

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FACULTAD
DE MEDICINA
Y ENFERMERÍA

MEDIKUNTZA
ETA ERIZAINNTZA
FAKULTATEA

Departamento de Inmunología,
Microbiología y Parasitología

Immunologia, Mikrobiologia eta
Parasitologia Saila

ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS MICROBIANAS SOBRE BIOMATERIALES

Tesis doctoral

Iker de la Pinta Aresti

Leioa, 2019

Agradecimientos

La realización de este trabajo de Tesis de doctorado ha sido posible gracias a la beca predoctoral ZabaldUz en colaboración con empresa (Leartiker) otorgada por la Universidad del País Vasco, a los proyectos de investigación como Grupo de Investigación Consolidado del Sistema Universitario Vasco (GIC 15/78 IT-990-16 y GIC12 210-IT-696-13) «Candidiasis y otras infecciones humanas asociadas a biopelículas microbianas» (Consejería de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco-Eusko Jaularitza), a la Unidad de formación e investigación multidisciplinar sobre enfermedades microbianas para la promoción de una vida y un envejecimiento saludables, «Microbios y salud», UFI 11/25 (Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea) así como al Ministerio de Economía y competitividad mediante por la financiación para el proyecto «Importancia de las adhesinas de *Candida glabrata* en la interacción huésped-patógeno, desarrollo de candidiasis y de nuevas terapias antifúngicas» (SAF2013-47570-P). Especialmente agradezco al Gobierno Vasco por todas las becas y ayudas otorgadas, directa o indirectamente, desde el instituto, pasando por la carrera y el máster, hasta el presente doctorado.

El destino quiso que acabara en este departamento. Por ello, en primer lugar tengo que agradecer a la secretaria que no me dejó modificar la automatrícula en la carrera, porque si no hubiera tardado ese año extra, el máster de microbiología no existiría. Incluso debería agradecer los problemillas del máster que me obligaron a retrasarme otro año más, porque si no es por ello no habría entrado en el grupo de Candidiasis y no habría coincidido con la beca ZabaldUz que me otorgaron durante tres años para realizar mi tesis doctoral en colaboración con empresa, concretamente Leartiker y Cikautxo a quienes agradezco también su colaboración en el desarrollo de esta tesis doctoral. Ciertamente, mi camino durante la tesis tampoco estuvo muy lubricado y se ha demorado más de lo aconsejable, de hecho en este punto no estoy seguro de si debiera agradecer a Bizkaibus por los 15 años de servicio prestados viniendo a la universidad, o si Bizkaibus debería agradecerme a mí por haber sido uno de los mayores inversores que han mantenido a flote la empresa en los últimos años. Sin embargo, lo que a veces parecen malas noticias te abren nuevos e interesantes caminos; al final todo ha salido bien y se ha podido llegar hasta aquí.

Quiero agradecer sinceramente a mi director de tesis y de departamento, Guillermo Quindós por permitirme ser parte de este grupo de trabajo, por el tiempo que me ha dedicado, por lo que me ha enseñado, en especial en la parte escrita, y por el trato y los ánimos que siempre me ha ofrecido. Y del mismo modo a mi otra directora de tesis, Teresa Guraya, porque siempre ha estado dispuesta a ayudarme en todo lo que ha estado en su mano, me ha dado buenos consejos y estoy seguro de que si la tesis se hubiera movido en su campo habría tenido que agradecer muchísimo más.

Me gustaría dar las gracias especialmente a Elena Eraso que siempre ha revisado todos mis escritos a lo largo de estos años y ha procurado que no nos faltara nada en el laboratorio, y a Estibaliz Mateo por ser tan proactiva, por interesarse en que mejorara mi carrera investigadora y por ayudarme a mí y a todo el que lo necesitara. También agradezco toda la ayuda que me han prestado otros profesores o investigadores en el desarrollo de esta tesis como Julen Ibarretxe, Héctor Lafuente, Miren Zaldua, Elisabeth Montoya, Francisco José Álvarez, Piet de Groot, así como a Asier Egia que me ha ayudado con la escritura de la parte más odontológica, y a la sonriente y ya odontóloga Ane Arakistain con la que colaboré en la parte práctica de la misma.

Han sido muchos años en este departamento y he visto pasar a muchos investigadores, por ello la extensión de estos agradecimientos va a ser mayor de la habitual, porque me gustaría darles las gracias como se merecen, empezando por Cristina, una compañera artística y la única doctora cuando yo llegué al laboratorio. De ella he heredado su “despacho” y ahora entiendo ese hincapié en que se llame a la puerta para evitar no morir de un microinfarto a veces. Luego están los primeros predoctors que conocí (ya doctores todos). Gracias Aketza por esas quedadas que te sacabas de la manga con chupitos de piruleta y por integrar a todos los que pasaban por el laboratorio. Gracias Sandra por las amenas discusiones durante las comidas (cuando me quedaba) y por haber sido una buena compañera, aún siento haberte tirado la torre de placas de CLSI con el papel albal aquel día. Otra doctora que, por antonomasia, es la reina de las comidas es Inés, eso ha sonado fatal, pero me hacía ilusión escribir “antonomasia”. Quiero decir que fue graciosísimo compartir mesa con ella y escuchar cómo despotricaba contra la homeopatía. Y me dejo la estrella para el final, el doctor gusano en jefe, Marcelo Ortega, mi sensei en el TFM y un buen amigo fuera del laboratorio. Gran parte de lo bien que me lo he pasado en la tesis fue porque él estaba ahí, y si bien desde que dejó Chile algunas cosas le han fluido mal, estoy seguro que al final superará todos los obstáculos y conseguirá lo que se merece, que es mucho. Además yo estaré ahí para verlo y celebrarlo con unos completos y unas cañas. ¡Gracias Martxelo!

Al año siguiente se desbloquearon dos nuevos personajes. Ambos han sido muy eficientes y me han adelantado en la carrera del doctorado, y no les deseo ningún mal, pero ojalá cuando estén coloreando no tengan color carne y tengan que pintar con naranja en plan flojito. Gracias Camiguita por ayudarme siempre que lo he necesitado, lamento las celebraciones de tesis que nos ha faltado por compartir, *mea culpa*, espero en un futuro tener a una compi de trabajo como tú, tanto como persona como por lo profesional. Y, Juan Daniel, un tío elegante como buen donostiarra y a la vez mal de la cabeza, pero muy buena gente. Hiciste del labo un lugar más divertido y en tu boda me lo pasé genial también (o eso creo).

El siguiente pack de estudiantes que apareció el siguiente año y decidieron quedarse con nosotros fueron Ainara y Katherine. Dos personas VIP durante mi tesis y yo creo que las que más me han echado una mano. Así que Gracias Ainara por ser la heredera del equipo Gusano, por estar ahí siempre que lo he necesitado como cuando dejaste lo que estabas haciendo para llevarme en coche a una reunión que se me había olvidado que

tenía, y por alimentarme en los cafés con el contrabando que guardas debajo de la mesa. Sé que te da pena que termine y me marche, supongo que disteis ya por sentado que estaba ahí puesto por el ayuntamiento, pero así es el ciclo de la vida doctoril y el rector de la UPV me ha dicho que no va a reconocer el título de “doctorando emérito”, así está la cosa. Nos vemos en las quedadas que es lo bueno. Y a la “gran” Katherine, que cada vez que venía de Colombia se acordaba de mí y me traía algo rico, siempre dispuesta a ayudar cuando me dejaba (que es casi nunca) y que se apuntaba a todos los planes que salían. Gracias por todas esas cañas con Marcelo y Giulia durante todos estos años, y por acompañarme a Barcelona a hacer el examen de japonés, fue una gran aventura y lo he pasado muy bien.

Y ya que he nombrado a Giulia seguiré estos agradecimiento con el laboratorio de arriba, los de “*Shelbyville*”. Ya he mencionado a la doctora Inés, ahora también quiero agradecer a Pilar y a Marta por bajar tanto a integrarse con nosotros y por los buenos momentos que hemos compartido dentro del laboratorio y en las quedadas. También a Ander, que cuesta más que baje, pero hemos descubierto que si le ponemos un cebo de bizcocho aparece hasta en domingo jaja, pero se apunta a todas las salidas dando siempre buen ambiente y además se queda como un campeón hasta el final así que gracias. Y no me estoy olvidando de Giulia, italo-barakaldarra, una doctora con la que he compartido viajes cada día en el 26, congresos, fiestas y hasta academias. Aunque hubo un poco de tensión en Lisboa, eso no empaña lo bien que nos lo hemos pasado, en especial recuerdo ese día de fiestas en Basauri, gracias por invitarme a ir.

Los últimos doctorandos en llegar fueron el trío de la “i” (Irene, Iñigo, Iratxe) y Aitzol (siempre a su bola). Irene, mi nueva y última compi de autobús 26, eres una digna sucesora de chistes malos y me habría gustado compartir más generación doctoral contigo, pero ya no puedo estirarlo más. Sólo espero que protejas mi asiento del bus y lo dejes vacío en señal de profundo respeto. Con Iñigo e Iratxe he coincidido un poco menos porque no son de Baraka, están en otro labo, o pasando consulta, o bailando o levantando ruedas de camión (nunca adivinaríais quién hace qué)... las típicas excusas para no visitarme en mi OP18, pero siempre nos quedarán los cafés que son sagrados, gracias por vuestra alegría, por las risas y por haberme acompañado en esta etapa final...de doctorado. Y al foodlover de Aitzol le pronostico un buen futuro en el department, con su potencial sólo tiene que confiar en sí mismo y perseverar. Pírate de estancia, que hay que sacarle partido a tu profiency. Tienes mucho swag pero te recomiendo quitarte la gorra cuando

lleves bata, que pincha a los ojos. Te ha tocado el rol del loco-raro del laboratorio así que no faltes a las futuras excursiones del labo que el equipo te necesitará, y vete vestido de spiderman algún día para animar.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros del Máster de Microbiología porque han sido la mayoría muy importantes en mi vida. Con Nathalia lo que he compartido daría para escribir dos veces las páginas de esta tesis, así que no me meteré ahí y simplemente diré gracias por los libros de microbiología y por todo lo vivido. Me quedo con tu frase de *“lo último es lo que no se hace”*. Te deseo lo mejor y espero que encuentres la tranquilidad y felicidad que mereces. A mi amiga y compañera Itxaso, pues por acompañarme desde 2010 hasta el día de hoy en máster, tesis y ahora a una puerta de distancia ya como doctora y profesora sustituta, ahora nos alejaremos más, pero como minimísimo siempre nos quedará la reunión anual del máster y el propio grupo de whatsapp, que casi diez años después se mantiene activo, en gran parte debido a nuestro José, que siempre se está preocupando por todos y nos mantiene informados de las últimas noticias microbiológicas. José, gracias por tus visitas y tus consejos. Aunque es madrileño, no me puedo olvidar de Álvaro, otro colega de máster y quasi-barakaldarra, que hasta se atrevió a venir a jugar un partido con mis amigos y todo. Gracias por invitarme a tu boda, y siento mucho no haber podido ir a pesar de que me insististe, os deseo lo mejor. Ana es otro pilar vital del grupo que viene a las quedadas año tras año aún siendo madre de dos niñas (como pasa el tiempo) así que muchas gracias por estar ahí. Con Lina, Sara, Verónica y Cristina no he podido coincidir mucho desde el máster, pero espero que les vaya todo genial y coincidamos milagrosamente algún día.

Como soy un poco bromista, he desplazado aquí a un compañero de laboratorio para que piensen que me había olvidado de él. Pues no. Unai, una persona que sabe reírse de sí mismo, cosa que valoro en una persona, y aunque muchas veces esté de broma, se ve que piensa las cosas con justicia y sin dejarse influenciar. Es la salsilla del laboratorio, gracias por todos los cotilleos y por toda tu sabiduría expresada mediante frases de los Simpsons. No te metas en líos en tu estancia en USA.

Mónica, una persona muy especial para mí, le tengo que agradecer mucho, tanto en lo profesional como en lo personal. He recibido tanto de ella que un párrafo no le hará justicia. Compartimos todo juntos, desde artículos, series y risas hasta viajes lejanos y experiencias inolvidables que han hecho que estos años sean de los mejores de mi vida.

Gracias por estar conmigo en esas aventuras y espero haber podido devolverte algo de lo que me has dado.

Y en la base de todo siempre está la familia, gracias a mis padres Karmele y Manuel, porque durante todos mis estudios (y creo que coincidimos en que se me han alargado un poquito) siempre me han dado todo lo que he necesitado. Sin ellos metafóricamente y literalmente no estaría aquí. Gracias también a mi hermano mayor Oscar y a mi mellito Imanol, que son las personas con las que mejor me entiendo en el mundo, tenemos gustos muy parecidos y han mejorado mi calidad de vida en un 200%, pero nunca lo sabrán porque no les diré ni que este párrafo existe.

Finalmente hay muchas personas a las que quiero mencionar, pero como esto es una tesis doctoral y no una biografía simplemente las nombraré: A profesores del máster y compañeros de equipo/departamento como Nerea, Ezpeleta, Lola, Elena Sevillano, Miren Basaras, Elixabete, Ágeda, Adelaida, Rosario, Alicia Muela, Carmen Amurrio, Esther Tamayo, Andrea Guridi, Ana Abad, Maite Orruño o Arantxa (doctora que ya no está) que junto con los mencionados han generado un gran ambiente de trabajo. Al servicio de Microscopía (el tridente "Ricardo-Alex-Irene"). A las personas que han pasado momentáneamente por el laboratorio, en especial Marta, Desiré, Nerea, Lucia, Andrea, Izaguirre, Eduardo, Ana y Done. A peñita de ciencias con los que he podido hablar como el gran Xabi. A mi compañero de bioquímica Aritz, y no me olvidaré de Jon, Álvaro de Vitoria, Abel, David y José, a saber qué es de sus vidas. El 99% de la tesis se la quiero agradecer de corazón al Power Ranger rosa, el más infravalorado de los powerrangers, sin él esto no hubiera sido posible. A mi profesor del colegio Pablo Robles, mi profesora de biología Esperanza Palacios, y como no me cobran por palabras, hasta a mi profesor de filosofía Iñaki Bilbao. Siempre te dejas a alguien de agradecer, pero si estás leyendo esto y no te he agradecido, pues a ti también gracias.

«Asante sana Squash banana, wewe nugu mimi hapana»

- Rafiki

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Biopelícula	3
1.2. Matriz extracelular	7
1.2.1. Polisacáridos.....	8
1.2.2. Proteínas	8
1.2.3. ADN	9
1.2.4. Interacciones en la matriz	9
1.3. Relevancia de las biopelículas	11
1.3.1. Bioincrustación.....	12
1.3.2. Infecciones asociadas a los cuidados de la salud	14
1.4. Enfermedades asociadas con biopelículas.....	14
1.4.1. Fibrosis quística	15
1.4.2. Rinosinusitis crónica.....	16
1.4.3. Otitis media crónica	17
1.4.4. Infección crónica de heridas	18
1.4.5. Infección de válvula cardíaca nativa.....	18
1.4.6. Prostatitis infecciosa	20
1.4.7. Vaginosis.....	21
1.5. Infecciones asociadas a biopelículas en dispositivos biomédicos.....	21
1.5.1. Infección asociada a prótesis articular	22
1.5.2. Infección asociada a implantes dentales.....	23
1.5.3. Infección asociada a catéter.....	24
1.5.4. Infección asociada a sonda urinaria	25
1.5.5. Infección asociada a la ventilación mecánica.....	26
1.5.6. Endocarditis infecciosa asociada a prótesis valvular cardíaca	27
1.6. Microorganismos causantes de infecciones asociadas a los cuidados sanitarios.....	28
1.6.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	30
1.6.2. <i>Escherichia coli</i>	36
1.6.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
1.6.4. <i>Candida albicans</i>	46
1.7. Propiedades de los biomateriales	49
1.7.1. Rugosidad superficial	50
1.7.2. Hidrofobicidad.....	56

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.1. Microorganismos.....	65
3.1.1. Cepas de colección y aislamientos clínicos	65
3.1.2. Mantenimiento de las cepas e inóculo	66
3.2. Reactor para estudio de biopelículas <i>CDC Biofilm Reactor</i> (CBR)	66
3.2.1. CBR sin flujo de nutrientes	67
3.2.2. CBR con flujo continuo de nutrientes	68
3.3. Biomateriales y limpieza de discos.....	68
3.4. Estudio de la rugosidad de los materiales.....	69
3.5. Estudio de la hidrofobicidad de los materiales	71
3.6. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular	73
3.7. Análisis de la biopelícula mediante el CBR.....	74
3.7.1. Efecto de la topografía superficial con discos de poliuretano	74
3.7.2. Efecto de la hidrofobicidad en la formación de biopelícula.....	74
3.7.3. Influencia del medio de cultivo en la formación de biopelícula por <i>Candida albicans</i>	75
3.7.4. Inhibición del crecimiento en biopelícula preformada	77
3.7.5. Análisis in vitro de la adherencia de <i>Candida albicans</i> a diferentes materiales empleados en prótesis dental	79
3.8. Cuantificación de las células viables en el CBR	81
3.9. Análisis estadístico de los datos	83
4. RESULTADOS	85
4.1. Puesta a punto del CBR	87
4.1.1. Desprendimiento y recuento de la biopelícula	87
4.1.2. Adhesión, crecimiento y formación de biopelícula por <i>Staphylococcus aureus</i>	89
4.1.3. Formación de biopelícula de <i>Staphylococcus aureus</i> aplicando un flujo continuo al reactor	90
4.2. Efecto de la rugosidad en la formación de biopelícula	92
4.2.1. Caracterización de la rugosidad superficial e hidrofobicidad de los discos de poliuretano	92
4.2.2. Biopelícula formada por <i>Staphylococcus epidermidis</i> en discos de poliuretano	95
4.3. Efecto de la hidrofobicidad en la formación de biopelícula.....	98
4.3.1. Caracterización de la rugosidad superficial e hidrofobicidad de los seis biomateriales empleados	98

4.3.2. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular microbiana mediante el test de adherencia a N-hexadecano	101
4.3.3. Formación de biopelícula en los biomateriales estudiados	102
4.4. Estudio de la influencia del medio de cultivo en la formación de biopelícula.....	107
4.4.1. Ensayo en placas de microtitulación de poliestireno.....	107
4.4.2. Estudio del desarrollo de biopelículas en el CBR	112
4.5. Inhibición del crecimiento en la biopelícula preformada	114
4.6. Análisis in vitro de la adherencia de <i>Candida albicans</i> a diferentes biomateriales de prótesis dental.....	121
5. DISCUSIÓN.....	123
6. CONCLUSIONES.....	147
7. BIBLIOGRAFÍA	151
8. ANEXO.....	181
EFFECT OF BIOMATERIALS HYDROPHOBICITY AND ROUGHNESS ON BIOFILM DEVELOPMENT	185
<i>CANDIDA ALBICANS</i> BIOFILMS ON DIFFERENT MATERIALS FOR MANUFACTURING IMPLANT ABUTMENTS AND PROSTHESES	209

Abreviaturas

3-oxo-C12 HSL	3-oxo-dodecanoil homoserina lactona
Mp65	Manoproteína de 65 Kda
AAF	Fimbria de adherencia agregativa (<i>Aggregative Adhesion Fimbria</i>)
ADNe	ADN genómico extracelular
AFM	Microscopía de fuerza atómica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
Ag43	Antígeno 43
ALS	Agglutinin-like sequence
Agr	Sistema regulador de genes accesorio (<i>Accessory Gene Regulatory</i>)
AHL	Acilhomoserina lactonas
AI	Autoinductores
AIP	Péptido autoinductor (<i>Auto-Induced Peptide</i>)
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (<i>American Society for Testing and Materials</i>)
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
BRC	Bacteriemias Relacionadas con Catéteres
BAP	Proteínas asociadas a biopelículas (<i>Biofilm Associated Protein</i>)
BHI	Infusión Cerebro-Corazón (<i>Brain Heart Infusion</i>)
C4 HSL	Butiril homoserina lactona
c-di-GMP	Diguanosina monofosfato cíclica
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
Csh1	<i>Cell surface hydrophobicity-associated protein 1</i>
Co-Cr	Cromo-cobalto
CV	Cristal violeta
CVC	Catéter venoso central
EA2	Diésteres de furanosil borato
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregante (<i>Enterocoaggregative Escherichia coli</i>)
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)

ECIS	Impedancia microbiológica (<i>Electric Cell-substrate Impedance Sensing</i>)
EIVP	Endocarditis infecciosa sobre válvula protésica
Eap1	Enhanced adherence to polystyrene 1
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>)
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares (<i>Extracellular Polymeric Substance</i>)
EPINE	Estudio de la Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España
ENVIN	Estudio Nacional de Vigilancia de la Infección Nosocomial
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GPI	Glicofosfatidilinositol
Hwp1	Proteína 1 de la pared de la hifa (<i>Hyphal wall protein 1</i>)
IACS	Infecciones asociadas a los cuidados de la salud
IHF	Factor de integración al huésped
ISQ	Infecciones de sitio quirúrgico
LPS	Lipopolisacárido
LS2	Disilicato de litio
LSCM	Microscopía confocal (<i>Laser Scanning Confocal Microscopy</i>)
MATH	Ensayo de adhesión microbiana a hidrocarburos (<i>Microbial adhesion to hydrocarbons</i>)
LPXTG	Motivo Leu-Pro-X-Thr-Gly
MSCRAMM	Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>)
NAVM	Neumonías Asociadas a Ventilación Mecánica
NCPF	Colección Nacional Británica de Hongos Patógenos (<i>National Collection of Pathogenic Fungi</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCA	Agar para contaje de placas (<i>Plate Count Agar</i>)
PEEK	Polieteretercetona
PET	Polietileno tereftalato
Pra1	Antígeno 1 regulado por pH (<i>pH-regulated antigen 1</i>)
PIA	Adhesina polisacárida intercelular (<i>Polysaccharide Intercellular Adhesin</i>)

PICC	Catéteres centrales de inserción periférica (<i>Peripherally inserted central catheter</i>)
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares (<i>Polymorphonuclear neutrophils</i>)
PNAG	Poli-N-acetil glucosamina
PSI	Interferometría de cambio de fase (<i>Phase Shifting Interferometry</i>)
PSM	Modulinas solubles en fenol (Phenol-soluble modulins)
PTFE	Teflon (<i>politetrafluoroetileno</i>)
QS	<i>Quorum Sensing</i>
Rbt1	Gen represado por TUP1 (<i>Repressed By TUP1</i>)
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SDA	Agar glucosado de Sabouraud (<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>)
SEC3	Enterotoxina C3 (<i>Staphylococcal Enterotoxin type C</i>)
SEIL	Toxina similar a enterotoxina L (<i>Staphylococcal Enterotoxin-like toxin L</i>)
SEMICYUC	Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias
SiC	Carburo de silicio
SLM	Fundido selectivo por láser (<i>Selective laser melting</i>)
XTT	Sal de tetrazolio
Ti	Titanio puro de grado II
TIVAP	Puertos de acceso venoso implantados (Totally Implantable Venous Access Ports)
TNF	Factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor)
TSB	Caldo de soja tripticaseína (Tryptic Soy Broth)
VBNC	Viable pero no cultivable
Ywp1	<i>Yeast wall protein 1</i>
YEPD	Caldo extracto de levadura peptona glucosa (<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>)
Zr	Zirconio estabilizado con itrio

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biopelícula

Los microorganismos, lejos de vivir aislados en la naturaleza, se encuentran en estrecha asociación entre ellos y con las superficies e interfaces bióticas y abióticas en forma de agregados multicelulares comúnmente denominados biofilms o biopelículas.

Estas biopelículas son conglomerados estructurados de microorganismos que están embebidos en una matriz extracelular polimérica que ellos mismos producen y que está compuesta por polisacáridos, proteínas y ADN. Es posible encontrar tanto biopelículas formadas por una sola especie o monomicrobianas, como biopelículas formadas por una mezcla de microorganismos o mixtas (1).

Las células microbianas adheridas o presentes en esa matriz polimérica son conocidas como células sésiles, mientras que las células liberadas o suspendidas en el medio acuoso son denominadas células planctónicas. Ambos tipos de células tienen idénticos genotipos, pero sus fenotipos pueden variar. Estos cambios se observan cuando un microorganismo cambia su crecimiento planctónico a un modo de crecimiento sésil dentro de una biopelícula. Durante este cambio fenotípico se regulan diferencialmente un gran repertorio de genes (2).

Esta multicelularidad hace que las células microbianas sean similares a muchos otros tipos de células vivas, capaces de existir de forma unicelular o de residir en comunidades multicelulares que ofrecen a sus células beneficios tan diversos como la protección frente a condiciones ambientales adversas tales como el estrés mecánico de los fluidos, oscilaciones de pH, compuestos antimicrobianos o las propias defensas del sistema inmunitario (3). Las causas del aumento de esta resistencia comprenden tanto mecanismos de tolerancia física, como la disminución de la penetración, como de tolerancia fisiológica debida a las diferentes tasas de crecimiento de las células en las diferentes capas de la biopelícula o de mecanismos de resistencia convencional debida a la transferencia genética y a mutaciones que englobarían la modificación de los genes diana de los compuestos antimicrobianos y otros mecanismos de resistencia adaptativa, como la inducción de bombas de expulsión o de enzimas capaces de degradar o alterar el fármaco antimicrobiano (4).

La biopelícula puede desarrollarse como respuesta a muchos factores, que pueden incluir el reconocimiento de zonas de fijación en una superficie, cambios de pH, señales nutricionales o, en algunos casos, la exposición a concentraciones subinhibitorias de antibióticos (5-8). Para ello, cada célula microbiana coordina esfuerzos con otras células microbianas de su comunidad pudiendo generar no sólo el desarrollo de biopelícula sino, en otros casos, la producción de bioluminiscencia o la secreción de exoenzimas (9). Esta coordinación se produce a través de un mecanismo de comunicación intercelular llamado *Quorum Sensing* (QS).

El QS confiere a los microorganismos la capacidad de reconocer la densidad poblacional midiendo la acumulación de una molécula de señalización específica que secretan las células al medio. Sólo cuando la densidad de población es alta, la acumulación de la señal en el entorno extracelular es suficiente para activar la respuesta. Estructuralmente, estas moléculas de señalización tienen un bajo peso molecular y pertenecen a una amplia gama de clases químicas incluyendo acilhomoserina lactonas (AHL), diésteres de furanosil borato (EA2), ácidos grasos cis insaturados, diguanosina monofosfato cíclica (c-di-GMP, cyclic diguanylate monophosphate), ARN de cadena corta y péptidos. El proceso más característico y común que los microorganismos desarrollan de esta manera cooperativa es la formación de biopelícula (10,11).

