante 2 minutos y vorteadado nuevamente, durante otros 30 segundos, con el fin de disgregar las bacterias que se encuentren en acúmulos en la biopelícula, hasta obtener una disolución homogénea.
- Flujo utilizado = 1,2 ml/min



**Figura 9.** Reactor (RDR) utilizado para los estudios de formación de biopelículas.

Se realizaron diluciones seriadas a partir de la dilución  $10^0$ , y cada una de las diluciones fue cultivada por la técnica “Drop Plate” (83) en placas de agar corazón cerebro al 10%, a excepción de los estudios de *C. albicans* que se sembraron en agar Sabouraud dextrosa (SDA).



**Figura 10.** Ejemplo de placas inoculadas por la técnica DROP PLATE

El cálculo de la acumulación global de la biopelícula, sobre cada uno de los discos fue calculado siguiendo el protocolo de la ASTM (82):

1. Cálculo del  $\text{Log}_{10}$  de densidad para cada uno de los discos;

$$\text{LOG}_{10} (\text{UFC/ml}) = \text{LOG}_{10} [(X/B)(V/A)(D)]$$

X= la media de UFC

B= el volumen inoculado

V= volumen esrapeado

A= área de superficie

D= dilución

El área de superficie del disco fue calculada para cada uno de los discos,

$$A_c = \pi \cdot r^2$$

Donde el radio = 0,9 cm

2. Calcular la media de la acumulación global tomando la media del  $\text{Log}_{10}$  de las densidades calculadas.

Los materiales se reciclaron durante todo el estudio, para lo que siguió el siguiente protocolo:

- Cada disco fue sonicado durante 15 min sumergido en PBS.
- Tras extraer cada uno de los discos y antes de ser esterilizados, se limpiaban con etanol de 70 °.
- Después de dejar evaporar el etanol, los discos eran autoclavados durante 30 min a 121°C en programa de sólidos con secado.

Aplicando la misma metodología utilizada para realizar el análisis estadístico de los resultados de adherencia bacteriana, se realizó el análisis estadístico para estudiar posibles diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de biopelícula en el cada uno de los materiales de Ti-6Al-4V.



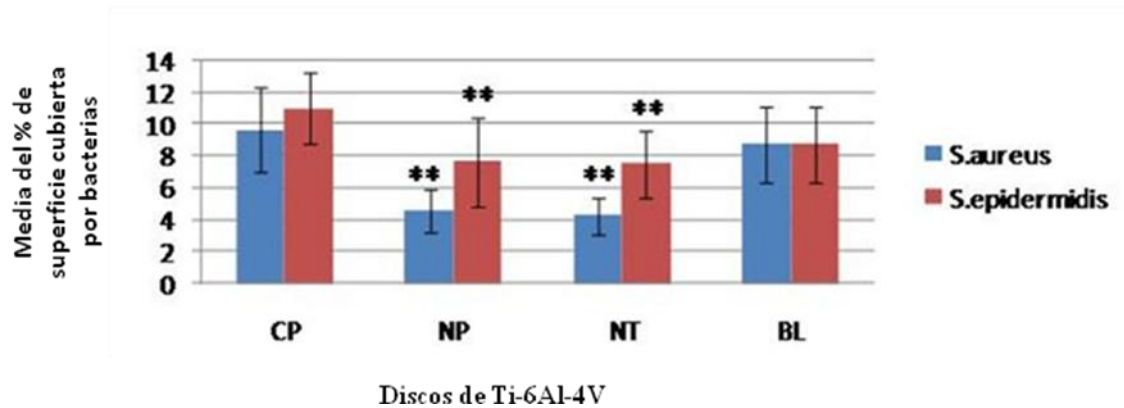
## **RESULTADOS**

---

## 1. Estudios de adherencia bacteriana

### 1.1. Estudios de adherencia bacteriana para conocer cómo influye la presencia de nanoestructuras con flúor en la superficie del material.

#### Resultados de adherencia bacteriana para las cepas de colección.



**Figura 11.** Adherencia bacteriana de las cepas colección a los materiales CP, NP, NT y BL (\*\*  $p < 0,0001$ , al comparar NP y NT con CP).

La **figura 11** muestra la adherencia de ambas cepas colección, *S. aureus* y *S. epidermidis*, a las superficies de los materiales no modificados nanoestructuralmente (CP y BL) y a las superficies de los materiales modificados con flúor (NP, NT), expresada como la media del porcentaje de superficie cubierta por bacterias.

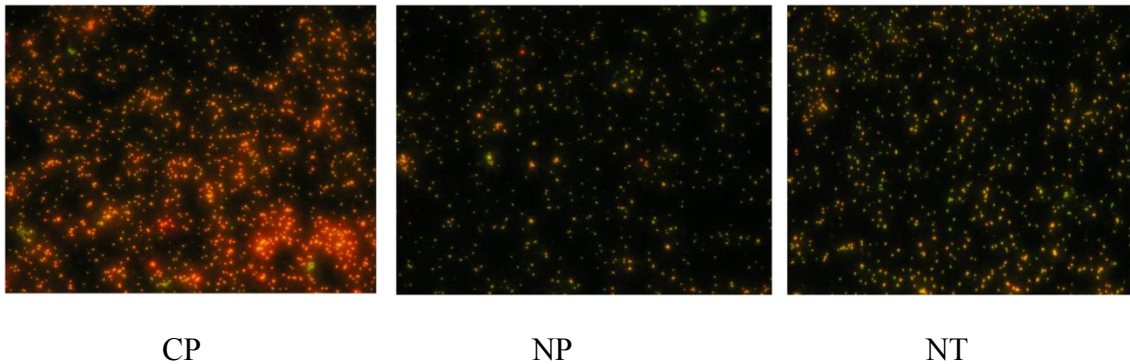
Los resultados revelan una menor adherencia de *S. aureus* frente a *S. epidermidis* a los materiales nanoestructurados (NP y NT). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de superficie cubierta en los materiales nanoestructurados (NP y NT), al compararlos con el material no modificado (CP). *S. aureus* mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar la superficie no modificada (CP), con los materiales modificados (NP y NT), ambos con una  $p < 0,0001$  (test de Kruskal-Wallis). Realizando la misma comparación, *S. epidermidis* presentó diferencias estadísticamente significativas para los materiales modificados (NP y NT) con una  $p = 0,0001$  y  $p < 0,0001$  (test de Kruskal-Wallis), respectivamente.

La adhesión de ambas especies a la superficie del material no modificado (CP) no fue estadísticamente significativa ( $p < 0,13$ , test de Kruskal-Wallis). Sin embargo, existieron

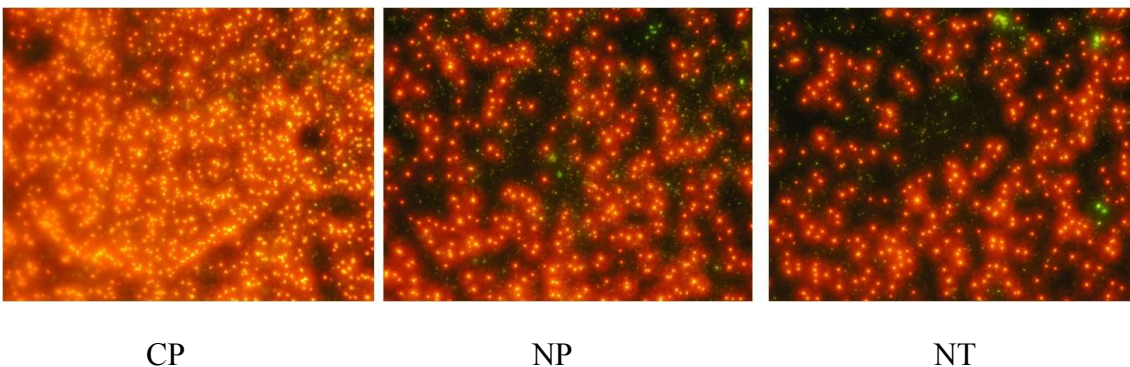
diferencias estadísticamente significativas entre ambas especies, en relación con las superficies de NP ( $p = 0,0001$ , test de Kruskal- Wallis) y las de NT ( $p < 0,0001$ , test de Kruskal-Wallis).

Por otra parte, la **figura 11** muestra además los resultados de adherencia bacteriana de cepas colección al material con una capa barrera libre de flúor (BL), en la superficie. Comparando los resultados de porcentaje de superficie cubierta para el material BL frente a los otros dos materiales modificados (NP y NT), existen diferencias estadísticamente significativas tanto para *S. aureus* ( $p < 0,001$ , test de Kruskal-Wallis) como para *S. epidermidis* ( $p = 0,047$ , test de Kruskal-Wallis) entre los materiales BL y NP.