Nuestra comprensión de cómo los microorganismos construyen la biopelícula se compone de varias etapas que, en general, incluyen: i) el anclaje inicial seguido de una unión irreversible a la superficie mediante adhesinas; ii) el desarrollo de microcolonias; iii) la maduración de la arquitectura de la biopelícula; y iv) el desensamblado y dispersión de la biopelícula (Figura 1.1).

Los diferentes estadios de la biopelícula sugieren una fisiología y respuestas fenotípicas únicas de las células sésiles que no se observan en las células planctónicas. El cambio del modo de vida desde célula planctónica a una comunidad microbiana conlleva modificaciones celulares con el comienzo de una mayor síntesis de adhesinas y componentes de la matriz extracelular que acaban interconectando las células de la biopelícula entre sí y con su entorno. La matriz extracelular sirve como andamiaje y presenta una función esencial en la adhesión del microorganismos, las interacciones

entre células y en la tolerancia a compuestos nocivos como los fármacos antimicrobianos (12-15).

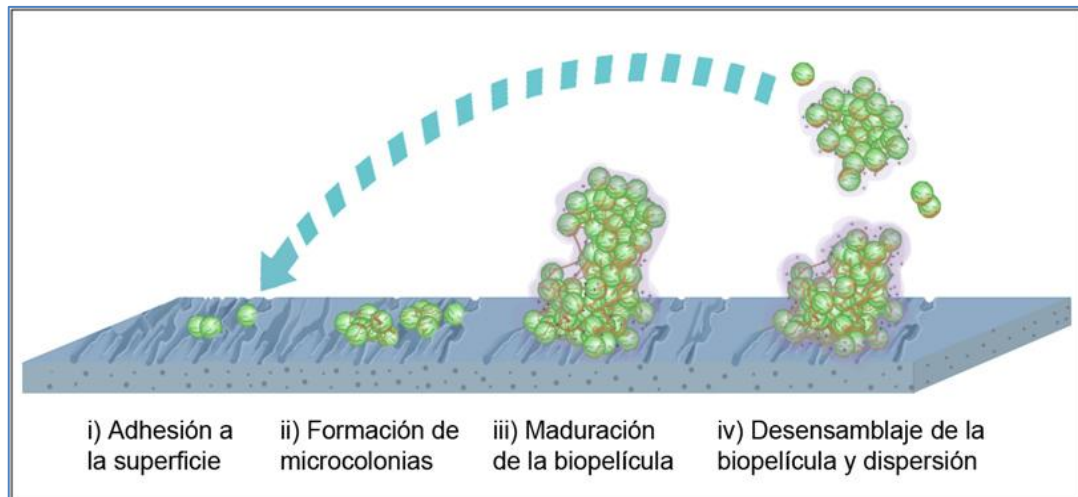


Figura 1.1. Etapas en el desarrollo de la biopelícula.

Existen estudios de varias especies bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Burkholderia cenocepacia*, *Bacillus subtilis* y *Clostridium difficile*, en las que el inicio de la formación de la biopelícula parece tener lugar como respuesta a un incremento en las concentraciones de c-di-GMP, una molécula que actúa como segundo mensajero (16-23). Se cree que ciertas señales ambientales y mecanismos de transducción dan lugar a un aumento del c-di-GMP que a su vez puede activar la producción de adhesinas y compuestos de la matriz extracelular. Además de la regulación mediada por c-di-GMP, la formación de biopelícula está también regulada mediante pequeños fragmentos de ARN en muchas especies bacterianas (24).

Existen varios factores que pueden dar lugar a diferentes formas de biopelículas. Las microcolonias son la unidad básica en la mayoría de las biopelículas. Sin embargo, la estructura de estas microcolonias puede variar enormemente dependiendo de las especies microbianas que las formen. Por ejemplo, se ha demostrado que bajo condiciones idénticas en una cámara de flujo *Pseudomonas putida* forma microcolonias que, aunque débiles, sobresalen con una estructura irregular, mientras

que *Pseudomonas knackmussii* forma microcolonias esféricas. Por consiguiente, las diferencias de las cepas en la producción de componentes de la matriz extracelular que interconectan bacterias en las biopelículas pueden dar lugar a diferentes estructuras en las microcolonias (25).

Del mismo modo, la misma especie podría formar diferentes biopelículas bajo diferentes condiciones ambientales. Por ejemplo, Klausen et al. (26) demostraron que *Pseudomonas aeruginosa* formaba microcolonias con forma de hongo al crecer en una cámara de flujo irrigada con medio glucosado mientras que desarrollaba biopelículas planas usando medio citrato. Wolfaardt et al. (27) estudiaron una mezcla de microorganismos capaces de degradar el herbicida diclofop. Cuando esta combinación de microorganismos crecía en una cámara de flujo irrigada con diclofop se formaba una biopelícula altamente estructurada, pero al utilizar únicamente caldo de soja tripticaseína (TSB, Tryptic Soy Broth) se generaba una biopelícula sin variación en espesor ni estructura.

La biopelícula no sólo está regulada genéticamente por la síntesis de ciertos componentes de matriz extracelular, sino que también obedece a respuestas adaptativas. La estructura de las biopelículas ha podido evolucionar para proporcionar una función específica. Por ejemplo, se ha propuesto que la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para formar microcolonias en forma de hongo se ha desarrollado como resultado de la evolución de grupo, ya que estas estructuras podrían proporcionar un adecuado suministro de nutrientes eliminando eficientemente los residuos (28). Sin embargo, también se ha postulado que estas microcolonias fungiformes se originan principalmente como consecuencia de las condiciones especiales en la cámara de flujo y la existencia de subpoblaciones móviles e inmóviles (29). Hay un gradiente de nutrientes decreciente desde la parte superior hasta la profundidad de la biopelícula debido al consumo de nutrientes. Las bacterias móviles que se acumulan en la parte superior de las microcolonias tienen una ventaja de crecimiento en comparación con las bacterias de la parte inferior de la biopelícula y pueden proliferar para formar las características estructuras con forma de seta (30). La falta de detección de puntos comunes en el perfil de expresión génica de *Pseudomonas aeruginosa* en biopelículas sugiere que la formación de la biopelícula se

rige principalmente por respuestas adaptativas. Esto está de acuerdo con el hecho de que el desarrollo estructural de las biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa* y en diferentes especies depende de las condiciones nutricionales y puede cambiar en respuesta a ellas.

1.2. Matriz extracelular

La formación de biopelícula comienza con la interacción de los microorganismos entre sí y con las superficies o interfaces presentes. Una vez las células se han agregado en esas microcolonias comienza la producción de matriz extracelular, lo que contribuye en gran medida a la formación de una biopelícula madura con una arquitectura final concreta. Sin embargo, la matriz extracelular formada no siempre es igual. Existe una gran variedad en su composición, en el ritmo en la que se forma y en el momento escogido para ello. Por ejemplo, las biopelículas formadas por diferentes especies microbianas suelen ser fácilmente distinguibles unas de otras y, de igual modo, también podría existir una gran variación en las propiedades de la biopelícula entre cepas de la misma especie. Incluso la arquitectura de la biopelícula se puede ver muy afectada por pequeños cambios en las condiciones ambientales (26,27).

Estas diferencias en la estructura de la biopelícula parecen reflejar cambios en la composición de su matriz extracelular. Se ha observado que las proteínas y los polisacáridos extracelulares son los componentes clave de la matriz (31,32). Del mismo modo, otros estudios indican que el ADN extracelular juega también un papel importante en establecimiento de la estructura de la biopelícula (12,33).

En el caso del género *Staphylococcus*, los principales componentes de su matriz extracelular son polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (34-37). Aunque no suelen ser apreciados como matriz extracelular, los ácidos teicoicos extracelulares han sido también purificados de la matriz de las biopelículas de *Staphylococcus*. Igualmente, se ha propuesto que el peptidoglicano puede mantener alguna función aún desconocida ya que exponiendo la biopelícula a lisostafina, un enzima capaz de degradar los puentes de pentaglicina en la pared celular estafilocócica, las biopelículas se

desensamblan (38,39). Además, la biopelícula se forma también con otros componentes procedentes del hospedador que dependerán a su vez de la zona donde se produce la infección.

1.2.1. Polisacáridos

Muchas especies estafilocócicas producen un polisacárido llamado poli-N-acetil glucosamina (PNAG) o adhesina polisacárida intercelular (PIA, Polysaccharide intercelular adhesin). PNAG / PIA se sintetiza mediante enzimas codificadas por el operón *ica* y se deposita sobre la superficie de la pared celular (37). Varias condiciones ambientales pueden influir en el papel que juega PNAG / PIA en la matriz extracelular de *Staphylococcus*, como son el crecimiento anaerobio, altas temperaturas, osmolaridad y la presencia de concentraciones subinhibitorias de antibióticos (40). En algunos modelos animales, se ha demostrado que el PNAG / PIA desempeña un papel esencial en el establecimiento de la biopelícula y el mantenimiento de una infección persistente (41). Evidencias más recientes sugieren que mientras algunas cepas de *Staphylococcus* basan su biopelícula en polisacáridos, otras forman biofilms independientes de éstos siendo las proteínas y el ADN extracelular los componentes que sustituyen al PNAG en la estructura de la matriz (40,42).

1.2.2. Proteínas

Las proteínas son otro componente importante de la matriz de la biopelícula, como demuestra la susceptibilidad que muestran las biopelículas estafilocócicas a las proteasas (34,36,42). Muchos de los contactos célula-célula y célula-huésped dentro de la biopelícula están mediados por proteínas superficiales, como las proteínas de unión a fibronectina, proteína A, SasG y las proteínas asociadas a biopelículas (BAP, Biofilm-Associated Protein) (43-45). Las proteínas citoplásmicas podrían desempeñar un doble papel en la matriz donde se asocian con células tras una caída del pH (46,47). Además, los amiloides han emergido como un componente importante de muchas biopelículas microbianas. Los amiloides son agregados fibrosos insolubles de proteínas que contienen láminas beta paralelas y han sido identificados en enfermedades

neurodegenerativas humanas. Las fibras amiloides producidas por *Staphylococcus aureus* están compuestas por pequeños péptidos llamados modulinas solubles en fenol (PSM, Phenol-soluble modulins) (48). Estos amiloides son relativamente resistentes a las proteasas e insolubles en detergentes. En la biopelícula, ofrecerían resistencia a las proteasas y a los agentes tensioactivos capaces de degradar las biopelículas.

1.2.3. ADN

Se cree que el ADN genómico extracelular (ADNe) es un componente estructural importante en muchas biopelículas bacterianas (49,50). La adición de ADNasas a las biopelículas en crecimiento o maduras da como resultado la inhibición de la formación de la biopelícula o la interrupción de la ya establecida. Sin embargo, la disrupción mediada por las ADNasas depende de la edad de la biopelícula, siendo las biopelículas jóvenes más sensibles que las biopelículas maduras. En *Staphylococcus aureus*, la actividad autolítica de una subpoblación de células da como resultado la liberación de ADN genómico que contribuye a la adhesión celular durante la maduración del biofilm (51). La naturaleza química de la molécula de ADN modularía las propiedades de la superficie celular y promovería la adhesión célula-célula y célula-superficie, desempeñando un papel estructural en la matriz de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* (52,53).

1.2.4. Interacciones en la matriz

Varios estudios sugirieron que los componentes de la matriz son capaces de interactuar e influir en el desarrollo de biopelículas (54-57). Huseby et al. (54) revelaron en un análisis estructural que la toxina beta secretada por *Staphylococcus aureus* tenía una estructura tridimensional que se asemeja a una nucleasa. Aunque carece de actividad nucleasa, es capaz de unirse a ADNe y producir oligómeros para formar estructuras ordenadas superiores. La unión toxina beta-ADNe actuaría como un esqueleto esencial para la matriz de biopelícula durante la infección. Sin embargo, muchos aislamientos clínicos poseen un fago que interrumpe el gen de la toxina beta por lo que tal vez esta proteína no sea relevante para la infección causada por esas

cepas y puede haber otras proteínas de unión al ADNe (54). Sin embargo, Salgado et al. (58) han observado que la escisión del fago puede ocurrir durante la infección dando como resultado la producción de toxina beta activa. Se ha demostrado también que las proteínas citoplásmicas liberadas mediante autólisis interaccionan con ADNe de una manera dependiente del pH y esta interacción ofrece protección contra enzimas que degradan la matriz (55). De hecho, en patógenos gramnegativos como *Haemophilus influenzae* y *Burkholderia cenocepacia*, se ha descrito que proteínas como el factor de integración al huésped (IHF, Integration Host Factor) interactúan con el ADNe y estabilizan las biopelículas. Los intentos de eliminar estas proteínas de las biopelículas con antisueros que bloquean las interacciones proteína-ADN reducen la biomasa de las biopelículas in vitro y son útiles en el tratamiento de infecciones crónicas en animales (56,57).

Las proteínas citoplásmicas de *Staphylococcus aureus* podrían tener un papel en la matriz de la biopelícula (47,55). Dengler et al. (55) encontraron que la asociación de ADNe con la matriz de la biopelícula dependía de unas proteínas de la matriz, que eran proteínas citoplásmicas que sólo se liberaban tras la autólisis de la célula. La adición de ADNe a las células tratadas con ADNasa podía recuperar la formación de biofilm posiblemente desarrollando un papel facilitador de las interacciones intercelulares. En *Staphylococcus aureus*, la presencia de ADNe promueve la polimerización de péptidos amiloidógenos (modulinas solubles en fenol) a concentraciones en las que por sí solos no polimerizan fácilmente (59). El ADN atraería los PSM positivamente cargados y aumentaría la concentración del péptido, facilitando su polimerización.

En *Escherichia coli* se ha demostrado que el componente amiloide funcional CsgA se une al ADN, estimulando la autoinmunidad (60). También se han observado interacciones entre ADNe y polisacáridos en las biopelículas (61). Dos componentes principales de la matriz de biopelícula (ADNe y el polisacárido Psl) cooperan en *Pseudomonas aeruginosa* interactuando físicamente en la biopelícula para formar una red de fibras de Psl-ADNe, que permiten que las bacterias se adhieran y crezcan. El Psl puede interactuar no sólo con el ADN de *Pseudomonas aeruginosa*, sino también con el ADN genómico de neutrófilos humanos y de *Staphylococcus aureus*, lo que implica

que *Pseudomonas aeruginosa* tiene la capacidad de utilizar el ADN de otros microorganismos para formar sus propias comunidades celulares (61).

Las interacciones entre componentes de la matriz pueden proporcionar nuevos objetivos para interrumpir la formación de biopelícula o erradicar la que ya está establecida. No obstante, a pesar de la importancia de las biopelículas microbianas para la salud y los procesos industriales, numerosas interacciones entre los componentes de la matriz de la biopelícula siguen aún por descubrirse.

1.3. Relevancia de las biopelículas

La primera observación de una biopelícula fue realizada en el siglo XVII por Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) con un microscopio primitivo en muestras de su boca donde distinguió agregados de microorganismos entre los dientes. Al examinar la boca de un bebedor habitual que no se cepillaba los dientes, observó que a pesar del consumo de alcohol había una gran cantidad de microorganismos en las incrustaciones de sus dientes. Leeuwenhoek intentó esterilizar sin éxito su boca con vinagre consiguiendo únicamente matar los microorganismos presentes en las capas más superficiales. Estas incrustaciones se denominan placa dental, una biopelícula que permite a los microorganismos adherirse a la superficie dental y estar más protegidos (62). Posteriormente, en 1933, Henrici observó que, sumergiendo una lámina de vidrio en un estanque, ésta acababa recubierta por microorganismos, siendo la capa en ocasiones tan espesa que apenas se distinguían células aisladas. Henrici también observó en su estudio que «en otros casos, las agrupaciones de células están claramente rodeadas por una envoltura de goma que también sirve para sujetar la colonia al vidrio»; de este modo Henrici describió la matriz extracelular (63). Dos años más tarde, Zobell y Allen estudiaron la adhesión y el crecimiento de bacterias en láminas de vidrio sumergidas en agua de mar en cuya superficie el número de bacterias era significativamente mayor que en el medio circundante (64). Sin embargo, habría que esperar a la llegada de la microscopía electrónica de alta resolución para conseguir un examen detallado de las biopelículas. Así, Costerton et al. en 1978 plantearon una teoría sobre la formación de biopelículas que explicaba los

mecanismos por los cuales los microorganismos se adhieren a las superficies bióticas y abióticas y los beneficios que obtenían en este nicho ecológico (3).

En el ámbito industrial y ecológico, las biopelículas son responsables de la biocorrosión de materiales, del *biofouling* en materiales en contacto con el agua o la acidificación de superficies de materiales. En el ámbito sanitario, las ubicuas biopelículas microbianas se han asociado con una serie de enfermedades infecciosas como la fibrosis quística, las endocarditis sobre válvulas cardíacas nativas, la otitis media, la periodontitis o la prostatitis crónica (65,66). Además, un gran número de dispositivos médicos pueden albergar biopelículas y ser el reservorio de infecciones asociadas a estos dispositivos (66).

1.3.1. Bioincrustación

La bioincrustación o *biofouling* es una acumulación de materia biológica en superficies en contacto con agua. Se asocian tanto a biopelículas generadas por microorganismos como a bioincrustaciones macroscópicas (macroincrustaciones) creadas por animales y plantas (67) (Figura 1.2). Primero, tienen lugar interacciones de Van der Waals que promueven que la superficie sumergida se cubra con una película acondicionadora de polímeros orgánicos. Esta capa permite la adhesión de bacterias (*Vibrio alginolyticus* y *Pseudomonas putrefaciens*) y diatomeas, y la formación de biopelícula. A continuación, la presencia de nutrientes y la facilidad de unión a la biopelícula permiten la unión de colonizadores secundarios, como esporas de algas y protozoos. Finalmente, los colonizadores terciarios, tunicados, moluscos y cnidarios sésiles, acaban adhiriéndose (68).



Figura 1.2. Efecto del *biofouling* en una embarcación. (© Photo: Rob S.E.W. Leuven, November 20, 2015)

El *biofouling* plantea riesgos para la salud y pérdidas económicas. Tal vez, la forma más reconocida de *biofouling* se encuentra en el medio marino. En el caso de los barcos, los efectos adversos incluyen una mayor resistencia friccional con una reducción en la velocidad, pérdida de maniobrabilidad y aumento del consumo de combustible y de emisiones de compuestos nocivos, deterioro del revestimiento por la biocorrosión, mayor decoloración y alteración de la conductividad eléctrica del material, así como la introducción de especies invasoras en ambientes donde no estaban presentes de forma natural (69,70). El *biofouling* no sólo se limita a embarcaciones y cualquier estructura en contacto con el agua puede ser colonizada (boyas, dispositivos sonar, instalaciones petrolíferas, plataformas, cables submarinos y sistemas de refrigeración) con un aumento de los gastos, problemas medioambientales, corrosión y riesgos para la seguridad.

Además del *biofouling* marino, existe un *biofouling* industrial que afecta a otras áreas como las centrales nucleares, los sistemas de tratamiento de agua y la producción de alimentos. En general, los biofilms aumentan la fricción, las necesidades energéticas, la disminución de la presión en tuberías, así como una posible reducción en la eficiencia de transferencia de calor. Estos biofilms pueden albergar microorganismos patógenos en los suministros de agua potable, como *Escherichia coli* o *Legionella* spp. A su vez, las biopelículas de hongos pueden causar malos olores y sabores (67). Por ejemplo, los costes directos del control del *biofouling* en la industria

de la acuicultura son sustanciales, teniendo en cuenta estimaciones conservadoras, el 5-10% de los costes de producción son atribuidos al *biofouling* (71). A nivel mundial, esto equivaldría a un gasto de 1.300 a 2.600 millones de euros por año solo en esta industria (72).

1.3.2. Infecciones asociadas a los cuidados de la salud

Las infecciones asociadas a los cuidados de la salud (IACS) incluyen a aquellas infecciones que se adquieren en hospitales (infecciones nosocomiales), en centros sanitarios ambulatorios o durante los cuidados a domicilio. Aproximadamente cuatro millones de pacientes adquieren una infección asociada a los cuidados sanitarios en la Unión Europea cada año. El número de muertes como consecuencia directa de estas infecciones supera las 37.000 y estas infecciones contribuyen a otras 110.000 muertes anuales adicionales (73). Las IACS en Europa son responsables de alrededor de 16 millones de días adicionales de hospitalización por año y representan un 25% de las complicaciones sufridas por los pacientes hospitalizados, lo que representa un coste estimado en 7.000 millones de euros (74). En 2016, el 8,4% de los pacientes ingresados en UCI durante más de dos días presentaron al menos una IACS. Concretamente, 6% presentaron neumonía, 4% infección del torrente sanguíneo y un 2% infección del tracto urinario. El 97% de los episodios de neumonía se asociaron con intubación, el 44% de las infecciones del torrente sanguíneo estaban relacionados con catéteres y el 99% de los episodios de infecciones urinarias se asociaron con la presencia de sonda urinaria (75).

1.4. Enfermedades asociadas con biopelículas

Las infecciones relacionadas con biopelículas representan entre un 65 y un 80% de todas las infecciones (76). Se pueden localizar en cualquier tejido del cuerpo humano, destacando la infección de la herida crónica, las infecciones pulmonares crónicas, como ocurre en las infecciones respiratorias de los pacientes con fibrosis quística, o la

endocarditis. Las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas son difíciles de diagnosticar y de tratar.

1.4.1. Fibrosis quística

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que afecta a uno de cada 2.000 recién nacidos en poblaciones caucásicas (77). Es una enfermedad multiorgánica que afecta a las vías respiratorias, el páncreas, el intestino delgado, el hígado, el aparato reproductor y las glándulas sudoríparas. Los síntomas clínicos respiratorios se deben a la producción de un moco viscoso y a las infecciones que sufren y que conducen a una enfermedad bronquial crónica con bronquiectasias. La colonización microbiana de la vía aérea parece llevar una secuencia en el tiempo que se asocia a la edad del paciente. Durante los primeros años de vida, las principales infecciones respiratorias se deben a virus. Después, la colonización más frecuente es por *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* (78). A medida que el paciente entra en la edad adulta, el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* aumenta hasta convertirse en el microorganismo más prevalente, aunque en los últimos años se ha observado un decremento en el porcentaje de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados en adultos que sufren fibrosis quística, bajando de un 80% en 2010 a un 50% en 2016 (79). Con la edad se va deteriorando la función pulmonar y la presión antibiótica selecciona otros bacilos gramnegativos no fermentadores, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* o *Burkholderia cepacia*, y hongos, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Scedosporium apiospermum*.

El deterioro en estos pacientes del mecanismo de aclaramiento mucociliar de los microorganismos inhalados del tracto respiratorio conduce a la activación de mecanismos de defensa inflamatorios mediados por leucocitos polimorfonucleares (PMN) y anticuerpos. A pesar de las respuestas inflamatorias y del tratamiento antibiótico, las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* pueden persistir durante décadas, lo cual conduce a una insuficiencia respiratoria, que puede requerir un trasplante de pulmón o causar el fallecimiento del paciente. *Pseudomonas aeruginosa* emplea como principal mecanismo de adaptación al árbol bronquial la formación de biopelículas (80). Durante esta adaptación, los fenotipos mucoide (crecimiento en

modo de biopelícula) y no mucoide se separan debido a mutaciones. El fenotipo mucoide que es poco común en personas sanas, hiperproduce un polisacárido llamado alginato que dificulta el aclaramiento respiratorio de los microorganismos e inhibe la fagocitosis, dificulta la penetración de antibióticos y neutraliza los radicales de oxígeno (81-83). Las mutaciones en el gen *mucaA* generan la hiperproducción de alginato, siendo una de las mutaciones adaptativas más frecuentes. Se observa en el 80-90% de los pacientes con infección pulmonar crónica y con una alta prevalencia de cepas hipermutadoras (30-60% de los pacientes) con defectos en el sistema de reparación del emparejamiento erróneo del ADN, en contraste con lo que se observa en las infecciones agudas (<1%) (84). La presencia de cepas hipermutadoras está relacionada con altas tasas de resistencia a los antibióticos.

1.4.2. Rinosinusitis crónica

La rinosinusitis crónica es una enfermedad común que afecta al 10-15% de la población adulta. En su etiología se han implicado múltiples factores anatómicos, funcionales (deterioro del aclaramiento mucociliar), alérgicos, ambientales e infecciosos, incluyendo las biopelículas. La presencia de estas biopelículas se observó en 2004 mediante microscopía electrónica de barrido de la mucosa nasal de pacientes con rinosinusitis crónica (85). Sin embargo, no se desarrollan biopelículas en todos los pacientes con rinosinusitis crónica (85-87), que sí pueden observarse en personas sin rinosinusitis (88). *Staphylococcus aureus* es el microorganismo predominante en las biopelículas nasales, encontrándose en la mitad de los pacientes con rinosinusitis crónica, aunque las comunidades microbianas que las componen son muy diversas (89). *Staphylococcus aureus* puede alterar in vitro su fenotipo después de su internalización en las células epiteliales (90), provocando cambios en la regulación de genes involucrados en la división celular, el transporte de nutrientes y la virulencia. Otros trabajos han mostrado una mayor resistencia a los antibióticos (91) y al sistema inmunitario innato (92).

El sistema inmunitario innato (aclaramiento mucociliar junto con péptidos antimicrobianos como la lactoferrina y los receptores tipo Toll) supone la primera línea de defensa antiinfecciosa. En pacientes con rinosinusitis crónica se ha observado una

disminución de las concentraciones de proteínas antimicrobianas, especialmente la lactoferrina (93). Además, el aclaramiento mucociliar puede ser defectuoso y si se desarrollan biopelículas, se produce una marcada destrucción de la capa epitelial, con ausencia completa de cilios (94). El polisacárido PNAG de *Staphylococcus* es un factor importante para la formación de biopelícula y la evasión del sistema inmunitario. Es esencial en las interacciones electrostáticas con las células del hospedador y confiere a *Staphylococcus* una resistencia al sistema inmunitario innato a través de la repulsión de péptidos antimicrobianos catiónicos (95-97).

1.4.3. Otitis media crónica

La otitis media es una enfermedad muy prevalente siendo la enfermedad más frecuente diagnosticada en niños menores de 15 años y una causa importante de las visitas a los servicios de urgencias (98). La pérdida de la audición en el inicio temprano de la otitis media puede conllevar retrasos en el desarrollo del lenguaje, la conducta y educativo (99). Rayner et al. observaron una ausencia de respuesta al tratamiento con antibióticos, con cultivos sin crecimiento en muestras del oído medio (estériles) de pacientes con otitis media crónica o recurrente. Un gran porcentaje de estos cultivos estériles mostraban resultados positivos mediante PCR (ADN y ARNm –indicador de multiplicación microbiana) y parecían asociarse a la presencia de biopelículas (100). Los tres principales agentes causantes de otitis media aguda, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*, desarrollan biopelículas tanto in vitro (101-103) como in vivo (104-106). Más tarde, Bouchet et al. (105), en un modelo experimental de chinchilla, y Greiner et al. (107), observaron que los lipooligosacáridos sialilados son un componente clave en la virulencia de *Haemophilus influenzae* y la formación de biopelículas in vitro e in vivo (105,107).

En las otitis medias crónicas supuradas son *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, buenos productores de biopelícula, los microorganismos más comúnmente involucrados. Las biopelículas se pueden adherir al tejido óseo dañado, a la mucosa ulcerada del oído medio o a los implantes óticos (tubos de timpanostomía). Se ha observado, mediante microscopía electrónica de barrido, la presencia de biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* hasta en el 70% de

los pacientes con otitis media crónica supurativa y otitis media crónica colesteatomatosa (108).

1.4.4. Infección crónica de heridas

Se calcula que el 1-2 % de la población sufrirá una herida crónica y se estima que irá aumentando, con el incremento de la esperanza de vida, del índice de masa corporal y de enfermedades predisponentes como la diabetes o las insuficiencias cardiovasculares (109). Las heridas crónicas generan altas tasas de morbilidad y mortalidad, y causan un gasto elevado anual. Las heridas se consideran crónicas cuando la cicatrización es lenta o anómala y la integridad anatómica o funcional de la piel no se consigue en menos de un mes. La curación se ve obstaculizada por la formación de biopelículas, en las que las bacterias están encerradas en una matriz de exopolisacáridos y son menos activas metabólicamente que en vida libre (110). Las biopelículas bacterianas inducen una respuesta inflamatoria crónica excesiva en el lugar de la herida, con retraso en la síntesis de colágeno, la epitelización y presencia de daño tisular (111). Las biopelículas juegan un papel importante en el fracaso del tratamiento al retrasar la curación de las heridas. La biodiversidad microbiana es pobre y *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* son los microorganismos predominantes en las heridas crónicas (109).

1.4.5. Infección de válvula cardíaca nativa

La endocarditis infecciosa es una inflamación del endocardio (revestimiento interno de las cámaras y válvulas del corazón) con desarrollo de vegetaciones compuestas por microorganismos, plaquetas, fibrina y células inflamatorias. Esta enfermedad tiene una incidencia anual de 3 a 10 casos por cada 100.000 habitantes en países industrializados con una proporción de varones:mujeres de 2:1. Las tasas más altas se observan en pacientes con válvulas protésicas, dispositivos intracardiacos, cardiopatías congénitas o que han sufrido una endocarditis previamente, aunque la mitad de las endocarditis las sufren pacientes sin historia conocida de enfermedad valvular. Otros factores de riesgo son la cardiopatía reumática crónica (< 10% en los

países industrializados, pero es el principal factor de riesgo en los demás países), lesiones valvulares degenerativas relacionadas con la edad, hemodiálisis y otras condiciones como la diabetes, la infección por el VIH y el uso de drogas por vía intravenosa (112). Los pacientes afectados tienen más edad y sufren enfermedades más graves que en el pasado. La bacteriemia estafilocócica asociada a los cuidados de la salud suele ser precursora de la endocarditis infecciosa (113). Estafilococos, estreptococos y enterococos causan el 80-90% de las endocarditis infecciosas. *Staphylococcus aureus* causa el 30% de los casos. Los estafilococos coagulasa negativos, representados en su mayoría por *Staphylococcus epidermidis*, también causan con frecuencia endocarditis sobre válvula nativa nosocomial. La producción de biofilm, las altas tasas de formación de abscesos y la resistencia múltiple a los antibióticos son rasgos característicos (114).

Los microorganismos llegan al torrente circulatorio principalmente a través de la orofaringe, el tracto gastrointestinal y el tracto genitourinario. En condiciones normales, estos microorganismos no se adhieren al endotelio intacto. Sin embargo, una lesión del endotelio causa la liberación de citoquinas inflamatorias y del factor tisular de tromboplastina, y junto con la expresión de fibronectina, conduce a la formación de un trombo de plaquetas y fibrina que facilita la adhesión bacteriana (115). El daño al endotelio puede ser causado por esclerosis valvular, endocarditis reumática valvular o por actividad bacteriana directa (*Staphylococcus aureus*). Adhesinas como la proteína de unión a fibronectina y los factores de aglutinación A y B estafilocócicos median la adherencia al tejido y son determinantes en la patogenicidad. La colonización bacteriana desencadena ciclos adicionales de lesión endotelial y más deposición de trombos. El crecimiento microbiano se mantiene entre una matriz de plaquetas y fibrina, iniciando la formación de biopelículas y vegetaciones. Las vegetaciones pueden provocar una disfunción valvular y son una plataforma para la invasión, la destrucción y desintegración de las válvulas, así como la invasión de los tejidos circundantes. La liberación de células planctónicas de la biopelícula al torrente sanguíneo causa bacteriemia y siembra microbiana sistémica. Aunque esta bacteriemia sea transitoria y en los hemocultivos puedan no crecer microorganismos, existen células microbianas persistentes en las capas más profundas de la biopelícula. De este

modo, el ciclo puede repetirse con la dispersión de nuevas células planctónicas, además, la liberación de fragmentos de vegetaciones en la circulación ocasionando embolias sépticas distales. La biopelícula, además de ayudar a la persistencia bacteriana, contribuye a la tolerancia antibiótica (114). Un tratamiento exitoso depende de la erradicación del agente causante, que requiere de un tratamiento antibiótico prolongado. La cirugía puede contribuir eliminando el material infectado y drenando los abscesos (112).

1.4.6. Prostatitis infecciosa

La prostatitis infecciosa puede ser aguda o crónica, manifestarse como un síndrome de dolor pélvico crónico o ser asintomática (116). La prostatitis bacteriana crónica (más de tres meses) representa el 5-10% de las prostatitis. Los pacientes pueden sufrir disuria y dolor de espalda, perineal o genital (117). En los cultivos de orina obtenidos en el transcurso de la enfermedad crece la misma cepa microbiana. En pacientes con infección urinaria recurrente, debe realizarse un examen detallado para excluir cualquier anomalía anatómica que predisponga a la infección (piedras o cuerpos extraños en el tracto urinario, cáncer de vejiga, fístula enterovesical, etc.).

Escherichia coli y otras bacterias gramnegativas son responsables de la mayoría de los casos de prostatitis crónica (118). Sin embargo, los cocos grampositivos pueden tener un papel etiológico relevante (119). Si las células bacterianas planctónicas no son eliminadas, pueden formar biopelículas con una estimulación inmunológica persistente e inflamación crónica. Estas biopelículas se asocian con calcificaciones prostáticas y persistencia bacteriana. Este desarrollo de biopelículas se ha reproducido en un modelo de prostatitis bacteriana crónica en ratas inoculando mediante un catéter de polietileno 1×10^8 UFC/ml de *Escherichia coli* K-235 (120) en la glándula postática. Los aislamientos de *Escherichia coli* causantes de prostatitis son mayores productores de biopelícula que otras bacterias uropatógenas (121).

1.4.7. Vaginosis

La vaginosis bacteriana es responsable de más del 60% de las infecciones vulvovaginales. Esta enfermedad se acompaña de flujo vaginal maloliente por crecimiento excesivo de microorganismos anaerobios y aumento de la producción de aminas (putrescinas, cadaverinas y trimetilaminas). Está relacionada con complicaciones graves como la enfermedad inflamatoria pélvica, las infecciones postoperatorias, facilitan la adquisición y la transmisión del VIH, el parto prematuro y otras complicaciones del embarazo (122). En la vaginosis bacteriana se observa una sustitución de los lactobacilos de la microbiota vaginal por bacterias anaeróbicas, siendo *Gardnerella vaginalis* la especie predominante, asociada con otros anaerobios, como *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus mulieris*, *Prevotella bivia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Peptoniphilus spp.* (123).

El desarrollo de una biopelícula podría desempeñar un papel clave en la patogénesis de la vaginosis bacteriana. Swidsinski et al. constataron biopelículas en el 90% de las superficies epiteliales de biopsias vaginales en pacientes con vaginosis infecciosa, siendo *Gardnerella vaginalis* el microorganismo más abundante de estas comunidades polimicrobianas (124). Patterson et al. observaron que las biopelículas de *Gardnerella vaginalis* tenían una mayor tolerancia al peróxido de hidrógeno y al ácido láctico que las células planctónicas. Este hecho parece sugerir que la biopelícula de *Gardnerella vaginalis* confiere una mayor resistencia a las propiedades probióticas de los lactobacilos (125). Además, *Gardnerella vaginalis* es capaz de adherirse y desplazar la capa de lactobacilos protectores de las células epiteliales vaginales (126).

1.5. Infecciones asociadas a biopelículas en dispositivos biomédicos

Se estima que aproximadamente 4.100.000 pacientes adquieren IACS en la UE cada año, infecciones que se acompañan de morbilidad y mortalidad elevadas (73). Las más comunes son las infecciones de sitio quirúrgico (ISQ), infecciones respiratorias asociadas a ventilación mecánica y neumonías, infecciones asociadas a sondas

urinarias o a catéteres intravasculares, y bacteriemias. Los microorganismos causales más frecuentes son bacterias grampositivas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis*, bacterias gramnegativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, y hongos, sobre todo *Candida* (73,127,128).

1.5.1. Infección asociada a prótesis articular

El reemplazo articular es un procedimiento que mejora la vida de millones de personas porque proporciona alivio del dolor, restaura la función y mejora la calidad de vida. Entre los países europeos que participan en la red de vigilancia del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), las tasas de infección del ISQ es del 0,6% en los pacientes sometidos a reemplazo de rodilla y del 1% en el de cadera (73). Aunque el riesgo de infección en pacientes sometidos a artroplastia es bajo, la alta frecuencia de estos procedimientos debe tenerse en cuenta. El período de mayor riesgo se sitúa durante los dos primeros años, cuando ocurren el 60-70% de las infecciones (129,130).

Staphylococcus aureus es la causa más común de ISQ en artroplastias de cadera y rodilla (131,132). La red de vigilancia de la ISQ del ECDC indicó que el 33,5% de las ISQ confirmadas en estos en 2012 se debieron a infecciones por *Staphylococcus aureus* (33,5% y 38,1%, respectivamente). Los estafilococos coagulasa negativos también presentaron un puesto destacado (19,3% en artroplastia de cadera y 20,5% en artroplastia de rodilla). Los métodos actuales para de diagnóstico microbiológico de las ISQ presentan limitaciones. En un intento de mejorar la sensibilidad del diagnóstico, se han estudiado métodos basados en la detección de biopelículas (133). Las biopelículas podrían jugar un papel importante en la patogénesis de la infección protésica articular (134). Los implantes proporcionan una plataforma para la adhesión inicial y la multiplicación de bacterias. Esto hace que la respuesta inflamatoria sea mínima y permite que las bacterias sobrevivan y crezcan en la superficie de la prótesis sin verse afectadas. Además, las bacterias en la biopelícula pueden permanecer en un estado de reposo metabólico y no crecer en el cultivo (135). Entre las nuevas técnicas para el diagnóstico de infecciones protésicas articulares están la detección de biofilms con

hibridación fluorescente in situ y la detección de bacterias con *microarrays* de ADN. Por último, el uso de técnicas moleculares basadas en amplificación de ácidos nucleicos ha proporcionado métodos para identificar las especies de bacterias implicadas en infecciones protésicas. Del mismo modo, los métodos diagnósticos que apuntan a los componentes de la biopelícula (moléculas extracelulares o bacterias alojada embebidas en su interior) pueden mejorar el diagnóstico (136).

1.5.2. Infección asociada a implantes dentales

Los implantes dentales se instalan quirúrgicamente en el hueso de la mandíbula, sustituyendo la pérdida de uno o más dientes. De este modo, las necesidades funcionales y estéticas del paciente se ven restablecidas. Se utilizan materiales que se caracterizan por una mínima adhesión microbiana y formación de biopelícula, como, por ejemplo, titanio y sus aleaciones. La superficie de titanio es integrada biológicamente por el tejido óseo circundante denominada «osteointegración» (137).

La principal diferencia con los dientes naturales es la ausencia de ligamento periodontal, lo que provoca una interfaz directa entre el hueso y la superficie del implante. Las fibras de colágeno del tejido conectivo submucoso se colocan paralelas a la superficie del implante, formando un «collar» con una hendidura periimplantar más profunda que la gingival y la barrera física es más débil ante la invasión microbiana. Además, el suministro de sangre es más restringido y la llegada de células defensivas se encuentra dificultada (138).

Estas características, de forma colectiva, pueden hacer que los implantes dentales sean más susceptibles que los dientes naturales a la infección endógena. Una superficie de implante dental expuesta facilita la colonización microbiana exógena. Por lo tanto, las biopelículas pueden formarse en los implantes, con potenciales efectos perjudiciales para los tejidos periimplantarios. De hecho, las biopelículas se han asociado con casi el 65% de las enfermedades infecciosas periodontales y periimplantarias (139).

Es habitual encontrar bacilos gramnegativos al cultivar los implantes fallidos asociados con infecciones periodontales (140). Sin embargo, también se han

encontrado otras bacterias, como *Staphylococcus* y enterobacterias u hongos del género *Candida*, que no están vinculados etiológicamente con la periodontitis (139). El tipo de superficie del implante, la presencia de adhesinas microbianas y factores locales y sistémicos del paciente se han asociado con un mayor riesgo de formación de biopelícula (140).

1.5.3. Infección asociada a catéter

Un catéter venoso central (CVC) es un dispositivo biomédico para la nutrición parenteral, fluidos sanguíneos o fármacos, como los usados en quimioterapia antineoplásica, que causan daños cuando se utiliza una vena periférica más pequeña. El CVC también se puede utilizar para la hemodiálisis, obtener sangre o medir la presión venosa central. Los principales tipos de CVC incluyen catéteres no tunelizados y tunelizados, puertos de acceso venoso implantados (TIVAP, *Totally implantable venous access ports*) y catéteres centrales insertados periféricamente (PICC, *Peripherally inserted central catheter*). El uso de CVC y otros dispositivos implantados está aumentando constantemente en la medicina moderna. En EEUU, cada año se utilizan en UCI, 15 millones de CVC/día (número total de días con CVC en todos los pacientes de EEUU durante un año) (141). El uso de CVC se asocia con mayor riesgo de colonización e infección [2].

De acuerdo con un estudio realizado en Europa en 2016, el 44% de las infecciones del torrente sanguíneo estaban asociados a la utilización de catéteres siendo los estafilococos coagulasa negativos los microorganismos más frecuentemente aislados en estas infecciones (75). Los mismos resultados se pueden encontrar en España en 2016 donde las infecciones del torrente sanguíneo fueron la tercera causa de infecciones hospitalarias y de ellas el 49% estaban asociadas a un catéter intravenoso (127). El riesgo relativo de infecciones relacionadas con el catéter es hasta 64 veces mayor con los CVC que con los catéteres venosos periféricos (142).

Además de estas complicaciones clínicas, el impacto económico es importante, por el aumento de gastos, la duración mayor de la estancia hospitalaria y la complicación de los tratamientos antimicrobianos. Se estima que el gasto de las

bacteriemias asociadas a la utilización de catéteres oscila entre 30.000 y 68.000 euros, dependiendo del tipo de UCI (143).

La formación de biopelícula en el catéter puede ocurrir 24 horas después de la inserción. Después de la inserción del catéter, la superficie del dispositivo se cubre inmediatamente con una película de macromoléculas orgánicas, como piruvato, glucosa y fibrinógeno (144). La adhesión también depende de las características físico-químicas del catéter, como su rugosidad, hidrofobicidad e interacciones electrostáticas, así como de las adhesinas, fimbrias, flagelos, polisacáridos o proteínas microbianas (145). La colonización de la superficie externa del catéter puede originarse a partir de la microbiota cutánea, y la del interior del catéter por siembra hematógena desde un foco infeccioso o, con menor frecuencia, desde una infusión no estéril (146). La contaminación extraluminal de la piel la encontramos en los primeros 10 días de inserción del catéter y afecta a catéteres de corto plazo (insertados ≤ 14 días). La contaminación intraluminal aumenta en catéteres de larga duración. Los cuatro grupos de microorganismos que más comúnmente causan infecciones asociadas a catéter venoso son *Staphylococcus* coagulasa-negativo, *Staphylococcus aureus*, bacilos gramnegativos entéricos y *Candida* (147,148).

Es preferible que la zona de acceso del catéter sea la vena subclavia en lugar de la yugular o la femoral para reducir el riesgo de infección. La introducción de barreras estériles preventivas, el adecuado lavado de manos, la utilización de campos quirúrgicos grandes y el uso de guantes y mascarillas estériles durante la inserción del CVC reducen significativamente la incidencia de bacteriemias (149,150).

1.5.4. Infección asociada a sonda urinaria

La infección del tracto urinario asociada al uso de sondas es una de las infecciones asociadas a los cuidados de la salud más comunes (151,152). Entre el 70 y el 80% de estas infecciones son atribuibles al uso de un catéter uretral permanente, así en Europa, el 99% de los episodios de infecciones urinarias en las UCI se asociaron con la presencia de catéter urinario (75). El catéter urinario es el dispositivo médico más común: 17,5% de pacientes con catéter en 66 hospitales europeos (151) y el 23,6% en

183 hospitales estadounidenses (152). Según datos de EPINE (Estudio de la Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España), un 13,88 % de las infecciones asociadas a los cuidados de la salud se deben a catéteres urinarios (127).

Se consideran catéteres urinarios permanentes a corto plazo si permanecen in situ menos de 30 días y crónicos o a largo plazo cuando permanecen durante 30 días o más (153). El uso de catéteres en UCI suele ser breve, mientras que el uso crónico es más común en residentes de centros de atención a largo plazo. Otras complicaciones en pacientes con catéter crónico, incluyen la obstrucción del catéter urinario, la urolitiasis vesical, la uretritis purulenta, los abscesos de las glándulas y la prostatitis (154).

La formación de biofilm en el catéter es la causa más importante de bacteriuria nosocomial (155). La formación de biofilm comienza inmediatamente después de la inserción del catéter, cuando los organismos se adhieren a una película acondicionadora formada por proteínas del huésped incluyendo la proteína de Tamm-Horsfall e iones de magnesio y calcio. Las bacterias generalmente proceden de la microbiota del área periuretral o ascienden desde el tubo de drenaje tras colonizar la bolsa de drenaje.

Se suele identificar una sola especie al comienzo de una bacteriuria asociada a catéter permanente, pero si se desarrolla una biopelícula madura, la bacteriuria polimicrobiana es habitual, solíéndose aislar de tres a cinco especies de microorganismos (156). *Escherichia coli* predomina (153) pero también se pueden encontrar otras enterobacterias así como *Enterococcus*, *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Pseudomonas aeruginosa*, otras bacterias gramnegativas no fermentadores y *Candida* (156). *Proteus mirabilis* es un organismo frecuente en pacientes con catéteres crónicos permanentes ya que se aísla en aproximadamente el 40% de los urocultivos (157). *Proteus mirabilis* produce una biopelícula más abundante que otras bacterias que tiende a persistir durante períodos más largos (158).

1.5.5. Infección asociada a la ventilación mecánica

La infección respiratoria es la segunda infección nosocomial más frecuente (alrededor del 19 %) en los hospitales de España, muchas están asociadas con

ventilación mecánica, denominándose neumonías asociadas a ventilación mecánica (NAVVM) (127). Su incidencia oscila entre el 9 y el 67% de los pacientes que requieren ventilación mecánica y aumenta significativamente la estancia en la UCI ya que en un estudio realizado en 2016 que incluía a miles de UCI europeas se observó que hasta un 97% de los episodios de neumonía estaban asociados con intubación. El coste adicional por cada neumonía asociada a ventilación mecánica oscila entre 9.000 y 31.000 € (159,160).

Los principales factores de riesgo de NAVVM son la intubación y la duración de la ventilación mecánica. El aspirado de microorganismos de la orofaringe o el tracto gastrointestinal es la causa principal de NAVVM (161). Las defensas del huésped que incluyen la filtración y humidificación del aire en las vías respiratorias superiores, los reflejos epiglóticos, la tos, el transporte ciliar por el epitelio respiratorio, los fagocitos, opsoninas y la inmunidad humoral y mediada por células sistémicas previenen la invasión bacteriana. En la UCI, estas defensas suelen ser alteradas debido a las enfermedades subyacentes de los pacientes, la sedación o los dispositivos utilizados. Además, al estar intubados, el tubo endotraqueal mantiene las cuerdas vocales abiertas y facilita la aspiración de microorganismos (162).

Sin embargo, después de instaurarse los programas de prevención, el informe ENVIN (Estudio Nacional de Vigilancia de la Infección Nosocomial), muestra una reducción desde un 42% de NAVVM en 2010 al 30% en 2016. La NAVVM está causada principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, enterobacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (163,164). Sin embargo, la etiología de las NAVVM precoces (<7 días) están causadas por *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM) y las tardías (>7 días) suelen estar causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (160).

1.5.6. Endocarditis infecciosa asociada a prótesis valvular cardiaca

El principal inconveniente de la válvula protésica cardiaca son las complicaciones, como su obstrucción o la endocarditis infecciosa sobre válvula protésica (EIVP). La incidencia de EIVP es de 0,3-1,2% por paciente/año. Esta enfermedad está asociada

con altas tasas de comorbilidad, causa un sustancial gasto de la atención sanitaria y es potencialmente mortal. En la práctica clínica, la EIVP presenta un espectro heterogéneo de manifestaciones clínicas tales como fiebre, insuficiencia cardíaca y/o embolismos (165).

La EIVP se clasifica como temprana (perioperatoria) y tardía (no quirúrgica). La EIVP temprana tiene un pronóstico mucho peor que la EIVP tardía. Las diferencias etiológicas y su contexto clínico explican el pronóstico sombrío en la EIVP temprana y la necesidad de un tratamiento quirúrgico (166).

La prótesis valvular generalmente se coloniza durante la intervención quirúrgica o en el postoperatorio inmediato en el caso de la EIVP temprana. La mayoría son nosocomiales y los microorganismos proceden de la piel del paciente, del personal sanitario, o de la contaminación del sistema de circulación extracorpórea (*Staphylococcus epidermidis*, corinebacterias o bacterias difteromorfas) y, excepcionalmente, del ambiente (*Aspergillus*) (167). En la EIVP tardía, los microorganismos colonizan la prótesis en el curso de una bacteriemia o fungemia debida a una infección relacionada con un catéter, herida quirúrgica, del pulmón o de la vía urinaria. Es especialmente importante la asociación entre bacteriemia por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) asociada a cateterismos y el desarrollo de EIVP (168). Por otra parte, la EIVP por *Staphylococcus epidermidis* sólo se puede erradicar con la retirada de la prótesis, ya que este microorganismo produce una biopelícula en la prótesis que lo protege de la acción de los antibióticos y de los leucocitos (167).

1.6. Microorganismos causantes de infecciones asociadas a los cuidados sanitarios

Varios programas nacionales tienen como fin reducir las IACS. Entre las medidas básicas de prevención se incluyen el apoyo administrativo, la educación del personal de salud y una adecuada higiene de manos. En concreto, el programa STOP-BRC (Bacteriemias Relacionadas con Catéteres) tiene como objetivo la prevención de las

infecciones relacionadas con los catéteres centrándose en los siguientes puntos: a) Higiene adecuada de manos, b) Uso de clorhexidina en la preparación y cuidado de la piel de los pacientes hospitalizados, c) Uso de medidas de barrera total durante la inserción de los CVC, d) Uso preferente de la vena subclavia como lugar de inserción de los catéteres, e) Retirada de los CVC innecesarios, y f) Manejo higiénico de los catéteres (169).

En las infecciones del tracto urinario asociadas a la presencia de sonda uretral se recomienda mantener el sistema de drenaje cerrado ya que reduce el riesgo de infección. Para evitar la neumonía asociada a la ventilación mecánica, con una alta mortalidad, los pacientes deben colocarse en una posición semirrecostada y recibir cuidados orales que impidan la colonización microbiana e infección. La prevención de ISQ incluye la eliminación del vello de la zona, control de la glucemia y profilaxis antibiótica preoperatoria (170).

En 2017, la Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) publicó los resultados del ENVIN realizado en 205 UCI según el cual: el 31,6% de las infecciones nosocomiales eran infecciones urinarias asociadas a sondas, un 28,2% eran neumonías asociadas con ventilación mecánica, un 18,5% eran bacteriemias con un foco diferente de los catéteres, un 11,8% eran bacteriemias asociadas a catéter y un 10 % bacteriemias de origen desconocido (Figura 1.3 y Tabla 1) (171).

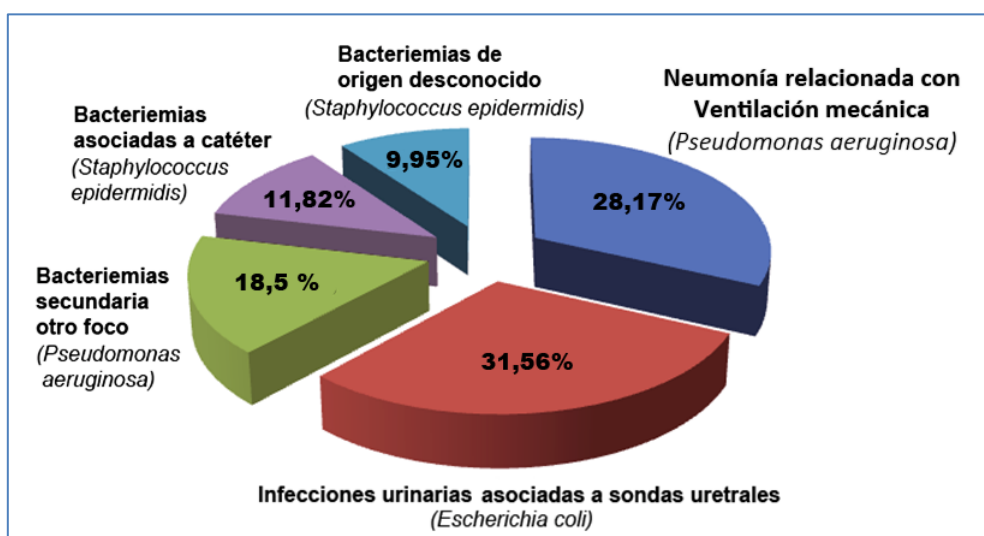


Figura 1.3. Infecciones nosocomiales adquiridas en la UCI y principal etiología.