Estos resultados confirman que las superficies BL no tienen mucho potencial en la prevención de la adhesión bacteriana y, por lo tanto, no se utilizaron en las pruebas de cepas clínicas

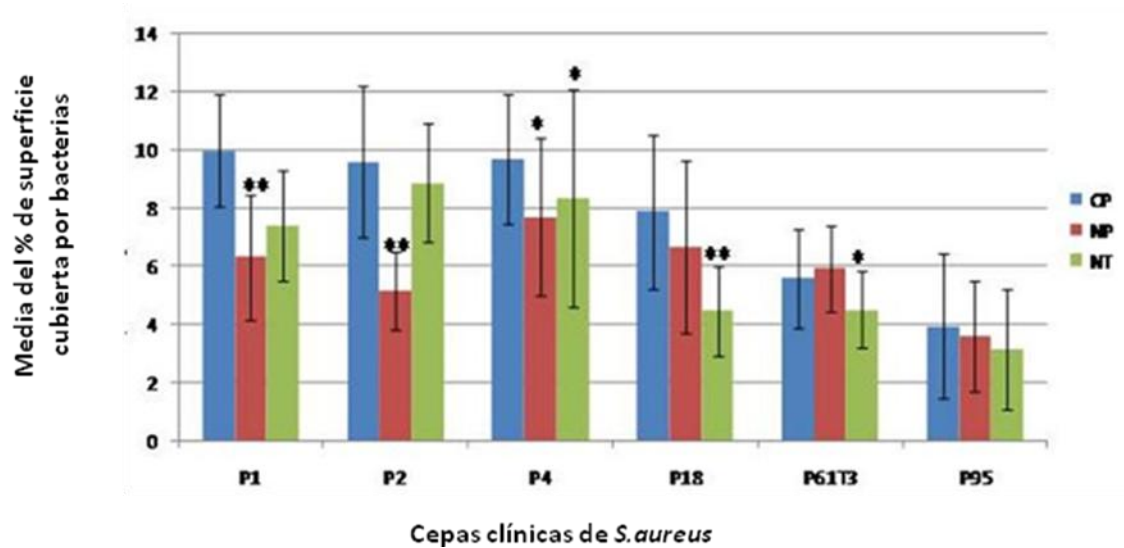


**Figura 12.** Adherencia de *S.aureus 15981* a los materiales CP, NP y NT, tinción de naranja de acridina.

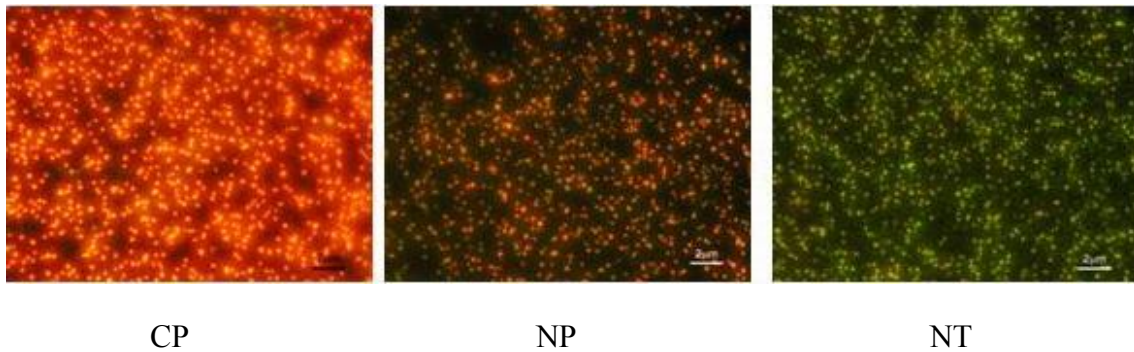


**Figura 13.** Adherencia de *S.epidermidis* ATCC 35984 a los materiales CP, NP y NT, tinción de naranja de acridina.

## Resultados de adherencia bacteriana para las cepas de clínicas



**Figura 14.** Adherencia bacteriana de las cepas 6 clínicas de *S. aureus* a los materiales CP, NP y NT (\*\* $p < 0,001$  y \*  $p < 0,05$ , al comparar NP y NT con CP).



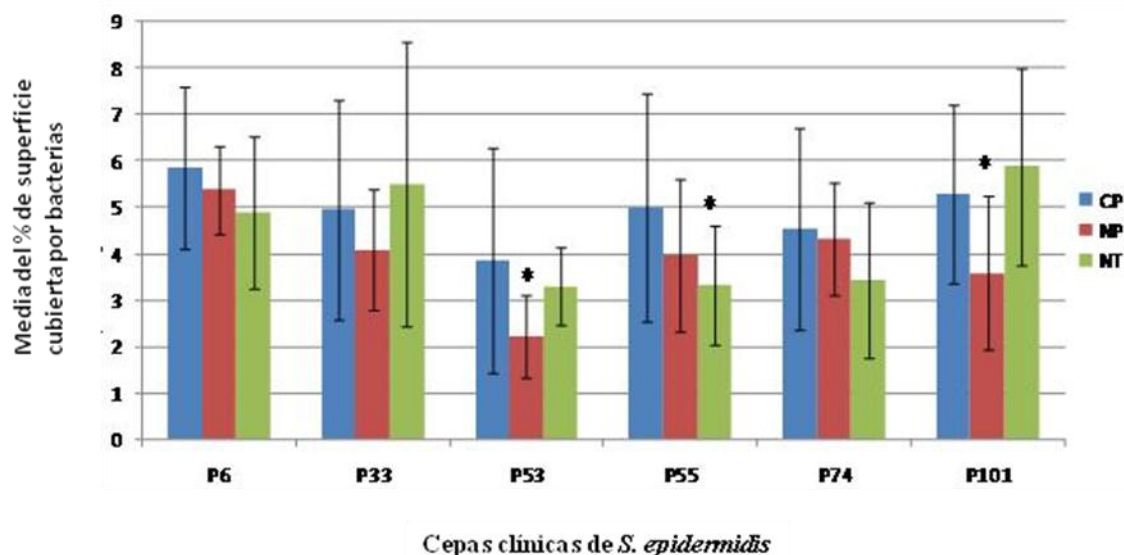
**Figura 15.** Adherencia de la cepa clínica P95 de *S. aureus* los materiales CP, NP y NT, tinción de naranja de acridina.

Las **figuras 14** y **16** representan la media del porcentaje de superficie cubierta de seis cepas clínicas de *S. aureus* y seis de *S. epidermidis* respectivamente, comparando el material de referencia con superficie no modificada (CP), con los materiales con superficies modificadas (NP y NT). Los resultados muestran una variabilidad entre cepas de la misma especie, tanto para *S. epidermidis* como para *S. aureus*, al comparar la adherencia bacteriana al material CP con la adherencia a los materiales modificados (NP y NT).

La **figura 14** muestra los resultados de adherencia de las 6 cepas clínicas de *S. aureus*, donde se observa que las cepas P61T3 y P95 presentaron una mayor variabilidad de adherencia bacteriana, en comparación con el resto de cepas de la misma especie. Las cepas P1 y P2 presentaron una menor adherencia a la superficie de NP, comparando con la superficie de NT. Las cepas P1 y P2 presentaron una mayor adherencia a la superficie NT que las cepas P18, P61T3 y P95.

Comparando los resultados de adherencia bacteriana de los materiales modificados con flúor (NP y NT), frente al material no modificado (CP), existen diferencias estadísticamente significativas, para la seis cepas clínicas de *S. aureus* ( $p < 0,001$ , test de Kruskal-Wallis). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas superficies modificadas (NP y NT).

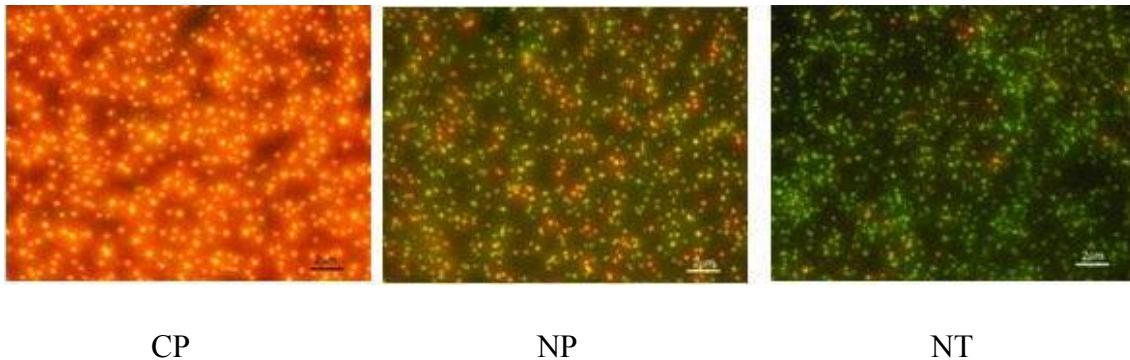
Al comparar la adherencia bacteriana entre los materiales modificados (NP y NT) con los materiales no modificados, para ambas especies *S. epidermidis* y *S. aureus*, se observó una diferencia estadísticamente significativa para los materiales modificados con flúor ( $p < 0,0001$ , test de Kruskal-Wallis), pero no para el material no modificado CP ( $p = 0,12$ , test de Kruskal-Wallis).



**Figura 16.** Adherencia bacteriana de las 6 cepas clínicas de *S. epidermidis* a los materiales CP, NP y NT (\*\* $p < 0,0001$ , al comparar NP y NT con CP).

En la **figura 16** se observa que la mayor diferencia en la adherencia de *S. epidermidis* apareció para la superficie NP, como ocurre en las cepas P101 y P33, que mostraron

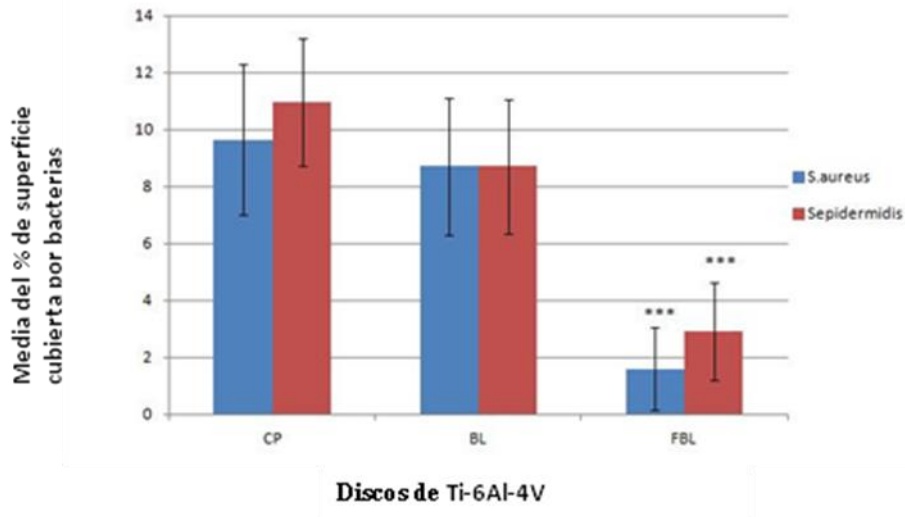
una mayor adherencia a la superficie de NT que a la superficie de NP. Al comparar los materiales modificados (NP, NT) con el material no modificado (CP), se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las seis cepas clínicas, para la superficie NP comparada con la superficie no modificada (CP)  $p = 0,0005$  (test de Kruskal-Wallis) y para las superficies NT y CP ( $p = 0,035$ , test de Kruskal-Wallis). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las superficies de NP y NT ( $p = 0,174$ , test de Kruskal-Wallis).