Tabla 1.1. Microorganismos más frecuentemente aislados de pacientes críticos con infección adquirida en UCI (171).

MICROORGANISMOS	%
1. <i>Escherichia coli</i>	13,26
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,6
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11,02
4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	8,82
5. <i>Candida albicans</i>	5,62

En negrita los cuatro microorganismos analizados en esta Tesis doctoral.

1.6.1. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis es la especie predominante en patología humana dentro de los estafilococos denominados coagulasa negativos. Es una bacteria comensal muy abundante en la piel. Bajo determinadas circunstancias, como la implantación de un dispositivo biomédico (catéteres o prótesis), *Staphylococcus epidermidis* puede invadir los tejidos causando infecciones graves, como bacteriemias y endocarditis de válvula nativa (167). Los estafilococos coagulasa negativos se aíslan con mayor frecuencia en infecciones del torrente sanguíneo en UCI (172).

A diferencia de *Staphylococcus aureus*, los factores de virulencia asociados a *Staphylococcus epidermidis* no son tan numerosos y su acción patógena está estrechamente vinculada a su capacidad de formación de biopelículas (173). *Staphylococcus epidermidis* presenta una serie de factores de virulencia, sobre todo proteínas y exopolímeros (PIA), que contribuyen a la formación de biopelículas e inhiben la fagocitosis y la actividad de los péptidos antimicrobianos. Otros factores de virulencia pueden ser la producción de ácido poli- γ -glutámico que es un homopolímero lineal de residuos de glutamato, común en las bacterias halófilas, que actuaría como un osmoprotector, la secreción infrecuente de toxinas como la enterotoxina C3 (SEC3) y la toxina similar a enterotoxina L (SEIL), la producción de péptidos proinflamatorios PSM con múltiples funciones de evasión del sistema inmunitario y en la formación de biopelícula, pudiendo ser además citolíticas, y la presencia de proteasas, como SepA que degrada los péptidos antimicrobianos o como Esp que degrada colágeno y el factor del complemento C5 (173).

- **Formación de la biopelícula**

La formación del biopelícula por *Staphylococcus epidermidis* se desarrolla en tres fases: adherencia y acumulación, maduración y dispersión.

- *Fase de adhesión*

El paso inicial de *Staphylococcus epidermidis* es su adhesión a un cuerpo extraño o biomaterial. Estas interacciones iniciales son inespecíficas y de naturaleza hidrófoba (174,175). Sin embargo, se han identificado proteínas específicas que median esta unión a superficies abióticas como las adhesinas / autolisinas bifuncionales denominadas AtlE y Aae (176,177) para la adherencia por unión no covalente a vitronectina o liberando ADNe que es un importante factor de adherencia y de agregación también en *Staphylococcus aureus* (51).

Los biomateriales se recubren rápidamente con las proteínas presentes en sangre como fibronectina, colágeno, fibrinógeno y vitronectina. Los estafilococos tienen múltiples factores de adherencia, conocidos como componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMM, Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) que se unen a estas proteínas plasmáticas (178).

Los MSCRAMM más estudiados en *Staphylococcus epidermidis* son la proteína SdrG, de unión al fibrinógeno, y la SdrF, de unión al colágeno. La eliminación de SdrG disminuye la adherencia a las superficies revestidas de fibrinógeno. Los anticuerpos contra SdrG causan una disminución de la adherencia de *Staphylococcus epidermidis* a biomateriales in vivo (179,180). También se ha observado que los anticuerpos anti-SdrF reducen significativamente la adherencia de la bacteria a los dispositivos de asistencia ventricular (181,182). Christner et al. constataron que una isoforma de 460 kDa de Embp era capaz de unirse a la fibronectina y mediar en la formación de biopelícula en aislamientos que no presentan el gen *ica* productor del exopolímero PIA. Además, la biopelícula mediada por Embp era resistente a la fagocitosis por macrófagos, lo que sugiere que Embp es suficiente para formar biopelículas funcionales y clínicamente relevantes por algunos aislamientos de *Staphylococcus epidermidis* (183).

- Fase de formación de biopelícula

La síntesis de PIA o PNAG es el mecanismo de acumulación de biopelícula mejor estudiado en *Staphylococcus epidermidis*. Sin embargo, muchos aislamientos de *Staphylococcus epidermidis* causantes de infección son PIA negativos. La biopelícula en estos aislamientos está mediada por proteínas, ya parecen ser sensibles a proteasas pero resistentes a enzimas degradadoras de polisacáridos (184).

El PIA es sintetizado por los productos del operón *ica* el cual se compone de cuatro genes: *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*. Por otra parte, *icaR* es un represor que se encuentra antes del operon *IcaABCD*. Gerke et al. descubrieron que tanto *IcaA* como *IcaD* son proteínas de membrana que actúan en conjunto como UDP-N-acetilglucosaminiltransferasas. *IcaC*, también constituiría una proteína de membrana que actuaría en la translocación de polisacáridos sintetizados por *IcaA* e *IcaD* a través de la membrana citoplasmática (185,186). *IcaB* actúa como una desacetilasa siendo la desacetilación de PIA necesaria para su fijación a la superficie celular, la formación de biopelícula, la colonización de superficies y la evasión del sistema inmunitario (186). La importancia de PIA en la virulencia de *Staphylococcus epidermidis* se ha demostrado en infecciones asociadas a biodispositivos en ratas (41,187). La secreción de PIA media la adhesión inicial a polímeros, la adhesión entre bacterias y facilita la formación de biopelícula. PIA actúa como facilitador de la formación de biopelícula, la persistencia de las infecciones y la disminución de la eficacia de los antibióticos.

En las infecciones que no codifican *icaADBC*, la acumulación de biopelícula la realizan proteínas que incluyen *Embp* y otras dos proteínas específicas denominadas *Aap* y *Bhp*. *Aap* es una proteína LPXTG (motivo Leu-Pro-X-Thr-Gly) de 220 kDa que es procesada tanto por bacterias como por proteasas del hospedador a una forma activa dando lugar a una proteína fibrilar que es extruida de la célula en una especie de mechones localizados (188,189). La acumulación de *Aap* está mediada por la dimerización dependiente del Zn^{2+} de los dominios B, mientras que el dominio A media la adhesión a los corneocitos de la piel, nicho frecuente de *Staphylococcus epidermidis* (190). Se desconoce la función de *Aap* en un biopelícula dependiente de PIA. Sin embargo, los anticuerpos policlonales contra *Aap* de la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (sintetizadora de PIA) inhibían la formación de biopelícula

hasta en un 87%. Este hecho sugiere que la proteína Aap juega un papel en la adhesión o la maduración inicial de la biopelícula [86].

En contraste con Aap, que se encuentra en aproximadamente el 90% de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus epidermidis*, Bhp se codifica en aproximadamente 15-45% de los aislamientos y se ha demostrado que también induce la formación de biopelícula y su acumulación en ausencia de PIA (191).

Estudios con microarrays han demostrado que tanto *Staphylococcus epidermidis* como *Staphylococcus aureus* creciendo en estado de biopelícula tienen respuestas únicas de transcripción en comparación con las células planctónicas que crecen exponencialmente. Por ejemplo, se ha demostrado que los estafilococos que crecen como biopelícula cambian su fisiología a un metabolismo anaeróbico o microaeróbico con una regulación negativa de la síntesis de proteínas, de la pared celular y el ADN (192,193).

Rani et al. han demostrado recientemente que las células sésiles de *Staphylococcus epidermidis* del interior de una biopelícula presentan al menos tres estados metabólicos (crecimiento aeróbico, crecimiento anaeróbico y células latentes) así como células muertas, y asocian estos estados fisiológicos a su potencial tolerancia a los antibióticos (194).

- Fase de desensamblado y dispersión

El proceso de desensamblado de la biopelícula involucra múltiples pasos que incluyen la degradación de la matriz extracelular y cambios fisiológicos en las células para prepararse a las condiciones externas a la biopelícula. Durante el desensamblado de la biopelícula, las bacterias pasan de un estado en el que son resistentes a los antimicrobianos a otro donde son sensibles a estos (195).

Los beneficios que proporciona la biopelícula a la comunidad microbiana son enormes. Sin embargo, estas estructuras también tienen un coste con situaciones posibles en las que el mantenimiento de la biopelícula es desfavorable. La producción de matriz es una carga energética muy grande para la síntesis de moléculas. El riesgo más significativo se produce cuando las condiciones locales se deterioran, por ejemplo, cuando se agotan los nutrientes del medio en el que se encuentra la biopelícula, con la

acumulación de compuestos residuales tóxicos o con la aparición de agentes antimicrobianos y otras amenazas. La capacidad para evadir este tipo de estrés es reducida porque las células se encuentran confinadas en la matriz. En estas situaciones, las bacterias cuentan con mecanismos para separarse de las biopelículas y asumir nuevamente un estilo de vida planctónico y dispersarse hacia hábitats más propicios (42).

Muchos de los mecanismos de desensamblado de la biopelícula estafilocócica están basados en la degradación o solubilización de la matriz. El principal mecanismo de desensamblado utilizado por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* es la producción de enzimas extracelulares que incluirían proteasas y ADNasas y compuestos tensioactivos como las PSM que degradan y solubilizan los componentes adhesivos en la matriz de la biopelícula. La degradación de la matriz que encierra a las células bacterianas en su interior, permite el desprendimiento celular y su liberación al medio.

En *Staphylococcus* el sistema regulador que controla la producción de estas enzimas que degradan la matriz se denomina sistema regulador de genes accesorio (*agr*). El proteoma extracelular *agr* incluye múltiples proteasas y pequeñas toxinas formadoras de poros llamadas PSM. Las PSM son péptidos similares a surfactantes producidas por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* que contribuyen al desensamblado de la biopelícula y que promueven la diseminación de las bacterias en catéteres colonizados en un modelo de ratón (196). Además, los anticuerpos contra las PSM provocan la propagación de las bacterias desde los catéteres implantados, indicando la posible utilidad de la manipulación del proceso de desensamblado de la biopelícula en la prevención de la propagación de la infección y el pronóstico de la enfermedad. Los principales mecanismos de desmontaje se describen en la tabla 1.2 (197).

Tabla 1.2. Mecanismos de desensamblado de la biopelícula estafilocócica.

Especies	Componente	Mecanismo
<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Activación de <i>agr</i>	Expresión de factores reguladores de <i>agr</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Péptido autoinductor (AIP, auto-induced peptide)	Activación del sistema <i>agr</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Modulinas solubles en fenol	Desensamblado mediado por surfactante
<i>Staphylococcus aureus</i>	Inducción de la expresión de proteasa extracelular	Cortar las proteínas de la matriz
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cambio de pH	Reactivación de <i>agr</i> u otros sistemas reguladores
<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Adición de ADNasa I	Degradación del ADN de la matriz
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Adición de dispersina B	Degradación de polisacárido de la matriz
<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Proteinasa K, tripsina, V8, Esp u otra adición de proteasas	Degradación de proteínas de la matriz
<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Adición de lisostafina	Degradación de la pared celular
<i>Staphylococcus aureus</i>	Adición de ácido Cis-2-decenoico	Desconocido
<i>Staphylococcus aureus</i>	D-aminoácidos	Desconocido

1.6.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo que no esporula. Se utiliza como modelo para diferentes estudios en bioingeniería y microbiología industrial (198). La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* viven en el intestino de animales de sangre caliente donde forma parte de la microbiota. Sin embargo, varias cepas de *Escherichia coli* pueden causar morbilidad y mortalidad en pacientes con infecciones asociadas a dispositivos médicos (199). La formación de biopelículas en sondas urinarias la convierten en la especie más frecuentemente encontrada en infecciones del tracto urinario (172).

Escherichia coli es una especie genéticamente heterogénea con diferentes factores de virulencia implicados en la persistencia y colonización del tracto urinario que incluyen adhesinas de las fimbrias y otras adhesinas, toxinas (hemolisina y factor necrotizante citotóxico), sideróforos y polisacáridos capsulares.

La mayoría de las adhesinas son fimbrias proteicas que se unen a receptores específicos situados en las membranas de las células epiteliales. Una misma cepa puede contener simultáneamente varias adhesinas. La fimbria tipo 1 es la más universal y está presente en casi la totalidad de las cepas de *Escherichia coli* y de la familia *Enterobacteriaceae*. Su receptor es la α -D-manosa presente en las membranas de la mayoría de las células del huésped. Las fimbrias tipo 1 parecen desempeñar un papel fundamental en el comienzo de la infección. En las vías urinarias se une a la proteína Tamm-Horsfall, un uromucoide rico en manosa excretado por las células epiteliales urinarias. Esta unión actúa como un mecanismo de defensa inespecífico, ya que evita la unión de *Escherichia coli* a sus dos receptores urinarios principales, las uroplactinas Ia e Ib. La unión a la proteína Tamm-Horsfall favorece la eliminación urinaria de *Escherichia coli*. En la vejiga, la adhesina FimH presente en el extremo distal de la fimbria tipo 1, se une e interacciona con la uroplactina. Esta unión parece ser la señal para activar la cascada defensiva del huésped que incluye la muerte programada y la exfoliación de las células del epitelio vesical y la activación de los mediadores de respuesta inflamatoria (interleucinas y factor de necrosis tumoral [TNF, Tumor Necrosis Factor]) (200).

Otro tipo de adhesinas son las fimbrias P que presentan tres variantes moleculares (I, II y III) y se unen a receptores distintos. Probablemente las tres variantes ejercen funciones distintas. La variante II de la fimbria P está asociada a la pielonefritis. Sus receptores, constituidos por los glucoesfingolípidos, se encuentran en la vagina, la vejiga, los uréteres y los túbulos renales, lo que facilita la ascensión de los *Escherichia coli* hasta la pelvis renal (200).

- **Formación de la biopelícula**

Se pueden distinguir cuatro etapas en la formación de la biopelícula por *Escherichia coli*: adhesión inicial (reversible), desarrollo temprano de la estructura de la biopelícula (irreversible), maduración de la biopelícula y dispersión de las células de la biopelícula.

- *Fase de adhesión inicial*

La superficie para la fijación de la bacteria puede ser tanto abiótica (metal, vidrio, plástico, implantes médicos o acero inoxidable) como biótica (células epiteliales, piel y tejidos animales). Además de las condiciones ambientales, como la temperatura, el pH y la fuerza iónica del medio, existen fuerzas electrostáticas e hidrodinámicas repulsivas en un ambiente líquido que inhiben la formación de la biopelícula. Los flagelos de *Escherichia coli* ayudan a superar estas fuerzas con el aumento de la interacción entre la bacteria y la superficie, proporcionando el primer contacto célula-superficie para la adhesión. La motilidad de *Escherichia coli* es un factor importante para la adhesión (201).

- *Desarrollo temprano del biofilm*

Durante la primera fase del desarrollo de la biopelícula, la síntesis de los flagelos se reprime y las bacterias pasan a un modo de vida sésil unidas a la superficie. Varias moléculas pequeñas, como c-di-GMP, son responsables de este cambio de estado de planctónico a sésil. La concentración de c-di-GMP es baja en estado de motilidad y aumenta durante la formación de la biopelícula. Se han descrito también dos tipos de autoinductores (AI) de QS en bacterias gramnegativas (AI-1 y AI-2). Las moléculas AI-1 corresponden a AHL y el AI-2 es un diéster de furanosil borato.

Los orgánulos adhesivos tales como las fimbrias de tipo 1 o las fimbrias Curli juegan un papel importante en la unión irreversible de *Escherichia coli* a la superficie (202). Las fimbrias de tipo 1 son importantes para la fijación inicial a las superficies abióticas y están codificadas por el gen *fim*. Su expresión es inducida por la adhesión y el desarrollo inicial de la biopelícula. Las fimbrias Curli, codificadas por el gen *csg*, se unen a las proteínas de la matriz extracelular. También proporcionan adherencia a las superficies abióticas mejorando la interacción célula-superficie y facilitan la comunicación intercelular (201). Los genes atribuidos en la formación de biofilm se muestran en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Genes involucrados en el QS de *Escherichia coli*. (203)

Gen	Proteína sintetizada	Función	Localización
<i>luxS</i>	S-ribosilhomocisteína liasa	Sintetiza el autoinductor 2. Estimula la formación y arquitectura de la biopelícula.	Citoplasma
<i>mqsR</i>	MqsR	Regula la motilidad, el QS y regula positivamente a <i>qseBC</i> .	Citoplasma
<i>qseB</i>	La proteína reguladora transcripcional QseB	Regulador de respuesta en la síntesis de flagelos. Activa la transcripción de <i>FlhDC</i> y regula la motilidad.	Citoplasma
<i>qseC</i>	Proteína sensora QseC	Quinasa receptora de los autoinductores.	Membrana celular interna
<i>pfs</i>	5'-metiltioadenosina/S-adenosilhomocisteína nucleosidasa	Precursor de AI-2. Convierte S-adenosil homocisteína (SAH) a S-adenosil homocisteína mediante la eliminación de adenina. Regula el conjunto de flagelos bacterianos.	Citoplasma
<i>flhD</i>	Regulador transcripcional flagelar FlhD	Factor Sigma que activa los operones del flagelo de clase 3. Componente del Complejo Motor Flagelar.	Citoplasma
<i>fliA</i>	Factor sigma FliA de la RNAPolimerasa	Genera la fuerza para la rotación del motor flagelar.	Citoplasma
<i>motA</i>	Mot A	Fosforila al AI-2 evitando la unión con el represor regulado por LuxS (lsrR)	Proteína integral de membrana

<i>lsrK</i>	Autoinductor 2 quinasa LsrK	Reprime el complejo transportador LsrABCD en ausencia de AI-2	Citoplasma
<i>lsrR</i>	Regulador transcripcional LsrR	Inactivado en presencia de AI-2 ya que se une a la AI-2 fosforilada	Citoplasma
<i>csrA</i>	Regulador de almacenamiento de carbono	Motilidad y biosíntesis de flagelos a través de la activación post- transcripcional de la expresión de flhDC	Citosol

- Fase de maduración

Una vez que *Escherichia coli* se adhiere firmemente a la superficie, comienza a agregarse a través de una interacción célula a célula. En este punto las bacterias producen la matriz extracelular que proporciona una estructura tridimensional a la biopelícula. Los llamados autotransportadores y las sustancias poliméricas extracelulares (EPS, *Extracellular polymeric substances*) son cruciales para la maduración del biofilm. Las proteínas que no requieren la ayuda de proteínas accesorias para su translocación a la membrana externa se denominan proteínas autotransportadoras (201). El antígeno 43 (Ag43) es un autotransportador codificado por el gen *flu* que promueve la adhesión entre células, facilitando así la agregación y el desarrollo tridimensional de la biopelícula. Las proteínas transportadoras AidA y TibA se observan en cepas virulentas de *Escherichia coli* y causan agregación y promueven la formación de biofilm (204).

La producción de EPS es la mayor característica que distingue a las bacterias sésiles de las planctónicas. La matriz EPS es el medio a través del cual las células se unen a la superficie y facilitan las interacciones intercelulares generando una arquitectura tridimensional con un papel protector y estructural. El agua es uno de los principales componentes de la EPS, junto con componentes extrapoliméricos, proteínas, ácidos nucleicos, nutrientes, lípidos y otros metabolitos (205). El biofilm de *Escherichia coli* contiene tres exopolisacáridos principales: la 1,6-β-N-acetil-D-glucosamina (PGA), la celulosa y el ácido colánico. Sin embargo, el lipopolisacárido (LPS) y la cápsula son también importantes en la formación de la biopelícula de *Escherichia coli*. La PGA media en la adhesión intercelular y con la superficie. También sirve como una adhesina que estabiliza el biofilm de *Escherichia coli*. El operón

pgaABCD de *Escherichia coli* codifica proteínas que incluyen la glicosiltransferasa Pga C que está implicada en la síntesis, exportación y localización del polímero PGA. La celulosa, sintetizada por la celulasa sintasa BcsA, es responsable de la rigidez de la biopelícula. El ácido colánico o antígeno M forma una cápsula alrededor de las células bacterianas y las protege de posibles condiciones adversas. Los otros componentes, lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares (antígeno K), juegan un papel indirecto en la formación de biopelículas al facilitar la interacción entre las células bacterianas y el medio en el que se encuentran. El LPS también juega un papel importante en la adhesión al interactuar con los factores de adhesión expuestos en la superficie celular (203).

- Fase de dispersión

Este paso final incluye el desprendimiento de bacterias del biofilm maduro y su dispersión. La dispersión puede causar que las células planctónicas se alojen en un sitio distante y formen una nueva biopelícula. El desprendimiento puede ocurrir como resultado de la degradación enzimática de la matriz del biofilm en respuesta a los cambios ambientales relacionados con el gradiente de nutrientes y el agotamiento del oxígeno (121). Sin embargo, la dispersión es un proceso complejo que involucra varias señales y efectores ambientales y no existe un único mecanismo de dispersión que sea utilizado por todas las especies bacterianas. Por ejemplo, según un estudio de Vogeleer et al. (204), la modulación de estructuras superficiales cruciales como las fimbrias que forman el haz de tipo IV en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC, *Enteropathogenic Escherichia coli*) y de las fimbrias de adherencia agregativa (AAFs) adherentes en *Escherichia coli* enteroagregante EAEC resultan en el desprendimiento de las bacterias de la biopelícula. Esto se produce debido a que las fimbrias AAFs cargadas positivamente sobresalen de la superficie celular bacteriana para adherirse a otras superficies. Sin embargo, esta unión se puede dar mientras se esté sintetizando una molécula conocida como dispersina que se une al LPS de la bacteria y neutraliza sus cargas negativas. Cuando se inhibe la expresión de la dispersina las fimbrias AAF colapsan en la superficie bacteriana adhiriéndose al LPS y la bacteria deja de adherirse a la superficie dispersándose la biopelícula.

1.6.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una especie que incluye bacilos gramnegativos de la familia *Pseudomonadaceae*. El género *Pseudomonas* está muy extendido en la naturaleza, habitando suelos, agua, plantas y animales. Es un patógeno oportunista que rara vez causa enfermedad en personas sanas, pero que causa infecciones graves en pacientes con inmunodeficiencias. Su adaptabilidad y alta resistencia intrínseca a los antibióticos le permiten sobrevivir en una amplia gama de entornos naturales y artificiales, incluyendo superficies de dispositivos médicos. Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* suelen ser nosocomiales y casi todas están asociadas a estados de neutropenia prolongada, quemaduras graves o fibrosis quística (206).

Pseudomonas aeruginosa es el segundo microorganismo más frecuentemente aislado en infecciones nosocomiales después de *Escherichia coli* en España (127). Además es el microorganismo más frecuentemente aislado en neumonías en UCI de Europa (172).

La resistencia a los antibióticos se debe en gran parte a la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para formar biopelícula en catéteres y tubos de ventilación. Aunque las tasas varían entre los estudios y las instituciones, la NAVM generalmente presenta una gran mortalidad, que puede alcanzar el 30% (207). Los pacientes con NAV a menudo presentan daños en el epitelio traqueal debido a la inserción del tubo endotraqueal, que puede colonizarse por *Pseudomonas aeruginosa* y desarrollar una biopelícula en la superficie del material (207).

Pseudomonas aeruginosa produce un gran número de factores de virulencia (Figura 1.4). Los flagelos y los pili de tipo 4 son sus principales adhesinas, capaces de unirse a los gangliósidos epiteliales asialoGM1 y asialoGM2 del huésped. Junto con el lipopolisacárido, estos apéndices de superficie son también altamente inflamatorios. Una vez que se produce el contacto con el epitelio del huésped, el sistema de secreción tipo III se activa y diversas citotoxinas son inyectadas directamente en la célula huésped. Se conocen cuatro proteínas efectoras: ExoY, ExoS, ExoT y ExoU. Todas participan en la citotoxicidad de *Pseudomonas aeruginosa* que lleva a la invasión y diseminación de *Pseudomonas aeruginosa*. También existen otros factores de virulencia segregados a través del sistema de secreción tipo II en el espacio

extracelular, como la elastasa, la fosfatasa alcalina, la exotoxina A y la fosfolipasa C que participan en la invasión destruyendo el glicocálix protector del epitelio respiratorio y exponiendo los ligandos epiteliales a *Pseudomonas aeruginosa* (208). También libera compuestos como la pioverdina, un pigmento azul verdoso, que puede interferir con las vías de transporte de electrones de la célula huésped y el ciclo redox, o la pioverdina que captura Fe^{3+} para dar una ventaja competitiva en un ambiente en el que el hierro libre es escaso (206).

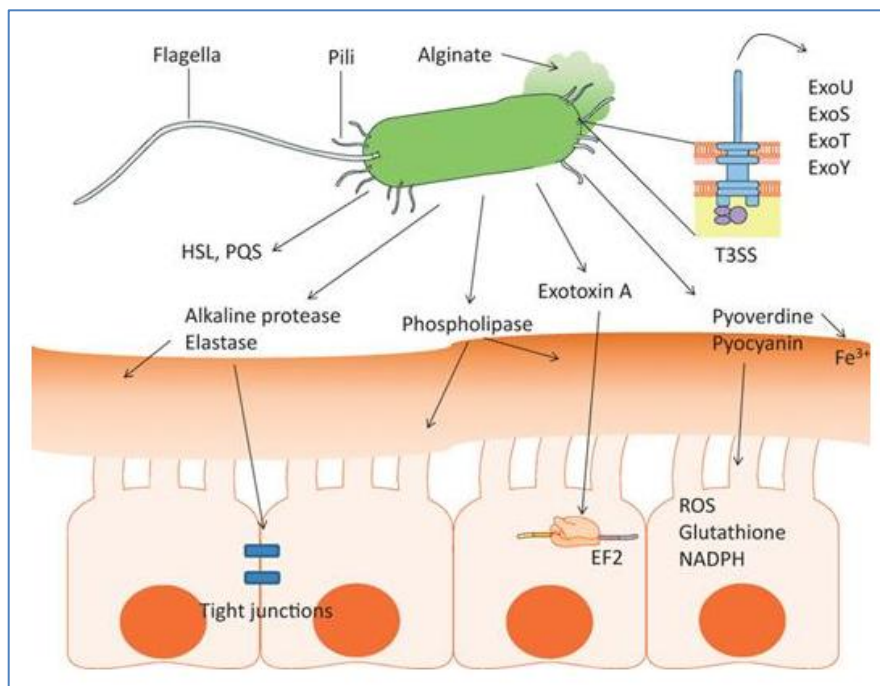


Figura 1.4. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* (206).

El fenotipo encontrado en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en infecciones agudas difiere sustancialmente del fenotipo encontrado en infecciones crónicas (209). Los primeros expresan una gran cantidad de factores de virulencia, mientras que muchos aislamientos de infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística carecen de algunas de las típicas estructuras proinflamatorias, como los flagelos o los pili, y además regulan negativamente otros mecanismos de virulencia, como el sistema de secreción tipo 3 (T3SS) (210). Sin embargo, los aislamientos de infecciones crónicas forman con mayor facilidad biopelículas y sobreexpresan un exopolisacárido característico de *Pseudomonas aeruginosa* denominado alginato, convirtiendo estas cepas en cepas mucoides (208).

- **Formación de la biopelícula**

Como anteriormente se ha descrito la formación y desarrollo de la biopelícula se puede dividir en fases.

- *Fase de adhesión*

Muchos estudios sobre la fijación inicial de bacterias sugirieron la participación de enlaces químicos simples, como las fuerzas de Van der Waals. Sin embargo, el desarrollo de biopelículas en su primera etapa se compone de eventos mucho más complejos.

Tras ese primer contacto reversible sigue una unión irreversible mediada por los pili tipo 4, flagelos y unos apéndices extracelulares llamados fimbrias Cup (fimbrias Fap o Fim en *Escherichia coli*) que tienen diversas funciones, como promover la adhesión a superficies inertes, mediar la adherencia a los tejidos del huésped a través de adhesivos específicos, o facilitar la evasión de las defensas del huésped (211). Se ha demostrado que en el inicio de la formación de la biopelícula se produce un aumento de c-di-GMP. Muchos tipos de señales ambientales pueden causar un aumento de c-di-GMP que activa la producción de adhesinas y otros productos de la matriz extracelular (16,212). Por ejemplo, el contacto de *Pseudomonas aeruginosa* con una superficie es reconocido por la proteína WspA, una proteína receptora unida a la membrana, generando una señal que acaba produciendo un aumento de c-di-GMP y que a su vez regula positivamente la producción de adhesinas y polisacáridos como CdrA, Psl, Pel, y alginato (213,214).

- *Fase de maduración*

Después de que las bacterias se adhieren a las superficies o entre sí, experimentan una serie de cambios para adaptarse al nuevo modo de vida. A medida que *Pseudomonas aeruginosa* se adhiere a la superficie, crece y va formando microcolonias que generan una matriz extracelular. La matriz está compuesta principalmente por sustancias poliméricas extracelulares que son segregadas como polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular. *Pseudomonas aeruginosa* secreta tres polisacáridos característicos: Pel, Psl y alginato, cada uno de los cuales proporciona diferentes propiedades fisiológicas a la matriz. Psl es responsable de la formación de

una tela que cohesiona las células de la biopelícula. Las proteínas codificadas por el grupo de genes *Pel* producen exopolisacáridos ricos en glucosa que son necesarios para la formación de una biopelícula asociada a las superficies, a la formación de agregados en la interfase aire-líquido e imparte un fenotipo arrugado a la colonia. En cuanto al alginato, es un polisacárido que se encuentra sobreexpresado en las cepas mucoides características de pacientes con fibrosis quística, y se cree ayuda a proteger a la bacteria de los mecanismos de defensa del sistema inmunitario (206).

Durante las primeras etapas del desarrollo de la biopelícula, el ADNe es el principal componente que mantiene las células unidas, pero a medida que la biopelícula madura, otras sustancias mantienen esta cohesión. El ADNe procede de la lisis de una pequeña población de células (215). Los ramnolípidos, glicolípidos anfipáticos, desempeñan múltiples funciones en el establecimiento y mantenimiento de la biopelícula ya que son necesarios para facilitar la formación de la estructura en forma de hongo, el mantenimiento de canales abiertos, la formación de microcolonias y el desprendimiento celular (216).

A medida que el biofilm madura, las bacterias experimentan cambios fisiológicos y se vuelven mucho más resistentes a las tensiones del medio ambiente y a los antibióticos. El desarrollo y maduración de la biopelícula está estrechamente relacionado con la señalización por QS.

Además del c-di-GMP, *Pseudomonas aeruginosa* produce tres autoinductores que regulan el QS. Dos de estos autoinductores, la 3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3-oxo-C12 HSL) que actúa sobre el activador transcripcional de LasR, y la butiril homoserina lactona (C4 HSL) que actúa sobre el activador transcripcional RhIR, son AHLs. Un tercer autoinductor es una 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona que se sintetiza mediante un proceso complejo de múltiples etapas que implica a dos operones (*pqsABCDE* y *phnAB*), y a tres genes situados fuera de estos, los operones (*pqsR*, *pqsH*, y *pqsL*). Este sistema de QS controla la supervivencia celular, la resistencia y la virulencia: las cepas deficientes en cualquiera de estos sistemas presentan una capacidad patógena reducida (217).

- Fase de dispersión

Es la fase final del desarrollo de la biopelícula. Hay tres maneras de liberación y dispersión celular de la biopelícula: desprendimiento, erosión y dispersión activa. Los mecanismos de desprendimiento de una parte de la masa original de la biopelícula o la erosión por lavado de una pequeña parte de la biomasa o de las bacterias de la superficie externa son pasivos y están mediados por el estrés de la fuerza de flujo del medio en el que se encuentra la biopelícula (11,218). La dispersión activa es un mecanismo de desprendimiento activo por el que las biopelículas liberan células planctónicas únicas o pequeñas porciones de biopelícula dejando un hueco o cavidad. Este tipo de dispersión comienza al formarse una cavidad en la parte interior de la biopelícula al alcanzar la microcolonia un tamaño crítico ($> 80 \mu\text{m}$ en *Pseudomonas aeruginosa*). Las cepas mutantes deficientes en una motilidad basada en flagelos no son capaces de formar estas cavidades, por lo que la motilidad celular debería estar reprimida en la etapa de formación de microcolonias pero inducida en la dispersión de la biopelícula (218). Las enzimas que degradan la EPS pueden causar la diferenciación y dispersión espacial al destruir y modificar la matriz de la biopelícula. Las enzimas efectoras para la destrucción de la matriz incluyen las ADNasas, las enzimas de degradación de polisacáridos, las proteasas, etc. (216).

La dispersión también puede ser inducida por señales ambientales: disponibilidad de nutrientes, oxígeno, óxido nítrico (NO), pH y diversos productos químicos. Por ejemplo, un aumento repentino en el suministro de glucosa puede disminuir la c-di-GMP intracelular, lo que aumenta la producción de flagelos e induce a la dispersión. Por otra parte, el suministro limitado de oxígeno también puede inducir la dispersión por un aumento de la degradación de c-di-GMP. Otro compuesto que promueve la dispersión es NO que estimula la actividad fosfodiesterasa, que disminuye la concentración intracelular de c-di-GMP. Además, existen diversos productos químicos que contribuyen a la dispersión, como quelantes metálicos, ácido cis-2-decenoico, antranilato y otros agentes tensioactivos (216).

1.6.4. *Candida albicans*

Candida albicans es parte de la microbiota del tracto gastrointestinal, el aparato reproductor, la cavidad oral y la piel de la mayoría de los seres humanos. La alteración de la microbiota con el uso de antibióticos, la neutropenia o las inmunodeficiencias pueden favorecer la infección por *Candida albicans*. Estas infecciones van desde infecciones leves superficiales de la mucosa y de la piel, como candidiasis oral o vaginal, hasta infecciones invasoras con alta mortalidad (alrededor del 40% en algunos casos). Las candidiasis son especialmente graves en personas con inmunodeficiencia y en pacientes críticos con dispositivos médicos (219).

Candida albicans es la especie predominante en infecciones asociadas con el uso de dispositivos médicos y es una causa frecuente de infecciones en las UCI (172). La formación de biopelículas de *Candida albicans* es frecuente en catéteres venosos centrales y urinarios, marcapasos, válvulas cardíacas, prótesis articulares, lentes de contacto y dentaduras postizas. Cabe destacar también el papel que juega *Candida* en la microbiota oral, ya que es causa común de infección asociada a prótesis dentarias y el porcentaje de portadores aumenta con la edad del paciente aislándose en un 60% de las bocas de personas mayores de 60 años (220). La adhesión es un prerrequisito esencial para la colonización e invasión y, consecuentemente, en la patogenia de las enfermedades oportunistas de las que es responsable (221).

• Formación de la biopelícula

La estructura de la biopelícula fúngica refleja la secuencia de los eventos de división celular que ocurren durante el desarrollo de ésta (222). En la fase inicial, las células se adhieren al sustrato. Posteriormente, se dividen aún como blastoconidia (levadura) produciendo microcolonias que se unen en una capa base para la biopelícula entrando en una etapa intermedia de alta actividad metabólica con el desarrollo de hifas y de la matriz extracelular. En la fase de maduración, se produce una gran acumulación de material de la matriz extracelular.

- Fase de adhesión

La capacidad de las células de una biopelícula para adherirse entre sí y a diversas superficies (dispositivos médicos o mucosas) es importante en todas las etapas del desarrollo de la biopelícula de *Candida albicans*.

La pared celular es la estructura que interactúa más directamente en el proceso de adhesión está compuesta principalmente por carbohidratos y glucoproteínas. Los carbohidratos como el 1,3- β -D-glucano y la quitina forman el núcleo interno de la pared celular confirmando su resistencia mecánica. Las manoproteínas, con una función de adhesinas, forman una capa fibrilar externa (223).

Muchas adhesinas de *Candida albicans* tienen una secuencia C-terminal que se utiliza para el anclaje covalente de un glicofosfatidilinositol (GPI) (224). Este GPI ancla la proteína inicialmente en la cara externa de la membrana plasmática, posteriormente el GPI es cortado y la proteína es transferida al β -1,6- D-glucano quedando ya unida a la pared celular (224). Las adhesinas de esta clase incluyen miembros de la familia Als (*Agglutinin-like sequence*), Eap1 (*Enhanced adherence to polystyrene 1*), Hwp1 (*Hyphal wall protein 1*), y Rbt1 (*Repressed by TUP1*), que se expresan más en las hifas que en las levaduras. La Ywp1 (*Yeast wall protein 1*) se expresa más en levaduras, actuando como una antiadhesina: las levaduras que carecen de Ywp1 son más adhesivas y forman biopelículas más consistentes (225). También hay proteínas que actúan como adhesinas pero carecen de anclaje GPI, como la Mp65 (*65 kDa mannoprotein*), Csh1 (*Cell surface hydrophobicity-associated protein 1*) y Pra1 (*pH-regulated antigen 1*) (224,226,227).

La formación de biopelículas por *Candida albicans* puede ocurrir en una amplia gama de condiciones y los requisitos genéticos pueden variar de una condición a otra.

- Fase de formación de hifas

Candida albicans es un hongo polimorfo, con diferentes morfologías según las condiciones ambientales. Las hifas son un componente estructural importante de las biopelículas de *Candida albicans* y varios de los genes requeridos para el desarrollo de las hifas son necesarios para la formación de biopelículas, como los genes reguladores de transcripción *efg1*, *tec1*, *ndt80* y *rob1*. Las hifas en las biopelículas contribuyen a la

estabilidad estructural de la biopelícula, actuando como un soporte para las levaduras y otras hifas. La capacidad de formar hifas es crucial en el desarrollo y mantenimiento de la biopelícula y también lo es la capacidad de estas hifas para adherirse entre sí y a otras levaduras. De hecho, otro factor regulador de la transcripción conocido como *Bcr1* no es necesario para la formación de hifas pero sí para que las hifas se adhieran entre sí durante la formación de biopelículas (219).

- Fase de producción de material extracelular

Una biopelícula madura muestra una arquitectura compleja con diversos tipos de células enredadas en la matriz extracelular. La matriz de la biopelícula de *Candida albicans* se caracterizó por primera vez en 2006 por Al-Fatanni y Douglas (228) que encontraron carbohidratos, proteínas, hexosaminas, fósforo y ácido urónico. Además, observaron que el tratamiento con enzimas, como la 1,3- β -D-glucanasa, proteinasa K, ADNasa I, quitinasa y β -N-acetilglucosaminidasa, comprometía la cohesión de la biopelícula. Por otra parte, Nett y colaboradores (229) manipularon el gen *fks1*, que es responsable de la síntesis de 1,3- β -D-glucano en la pared celular, y observaron que una disminución o aumento de su expresión produce un cambio en la concentración de 1,3- β -D-glucano en la matriz de biopelícula. Además, las cepas con actividad reducida de *FKS1* producían biopelículas notablemente más sensibles a fluconazol, mientras que durante el crecimiento planctónico no hubo ningún cambio en la sensibilidad al fluconazol. El 1,3- β -D-glucano soluble en la matriz extracelular confiere a la biopelícula resistencia a los azoles y la adición de matriz extracelular a las células planctónicas confiere resistencia al fluconazol (229).

Por lo tanto, la matriz de biopelícula de *Candida albicans* se relaciona tanto con la integridad de la biopelícula como con la resistencia a los fármacos antifúngicos. Además, la producción de matriz extracelular puede variar considerablemente con las condiciones de crecimiento, por ejemplo, existen variaciones cuando las biopelículas se cultivan estáticamente o dinámicamente (230), o al emplear diferente medio de cultivo (231).

- Fase de dispersión

La dispersión de células desde una biopelícula de *Candida albicans* al medio es una etapa importante. Las células se dispersan continuamente durante la formación de la biopelícula, principalmente en forma de levadura. Sin embargo, a pesar de que estas células dispersadas se asemejan morfológicamente a las levaduras, presentan características distintas con un aumento de las propiedades de adherencia, mayor capacidad de formar biopelículas y mayor virulencia en ratones (232). Se han identificado dos factores de transcripción de la dispersión de biopelículas de *Candida albicans*, Nrg1 y Ume6; la sobreexpresión de cualquiera de ellos incrementó el número de células liberadas activamente. Nrg1 es un factor de transcripción reprimido por un complejo modificador de cromatina formado por deacetilasas llamado Set3. Las cepas mutantes del complejo Set3 (*set3Δ/Δ*) formaban biopelículas demasiado sólidas, recalcitrantes a la perturbación mecánica e incapaces de dispersar células adecuadamente (232,233).

La proteína de shock térmico Hsp90 también ha sido implicada en la dispersión de la biopelícula de *Candida albicans*. El agotamiento de Hsp90 reduce notablemente el número de células dispersadas de una biopelícula e induce la filamentación al liberar la vía de señalización cAMP-PKA (234). La proteína de la pared celular Ywp1 también es importante en la fase de dispersión de la biopelícula, ya que la eliminación del *YWP1* conlleva una menor dispersión y una mayor adhesividad (225). Cualquier mutación que favorezca el desarrollo de células filamentosas reduce la dispersión, pero ambos tipos de células son necesarios para un correcto funcionamiento de la biopelícula.

1.7. Propiedades de los biomateriales

La adhesión y formación de biopelícula son procesos estrechamente relacionados con determinadas propiedades de la superficie del material o del tejido donde se adhieren los microorganismos. Algunas de estas propiedades relevantes son la topografía superficial, la composición química y física del material y, por consiguiente, su hidrofobicidad.

1.7.1. Rugosidad superficial

Gran parte de las investigaciones realizadas para inhibir la adhesión inicial de microorganismos en las superficies han utilizado diversos enfoques que incluyen la modificación química del material, la funcionalización de su superficie añadiendo una capa de algún compuesto o la manipulación de la topografía de la superficie del material (235-239). Sin embargo, los resultados han sido contradictorios al describir la influencia tanto de la rugosidad superficial como de la hidrofobicidad en la adhesión de los microorganismos (237,239-241), mientras que en otros no se encuentra relación.

Dentro de la topografía superficial del material encontramos una de las propiedades que más afecta a la adhesión microbiana, la rugosidad del material. Existen diversas herramientas para analizar la rugosidad de una superficie como pueden ser los rugosímetros, la microscopía de fuerza atómica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) o la microscopía confocal (LSCM, *Laser Scanning Confocal Microscopy*).

La AFM es el método de medición de la rugosidad más usado, ya que tiene una buena resolución para caracterizar la topografía de la superficie a una escala submicrométrica. El funcionamiento de la AFM se basa en la interacción entre una punta afilada de forma piramidal o cónica y la superficie de la muestra. Un láser entrante es reflejado desde la punta a un detector de fotodiodos sensible a la posición, que detecta cualquier desviación mientras la punta barre la superficie de la muestra registrando continuamente la topografía del material. Las desviaciones de la punta se utilizan para generar un mapa topográfico de superficie. Como su nombre sugiere, la AFM es capaz de alcanzar una resolución atómica y es especialmente útil en el mapeo de la topografía superficial a escala nanométrica (242).

Cuando se revisa la literatura disponible sobre la influencia de la topografía de una superficie en la adhesión de microorganismos, se hace evidente la falta de estandarización al medir la rugosidad de un material. Una de las razones por las que existen estas diferencias es determinar lo que consideramos rugosidad.

Las superficies, por muy perfectas que sean, presentan particularidades que son una marca del método empleado para su obtención. El torneado, fresado, rectificado, bruñido o lapidado, son algunos ejemplos de métodos de producción, y las superficies

obtenidas a partir de estos métodos presentan irregularidades con espaciamentos regulares o irregulares que tienden a formar un patrón o textura característicos. La topografía de superficie de un material presenta dos formas: rugosidad y ondulación (Figura 1.5).

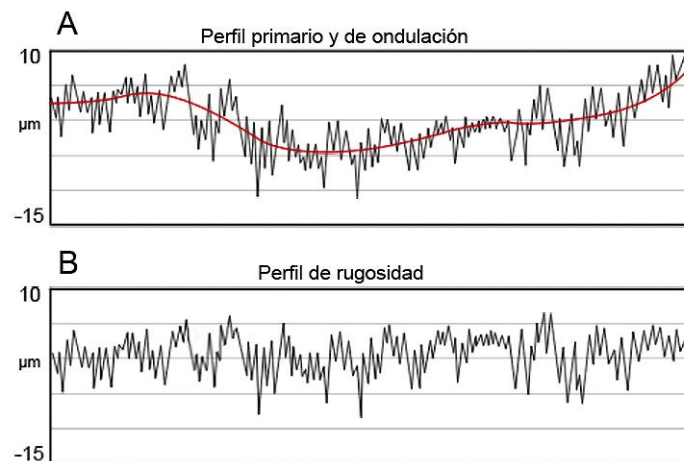


Figura 1.5. Ondulación y rugosidad. A) Perfil primario de rugosidad (línea negra), perfil de ondulación (línea roja); B) Perfil de rugosidad filtrado.

La rugosidad está formada por los surcos o marcas dejadas por los agentes que atacan la superficie en el proceso de mecanizado (herramientas utilizadas, partículas abrasivas, acción química, etc.) y se encuentra superpuesta al perfil de ondulación. Los espacios entre los picos o crestas (longitud de onda) varían entre 4 y 50 veces la profundidad de la depresión, lo que se considera una longitud de onda pequeña.

La ondulación es el conjunto de irregularidades repetidas en ondas de paso con una amplitud mucho mayor y que pueden ocurrir por movimientos de la máquina, deformaciones debidas tratamientos térmicos, tensiones residuales de forja o fundición, etc. De este modo, para calcular el perfil rugosidad real es necesario eliminar factores macrométricos como la ondulación o curvaturas de forma como la cilindricidad o la conicidad del material y analizar únicamente el perfil micrométrico (Figura 1.5B). Esto se ha conseguido con el avance de la electrónica, informática y de las herramientas anteriormente mencionadas (243,244). La determinación de la

rugosidad se consigue fundamentalmente mediante tres pasos: corrección, filtrado y análisis.

1.7.1.1. Corrección

En este paso se elimina la forma del material mediante una corrección con una forma geométrica de referencia como una línea o un arco (Figura 1.6).

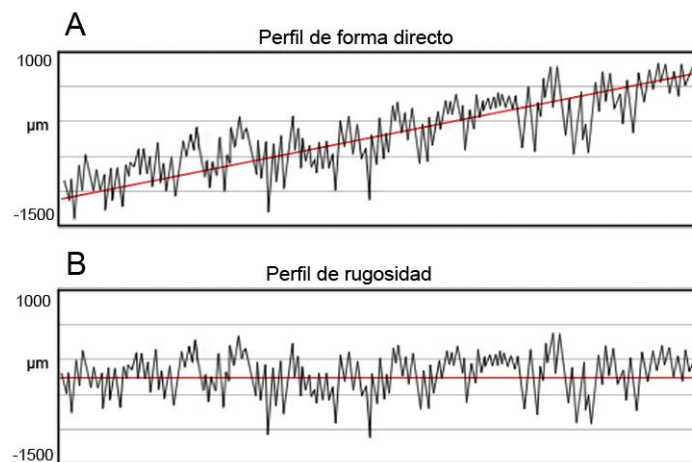


Figura 1.6. Corrección de la forma. A) Datos de rugosidad directos; B) Perfil de rugosidad corregido.

En el caso de analizar toda una superficie tridimensional en lugar de un perfil 2D, este paso correspondería a la aplicación del llamado Filtro F que elimina la forma del material (Figura 1.7).

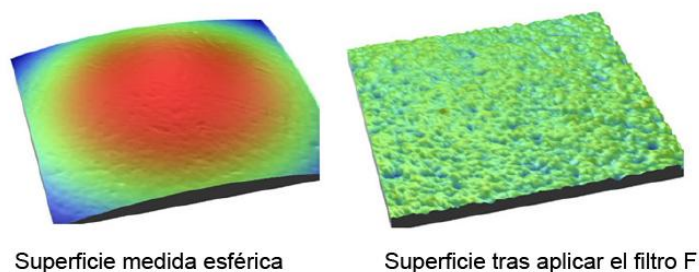


Figura 1.7. Superficie esférica antes y después de aplicación del filtro F. (245)

1.7.1.2. Filtrado

Una vez la forma geométrica ha sido eliminada es necesario separar la ondulación de la rugosidad. Este es el proceso más crítico a la hora de determinar la rugosidad e implica la aplicación de un filtro de «suavizado». El grado de suavizado se basa en elegir un punto de corte de filtrado que se denomina «Longitud de corte» o *Cut-off* (L_c) y es la longitud de onda o distancia que separaría la rugosidad de la ondulación. Las longitudes de onda más cortas entrarían en el perfil de rugosidad y las longitudes de onda más largas aparecen como perfil de ondulación.

Los filtros más comunes son el filtro ISO (electrónico) y el filtro gaussiano (matemático). Para medir de rugosidad se utiliza por norma el filtro ISO que filtra gradualmente los picos y valles en función de la longitud de corte, que comúnmente es de 0,25 mm, 0,8 mm o 2,5 mm. Depende de la aplicación que vaya a tener el material se procesará su superficie de una manera u otra y se seleccionará una longitud de corte acorde con lo que se busca.

La elección de la longitud de corte puede tener un gran impacto en la medición de la rugosidad. Con una longitud de corte muy pequeña se obtienen valores de rugosidad pequeños, aunque la superficie «real» sea rugosa. En la figura 1.8 se representa la misma superficie filtrada con dos longitudes de corte diferentes obteniendo dos perfiles de rugosidad totalmente distintos.

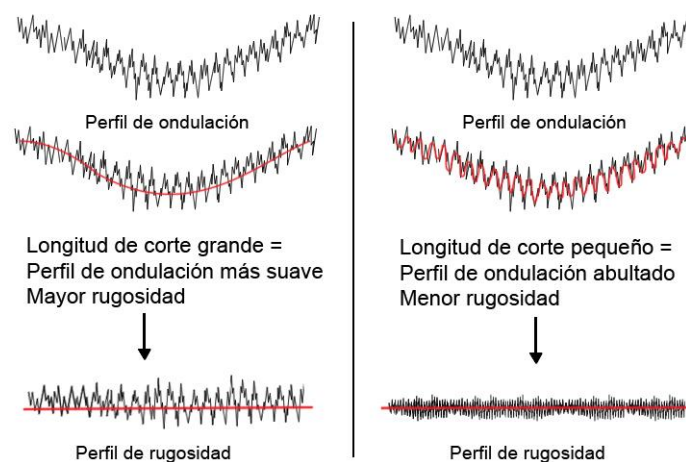


Figura 1.8. Filtrado de la rugosidad.

Para obtener el perfil de rugosidad mediante análisis 3D de la superficie se aplicarían esos puntos de corte utilizando el filtro S-L, que elimina tanto las longitudes de onda corta correspondiente al ruido del instrumento como las longitudes de onda grandes que corresponderían a la ondulación (Figura 1.9).

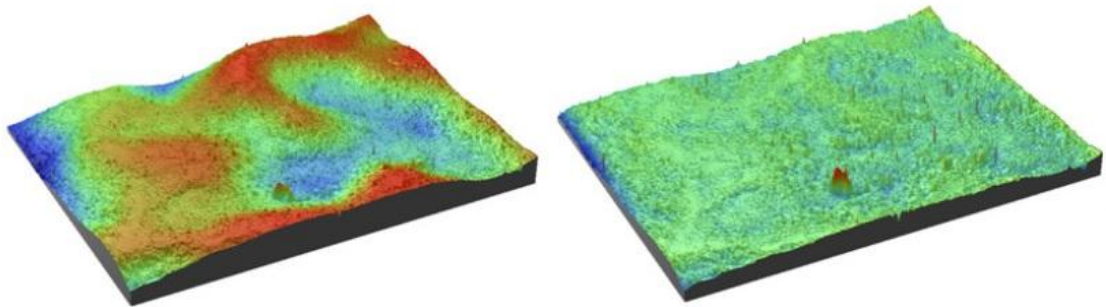


Figura 1.9. Aplicación del filtro S-L (245)

1.7.1.3. Análisis

Una vez elegida la longitud de muestra a analizar (L_n), que por norma suele ser cinco veces la longitud de corte ($L_n = 5 \times L_c$), medida la rugosidad y filtrada la ondulación, se establece una línea media que es una línea que separa picos y valles en áreas iguales.