**Figura 17.** Adherencia bacteriana de la cepa clínica P74 de *S. epidermidis* a los materiales CP, NP y NT, tinción naranja de acridina.

1.2. Estudios de adherencia bacteriana para conocer cómo influye la presencia de una capa barrera de flúor en la superficie del material.

Resultados de adherencia bacteriana para las cepas de colección.



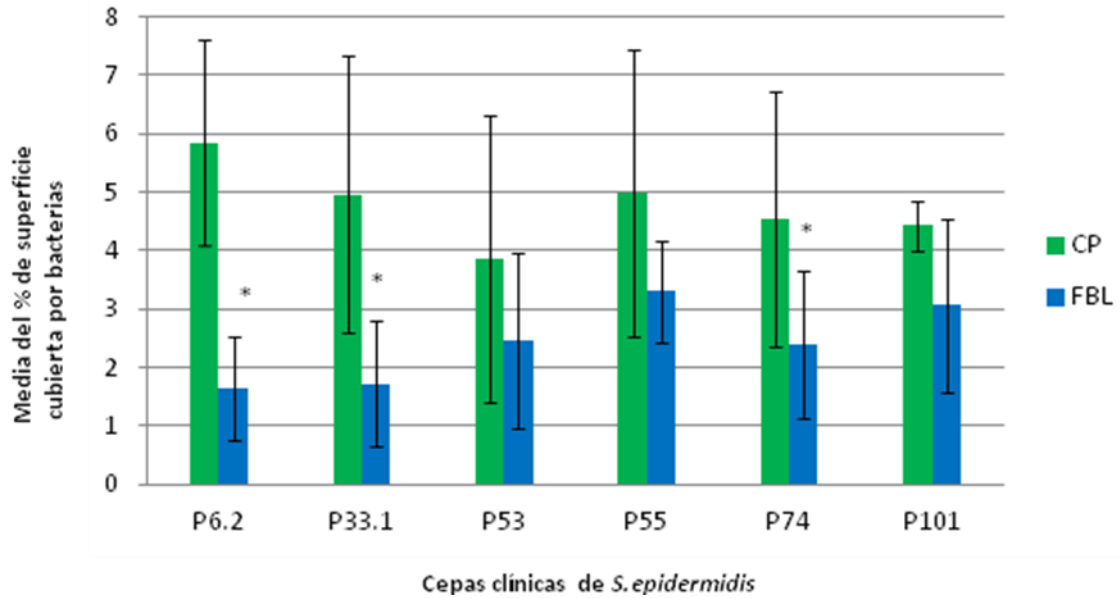
**Figura 18.** Adherencia bacteriana de las cepas colección a los materiales CP, BL y FBL (\*\*\*) $p < 0,0001$ , al comparar FBL con CP y BL).

La **figura 18** muestra los resultados de la media del porcentaje de superficie cubierta de las cepas de colección. Ambas cepas de colección, *S. aureus* y *S. epidermidis*, presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ , test de Kruskal-Wallis) en la disminución de la adherencia bacteriana para el material modificado con flúor al comparar con los materiales no modificados (CP y BL).

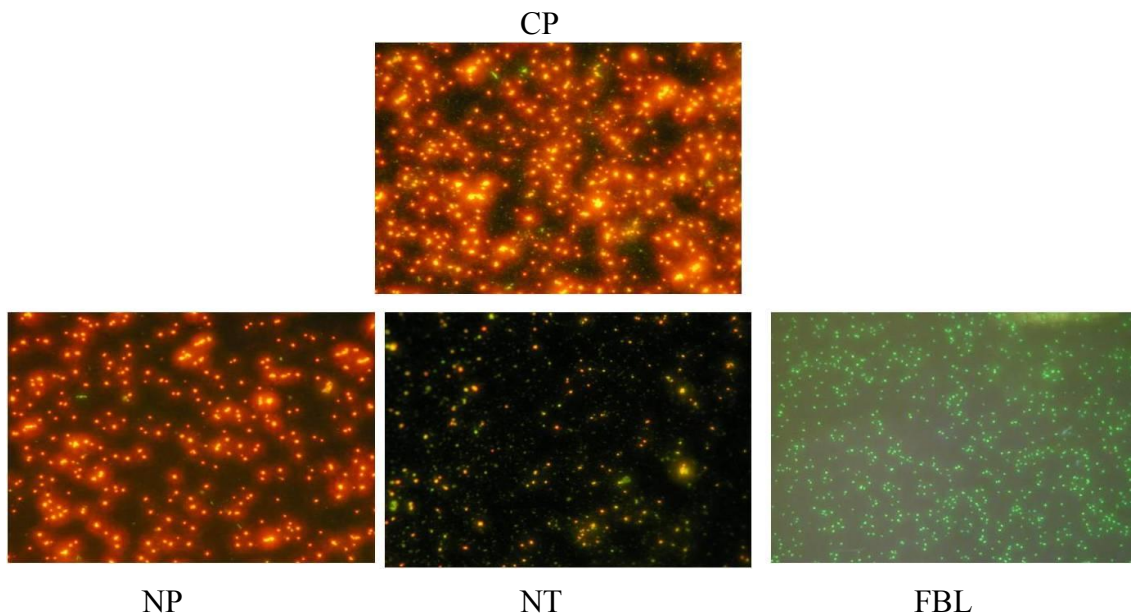
El porcentaje de superficie cubierta del material FBL es mayor para *S. epidermidis* que para *S. aureus*. Sin embargo, no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de superficie cubierta de BL y CP ( $p > 0,0001$ , test de Kruskal Test-Wallis).

### Resultados de adherencia bacteriana para las cepas clínicas

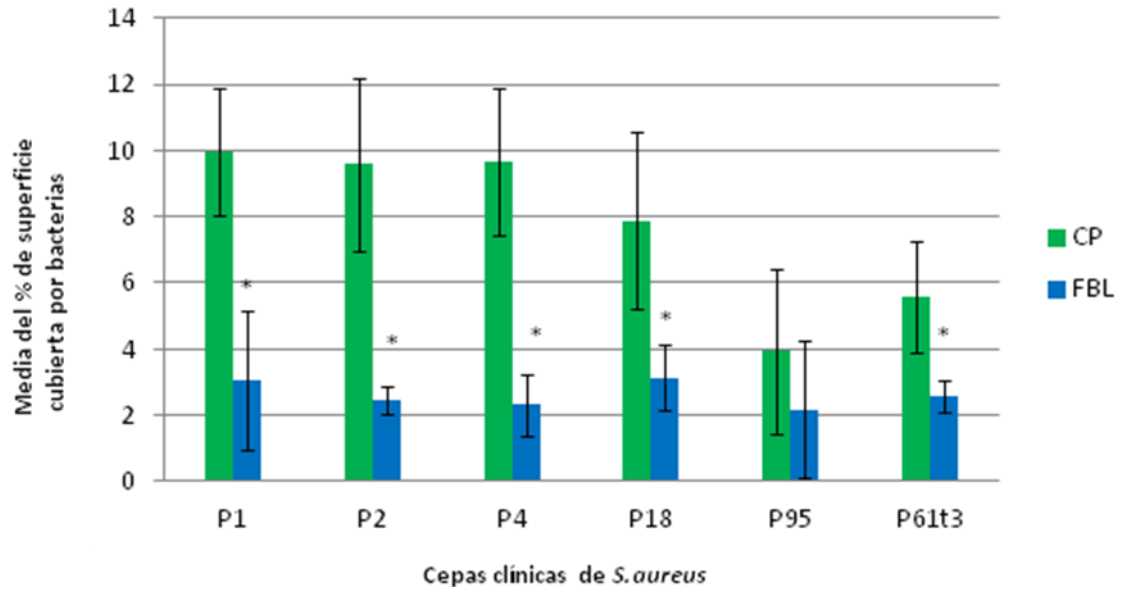
Al igual que ocurre con las cepas colección, las cepas clínicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los materiales CP y BL, por lo que las comparaciones de adherencia bacteriana entre materiales se realizó para los materiales CP y FBL.



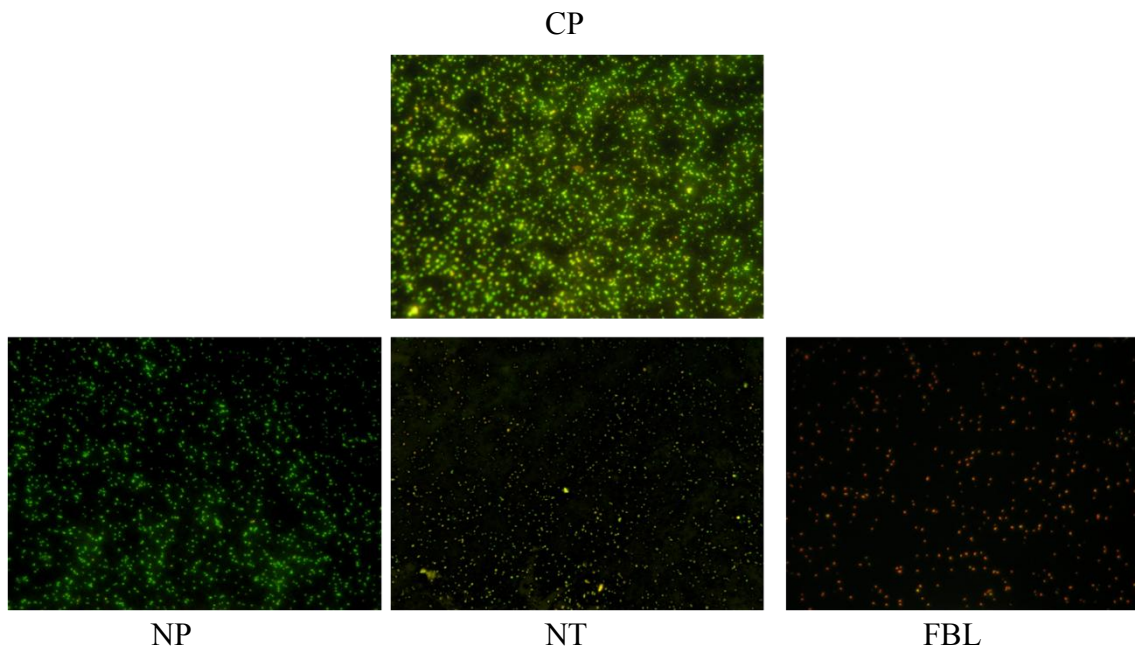
**Figura 19.** Adherencia bacteriana de seis cepas clínicas de *S. epidermidis* a los materiales CP y FBL (\* $p < 0,0001$ , al comparar FBL con CP).