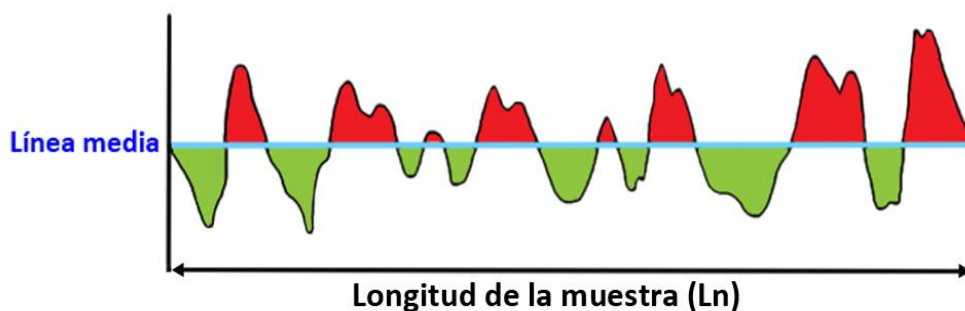


Figura 1.10. Representación de un perfil de rugosidad y su línea media.

Por último, los datos son representados y se calculan una serie de parámetros estadísticos para cuantificar la rugosidad. Éste es otro paso complejo e importante a la hora de definir la rugosidad ya que no hay un único parámetro que represente completamente la topografía de una superficie. De hecho, desde el inicio del proceso se debe tener en cuenta qué función cumplirá el material, eligiendo una adecuada

longitud de corte que separa rugosidad de ondulación, así como unos parámetros que representen bien lo que se busca.

Los parámetros Ra y Rq son los más citados para describir la rugosidad de los biomateriales (235,246-249).

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2}$$

La rugosidad media, Ra, es la desviación media de los valores de altura con respecto a la línea media. De forma similar, la rugosidad RMS (*Root Mean Square*), Rq, es la raíz cuadrada de la media de las desviaciones al cuadrado, es decir, la desviación estándar con respecto a la línea media. Sin embargo, al ser Ra/Rq únicamente una distancia promedio respecto a la línea media, diferentes tipos de superficies pueden tener el mismo valor Ra/Rq.

En un intento por corregir esta deficiencia se desarrollaron otros parámetros estadísticos que están incluidos en la ISO 4287:2000 (ISO 25178 en el análisis 3D de la superficie) y son usados en diferentes tipos de industrias. Algunos de ellos son los siguientes:

Rv: Profundidad máxima del valle.

$$R_v = \min_i y_i$$

Rp: Altura máxima de pico.

$$R_p = \max_i y_i$$

Rt, Ry: Altura máxima del perfil de rugosidad.

$$R_t = R_p - R_v$$

Rsk: Asimetría del perfil. Valoración: Rsk > 0 predominancia de picos respecto a valles, Rsk < 0 predominancia de valles respecto a picos.

$$R_{sk} = \frac{1}{nR_q^3} \sum_{i=1}^n y_i^3$$

Rku: Kurtosis. Medida de la nitidez del perfil de rugosidad. Valoración: Rku >3 picos o valles estrechos. Rku <3 picos o valles amplios.

$$R_{ku} = \frac{1}{nR_q^4} \sum_{i=1}^n y_i^4$$

Rz (DIN): Distancia media entre el pico más alto y el valle más bajo en cada longitud de muestreo.

$$R_{zDIN} = \frac{1}{s} \sum_{i=1}^s R_{ti}$$

Rz (JIS): Distancia media que separa los cinco picos más altos de los cinco valles más profundos.

$$R_{zJIS} = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 R_{pi} - R_{vi}$$

Éstos son parámetros 2D obtenidos a partir de un perfil de rugosidad, se nombran con la letra R, son ampliamente utilizados en diferentes aplicaciones, pero no proporcionan una información completa sobre las superficies tridimensionales. Los parámetros citados tienen sus equivalentes en superficies 3D, y se marcan con la letra S en lugar de la R (Sa, Sq, Sz, Ssk, Sku, etc.), además existen otros parámetros desarrollados específicamente para superficies 3D donde se calcula el volumen funcional de la superficie y son designados con la letra V (Vvv, Vvc, Vmp, Vmc).

1.7.2. Hidrofobicidad

La adhesión bacteriana depende en gran medida de la hidrofobicidad de la superficie celular y de la del material. La hidrofobicidad celular junto con la carga superficial es la propiedad química superficial más ampliamente estudiada y depende de la composición de la estructura externa del microorganismo. La superficie de las bacterias gramnegativas está compuesta por una membrana externa con lípidos y lipopolisacáridos, mientras que las bacterias grampositivas presentan una pared celular con peptidoglicanos y ácidos teicoicos. Estas diferentes estructuras explican la

variedad en las propiedades químicas de las superficies bacterianas. Las superficies bacterianas con una alta relación nitrógeno-carbono debido a la presencia de proteínas son más hidrófobas, mientras que las superficies hidrófilas tienen una alta relación oxígeno-carbono (250,251). La hidrofobicidad depende de la especie, de la cepa, pero también de la edad de los microorganismos o del medio de cultivo donde se encuentran (252).

Por su parte, los materiales también pueden caracterizarse por su hidrofobicidad y su carga superficial. Los materiales metálicos y el vidrio son generalmente hidrófilos y de carga negativa; sin embargo, en los materiales poliméricos estas características dependen de su composición.

Una manera de estimar la hidrofobicidad superficial se basa en la humectabilidad superficial, que puede medirse por el ángulo de contacto: el ángulo que forma la superficie de una gota de un líquido al entrar en contacto con un sólido. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación que existe entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas del líquido.

También existe una correlación entre la hidrofobicidad de la superficie celular y la adhesión. Generalmente, las células hidrófobas se adhieren más fuertemente a las superficies, sobre todo a las superficies hidrófobas (253-255).

Se han desarrollado varios recubrimientos hidrófilos, como hidrogeles o superficies químicamente modificadas de dispositivos médicos, para limitar el desarrollo de biopelículas (235,236,256). Un ejemplo es la heparina o el ácido hialurónico que pueden añadirse a los recubrimientos hidrófilos. La heparina no sólo tiene una actividad anticoagulante, sino también una actividad antiadherente debido a sus características hidrófilas. Las sondas urinarias recubiertas de heparina pueden reducir la producción de biopelícula y la incrustación orgánica e inorgánica generadas por *Proteus mirabilis* (257,258). Los tratamientos con plasma también pueden crear zonas hidrófilas en la superficie del dispositivo médico, lo que produce una actividad antimicrobiana y antiincrustante (259,260).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los dispositivos médicos se utilizan ampliamente en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. Una de las complicaciones más frecuentes e importantes relacionadas con su uso es el riesgo de sufrir una infección con la formación de biopelículas extremadamente resistentes a los mecanismos de defensa del huésped y al tratamiento antimicrobiano. A menudo, la única solución para que un dispositivo implantado colonizado deje de ser un foco infeccioso es su eliminación. Esta aproximación terapéutica supone un importante reto médico y una sobrecarga económica.

Para combatir las IACS se están desarrollando diversas estrategias que van desde modificar la topografía de superficie de los materiales que componen estos dispositivos biosanitarios a la adición de capas hidrófilas o de componentes antimicrobianos. Sin embargo, la adhesión microbiana es un fenómeno complejo y multifactorial donde intervienen propiedades de superficie del material, de los microorganismos y del entorno donde se produce la adhesión. La adhesión microbiana a los biomateriales es esencial en la patogénesis de muchas infecciones. Sin embargo, no se comprenden en detalle las interacciones moleculares y físicas que gobiernan la adhesión a los biomateriales. Se ha intentado encontrar una asociación entre la adhesión microbiana y la rugosidad de la superficie. Hay estudios de rugosidad de superficies metálicas, como el titanio utilizado en implantes, pero los datos disponibles sobre polímeros son escasos y aunque se considera que cuanto más lisa es una superficie, menor es la probabilidad de adhesión microbiana, otros estudios sugieren lo contrario. La hidrofobicidad influye también en la adhesión microbiana. Las células con una superficie más hidrófoba tienden a adherirse con más fuerza y a formar una biopelícula mayor. Además, los materiales hidrófobos suelen facilitar una mayor adhesión de los microorganismos. Sin embargo, hay estudios que indican lo contrario, con una mayor adhesión en materiales hidrófilos o que la hidrofobicidad no tiene correlación con la adhesión.

El objetivo principal de esta Tesis de doctorado ha sido valorar diferentes biomateriales utilizados en el sector médico para evaluar cómo son colonizados por microorganismos patógenos y determinar qué propiedades influyen en la adhesión

microbiana y formación de biopelículas. Para conseguir este objetivo principal, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Poner a punto un bioreactor en el laboratorio para el estudio de biopelículas de bacterias y levaduras.
- Evaluar la influencia de la rugosidad en la formación de biopelícula de *Staphylococcus epidermidis*.
- Determinar la relevancia de la hidrofobicidad en la formación de biopelícula de *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.
- Comparar la diferente adherencia de *Candida albicans* a materiales empleados en prótesis dentales.
- Comprobar la influencia del medio de cultivo en la formación de biopelícula de *Candida* y en la actividad de fármacos antifúngicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos

3.1.1. Cepas de colección y aislamientos clínicos

Las cepas incluidas en este trabajo procedían de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, España), con sus correspondencias con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, EEUU) y de la Colección Nacional Británica de Hongos Patógenos (NCPF, Gran Bretaña). Estas cepas fueron *Staphylococcus epidermidis* CECT 4184 (ATCC 35984), *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 (ATCC 27853), *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922), *Candida albicans* NCPF 3153, *Candida albicans* SC5314, *Candida albicans* Ca2, *Candida glabrata* ATCC 2001 (16-033), *Candida parapsilosis* ATCC 20019 y *Candida parapsilosis* CDC317 (ATCC MYA-4646).

Staphylococcus epidermidis CECT 4184 (ATCC 35984) es una cepa empleada como control positivo en ensayos de formación de biopelícula. *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 (ATCC 27853) es una cepa de referencia utilizada en ensayos de sensibilidad in vitro a los fármacos antimicrobianos, como cepa control en ensayos de alimentación y en investigaciones de patógenos oportunistas. *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922) es una cepa de control de calidad utilizada en ensayos de sensibilidad in vitro a anticuerpos y antibióticos. *Candida albicans* NCPF 3153 y *Candida albicans* SC5314 son cepas productoras biopelícula utilizadas como controles en todo tipo de ensayos científicos. *Candida albicans* Ca2 es un mutante de la cepa parental NCPF 3153 incapaz de formar un tubo germinal y no genera biopelículas. *Candida glabrata* ATCC 2001 (16-033) y *Candida parapsilosis* ATCC 20019 son ampliamente utilizadas como cepas control en ensayos de sensibilidad a fármacos antifúngicos. *Candida parapsilosis* CDC317 (ATCC MYA-4646) tiene el genoma completamente secuenciado y es comúnmente empleada en ensayos genéticos.

Asimismo también se emplearon varios aislamientos clínicos en los ensayos de la influencia del medio de cultivo en la formación de biopelícula: *Candida albicans* #466C, *Candida albicans* #468C, *Candida albicans* #472C, *Candida albicans* #486C, *Candida glabrata* 16-028, *Candida glabrata* 16-029, *Candida parapsilosis* #486, *Candida parapsilosis* #495, *Candida parapsilosis* #496, *Candida parapsilosis* #501, *Candida parapsilosis* #582, *Candida parapsilosis* #586 y *Candida parapsilosis* #651.

3.1.2. Mantenimiento de las cepas e inóculo

Los microorganismos se almacenaron a -80 °C en criobolas (Microbank, Biolab Diagnostics, Canadá). En el momento del experimento, los microorganismos se sembraron en agar de Müller-Hinton y cultivaron 24 h a 37 °C. Posteriormente, dos o tres colonias fueron cultivadas en 5 ml de medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI, *Brain heart infusion*) y se mantuvieron durante la noche a 37 °C en una incubadora orbital. Los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos y lavados dos veces en tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*). Finalmente, el inóculo se ajustó a una densidad de 0,5 McFarland (aproximadamente $1-5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml para bacterias y $1-5 \times 10^6$ UFC/ml para *Candida albicans*). Para comprobar la concentración celular, se sembraron muestras de los inóculos en agar para conteo de placas (PCA, *Plate Count Agar*) en el caso de bacterias o agar glucosado de Sabouraud (SDA, *Sabouraud Dextrose Agar*) en el caso de *Candida* y se contaron las células viables tras 24 horas a 37 °C.

3.2. Reactor para estudio de biopelículas CDC Biofilm Reactor (CBR)

En el año 2002 Donlan et al. desarrollaron un biorreactor (CDC Biofilm Reactor, CBR) que incorpora 24 superficies para la formación de biopelícula bajo condiciones dinámicas tanto por la agitación del medio debido a una sonda magnética como por la entrada de un flujo constante de nutrientes y de salida de residuos. Los resultados mostraron que puede ser utilizado para detectar la formación de biopelículas, caracterizar su estructura o evaluar el efecto de los agentes antimicrobianos contra la biopelícula (261,262).

El CBR (CBR 90-1, BioSurface Technologies Corp., EEUU) es un recipiente de vidrio de un litro con una salida de efluente para mantener aproximadamente 350 ml de capacidad de fluido operativo, una tapa superior de polietileno donde se alojan ocho barras de polipropileno independientes y removibles, un puerto de entrada de medio y

un puerto de intercambio gaseoso (Figura 3.1). Cada barra contiene huecos para tres discos para el crecimiento de la biopelícula, sujetos por un pequeño tornillo. Las superficies de los discos permiten 24 evaluaciones cada vez.

3.2.1. CBR sin flujo de nutrientes

El CBR totalmente ensamblado fue esterilizado en autoclave y se llenó con 500 ml de medio de cultivo: caldo extracto de levadura peptona glucosa (YEPD, *Yeast Extract Peptone Dextrose*) o RPMI para *Candida albicans* y caldo de soja tripticaseína (TSB, *Tryptic Soy Broth*) para bacterias. Tras la inoculación de un mililitro del inóculo, el CBR se colocó en una placa de agitación controlada digitalmente (VWR Stirrer/Hotplate, VWR, EEUU) fijada a 37 ± 1 °C y 120 rpm durante 48 horas. El estrés hidrodinámico experimentado por los discos está en función de la velocidad a la que gira la barra de agitación magnética y de la distancia desde el exterior de ésta hasta la cara de los discos. En concreto, la fuerza hidrodinámica que soportaba el material, configurando el CBR a 120 rpm, era de 0.02 N/m^2 .

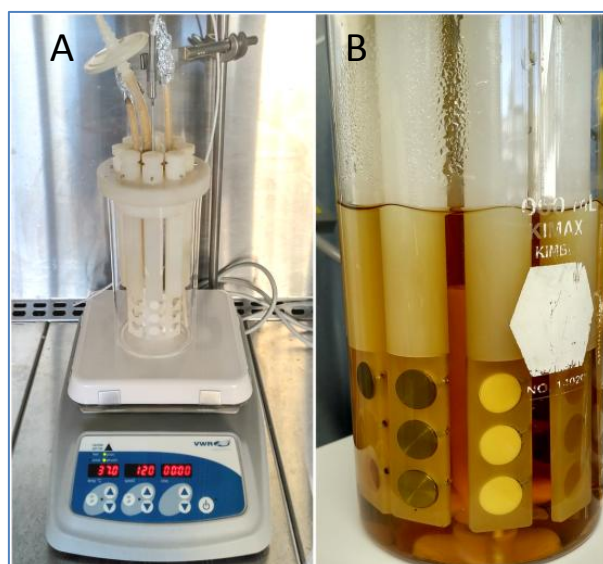


Figura 3.1. A) CBR para biopelículas microbianas sobre la placa termoagitadora. B) Discos colocados en las barras del reactor.

3.2.2. CBR con flujo continuo de nutrientes

Tras permanecer 24 horas sin renovar el medio de cultivo, se activa una bomba peristáltica que bombea continuamente medio de cultivo nuevo (12,67 ml/min) a través de unos tubos de silicona conectados asépticamente desde un bidón de 10 l al interior del CBR. El ambiente para el desarrollo de la biopelícula se renueva continuamente ya que el tiempo de residencia con ese flujo es menor que el tiempo de generación del microorganismo. Al alcanzar los 350 ml de cultivo en el interior del reactor, el exceso de medio tiene una salida efluente a otro bidón de almacenamiento. En esta fase el CBR operaría otras 24 horas adicionales, con cambio de los bidones cada doce horas.

3.3. Biomateriales y limpieza de discos

La superficie de crecimiento para la biopelícula constaba de discos de diferentes biomateriales con un diámetro de 1,27 cm y 0,3 cm de grosor. Los materiales seleccionados fueron titanio, policarbonato, silicona, vidrio de borosilicato, teflón y poliuretano.

Los discos de titanio, policarbonato, silicona, borosilicato y teflón fueron obtenidos comercialmente de BioSurface Technologies Corp. El proceso de esterilización y reciclado de los discos y del reactor se llevó a cabo según el protocolo EPA MLB SOP MB-19 de la Agencia de Protección Medioambiental de EEUU (263). Los discos de poliuretano fueron fabricados por Leartiker S. Coop (España) y, posteriormente, se esterilizaron con óxido de etileno en el Hospital Universitario de Cruces (España).

El teflón, la silicona y el poliuretano se utilizan principalmente para diseñar catéteres, implantes o dispositivos dentales, como *brackets* o revestimientos de dentadura postiza suaves (264-270). El titanio ha sido ampliamente utilizado en la reparación de tejidos duros, tales como articulaciones artificiales de cadera, articulaciones artificiales de rodilla, implantes dentales, así como implantes cardiovasculares debido a sus excelentes propiedades mecánicas, alta resistencia a la

corrosión y buena biocompatibilidad (271,272). El policarbonato por su parte, no es tan utilizado en biomedicina como otros plásticos como el policloruro de vinilo (PVC) o el poliestireno, pero tiene la ventaja de ser químicamente inerte, biocompatible, de alta resistencia y resistente a la esterilización por autoclave e irradiación. Los conectores intravenosos con frecuencia están hechos de policarbonato y también se han utilizado como corona para la restauración dental o en *brackets* dentales (273-276). En cuanto al vidrio, se utiliza como material de andamiaje para la ingeniería de tejidos óseos, implantes neuronales y mamaros, debido a su baja hidrofobicidad y rugosidad (277-279). Estos biomateriales suelen ser colonizados por agentes patógenos causantes de las IACS.

3.4. Estudio de la rugosidad de los materiales

La rugosidad de la superficie se determinó mediante un microscopio 3D de doble núcleo Leica DCM 3D (Leica Microsystems, Alemania) y los datos resultantes se analizaron mediante el software Leica Map DCM 3D (280-282) que genera una representación digital de la superficie. Este software sirve para visualizar y cuantificar las características de las diferentes superficies medidas combinando tecnologías confocales e interferométricas con la ventaja de ser un método sin contacto con la muestra.

La microscopía confocal utiliza un doble filtrado espacial. El primer filtro permite que sólo se ilumine un punto de la superficie; el segundo permite que sólo la luz del punto iluminado llegue al detector. Esta configuración se describe en la Figura 3.2, donde la luz procedente de la fuente de iluminación atraviesa un primer diafragma o *pinhole*, es reflejada por un espejo dicróico y se enfoca en un punto de la muestra mediante la lente de un objetivo. La señal emitida por el punto iluminado (luz reflejada o fluorescencia) regresa por el mismo camino óptico a través de la lente y mediante el espejo dicróico es dirigida al detector donde un segundo diafragma filtra la señal evitando que pase la luz procedente de la zona fuera de foco.

La resolución lateral de esta técnica, es decir, la capacidad de distinguir la distancia mínima entre dos picos cercanos, depende de la apertura numérica (AN), y

por tanto del objetivo escogido, así como de la longitud de onda de la fuente de luz según la siguiente fórmula:

$$\text{Resolución lateral} = 0.61\lambda/AN$$

En nuestro análisis de rugosidad se utilizó un objetivo de 20x con una AN en torno a 0,4 por lo que le correspondería una resolución lateral de 750 nm.

La resolución vertical sería la menor variación de altura que podemos detectar, y en microscopía confocal se encontraría en torno a 3 nm. Sin embargo, la discriminación de profundidad de la interferometría de cambio de fase (PSI) no depende de la AN del objetivo, sino de las propiedades de la fuente de luz. Así, la combinación confocal e interferometría permite mediciones que van desde milímetros hasta 0,1 nm (283).

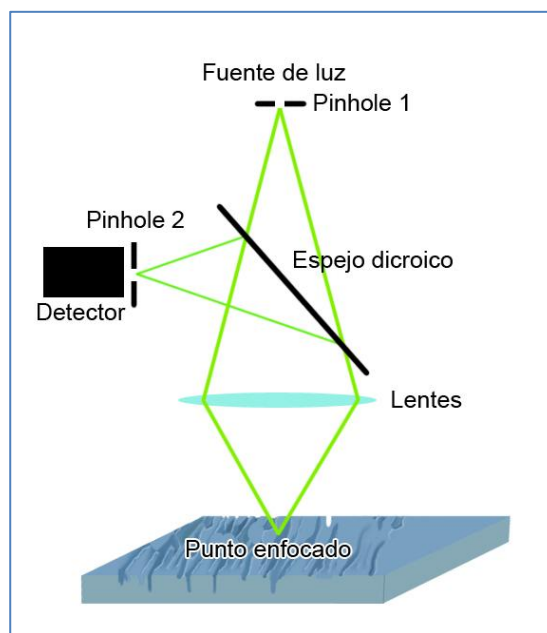


Figura 3.2. Esquema de la configuración de un microscopio confocal.

En este estudio se calcularon los parámetros S_a , S_q , S_z , S_{sk} , S_{ku} y S_{tr} (UNE ISO, 25178-2:2013). Tanto S_a como S_q representan una medida general de la textura superficial y son los parámetros más utilizados para evaluar la rugosidad. S_a es la altura media aritmética de la superficie y S_q es la raíz cuadrada de la media de las desviaciones de altura al cuadrado. S_z es la media de la altura máxima de la superficie en cinco tramos de la superficie analizada, S_{sk} es el grado de simetría de las alturas de la superficie alrededor del plano medio, S_{ku} es una medida de la nitidez del perfil de

rugosidad (kurtosis) y Sdr es la ratio entre área de contacto desarrollada y proyectada y se expresa como el porcentaje de superficie adicional aportada por la textura en comparación con una superficie idealmente plana. El parámetro Sdr de una superficie completamente lisa es cero. Sdr es un parámetro híbrido que se ve afectado tanto por la amplitud de textura de superficie (altura de los picos) como por el espaciado. Por lo que puede darse el caso que una superficie con un mayor Sa pero con una textura más espaciada puede tener en realidad un valor Sdr menor que otra con un Sa más bajo pero una textura con más frecuencia de picos.

La superficie de los discos analizada fue de 2 mm x 1,2 mm, y se aplicaron diversos filtros gaussianos de 0,8, 0,25 y 0,08 para determinar los parámetros de rugosidad según la ISO 25178. Los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

3.5. Estudio de la hidrofobicidad de los materiales

El ángulo de contacto se utiliza comúnmente para evaluar la hidrofobicidad de la superficie de un material. La determinación del ángulo de contacto se llevó a cabo utilizando un goniómetro (modelo OCA 15EC, Dataphysics, Alemania). Para ello, se colocaron diversas gotas de agua destilada con un volumen de 15 μ l en ambas caras de los discos y se tomaron diez lecturas en diferentes áreas de la superficie del disco determinando los valores promedio de cada disco. La imagen de la gota fue procesada por un sistema de análisis de imagen (*software* SCA), que calculó los ángulos de contacto izquierdo y derecho a partir de la forma de la gota con una precisión de $\pm 0,1^\circ$. Sin embargo, el ángulo de contacto no representa exactamente la hidrofobicidad química del material sino la humectabilidad de la superficie, es decir, la propensión de un líquido a esparcirse sobre una superficie sólida, es por ello que la rugosidad puede tener un efecto importante sobre el ángulo de contacto. La relación entre la rugosidad y la humectabilidad fue definida en 1936 por Wenzel, quien declaró que la adición de rugosidad superficial incrementa la humectabilidad causada por la química de la superficie: si la superficie es químicamente hidrófoba, se tornará aún más hidrófoba cuando se la rugosidad superficial entre en juego y, al contrario, si la superficie es químicamente hidrófila, se tornará más hidrófila. Sin embargo, este efecto depende de

si la gota penetra en las ranuras de la superficie o si deja bolsas de aire entre la gota y la superficie. Sólo en el caso de que la superficie se humedezca homogéneamente, la gota se encuentra en estado Wenzel (284).

El estado de Wenzel puede ser descrito por la siguiente fórmula:

$$\cos\theta_m = r \times \cos\theta_Y$$

Donde θ_m es el ángulo de contacto medido, θ_Y es el ángulo de contacto de Young (el ángulo de contacto ideal en una superficie plana independientemente de la rugosidad) y r es la relación de rugosidad. La ratio de rugosidad (ratio entre la superficie sólida real y la proyectada, $r = 1$ para una superficie lisa y $r > 1$ para una superficie rugosa) puede calcularse a partir de un parámetro 3D llamado Sdr según la siguiente ecuación:

$$r = 1 + Sdr/100$$

Los resultados de las mediciones se muestran en la Tabla 4.2.

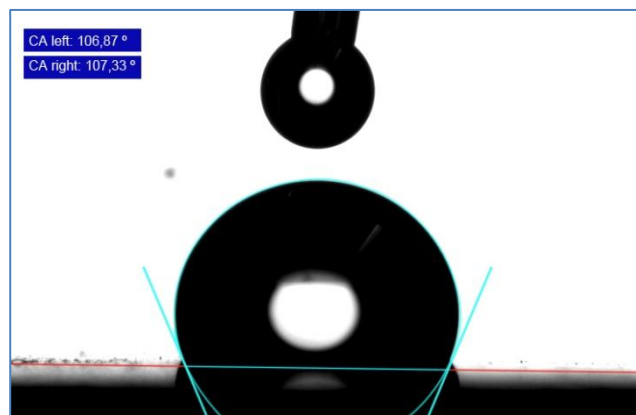


Figura 3.3. Medición de los ángulos de contacto formados por una gota en un disco de silicona.

3.6. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular

Se llevó a cabo un estudio de la hidrofobicidad de la superficie celular de las cuatro cepas de referencia utilizadas en el ensayo del efecto de la hidrofobicidad de los materiales en la formación de biopelículas: *Staphylococcus epidermidis* CECT 4184 (ATCC 35984), *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 (ATCC 27853), *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922) y *Candida albicans* NCPF 3153.