**Figura 20.** Adherencia bacteriana de la cepa clínica P74 de *S. epidermidis* a los materiales CP, NP, NT y FBL, tinción naranja de acridina.



**Figura 21.** Adherencia bacteriana de seis cepas clínicas de *S. aureus* a los materiales CP y FBL (\* $p < 0,0001$ , al comparar FBL con CP).



**Figura 22.** Adherencia bacteriana de la cepa clínica P95 de *S. aureus* a los materiales CP, NP, NT y FBL, tinción naranja de acridina.

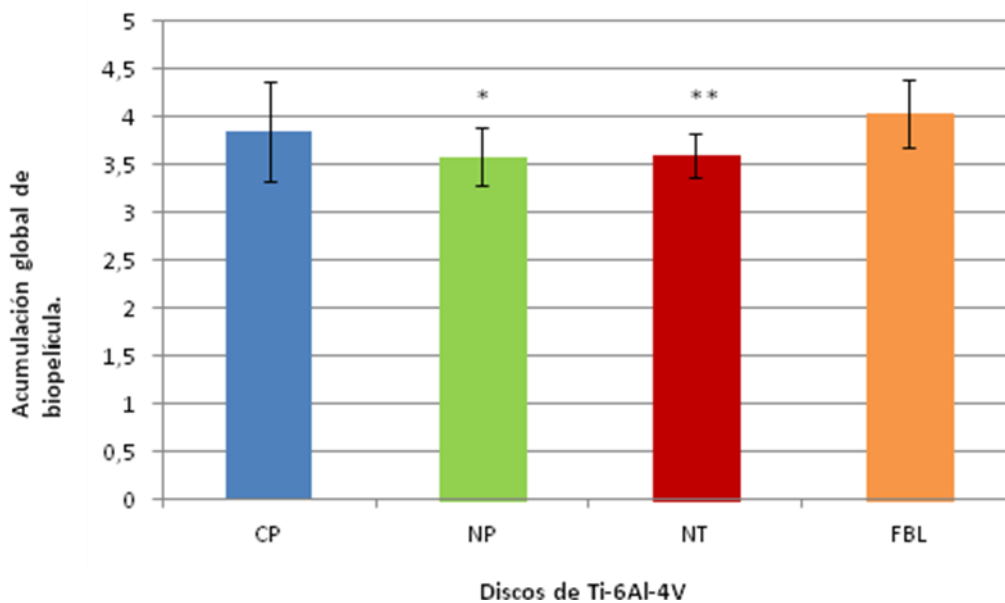
La **figura 19** muestra la media del porcentaje de superficie cubierta por seis cepas clínicas de *S. epidermidis*. Para las cepas P6.2, P33.1, y P74, los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de superficie cubierta de FBL en comparación con el CP. Del mismo modo, para la mayoría de las cepas clínicas

de *S. aureus* (P1, P2, P4, P18 y P61T3) la media del porcentaje de superficie cubierta reveló una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ , test de Kruskal-Wallis) en muestras FBL en comparación con muestras de CP, **figura 21**.

Por otra parte, la media del porcentaje de superficie cubierta al material FBL es menor para *S. aureus* que para *S. epidermidis*.

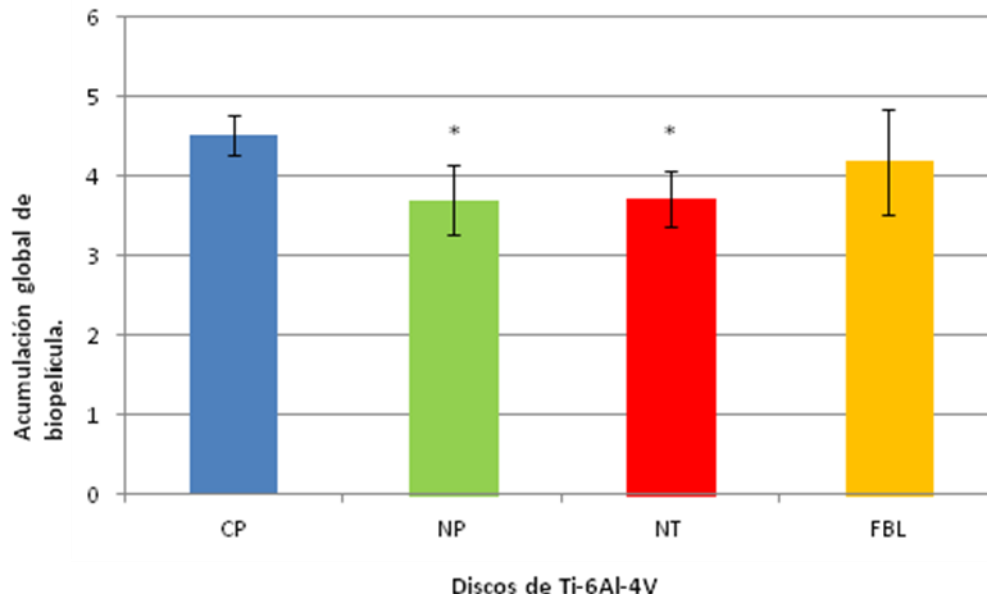
## 2. Estudios de formación de biopelículas

### 2.1. Estudios de formación de biopelículas en grampositivos



**Figura 23.** Acumulación global de biopelícula de *S. aureus* en diferentes materiales de Ti-6Al-4V (\* $p < 0,05$  y \*\* $p = 0,07$  al comparar NP y NT con FBL).

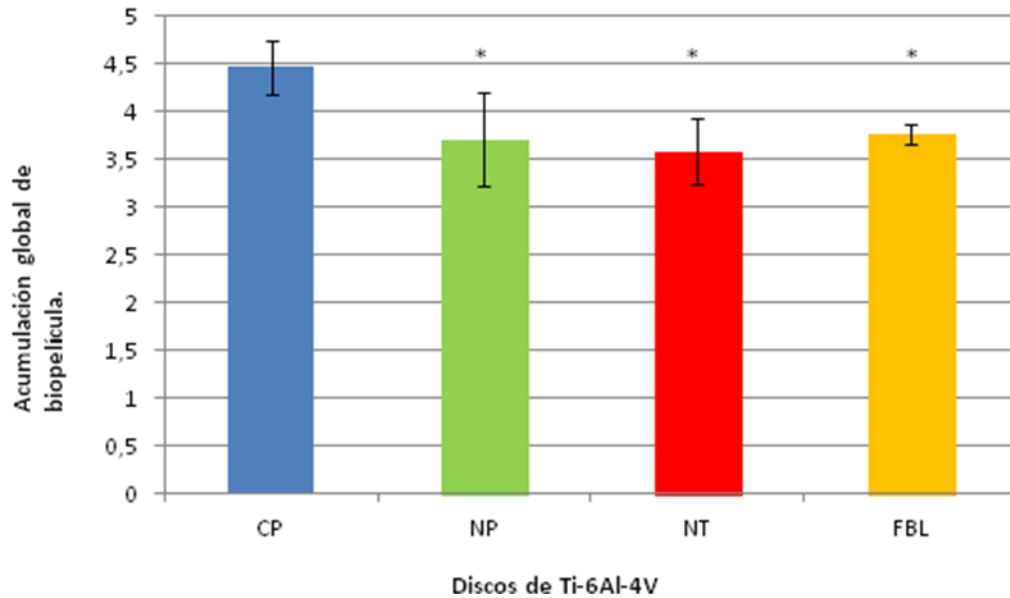
La **figura 23** muestra la acumulación global de biopelícula en la superficie de los materiales modificados con flúor (NP, NT y FBL) y el material no modificado (CP) para *S. aureus*. Se puede observar que aunque los resultados muestran una disminución en la acumulación de biopelícula de *S. aureus* a las superficies de NP y NT, no se observa una diferencia estadísticamente significativa al compararlos con el material no modificado (CP),  $p = 0,1526$  y  $p = 0,4020$  por el test de Kruskal-Wallis, respectivamente. Sin embargo, se encuentran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , test de Kruskal-Wallis) al comparar los materiales NP y NT con la capa barrera con flúor, para la que existe una mayor adherencia bacteriana.