La hidrofobicidad de la superficie celular fue evaluada mediante el ensayo de adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH, *Microbial Adhesion To Hydrocarbons*) descrito por Rosenberg (285). Básicamente, los microorganismos fueron cultivados durante 18-20 horas con agitación (100 rpm) a 37 ± 1 °C. Posteriormente, fueron centrifugados a 3000 rpm y lavados dos veces con PBS. La concentración de microorganismos necesaria se ajustó midiendo la turbidez de la suspensión en un espectrofotómetro UV/VIS (Biophotometer, Eppendorf, Alemania) a 600 nm y obteniendo valores entre 0,6 y 0,7 (A0); Posteriormente, 1,6 ml de esta suspensión fueron transferidos a otro tubo donde también se añadieron 0,4 ml de un hidrocarburo hidrófobo, el n-hexadecano (Sigma-Aldrich). Después de un minuto de vigoroso mezclado en vórtex, se dejaron los tubos en reposo durante 15 minutos y el contenido se separó en dos fases. El fundamento de esta técnica se basa en que si la cepa tiene muchas adhesinas y presenta una superficie hidrófoba se distribuirá en la fase apolar con el hexadecano, mientras que si tiene una superficie hidrófila permanecerá en la fase acuosa.

Por último, se midió la densidad óptica de la fase acuosa (A1) a 600 nm situada debajo de la fase apolar. La hidrofobicidad de la superficie celular se expresó como el porcentaje de reducción de la turbidez de la fase acuosa (A1) respecto a la turbidez de la suspensión microbiana inicial (A0), según la ecuación:

$$\text{Porcentaje (\%)} = [1 - (A1/A0)] \times 100$$

Todas las medidas se realizaron por triplicado y se consideró la media aritmética de éstas para calcular la hidrofobicidad de cada cepa.

3.7. Análisis de la biopelícula mediante el CBR

3.7.1. Efecto de la topografía superficial con discos de poliuretano

Este estudio se realizó para determinar la influencia de la rugosidad en la adhesión y formación de biopelícula. Varios discos de poliuretano fueron lijados en el Departamento de Ingeniería Minera y Metalúrgica y Ciencia de los Materiales de la Universidad del País Vasco por medio de lijas de carburo de silicio (SiC) de diferente tamaño de grano (320, 800, 1200, 4000) utilizando una pulidora semiautomática (Tegrapol-11/Tegraforce-1, Struers, EEUU). En el proceso se utilizaron tiempos y fuerzas fijas midiendo más tarde la rugosidad para comprobar que la superficie resultante fuera la adecuada. Posteriormente, los discos de poliuretano se esterilizaron con óxido de etileno.

De esta manera, se obtuvieron cuatro grupos de discos con diferente rugosidad que fueron dispuestos en las barras del CBR que fue llenado con medio TSB (30 g/l). Finalmente, se añadió 1 ml de la suspensión de *Staphylococcus epidermidis* a una concentración de 10^8 UFC/ml cuantificando la cantidad de biopelícula adherida a cada grupo de rugosidad al cabo de 48 horas.

3.7.2. Efecto de la hidrofobicidad en la formación de biopelícula

En este estudio se intentó determinar la influencia de la hidrofobicidad en la adhesión y formación de biopelícula. Una vez conocida la influencia de la rugosidad en un mismo material, se utilizaron seis biomateriales diferentes donde no sólo variaba su rugosidad sino su hidrofobicidad, de este modo se valoró qué propiedad era más influyente a la hora de permitir el desarrollo de biopelícula. Los materiales empleados estaban conformados por teflón, silicona, poliuretano, policarbonato, titanio y vidrio de borosilicato (Figura 3.4).

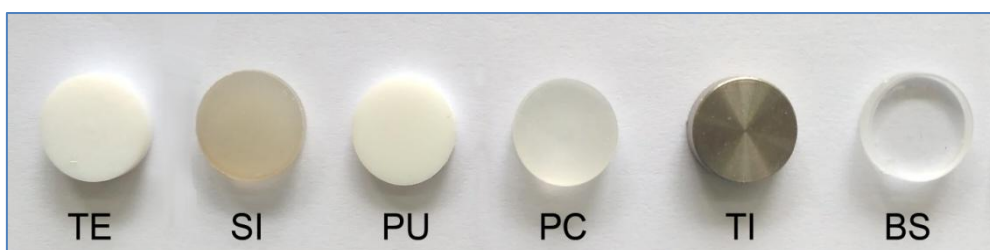


Figura 3.4. Discos de los seis materiales ensayados. TE: Teflón. SI: Silicona. PU: Poliuretano. PC: Policarbonato. TI: Titanio. BS: Borosilicato.

Los seis materiales fueron dispuestos en el reactor y se cuantificó la biopelícula formada en ellos al cabo de 48 horas. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando cuatro réplicas por disco en cada ensayo y por cada microorganismo. Se ensayaron cuatro microorganismos: *Staphylococcus epidermidis* CECT 4184 (ATCC 35984), *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 (ATCC 27853), *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922) y *Candida albicans* NCPF 3153.

El medio de cultivo TSB (30 g/l) empleado para *Staphylococcus epidermidis* fue el mismo que en el ensayo de rugosidad. En el caso de las bacterias gramnegativas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, se utilizó medio TSB más diluido (0,3 g/l). Para *Candida albicans* el medio empleado fue RPMI. Todos los inóculos consistieron en un mililitro de microorganismo a una concentración de 10^8 UFC/ml.

3.7.3. Influencia del medio de cultivo en la formación de biopelícula por *Candida albicans*

3.7.3.1. Ensayo en placas de microtitulación de poliestireno

En primer lugar, se estudió la adhesión de tres aislamientos clínicos de *Candida glabrata*, *Candida albicans* NCPF 3153 y *Candida albicans* SC5314 en microplacas de poliestireno siguiendo el protocolo descrito por Ramage et al. (286) utilizando diferentes medios de cultivo y analizando la absorbancia de la biopelícula mediante el lector Bioscreen C (Labsystem, Finlandia) y un espectrofotómetro de microplacas (iMark Microplate Reader, BioRad, EEUU). Los medios de cultivos escogidos fueron RPMI, RPMI 2% glucosa (RPMI 2% Glu), YEPD y dos medios basados en YEPD (Medio A y Medio B) a los que se añadió NaCl 0,9% y se diluyó el contenido de glucosa diez veces

para igualarlo a la concentración de glucosa presente en el RPMI (Tabla 3.1). De este modo, la composición de los medios fue la siguiente:

Tabla 3.1. Composición de los cinco medios ensayados.

RPMI + MOPS				RPMI 2%Glu	
Componente	mg/l	Componente	mg/l		mg/l
Glucosa	2000	L-lisina.HCL	40	RPMI 1640	10400
MOPS	34530	L-leucina	50	MOPS	34530
		L-metionina	15	Glucosa	18000
Glutati3n	1	L-fenilalanina	15		
Rojo de fenol	5	L-triptofano	5	YEPD	mg/l
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100	L-prolina	20	Glucosa	20000
KCL	400	L-tirosina	28,33	Peptona	20000
				Extracto de	
MgSO ₄ .7H ₂ O	100	L-serina	30	Levadura	10000
NaCl	6000	L-valina	20		
NaHCO ₃	2000	L-treonina	20	Medio A	mg/l
Na ₂ HPO ₄	800	Biotina	0,2	Glucosa	2000
L-arginina.HCL	200	Pantotenato de calcio	0,25	Peptona	2000
				Extracto de	
L-asparagina	50	Cloruro de colina	3	Levadura	1000
L-Aspartato	20	Ácido fólico	1	NaCl	8000
L-cistina	65	Inositol	35		
L-Glutamato	20	Nicotinamida	1	Medio B	mg/l
L-glutamina	300	Ácido p-aminobenzóico	1	Glucosa	2000
Glicina	10	Piridoxina.HCL	1	Peptona	2000
L-histidina	15	Riboflavina	0,2	NaCl	8000
Hidroxiprolina	20	Tiamina.HCL	1		
L-isoleucina	50	Vitamina B ₁₂	0,005		

A partir de cultivos frescos de *Candida* incubados durante 24 horas en SAD, se tomaron entre dos y cuatro colonias que fueron inoculadas en 5 ml de YEPD. Los tubos fueron dispuestos en un agitador orbital durante 24 horas a 30 °C. Posteriormente, las células fueron recogidas tras una serie de lavados con PBS y centrifugaciones. La concentración de inóculo fue ajustada mediante recuento por hemocitómetro a 10⁶ UFC/ml diluyéndolo en todos los medios de cultivo seleccionados para este ensayo.

Se añadieron 100 µl de cada suspensión a cada pocillo, concretamente, cinco pocillos por medio de cultivo y por cepa. El ensayo consistió de dos placas iguales,

siendo una teñida con cristal violeta (CV) para así cuantificar la biomasa generada, mientras que en la segunda placa se añadió XTT (*tetrazolium salt 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt*) para cuantificar la actividad metabólica. Finalmente, ambas placas fueron introducidas a la estufa a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo las placas fueron lavadas tres veces en PBS y continuaron con una metodología diferente; una placa fue teñida con CV y observada su absorbancia a 600 nm evaluando la biomasa adherida al pocillo, mientras que en la otra placa se añadió XTT y se incubó en oscuridad a 37 °C durante dos horas. Este compuesto se compone de unas sales de tetrazolio que son reducidas por las mitocondrias de las levaduras originando productos de formazán con un color anaranjado característico que fue cuantificado por el Bioscreen a 495 nm al cabo de esas dos horas lo que expresaba la biopelícula adherida en base a su actividad metabólica.

3.7.3.2. Ensayo mediante el CBR

Se comparó la capacidad para el desarrollo de biopelículas de *Candida albicans* NCPF 3153 y *Candida albicans* SC5314, en un ambiente hidrodinámico, en los medios RPMI y YEPD. La cuantificación del número de células viables adheridas se llevó a cabo tras 24 horas en tres biomateriales: titanio, poliuretano y silicona. La metodología empleada fue la descrita en el apartado anterior.

3.7.4. Inhibición del crecimiento en biopelícula preformada

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la influencia del medio de cultivo en el comportamiento de la biopelícula con cuatro fármacos antifúngicos. Para ello, se emplearon ocho aislamientos clínicos y una cepa de referencia de *Candida parapsilosis* almacenándose congeladas a -80 °C en criobolas (Microbank, Canadá). La semana anterior al ensayo, estas cepas fueron sembradas en SDA durante 96 horas a 30 °C. Posteriormente, una colonia de cada cepa se cultivó en 5 ml de caldo YEPD durante 24 horas a 37 °C en una incubadora orbital a 200 rpm. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se lavaron dos veces en PBS. Los *pellets* fueron resuspendidos en PBS y la densidad de levaduras se calculó mediante un conteo con

cámara de Neubauer. Cada inóculo se ajustó a 1×10^6 UFC/ml tanto en RPMI como en YEPD.

Se pipetearon 100 μ l del inóculo en cada pocillo de una placa de Bioscreen con la excepción de la última columna, que fue utilizada como blanco (RPMI o YEPD). A continuación, las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C para formar biopelícula en cada pocillo. Tras estas 24 horas, se retiraron las células planctónicas y se lavaron las placas dos veces con PBS.

Por otra parte, se prepararon diluciones dobles seriadas de cuatro fármacos antifúngicos en un rango de concentraciones entre 0,25 μ g/ml y 32 μ g/ml para posaconazol, voriconazol y micafungina y entre 0,0125 μ g/ml y 16 μ g/ml para anfotericina B, y se agregaron 100 μ l de cada concentración en cada pocillo con biopelícula por triplicado para, después, volver a incubar las placas a 37 °C durante 24 horas (Figura 3.5).

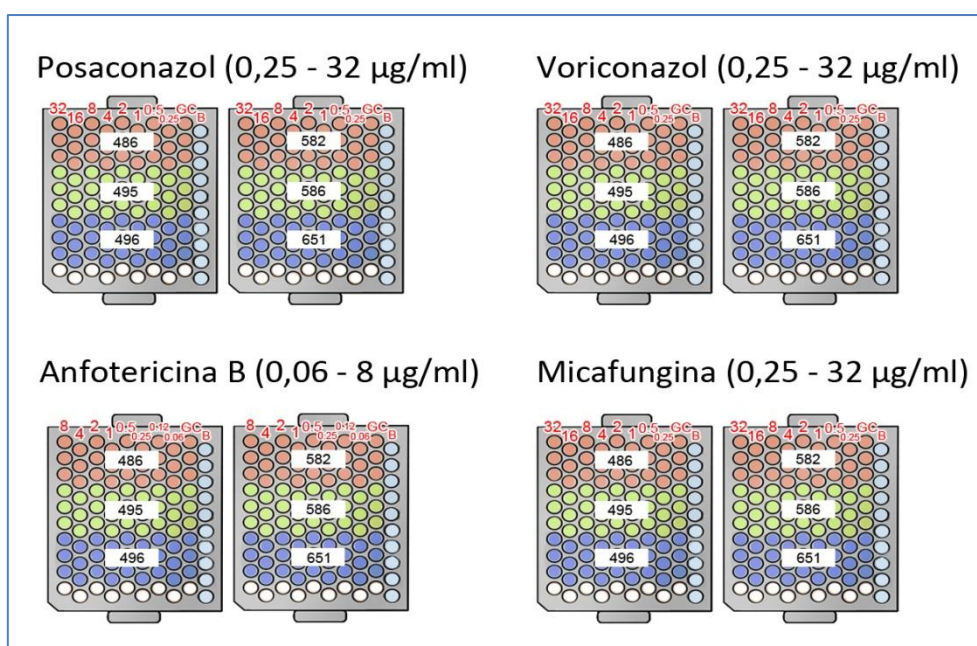


Figura 3.5. Diseño de las placas con las concentraciones de cada fármaco antifúngico.

Al día siguiente, las placas se lavaron dos veces en PBS y se añadieron a cada pocillo 100 μ l de XTT. La reducción de XTT a un formazán coloreado en presencia de actividad metabólica (principalmente por succinoxidasas mitocondriales, el citocromo P450 y flavoproteínas oxidasas) es un método ampliamente utilizado para estudiar la formación de biopelículas de *Candida*. Finalmente, las microplacas se introdujeron en

un lector de microplacas Bioscreen C (Labsystem, Finlandia) y la absorbancia del producto naranja resultante se midió a 492 nm. Este estudio se realizó por triplicado en tres semanas diferentes.

3.7.5. Análisis in vitro de la adherencia de *Candida albicans* a diferentes materiales empleados en prótesis dental

Los materiales seleccionados para este estudio fueron titanio puro de grado II (Ti), zirconio estabilizado con itrio (Zr) y una aleación de cromo-cobalto (Co-Cr). También se incluyó silicona, polimetilmetacrilato (PMMA) y un *composite* restaurador nanohíbrido basado en cerámica (Figura 3.6). Las principales características de los materiales se resumen en la Tabla 3.2.

Se utilizó un conjunto de 12 discos de cada material para cuantificar la formación de biopelícula a las 24 y 48 horas. Adicionalmente, se analizaron por SEM tres discos, uno de Ti, otro de Zr y otro de Co-Cr. La mitad del disco de este último material fue recubierto a medias con cerámica y vidrio con disilicato de litio (LS2) (IPS, Ivoclar, EE.UU.) para estudiar específicamente la unión entre ambos materiales por SEM.

Tabla 3.2. Materiales empleados en el estudio.

Tipo de material	Nombre comercial	Compañía	Composición
Aleación de Co-Cr	Colado CC®	Ivoclar (EEUU)	Co 59%, Cr 25.5%, Mo 5.5%, W 5.0%, Ga 3.2%, Si., Nb, Fe, B < 1%
Ti	RD128-Ti Coupon	BioSurface Tech. Co. (EEUU)	Ti 99%, C ,H, O, N, Fe <1%
Zr	Zenostar®	Ivoclar (EEUU)	ZrO ₂ + HfO ₂ + Y ₂ O ₃ 99%, Al ₂ O ₃ 1%
Resina PMMA <i>Composite</i> restaurador nanohíbrido	Probase Hot® Venus Pearl®	Ivoclar (EEUU) Heraeus-Kulzer (Alemania)	PMMA 95%, C ₁₄ H ₁₀ O ₄ 1-5% BisGMA (Bisphenol-A-Glycidyl-MethAcrylate)
Goma de silicona de grado médico	RD128-Si Coupon	BioSurface Tech. Co. (EEUU)	Organopolisiloxano

Cr-Co: Cromo-cobalto, Zr: Zirconio estabilizado con itrio, Ti: Titanio puro de grado II, PMMA: Polimetilmetacrilato.

Todos los discos utilizados tenían un diámetro de 12,7 mm y un espesor de 3,8 mm. Las muestras de titanio y silicona se utilizaron directamente tal y como fueron suministrados por el proveedor (Biosurfaces technologies Co., EE.UU.). Los discos Co-Cr se obtuvieron por fundición a la cera perdida con posterior procesamiento de acabado y pulido en un laboratorio dental, tratando de simular el proceso real de fabricación de las prótesis sobre implantes. Para ello, se realizó un pre-pulido con fresas dentales de carburo y ruedas de goma de grano decreciente (Komet, Alemania). Para el pulido final se emplearon discos de pulido y pasta de pulido de diamante de 5 /2,5 μm (Komet, Alemania). Los discos Zr se fabricaron con una fresadora de 5 ejes (Zenotec®, Ivoclar vivadent, Liechtenstein). Después del fresado, los discos Zr se sinterizaron a 1.400 °C, se esmaltaron y se acabaron con los mismos discos pulidores y pasta de pulir que los discos Co-Cr. El PMMA y los discos de composite se prepararon manualmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante mediante otros discos de contorneado y púlido, Sof-Lex® (3M, EE.UU.). La silicona y el titanio se utilizaron según lo dispuesto por el fabricante sin ningún procedimiento adicional. En los tres discos que estaban parcialmente recubiertos de cerámica Ls2, el esmaltado de la cerámica se realizó antes de pulir ambas superficies con el mismo protocolo que el de los discos Zr y Co-Cr. El objetivo final era reproducir las condiciones más reales del uso de estos materiales en la boca. La esterilización de los discos termosensibles, como las resinas, se realizó mediante irradiación con luz UV durante 30 minutos.

El microorganismo utilizado en este estudio fue la cepa de referencia *Candida albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876), ampliamente utilizada en ensayos con biopelículas. Se resuspendieron varias colonias de *Candida albicans* SC5314 en 5 ml de YEPD y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se llevaron a cabo una serie de lavados en PBS y centrifugaciones para finalmente hacer un recuento celular en hemocitómetro y ajustar el inóculo a 10^6 células/ml, del cual se añadió 1 ml en el biorreactor. En el medio empleado fue RPMI1640 y el CBR se configuró para 48 horas a 37 °C, tomando muestras cada 24 horas, con una agitación de 100 rpm.

El desprendimiento de la biopelícula y recuento de unidades formadoras de colonias se realizó según lo descrito en el apartado 3.8.

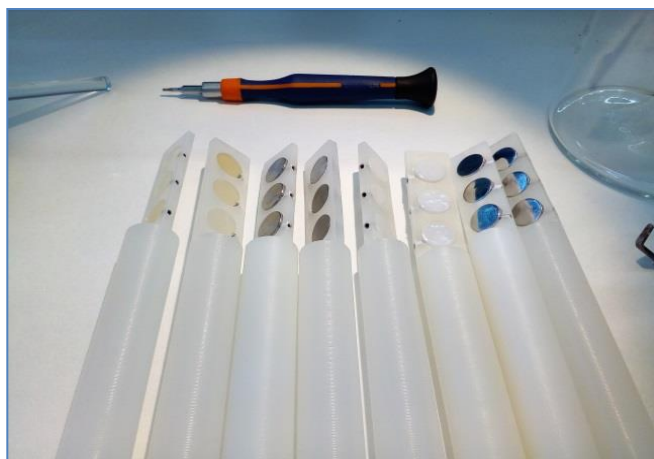


Figura 3.6. Discos de silicona, titanio, zirconio y cromo-cobalto montados en las ocho barras para ser introducidas en el reactor.

3.8. Cuantificación de las células viables en el CBR

Después de 24 o 48 horas, los discos fueron extraídos de las barras con un destornillador y lavados en 25 ml de PBS para eliminar las células planctónicas. A continuación, por medio de unas pinzas y, con cuidado de no alterar la biopelícula, los discos fueron transferidos a tubos de centrifuga de fondo cónico con 30 ml de PBS. El desprendimiento de la biopelícula del disco se consiguió agitando cada tubo durante 30 segundos en vórtex (Heidolph, Fisher Scientific, EEUU) y ultrasonicándolo durante dos minutos al 60% de amplitud (VCX 130, Sonics Materials, EEUU). Las suspensiones de microorganismos resultantes fueron diluidas de forma seriada y, a partir de estas diluciones, se sembraron 100 μ l en placas de PCA para bacterias o en placas de SDA en el caso de *Candida* (Figura 3.7).

Finalmente, las placas fueron incubadas en la estufa durante 24 horas a 37 ± 1 °C permitiendo el crecimiento de UFCs que fueron cuantificadas para calcular el número de microorganismos adheridos al disco inicial (Figura 3.8).

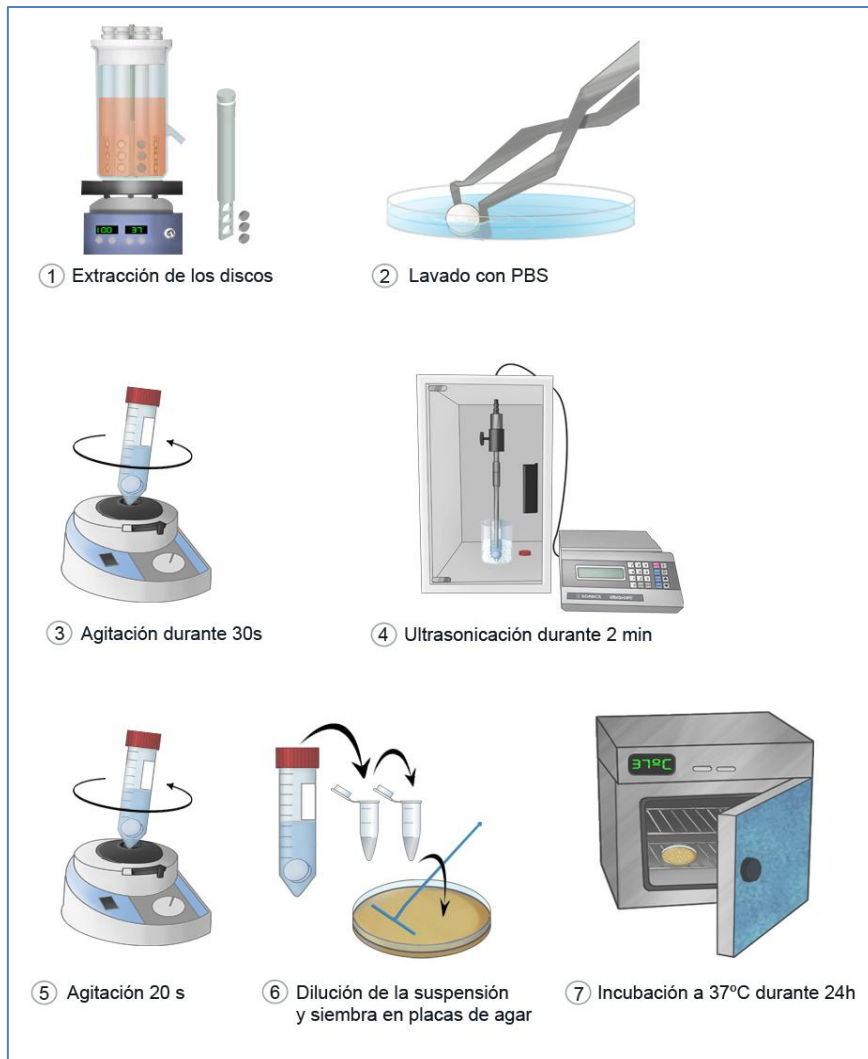


Figura 3.7. Esquema del proceso de desprendimiento de la biopelícula.

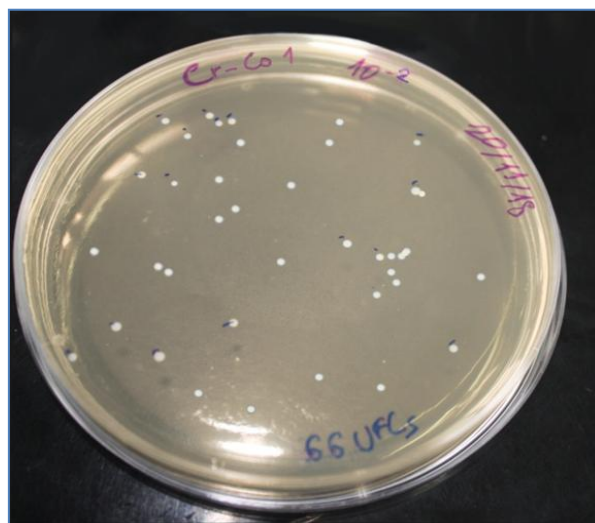


Figura 3.8. Unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* en agar glucosado Sabouraud.

3.9. Análisis estadístico de los datos

La carga de biopelícula se presentó como la media del logaritmo de las UFCs por cm^2 de material. Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de una comparación múltiple aplicando el test de Bonferroni o Games-Howell en función de la homogeneidad de las variaciones (prueba de Levene). Las diferencias se consideraron significativas con un valor p igual o inferior a 0,05. Los cálculos se realizaron con el software estadístico SPSS 24 (IBM SPSS Statistics, Chicago, EEUU). Todos los ensayos se realizaron al menos con tres réplicas y los experimentos se repitieron tres veces en semanas diferentes.

4. RESULTADOS

4.1. Puesta a punto del CBR

4.1.1. Desprendimiento y recuento de la biopelícula

Los parámetros de ultrasonificación deben estar bien controlados para conseguir el desprendimiento de la biopelícula sin afectar a la viabilidad de los microorganismos. Para ello, fue necesario determinar la amplitud óptima del tratamiento con ultrasonidos para desprender las células adheridas a los biomateriales.