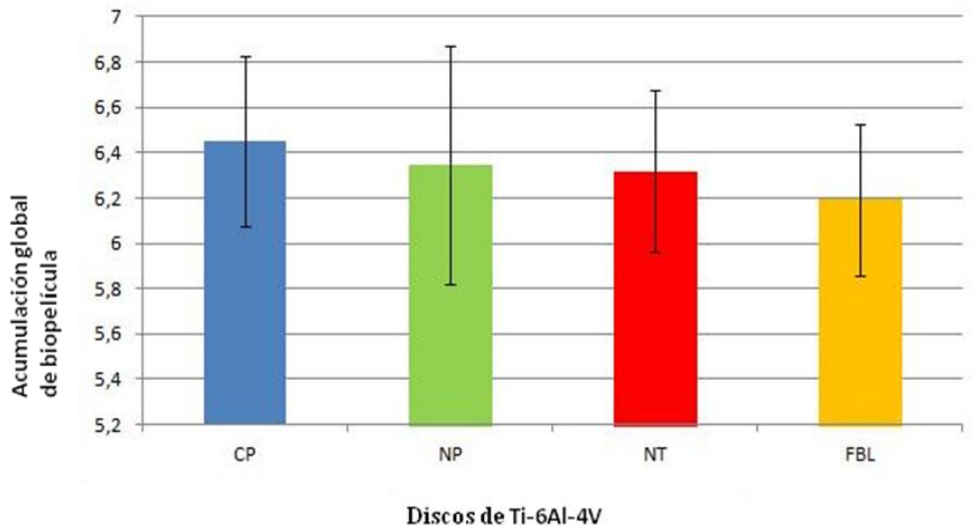
**Figura 24.** Acumulación global de biopelícula de *S. epidermidis* en diferentes materiales de Ti-6Al-4V (\* $p < 0,05$  al comparar NP y NT con CP).

La **figura 24** representa, al igual que la **figura 23**, la acumulación global de biopelícula de *S. epidermidis* en la superficie de diferentes materiales (CP, NP, NT y FBL). Los resultados muestran que existe una menor acumulación de biopelícula en los materiales anodizados con flúor (NP y NT), estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , test de Kruskal-Wallis), al compararlos con el material sin modificar (CP). No existen diferencias estadísticamente significativas al comparar CP con FBL ( $p = 0,5127$ , test de Kruskal-Wallis).

## 2.2. Estudios de formación de biopelículas en gramnegativos



**Figura 25.** Acumulación global de biopelícula de *E. coli* en diferentes materiales de Ti-6Al-4V (\* $p < 0,05$  al comparar NP, NT y FBL con CP)



**Figura 26.** Acumulación global de biopelícula de *P. aeruginosa* en diferentes materiales de Ti-6Al-4V

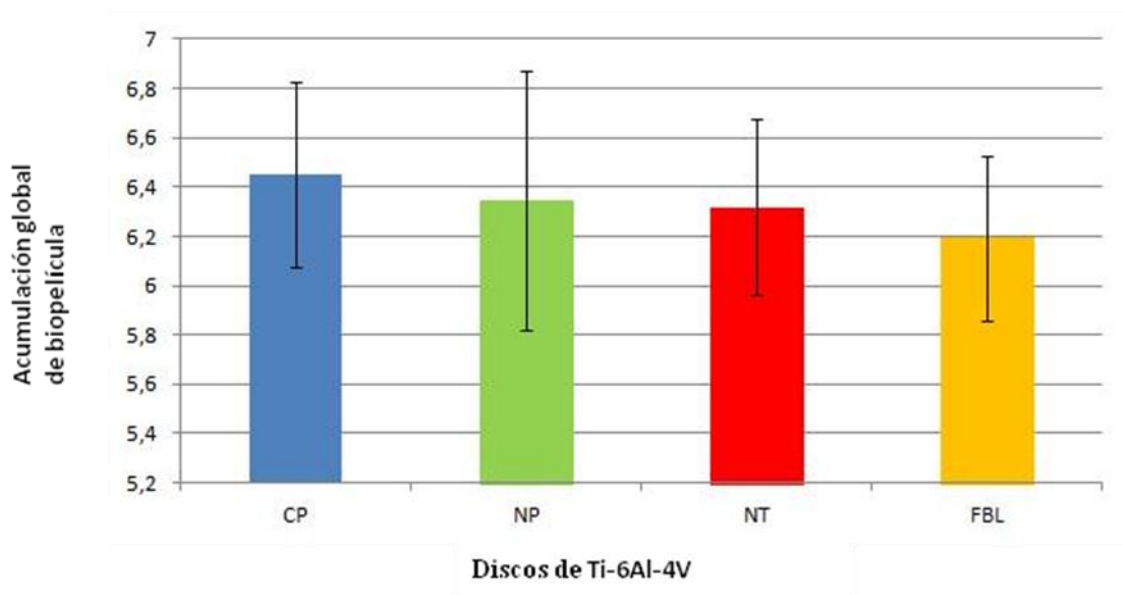
Las **figuras 25** y **26**, muestran la acumulación global de biopelícula de *E. coli* y *P. aeruginosa* en la superficie de diferentes materiales (CP, NP, NT y FBL).

Al comparar la acumulación de biopelícula de *E. coli* en la superficie de los distintos materiales con flúor (NP, NT y FBL), con la superficie no modificada (CP), se observa

una disminución estadísticamente significativa ( $p=0,01$ , test de Kruskal-Wallis). Podemos destacar que la menor disminución en la acumulación de biopelícula, comparando las superficies modificadas con la no modificada, la presentan las superficies de NT y FBL ( $p=0,008$  y  $p=0,009$  por el test de Kruskal-Wallis, respectivamente). Destacar que no existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre materiales modificados ( $p>0,05$ , test de Kruskal-Wallis), **figura 20**.

La **figura 26** muestra, que pese a unos resultados *in vitro*, donde existe una pequeña disminución de la acumulación de biopelícula de *P.aeruginosa* en las superficies modificadas, no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar la acumulación de biopelícula en los materiales modificados (NP, NT y FBL) con el material no modificado (CP).

### 2.3. Estudios de formación de biopelículas de *C. albicans*



**Figura 27.** Acumulación global de biopelícula de *C. albicans* en los diferentes materiales de Ti-6Al-4V

La **figura 27** representa gráficamente los resultados de acumulación de biopelícula de *C. albicans* en diferentes superficies, tanto modificadas con flúor (NP, NT y FBL), como no modificadas (CP).

La pequeña disminución en la acumulación de biopelícula de *C. albicans* en las superficies modificadas con flúor (NP y NT), no es estadísticamente significativa ( $p>0,05$ , test de Kruskal-Wallis) al compararla con CP.

Al comparar la acumulación de biopelícula entre los materiales CP y FBL, no existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ , test de Kruskal-Wallis).

## DISCUSIÓN

---

El campo de la cirugía traumatológica dedicada a la implantología ha supuesto un enorme avance científico, mejorando la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, la implantación de un dispositivo médico se relaciona con un mayor riesgo de infecciones en el lugar de la cirugía. El incremento de la susceptibilidad a las infecciones en estos pacientes está relacionado con un déficit inmunológico en la interfase entre el dispositivo y el huésped, facilitando la contaminación bacteriana de la superficie del biomaterial (61) (20, 84). La relevancia clínica de las infecciones osteoarticulares relacionadas con biomateriales, va ligada a su complejo manejo, que supone en muchos casos la retirada de la prótesis y tratamientos de larga duración (85).

Las infecciones asociadas a biomateriales, están relacionadas con la adherencia de las bacterias a la superficie del material, considerándose el primer paso en el desarrollo de la biopelícula. Todas aquellas actuaciones orientadas a disminuir la adherencia bacteriana son de elevado interés (61) (60, 86), ya que aquellas bacterias que no se adhieren rápidamente a la superficie del material son eliminadas por el sistema inmune (5) (23). Dentro de las principales estrategias en el diseño de nuevos biomateriales encontramos la modificación de características de la superficie material como; rugosidad, hidrofobicidad o morfología (5, 42) (87, 88) y la incorporación de una capa o cubierta con antibióticos. Buscando, en primer lugar, disminuir la adherencia bacteriana a la superficie y, en segundo lugar, interferir en la formación de la biopelícula, fueron desarrollados para este estudio diferentes materiales de Ti con o sin modificaciones en la superficie; CP, NP, NT, BL y FBL. En los materiales estudiados se combinaron tanto cambios en la morfología de la superficie (nanoporos y nanotubos), que a su vez originaron variaciones en los valores de rugosidad e hidrofobicidad, como el dopaje con sustancias inorgánicas con actividad antibacteriana, como el flúor. Las sustancias con actividad antibacteriana pueden incorporarse de diferentes maneras al material: unidas a la superficie, localizadas en la cubierta para ser liberadas o internalizadas en el biomaterial desde donde se liberarían (61). En nuestro estudio se siguieron diferentes estrategias en el diseño de superficies de Ti-6Al-4V dopadas con flúor, las estructuras con nanoporos y nanotubos (NP y NT) contienen el flúor en la propia estructura (16), mientras que la capa barrera de flúor (FBL) contiene el flúor en la cubierta del material, y carece de cambios morfológicos en su estructura (74).

Las modificaciones de la superficie dirigidas a generar nanoestructuras son de elevado interés por ser un factor que influye en la respuesta biológica de la superficie, un ejemplo de ello son los estudios realizados con materiales que presentan superficies rugosas en escala nano y microscópica que permiten una mayor osteointegración en implantes de titanio. Por otra parte, el crecimiento de barreras de óxido con nanoestructura, puede representar un punto de enlace con antibióticos, hidroxiapatita, proteínas, disminuyendo la adherencia bacteriana, facilitando la recuperación del tejido alterado durante la cirugía o favoreciendo la formación ósea. (15) (89) (90) (91). Sin embargo, la presencia de nanoestructuras en la superficie de biomateriales de Ti no deja de tener un papel controvertido. Hay estudios que concluyen que la presencia de dichas nanoestructuras favorece la adherencia bacteriana y formación de la biopelícula (65, 92-94) al incrementar el área (5) y la rugosidad de la superficie (95), un ejemplo de ello es el estudio llevado a cabo por Puckett y cols (96) sobre adherencia bacteriana a nanoestructuras de titanio, en el que concluyen que la superficie nanorugosa obtenida por evaporación con haz de electrones es la mejor superficie para inhibir la adherencia bacteriana, a diferencia de las superficies con nanoestructuras obtenidas por un proceso de anodización con HF, sugiriendo que el flúor es el responsable del incremento de adherencia bacteriana que obtienen. Si comparamos los resultados obtenidos en nuestro estudio con los obtenidos por Puckett y cols (96), una de las principales explicaciones que encontramos está relacionada con las cepas utilizadas. Mientras que ellos estudian cepas colección, nosotros utilizamos cepas clínicas, cepas con diferentes características de adherencia, que nos lleva a obtener en nuestro estudio una variabilidad interespecie en la adherencia bacteriana. Mientras que estudios como los de Truong y cols. (94), sobre la influencia de nanoestructuras en la adherencia de proteínas y bacterias en superficies de titanio, demostraron que la adherencia bacteriana a nanoestructuras de titanio está directamente relacionada con la rugosidad de la superficie y con la presencia de proteínas adheridas a la superficie. Sus resultados demostraron que existe una mayor adherencia bacteriana en aquellas superficies que presentan una menor rugosidad. En su estudio el incremento de rugosidad se relacionó con la aparición de una lámina de proteínas en la superficie, que disminuyó la adherencia bacteriana, obteniendo unos resultados que nunca antes se habían obtenido para la morfología en nanoescala (94). La conclusión de Truong y cols (94), sigue la misma línea de los resultados obtenidos en nuestros experimentos de adherencia bacteriana, al comparar el porcentaje de bacterias adheridas a un pulido químico de Ti frente a aleaciones de Ti-6Al-4V modificadas con

flúor (NP, NT), teniendo en cuenta que nosotros no estudiamos la adherencia de proteínas a la superficie. Las aleaciones de Ti-6Al-4V modificadas con flúor, que presentan nanoestructuras (NP y NT), incrementaron los valores de rugosidad y disminuyeron el ángulo de contacto incrementando la mojabilidad del material al compararlos con el pulido químico (CP) y el material con capa barrera sin flúor (BL). Comparando los porcentajes de bacterias adheridas a la superficie del material, observamos una disminución para aleaciones de Ti-6Al-4V modificadas con flúor (NP, NT), frente al pulido químico y capa barrera sin flúor (BL). Sin embargo, no observamos diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de bacterias adheridas a la superficie del material, entre los materiales NP y NT. Respondiendo a algunas de las hipótesis planteadas al principio del estudio, encontramos varias explicaciones a los resultados obtenidos, que podrían explicar la disminución del porcentaje de bacterias adheridas a la superficie del material. En primer lugar, el cambio de morfología de la superficie por la presencia de nanoporos y nanotubos, se traduciría en una disminución de bacterias adheridas a la superficie. En segundo lugar, la presencia de flúor en estos nanoporos y nanotubos, podría ser el responsable de la disminución de bacterias adheridas.

La presencia de flúor en implantes de titanio es otro tema controvertido, ampliamente estudiado en el área de la odontología. Existen trabajos (97) (98) (99) que sugieren que la presencia de flúor incrementa la adherencia bacteriana. Sin embargo, es importante señalar que este incremento es consecuencia de un proceso de corrosión, ya que cuando el titanio entra en contacto con un medio fluorado se forman una serie de cavidades como resultado de la disolución, que las convierte en reservorios de bacterias, las cuales quedan protegidas de la acción antibacteriana de los productos utilizados para la higiene bucal (100) (101). En nuestro estudio la disminución del porcentaje de bacterias adheridas a la superficie del material, obtenida para la capa barrera con flúor (FBL), comparándola con CP, BL, NP y NT, demuestran que es correcta la hipótesis planteada en relación a la existencia de actividad bacteriana del flúor al estar presente en la superficie de biomateriales de Ti-6Al-4V. Puesto que la capa barrera con flúor (FBL) está caracterizada por contener flúor en la superficie del material, sin existir estructuras de nanoporos ni nanotubos, pero presentando un incremento de rugosidad y disminución del ángulo de contacto, los resultados señalan al flúor como el responsable de esa disminución de la adherencia bacteriana. Corroborándose así los resultados

obtenidos por Yoshinari y cols (8), que estudiaron la influencia de diferentes sustancias antibacterianas en superficies de titanio, obteniendo únicamente actividad antibacteriana en los implantes que contenían flúor. Estudios *in vitro* (9) (79) (102) (103) (80), atribuyen al flúor un efecto positivo en la biocompatibilidad, traducándose en un incremento de la proliferación de líneas celulares. En la misma línea, estudios *in vivo* (80, 104) sugieren que las modificaciones en la superficie de materiales de titanio, originadas por la presencia de flúor, incrementan el proceso de osteointegración

La presencia de nanoporos en la superficie del material podría ser una de las causas de la diferencia de porcentaje de bacterias adheridas en la superficie al comparar los resultados de adherencia bacteriana en la capa barrera de flúor (FBL) con la obtenida para los materiales con nanoestructuras que contienen flúor (NP y NT). En esta línea hay trabajos como los de Merritt y cols. (105) que concluyeron que la presencia de estructuras porosas se relacionaba con una mayor tasa de infección. Otros estudios (97) (99) concluyen del mismo modo, que la presencia de estructuras porosas son focos de colonización bacteriana, donde la bacteria quedaría protegida de la actuación de los sistemas de defensa. Sin embargo, una de las principales diferencias entre el trabajo Meritt y col (105) y el nuestro, hace referencia a los diámetros de poro. Mientras que ellos trabajan con tamaños de poro alrededor de 100  $\mu\text{m}$ , la longitud de nuestros nanoporos es de 10 a 100 nm. Considerando que el tamaño de las bacterias estudiadas se encuentra entre 1 a 2  $\mu\text{m}$ , la presencia de nanoporos en nuestros materiales no supondría un foco de colonización bacteriana, puesto que las bacterias no penetrarían en ellos. Sin embargo este incremento de rugosidad en la superficie puede resultar interesante, como demostraron Truong y cols(94), An y cols. (42) al estudiar la influencia de cambios en la morfología de la superficie y su influencia en la adherencia bacteriana, concluyendo que el incremento de rugosidad se relacionaba con una mayor adherencia de proteínas, y por la tanto una disminución en la adherencia bacteriana a la superficie. Otros estudios avalan estos resultados, como el llevado a cabo por Kinnari y cols (106) en el que estudiaron la adherencia bacteriana a superficies de titanio con una cubierta de albúmina, concluyendo que un incremento de la rugosidad y de la energía de superficie permite una mayor absorción de proteínas en la superficie, traducándose en una disminución de la adherencia bacteriana. La carrera hacia la superficie (“race for the surface”) descrita por Gristina (84) explicaría los resultados en los trabajos anteriormente mencionados (94) (106) (42): una carrera en la que participan las células

del huésped, para una integración celular, y las células bacterianas, para una colonización bacteriana (84). Esta teoría explicaría la colonización bacteriana de la superficie del biomaterial, al verse alterado el sistema de defensa al implantarse un biomaterial, por lo que las células del huésped no ganarían la carrera.

Siguiendo estas conclusiones, se podrían explicar los resultados obtenidos en los experimentos de formación de biopelículas sobre los diferentes materiales (CP NP NT y FBL), para los que se utilizó un medio que contenía suero bovino fetal, a diferencia de los estudios de adherencia bacteriana. Al comparar la acumulación de biopelícula en los diferentes materiales (CP NP NT y FBL), se observó que los materiales con nanoestructuras que contienen flúor (NP y NT), presentaban una disminución en la acumulación de biopelícula, al comparar con el pulido químico (CP) y la capa barrera con flúor (FBL). Una disminución que sólo presentó diferencias estadísticamente significativas para *S. epidermidis* y *E. coli*. La presencia de nanoporos (NP) y nanotubos (NT) en la superficie del material, podrían haber originado una mayor absorción de proteínas en la superficie al aumentar la rugosidad, provocando una disminución de las bacterias adheridas y, por tanto, alterando la formación de la biopelícula, traduciéndose en una disminución en la acumulación de biopelícula en dichas superficies. De esta manera se explicaría la diferencia de resultados obtenidos en los estudios de adherencia bacteriana, donde FBL presentaba la mayor disminución de la adherencia bacteriana y los resultados de formación de la biopelícula, donde las nanoestructuras presentaban una menor acumulación de biopelícula.

*S. aureus* y *S. epidermidis* representan el principal agente etiológico en infecciones de prótesis osteoarticulares(21, 84) (107) (108). La capacidad para adherirse a la superficie del material y para formar biopelículas, son sus principales factores de virulencia relacionados con las infecciones de prótesis osteoarticulares (29). El uso de cepas clínicas y cepas de laboratorio de estas especies en los estudios de adhesión bacteriana, nos permite confirmar que existe una variabilidad bacteriana interespecie en la adhesión a las superficies estudiadas, como muestran nuestros resultados. La mayoría de los trabajos en el campo de la adherencia bacteriana a materiales se realizan con cepas colección (109), cepas con unas características conocidas y completamente adaptadas a la vida en el laboratorio. El uso de cepas clínicas, aisladas de pacientes con infección de prótesis osteoarticular, en este caso caracterizadas genéticamente, es la

principal diferencia con el resto de estudios que aparecen en la literatura, como hemos comentado anteriormente al hacer referencia a los resultados obtenidos por Puckett y cols. (96)

*E. coli* y *P. aeruginosa* suponen la tercera y cuarta causa, respectivamente, de infecciones de prótesis osteoarticulares (84). Sin embargo, las infecciones por *C. albicans* son muy raras. La realización del estudio de formación de biopelículas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* sobre los diferentes materiales (CP, NP, NT y FBL), nos ha permitido conocer el comportamiento de microorganismos, con características estructurales y morfológicas totalmente distintas. Puesto que los resultados de formación de la biopelícula han demostrado comportamientos similares tanto para grampositivos (*S. epidermidis*), como para gramnegativos (*E. coli*), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas para hongos levaduriformes como *C. albicans*. De los resultados obtenidos podemos deducir que la influencia de nanoestructuras con flúor, afectaría del mismo tanto a bacterias grampositivas como a gramnegativas.



## CONCLUSIONES

---

1. Los materiales de Ti-6Al-4V anodizados con flúor (NT, NP y FBL) presentan una disminución en la adherencia bacteriana, tanto para las cepas colección como para las cepas clínicas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.
2. La disminución de la adherencia bacteriana para los materiales de Ti-6Al-4V modificados parece deberse a la acción antibacteriana del flúor, y no a los cambios morfológicos de la superficie.
3. La capa barrera de flúor (FBL) presenta una menor adherencia respecto a los materiales modificados (NP y NT) y los materiales no modificados (CP y BL).
4. La adherencia bacteriana disminuye drásticamente para las cepas de ambas especies, *S. aureus* y *S. epidermidis*, en el material FBL.
5. Las cepas de colección y cepas clínicas de *S. aureus* presentan una menor adherencia bacteriana para los materiales modificados con flúor (NP, NT y FBL), en comparación con las cepas de *S. epidermidis*.
6. En cuanto a los materiales que presentan nanoestructuras, el material con nanoporos presenta una menor adherencia bacteriana tanto para las cepas de colección como clínicas de ambas especies, al ser comparados estos materiales con CP.
7. La presencia de nanoporos en la superficie de discos de Ti-6Al-4V anodizados con flúor disminuye la acumulación global de biopelícula en dicha superficie, tanto en bacterias grampositivas (*S. epidermidis*) como gramnegativas (*E. coli*), al compararse con CP.

## ACRÓNIMOS

---

**IPA:** Infecciones asociadas a prótesis osteoarticulares.

**BGN:** bacilos gramnegativos.

**SCN:** estafilococos coagulasa negativos.

**SCV:** small colony variants. Variantes de colonia pequeña.

**PS/A:** Adhesina rica en galactosa de la cápsula polisacárida compuesta de  $\beta$ -1,6 enlazada a N-acetil glucosamina

**SAA:** Antígeno asociado a slime compuesto de N-acetilglucosamina

**PIA:** Polisacárido compuesto de N-acetil glucosamina con residuos desacetilados

**AAP:** Acumulación asociada a proteínas

**Ra:** Rugosidad

**CP:** Pulido químico

**BL:** Capa barrera

**NP:** Nanoporos

**NT:** Nanotubular

**FBL:** Capa barrera fluorada

**RDR:** Rotating Disk Reactor

**SDB:** Caldo Sabouraud dextrosa

**SDA:** Agar Sabouraud dextrosa

**TSB:** Triptona soja

**PBS:** Tampón fosfato salino

## REFERENCIAS

---

1. Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med*. 2009 Aug 20;361(8):787-94.
2. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*. 2004 Apr 1;350(14):1422-9.
3. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(10):1466-77.
4. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007 Aug 16;357(7):654-63.
5. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. 2004 Dec 7;8:37-57.
6. Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Oct;91(1):470-80.
7. Rimondini L, Fini M, Giardino R. The microbial infection of biomaterials: A challenge for clinicians and researchers. A short review. *J Appl Biomater Biomech*. 2005 Jan-Apr;3(1):1-10.
8. Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. *Biomaterials*. 2001 Jul;22(14):2043-8.
9. Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok IJ, Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO<sub>2</sub> grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2007 Dec;28(36):5418-25.
10. Arenas MA CA, Damborenea JJ, Matykina E, Esteban, Moreno JM GoBE, Perez-Jorge Permarch C, Perez, R. T, inventors; *Materiales de Titanio anodizado con Flúor*. Spain. 2010.

11. Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR, et al. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2003 May;48(4):1075-87.
12. Esteban J, Gomez-Barrena E, Cordero J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Fernandez-Roblas R. Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection. *J Clin Microbiol*. 2008 Feb;46(2):488-92.
13. Esteban J, Molina-Manso D, Spiliopoulou I, Cordero-Ampuero J, Fernandez-Roblas R, Foka A, et al. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. *Acta Orthop*. Dec;81(6):674-9.
14. Kinnari TJ, Soininen A, Esteban J, Zamora N, Alakoski E, Kouri VP, et al. Adhesion of staphylococcal and Caco-2 cells on diamond-like carbon polymer hybrid coating. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Sep;86(3):760-8.
15. Kodama A, Bauer S, Komatsu A, Asoh H, Ono S, Schmuki P. Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO(2) nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite. *Acta Biomater*. 2009 Jul;5(6):2322-30.
16. Perez-Jorge C, Conde A, Arenas MA, Perez-Tanoira R, Matykina E, de Damborenea JJ, et al. In vitro assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO(2) nanotubes on Ti-6Al-4V alloy. *J Biomed Mater Res A*. Jul;100(7):1696-705.
17. Gomez-Barrena E, Padilla-Eguiluz NG, Garcia-Rey E, Cordero-Ampuero J, Garcia-Cimbrelo E. Factors influencing regional variability in the rate of total knee arthroplasty. *Knee*. Mar 22.
18. JM. Aguado JF. Guía de recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones asociadas a biomateriales. *Journal* [serial on the Internet]. 2006 Date: Available from:  
  
[http://www.seimc.org/documentos/guias/2006/Guia2\\_2006\\_Biomateriales.pdf](http://www.seimc.org/documentos/guias/2006/Guia2_2006_Biomateriales.pdf).

19. Fuller TA, Wysk RA, Charumani C, Kennett M, Sebastienelli WJ, Abrahams R, et al. Developing an engineered antimicrobial/prophylactic system using electrically activated bactericidal metals. *J Mater Sci Mater Med*. Jul;21(7):2103-14.
20. Aslam S, Darouiche RO. Prosthetic joint infections. *Curr Infect Dis Rep*. Oct;14(5):551-7.
21. Esposito S, Leone S. Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis, management and prevention. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Oct;32(4):287-93.
22. Mercedes Marín JE, María Antonia , Meseguer MS-S. Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. [revisión]. 2010;28:534-40.
23. Popat KC, Eltgroth M, Latempa TJ, Grimes CA, Desai TA. Decreased *Staphylococcus epidermidis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. *Biomaterials*. 2007 Nov;28(32):4880-8.
24. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*. 2004 Oct 14;351(16):1645-54.
25. Javier Ariza GE, Óscar Murillos. Infecciones relacionadas con las prótesis osteoarticulares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008;26:380-90.
26. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985 Dec;22(6):996-1006.
27. Gristina AG, Hobgood CD, Barth E, editors. Biomaterial specificity, molecular mechanism and clinical relevance of *S.epidermidis* and *S. aureus* infection surgery. Germany: Gustav Fisher Verlag; 1987.
28. RA B, Calhoun JH, Leid JG, ME S, editors. Infections of orthopaedic implants and devices. Berlin: Springer- Verlag; 2009.

29. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, et al. Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* Nov;6(11):1329-49.
30. Esteban J, Alonso-Rodriguez N, del-Prado G, Ortiz-Perez A, Molina-Manso D, Cordero-Ampuero J, et al. PCR-hybridization after sonication improves diagnosis of implant-related infection. *Acta Orthop.* Jun;83(3):299-304.
31. Maria Carolina Isea Peña JE. Infección protésica subclínica asociada a Staphylococcus aureus variante de colonia pequeña(SCV). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2010;486.
32. von Eiff C. Staphylococcus aureus small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Jun;31(6):507-10.
33. Sendi P, Frei R, Maurer TB, Trampuz A, Zimmerli W, Graber P. Escherichia coli variants in periprosthetic joint infection: diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication. *J Clin Microbiol.* May;48(5):1720-5.
34. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis.* 2006 Oct 15;43(8):961-7.
35. von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury.* 2006 May;37 Suppl 2:S26-33.
36. Molina-Manso D, del Prado G, Ortiz-Perez A, Manrubia-Cobo M, Gomez-Barrena E, Cordero-Ampuero J, et al. In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *Int J Antimicrob Agents.* Jun;41(6):521-3.
37. Emilia Cercenado JG, José Ramón Aranza y cols. Update on bacterial pathogens:virulence and resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2008;26.

38. Brouqui P, Rousseau MC, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa*-infected orthopedic prostheses with ceftazidime-ciprofloxacin antibiotic combination. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Nov;39(11):2423-5.
39. El Helou OC, Berbari EF, Marculescu CE, El Atrouni WI, Razonable RR, Steckelberg JM, et al. Outcome of enterococcal prosthetic joint infection: is combination systemic therapy superior to monotherapy? *Clin Infect Dis.* 2008 Oct 1;47(7):903-9.
40. Perez-Jorge C, Valdazo M, Blanco J, J E. *Mycobacterium tuberculosis* disease as cause of therapeutic failure in prosthetic joint infections. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2013.
41. Busscher HJ, van der Mei HC. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog.* Jan;8(1):e1002440.
42. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998 Fall;43(3):338-48.
43. Dunne WM, Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):155-66.
44. Vacheethasanee K, Temenoff JS, Higashi JM, Gary A, Anderson JM, Bayston R, et al. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. *J Biomed Mater Res.* 1998 Dec 5;42(3):425-32.
45. Hogt AH, Dankert J, Feijen J. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J Gen Microbiol.* 1985 Sep;131(9):2485-91.
46. Vaudaux PE, Waldvogel FA, Morgenthaler JJ, Nydegger UE. Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of *Staphylococcus aureus* adherence. *Infect Immun.* 1984 Sep;45(3):768-74.

47. Dickinson RB, Nagel JA, Proctor RA, Cooper SL. Quantitative comparison of shear-dependent *Staphylococcus aureus* adhesion to three polyurethane ionomer analogs with distinct surface properties. *J Biomed Mater Res.* 1997 Aug;36(2):152-62.
48. Baumgartner JN, Cooper SL. Influence of thrombus components in mediating *Staphylococcus aureus* adhesion to polyurethane surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998 Jun 15;40(4):660-70.
49. Chung KK, Schumacher JF, Sampson EM, Burne RA, Antonelli PJ, Brennan AB. Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Biointerphases.* 2007 Jun;2(2):89-94.
50. M.I. Sarró DAM, C. Ranninger, E. King and J. Ruiz,. Influence of gas nitriding of Ti6Al4V alloy at high temperature on the adhesion of *Staphylococcus aureus*. *Surface and Coatings Technology.* 2006;201:2807-12.
51. C.A.d.D.J. Arenas M.A. ME, Esteban J, Gomez-Barrena E, Perez-Jorge C, Perez, R T, inventors; **Materiales de titanio anodizado con fluor.** Spain. 2010.
52. Gristina AGHCDB, E. Pathogenesis and Clinical significance of Coagulase-negative *Staphylococci*. *Biomaterial specificity, molecular mechanisms and clinical relevance of *Sepidermidis* and *Saureus* infections in surgery:* Fisher Verlag; 1987. p. 15.
53. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1318-22.
54. Lauderdale KJ, Malone CL, Boles BR, Morcuende J, Horswill AR. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J Orthop Res.* Jan;28(1):55-61.
55. de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun.* 2000 Sep;68(9):4839-49.
56. Rebecca A.Brady JHC, Jeff G.Leid and Mark E. Shirtliff. *Infections of Orthopaedic Implants and Devices.* Costerton JW, editor. Los Angeles: Springer; 2008.
57. Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Jul;65(2):158-68.

58. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 2002 Jul;292(2):107-13.
59. Arboleya. CSyR, Masson. Barcelona. Monografias medico-quirurgicas del aparato locomotor. 2001 [updated 2001; cited]; Available from: <http://www.cirugiaarticular.com/protesis/cadera/>.
60. Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface.* 2008 Oct 6;5(27):1137-58.
61. Rochford ET, Richards RG, Moriarty TF. Influence of material on the development of device-associated infections. *Clin Microbiol Infect.* Dec;18(12):1162-7.
62. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, P T, editors. Titanium in medicine. Berlin: Springer; 2001.
63. Freese HL oM, Volas MG, Wood JR T. Titanium and titanium its alloys in biomedical engineering. In: Buschow KHJ CR, Flemings MC, IIScher B, Kramer EJ, Mahajan S, editor. *Encyclopedia of materials: Science and technology.* Oxford: Elsevier; 2001. p. 9374-80.
64. Glinel K, Thebault P, Humblot V, Pradier CM, Jouenne T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater.* May;8(5):1670-84.
65. Singh AV, Vyas V, Patil R, Sharma V, Scopelliti PE, Bongiorno G, et al. Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS One.* 6(9):e25029.
66. Machida M, Norimoto K KT. Antibacterial activity of photocatalytic titanium dioxide thin films with photodeposited silver on the surface of sanitary ware. *Journal american ceramic society.* 2005;88:95-100.
67. Perez-Tanoira R, Perez-Jorge C, Endrino JL, Gomez-Barrena E, Horwat D, Pierson JF, et al. Bacterial adhesion on biomedical surfaces covered by micrometric silver Islands. *J Biomed Mater Res A.* Jun;100(6):1521-8.

68. Chai LY WS, Peng B, Li ZY. Effect of thermal treating temperature on characteristics of silver-doped titania. Transactions of nonferrous metals society of china. 2008;18:980-5.
69. Das K, Bose S, Bandyopadhyay A, Karandikar B, Gibbins BL. Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008 Nov;87(2):455-60.
70. Periyat P, Pillai SC, McCormack DE, Colreavy J, SJ H. Improved high - temperature stability and sun-light-driven photocatalytic activity of sulfur.doped anatase TiO<sub>2</sub>. The Journal of Physical Chemistry C. 2008;112:7644-52.
71. Heidenau F, Mittelmeier W, Detsch R, Haenle M, Stenzel F, Ziegler G, et al. A novel antibacterial titania coating: metal ion toxicity and in vitro surface colonization. J Mater Sci Mater Med. 2005 Oct;16(10):883-8.
72. Petrini P, Arciola CR, Pezzali I, Bozzini S, Montanaro L, Tanzi MC, et al. Antibacterial activity of zinc modified titanium oxide surface. Int J Artif Organs. 2006 Apr;29(4):434-42.
73. Nurhaerani, Arita K, Shinonaga Y, Nishino M. Plasma-based fluorine ion implantation into dental materials for inhibition of bacterial adhesion. Dent Mater J. 2006 Dec;25(4):684-92.
74. Arenas MA, Perez-Jorge C, Conde A, Matykina E, Hernandez-Lopez JM, Perez-Tanoira R, et al. Doped TiO<sub>2</sub> anodic layers of enhanced antibacterial properties. Colloids Surf B Biointerfaces. May 1;105:106-12.
75. C.P.-J. Peremarch RPT, M.A. Arenas, E. Matykina, A. Conde, J.J.D. Damborenea,, Esteban EGBaJ. Bacterial adherence to anodized titanium alloy. Journal of Physics: Conference Series. 2010;252.
76. Sutton SV, Bender GR, Marquis RE. Fluoride inhibition of proton-translocating ATPases of oral bacteria. Infect Immun. 1987 Nov;55(11):2597-603.

77. Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006 Mar-Apr;21(2):203-11.
78. JE. E. Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1995;6:749–53.
79. Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO<sub>2</sub> grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials*. 2006 Feb;27(6):926-36.
80. Monjo M, Lamolle SF, Lyngstadaas SP, Ronold HJ, Ellingsen JE. In vivo expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants. *Biomaterials*. 2008 Oct;29(28):3771-80.
81. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Ayala G, Fernandez-Roblas R, Gadea I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol*. 2008;8:184.
82. Materials ASffTa. Standard test method for quantification of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm grown with medium shear and continuous flow using rotating disk reactor. *Journal [serial on the Internet]*. 2012 Date: Available from: <http://www.astm.org/Standards/E2196.htm>.
83. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*. 2001 Mar 1;44(2):121-9.
84. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*. 1987 Sep 25;237(4822):1588-95.
85. Bozic KJ, Ries MD. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Aug;87(8):1746-51.
86. Patel JD, Ebert M, Ward R, Anderson JM. S. epidermidis biofilm formation: effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Mar 1;80(3):742-51.

87. Harris LG, Meredith DO, Eschbach L, Richards RG. Staphylococcus aureus adhesion to standard micro-rough and electropolished implant materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Jun;18(6):1151-6.
88. Hosoya N, Honda K, Iino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of Streptococcus mutans to enamel after vital bleaching. *J Dent*. 2003 Nov;31(8):543-8.
89. Song YY, Schmidt-Stein F, Bauer S, Schmuki P. Amphiphilic TiO<sub>2</sub> nanotube arrays: an actively controllable drug delivery system. *J Am Chem Soc*. 2009 Apr 1;131(12):4230-2.
90. Shrestha NK, Macak JM, Schmidt-Stein F, Hahn R, Mierke CT, Fabry B, et al. Magnetically guided titania nanotubes for site-selective photocatalysis and drug release. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(5):969-72.
91. Brohede U, Forsgren J, Roos S, Mihranyan A, Engqvist H, Stromme M. Multifunctional implant coatings providing possibilities for fast antibiotics loading with subsequent slow release. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Sep;20(9):1859-67.
92. Rizzello L, Sorce B, Sabella S, Vecchio G, Galeone A, Brunetti V, et al. Impact of nanoscale topography on genomics and proteomics of adherent bacteria. *ACS Nano*. Mar 22;5(3):1865-76.
93. Scopelliti PE, Borgonovo A, Indrieri M, Giorgetti L, Bongiorno G, Carbone R, et al. The effect of surface nanometre-scale morphology on protein adsorption. *PLoS One*. 5(7):e11862.
94. Truong VK, Lapovok R, Estrin YS, Rundell S, Wang JY, Fluke CJ, et al. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials*. May;31(13):3674-83.
95. Whitehead KA, Colligon J, Verran J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005 Mar 25;41(2-3):129-38.

96. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*. Feb;31(4):706-13.
97. Correa CB, Pires JR, Fernandes-Filho RB, Sartori R, Vaz LG. Fatigue and fluoride corrosion on *Streptococcus mutans* adherence to titanium-based implant/component surfaces. *J Prosthodont*. 2009 Jul;18(5):382-7.
98. Schiff N, Grosgeat B, Lissac M, Dalard F. Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys. *Biomaterials*. 2002 May;23(9):1995-2002.
99. Sartori R, Correa CB, Marcantonio E, Jr., Vaz LG. Influence of a fluoridated medium with different pHs on commercially pure titanium-based implants. *J Prosthodont*. 2009 Feb;18(2):130-4.
100. Tatsumi NOGUCHI ST, Masayuki HATTORI, Masao YOSHINARI, Eiji KAWADA and, ODA Y. Discoloration and Dissolution of Titanium and Titanium Alloys with Immersion in Peroxide- or Fluoride-containing Solutions. *Dental Materials Journal*. 2008 27:117–23.
101. Reclaru L, Meyer JM. Effects of fluorides on titanium and other dental alloys in dentistry. *Biomaterials*. 1998 Jan-Feb;19(1-3):85-92.
102. Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(5):736-42.
103. Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Dec;16(6):650-6.
104. Lamolle SF, Monjo M, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haugen HJ. Titanium implant surface modification by cathodic reduction in hydrofluoric acid: surface characterization and in vivo performance. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Mar 1;88(3):581-8.

105. Merritt K, Shafer JW, Brown SA. Implant site infection rates with porous and dense materials. *J Biomed Mater Res.* 1979 Jan;13(1):101-8.
106. Kinnari TJ, Peltonen LI, Kuusela P, Kivilahti J, Kononen M, Jero J. Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin. *Otol Neurotol.* 2005 May;26(3):380-4.
107. Barth E, Myrvik QM, Wagner W, Gristina AG. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials.* 1989 Jul;10(5):325-8.
108. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis.* 1994 Aug;19(2):231-43; quiz 44-5.
109. JW. C. The biofilm primer. In: Springer Series on Biofilms. Berlin: Springer-Verlag; 2007. p 1–195. Berlin: Springer-Verlag; 2007.



## **ARTÍCULOS PUBLICADOS**

---