La amplitud de ultrasonificación supone el parámetro más importante del proceso, definiéndose como la distancia, medida en micrómetros, entre la posición de la sonda en los estados completamente extendido y totalmente contraído, aunque esta amplitud se suele ajustar a un cierto porcentaje que correspondería realmente a un valor en micrómetros que se puede identificar utilizando el certificado de calibración de la sonda. Cada sonda tiene una amplitud máxima específica. La amplitud y la intensidad de la cavitación están, por tanto, directamente relacionadas.

En este ensayo, llevado a cabo por triplicado, se compararon tres amplitudes de ultrasonificación: 40%, 60% y 80%. Asimismo, se añadieron unos discos de control que fueron agitados con vórtex sin ser tratados con ultrasonidos (V+S-). Los resultados se muestran en la Figura 4.1.

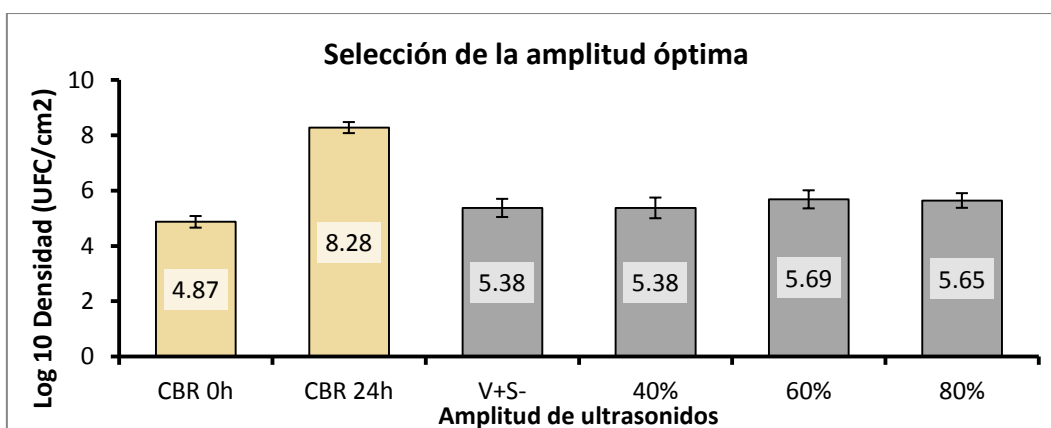


Figura 4.1. Amplitud óptima de ultrasonificación. Las barras amarillas representan las células planctónicas a las 0 horas y 24 horas (CBR 0 h y CBR 24 h). Las barras grises representan las células adheridas al policarbonato por cm² tras ser tratadas con ultrasonidos a diferentes amplitudes (%) o agitadas con vórtex únicamente (V+S-).

Se obtuvieron una cantidad similar de microorganismos con los dos métodos, agitación y ultrasonidos. Sin embargo, se encontró una diferencia entre los microorganismos recuperados por V+S- respecto al tratamiento con ultrasonidos con un 60% de amplitud ($p < 0,05$). En base a este hallazgo, se empleó esa amplitud para obtener el desprendimiento de biopelícula. El tratamiento con ultrasonidos con 80% de amplitud también mostró un buen desprendimiento sin señales de pérdida de viabilidad celular.

El protocolo original del CBR se basaba en el raspado (*scrapping*) de los discos de policarbonato para desprender la biopelícula y proceder al recuento de UFC. Por este motivo, otro objetivo en la optimización del proceso fue comparar el método del protocolo original con la ultrasonificación seleccionada (Figura 4.2).

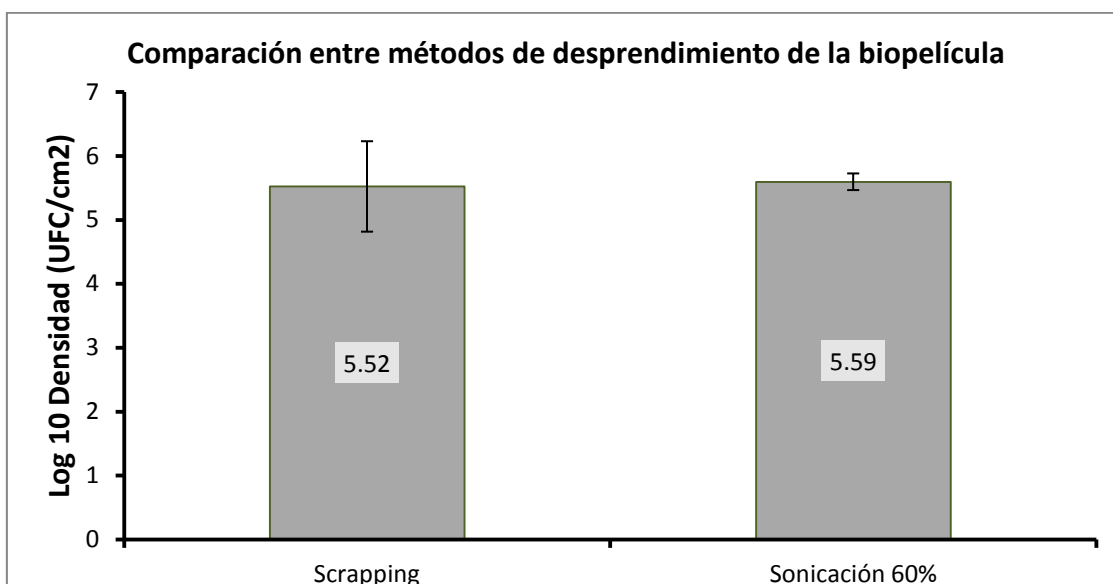


Figura 4.2. Biopelícula obtenida mediante raspado (*scrapping*) y ultrasonidos de discos de policarbonato.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos procesos, aunque la dispersión de los datos fue mayor al utilizar el raspado como método de desprendimiento.

Finalmente, tras estos primeros ensayos se decidió desprender la biopelícula mediante ultrasonificación configurando la amplitud a un 60%, y el tiempo de tratamiento con ultrasonidos a dos minutos.

4.1.2. Adhesión, crecimiento y formación de biopelícula por *Staphylococcus aureus*

En este ensayo se comenzó a trabajar con los parámetros seleccionados para ver la adhesión y desarrollo de biopelícula de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 sobre dos materiales, policarbonato, cuyos discos procedían del protocolo original del CBR, y poliuretano, suministrado por la empresa Leartiker.

El método de desprendimiento de la biopelícula fue modificado como se ha explicado anteriormente; sin embargo, el medio de cultivo y su concentración fueron los mismos, TSB a una concentración de 0,3 g /l (Figura 4.3).

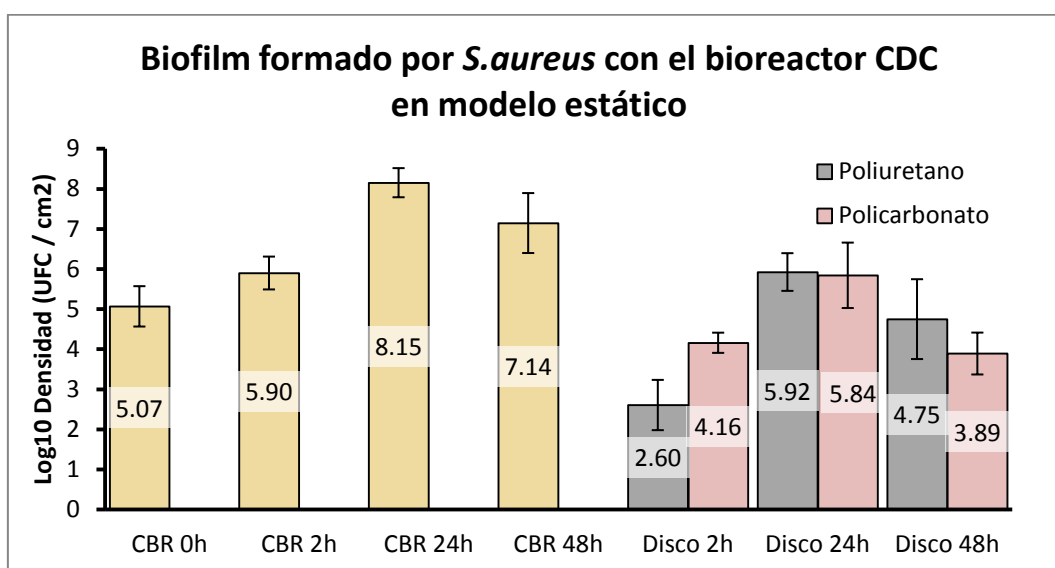


Figura 4.3. Adhesión y formación de biopelícula en discos de poliuretano y policarbonato a las 2 h, 24 h y 48 h. Las barras amarillas representan las células planctónicas en el interior del reactor (CBR) a las 0 h, 2 h, 24 h y 48 h.

Staphylococcus aureus ATCC 49775 fue capaz de crecer adecuadamente en el CBR hasta las 24 horas mostrando una densidad poblacional de $1,4 \times 10^8$ células/ml (Log10 = 8,15). Sin embargo, tanto planctónicamente como en forma de biopelícula, su concentración comenzó a decaer a las 48 horas.

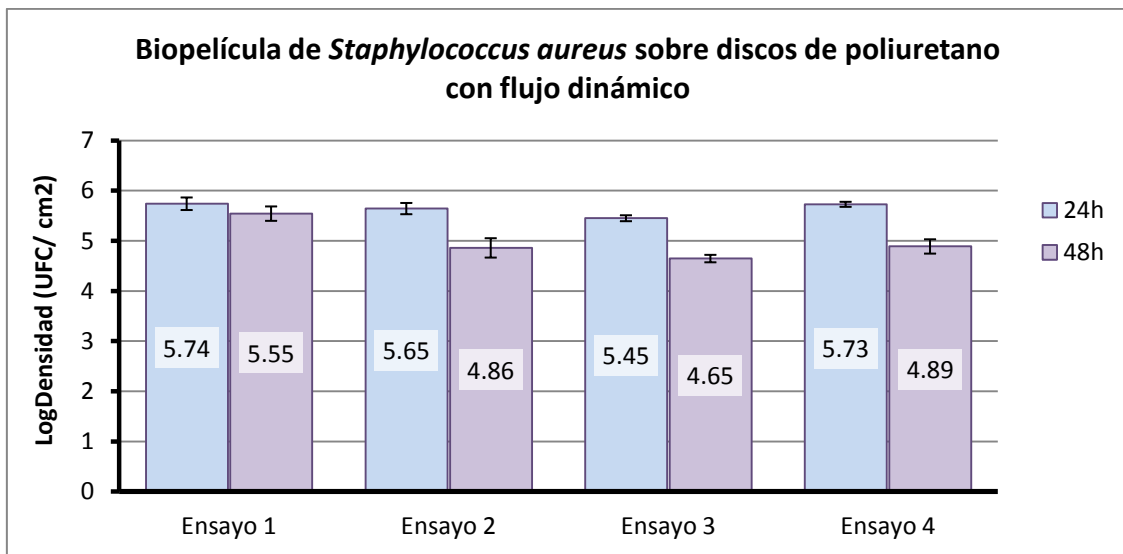
Se encontraron diferencias significativas a las dos horas entre el poliuretano y el policarbonato, indicando que este último era más propenso a la colonización por

Staphylococcus aureus; sin embargo, estas diferencias desaparecieron con el desarrollo de la biopelícula tras 24 horas.

4.1.3. Formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus* aplicando un flujo continuo al reactor

El agotamiento de nutrientes, así como la acumulación de metabolitos tóxicos podría haber sido la causa de esa disminución de la biopelícula a partir de las 24 horas, por ello se decidió implementar el modo de flujo continuo al biorreactor tras 24 horas bombeándose 18 l al día de medio de cultivo fresco. Sin embargo, este ensayo mostró que no había diferencias estadísticamente significativas entre la biopelícula formada sin flujo continuo de nutrientes y la biopelícula formada con un flujo continuo de nutrientes tras 48 horas (Figura 4.4). De este modo, se determinó que la aplicación de este sistema para el crecimiento de la biopelícula, a pesar de mostrar una menor dispersión de los datos, no aportaba mejores resultados siendo además mucho más complejo de llevar a cabo, por lo que el resto de los ensayos se realizaron sin el flujo continuo de nutrientes.

A)



B)

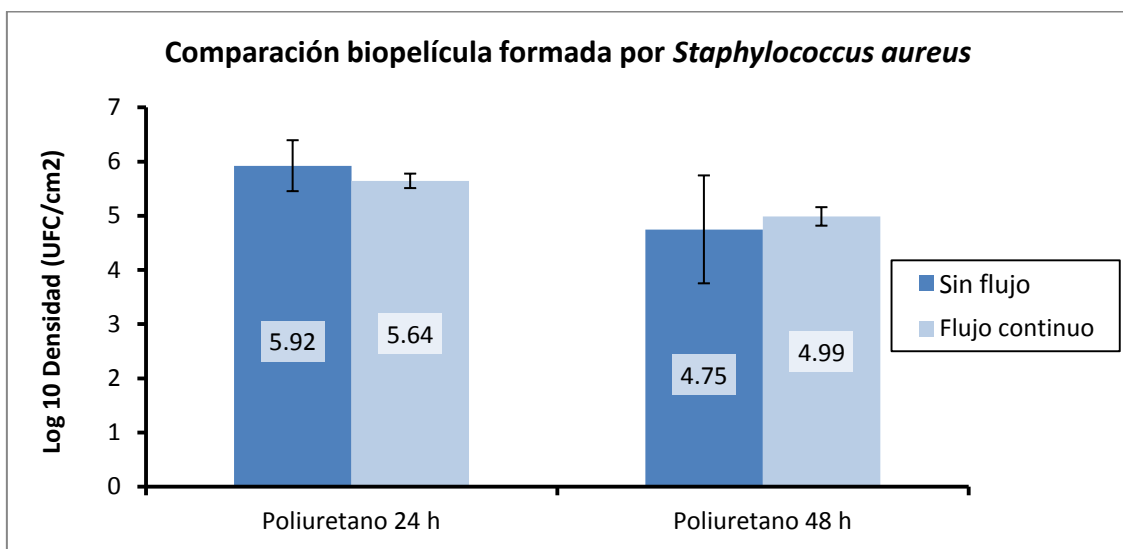


Figura 4.4. Biopelícula de *S. aureus* sobre discos de poliuretano con flujo de nutrientes.
 A) Biopelícula generada en los cuatro ensayos realizados a las 24 horas y 48 horas.
 B) Comparación entre el crecimiento de biopelícula sin flujo continuo de medio de cultivo y con flujo continuo de medio de cultivo.

4.2. Efecto de la rugosidad en la formación de biopelícula

4.2.1. Caracterización de la rugosidad superficial e hidrofobicidad de los discos de poliuretano

Con este ensayo se evaluó si la formación del biopelícula podría verse afectada por la rugosidad. Para ello, se lijaron discos de poliuretano mediante lijas de SiC de diferente tamaño de grano de 320, 800, 1200 y 4000 obteniendo así cuatro rugosidades diferentes.

Con el fin de caracterizar esos cuatro tipos de topografía, cada grupo de discos fue analizado con un microscopio confocal específico para medir rugosidades superficiales y a los datos obtenidos se les aplicó cuatro longitudes de corte diferentes correspondientes a 0,8, 0,25, 0,08 y 0,025 mm. Como hemos comentado en el apartado 1.7.1, estas longitudes de corte o *cut-offs* filtran la rugosidad separándola de lo que se considere ondulación. De todos los resultados generados por el software del microscopio, se han presentado en las tablas 4.1 y 4.2 únicamente los parámetros Sa y Sq obtenidos aplicándose los diferentes *cut-offs*.

Tabla 4.1. Parámetro Sa obtenido con diferentes longitudes de corte.

Tipo de lija	<i>Cut-off</i> 0,8	<i>Cut-off</i> 0,25	<i>Cut-off</i> 0,08	<i>Cut-off</i> 0,025
Sin tratar	0,3423	0,3118	0,2287	0,0849
4000	0,3824	0,3415	0,3199	0,2455
1200	0,5054	0,4590	0,4296	0,3129
800	1,0778	0,9723	0,8738	0,5590
320	1,8800	1,7293	1,3412	0,6946

Tabla 4.2. Parámetro Sq obtenido con diferentes longitudes de corte.

Tipo de lija	<i>Cut-off</i> 0,8	<i>Cut-off</i> 0,25	<i>Cut-off</i> 0,08	<i>Cut-off</i> 0,025
Sin tratar	0,4585	0,4213	0,3111	0,1338
4000	0,5899	0,5198	0,4519	0,3274
1200	0,6639	0,6130	0,5731	0,4186
800	1,5133	1,3910	1,2219	0,7802
320	2,4581	2,2796	1,7872	0,9698

En todos los perfiles de rugosidad obtenidos se observa que el lijado produce un aumento creciente del parámetro S_a y S_q . Además, las tres primeras longitudes de corte muestran valores similares. Sin embargo, el *cut-off* de 0,025 genera unos valores más bajos. Finalmente, se consideró que el *cut-off* de 0,8 (800 μm) era la longitud de onda adecuada para empezar a considerarla como ondulación por lo que a partir de aquí todos los parámetros de los cuatro tipos de discos de poliuretano fueron calculados usando esa longitud de corte como se muestra en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Parámetros de rugosidad de la superficie de los discos lijados y sin modificar.

Tipo de lija	S_a (μm)	S_q (μm)	S_z (μm)	S_{sk}	S_{ku}	S_{dr} (%)
Original	0,34	0,46	24,61	-1,85	24,54	1,87
320	1,88	2,46	22,08	-0,16	4,11	14,68
800	1,08	1,51	19,79	0,97	9,36	9,76
1200	0,51	0,66	9,27	-0,24	5,00	3,43
4000	0,38	0,59	8,52	2,10	19,09	1,94

Parámetros ISO 25178. S_a : Promedio de la altura; S_q : Raíz cuadrada de la media de las desviaciones al cuadrado; S_z : Altura máxima de la superficie; S_{sk} : grado de simetría de las alturas de la superficie con respecto a la línea media; S_{ku} : medida de la nitidez del perfil de rugosidad (kurtosis); S_{dr} : Relación entre el área de contacto desarrollada y proyectada.

De este modo, el disco original mostraba la rugosidad más baja ($S_a = 0,34 \mu\text{m}$). El disco lijado con el número de grano más bajo (320), que correspondiente a partículas abrasivas más grandes, produjo la mayor rugosidad ($S_a = 1,90 \mu\text{m}$), mientras que el número de grano más alto (4000), de partículas abrasivas más finas, produjo una superficie más lisa cercana a la del disco sin tratar ($S_a = 0,38 \mu\text{m}$). La Figura 4.5 muestra una reconstrucción 3D de la superficie de los discos lijados tras haberse aplicado el filtro que elimina la forma del material y la ondulación.

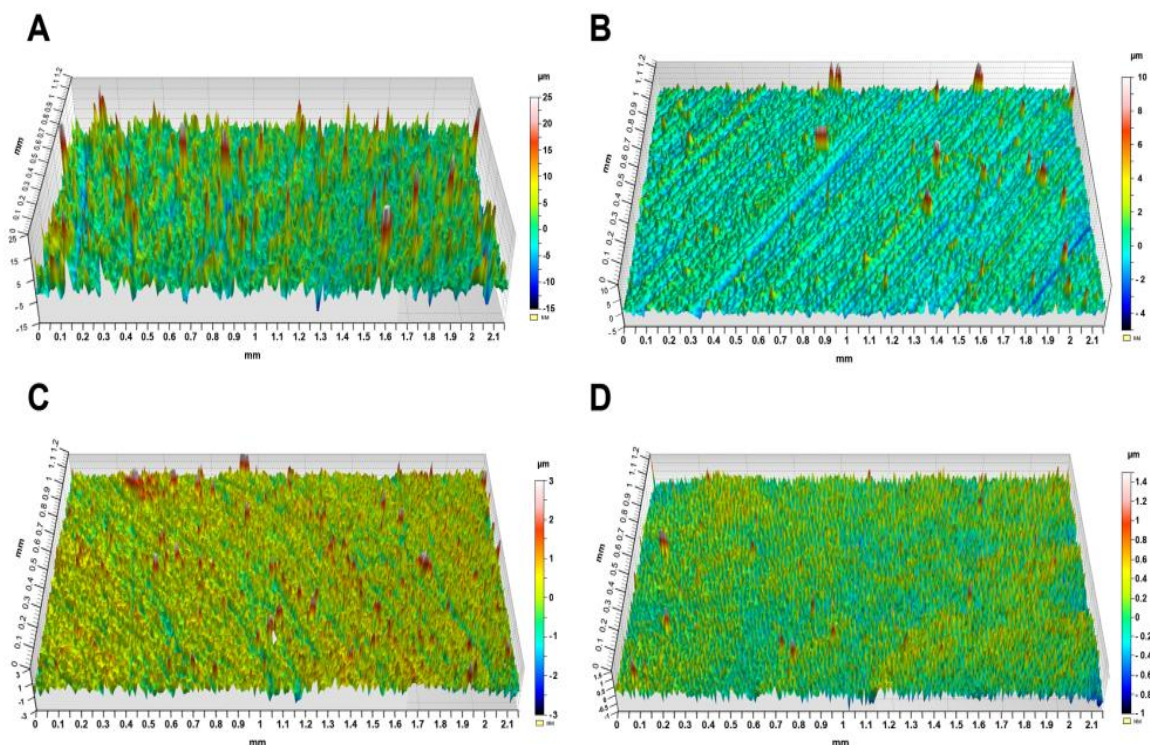


Figura 4.5. Reconstrucción 3D de la topografía superficial de los discos de poliuretano. A) Superficie lijada con la lija de 320; B) Superficie lijada con la lija de 800; C) Superficie lijada con la lija de 1200; D) Superficie lijada con la lija de 4000.

En la Tabla 4.4 se puede observar como al modificar la rugosidad del material, la humectabilidad también se ve afectada, aumentando su ángulo de contacto debido a que el poliuretano es un polímero hidrófobo de baja energía.

Tabla 4.4. Humectabilidad de los discos de poliuretano.

Tipo de Lija	Ratio de rugosidad (r)	Ángulo de contacto θ_Y (°)	Ángulo de contacto teórico θ_m (°)
Original	1,02	103,84 ± 0,93	103,58 ± 0,91
320	1,15	130,09 ± 2,80	124,15 ± 2,24
800	1,10	130,89 ± 3,59	126,59 ± 3,09
1200	1,03	119,05 ± 1,76	118,00 ± 1,69
4000	1,02	108,41 ± 4,48	108,04 ± 4,39

θ_Y : Ángulo de contacto medido. θ_m : Ángulo de contacto teórico en una superficie plana ideal.

4.2.2. Biopelícula formada por *Staphylococcus epidermidis* en discos de poliuretano

La rugosidad afectó a la abundancia de biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* sólo en los discos procesados (Figura 4.6). La biopelícula más pequeña se observó en el disco lijado con la menor rugosidad ($S_a = 0,38 \mu\text{m}$) con un logaritmo de densidad bacteriana de 6,65 ($p < 0,01$). La mayor formación de biopelícula se observó en el disco con la mayor rugosidad ($S_a = 1,88 \mu\text{m}$) con un logaritmo de 7,45 ($p < 0,005$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el desarrollo de la biopelícula entre discos con rugosidad intermedia ($S_a = 0,51 \mu\text{m}$ y $1,08 \mu\text{m}$). Es interesante resaltar que el disco original ($S_a = 0,34 \mu\text{m}$), con un logaritmo de densidad en torno a 7, no mostró ser la superficie donde menos biopelícula se formó, y se observaron diferencias estadísticamente significativas con el disco que presentaba una S_a de 0,38.

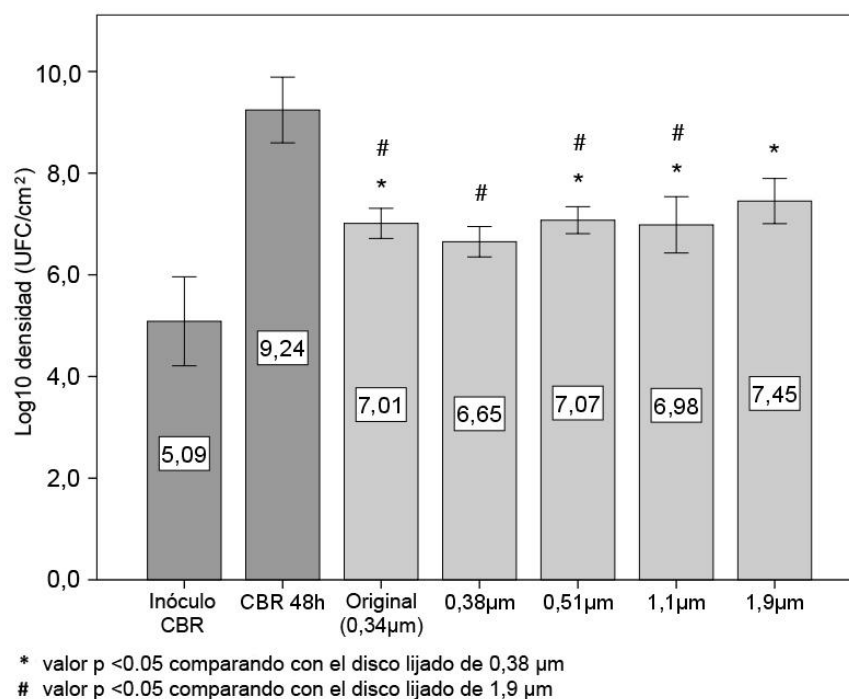


Figura 4.6. Biopelícula formada sobre discos con diferente rugosidad. Las barras de color gris oscuro representan el crecimiento planctónico en el reactor a las 0 y 48 horas. Las barras de color gris claro representan el biofilm producido por *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 en discos de poliuretano después de 48 horas.

La estructura y diferencias en la distribución de la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* en todos los discos lijados fueron confirmadas por SEM. En la figura 4.3 se muestran fotografías representativas de la adherencia estafilocócica en las superficies lijadas. Los discos tratados con las lijas de 320 y 800 presentaban ranuras largas y profundas a lo largo de toda la superficie. Por el contrario, los discos tratados con lijas de 1200 y 4000 mostraron una superficie más lisa. En todos los discos estudiados se observaron biopelículas con una red importante de componentes de la matriz extracelular, siendo más numerosas en aquellos discos con superficies más rugosas. La adhesión estafilocócica y el desarrollo de biopelículas se vieron influenciados por la topografía de la superficie del poliuretano, observándose un aumento de la adhesión bacteriana y los agregados bacterianos más grandes en las superficies más rugosas, concretamente, en los discos lijados con la lija de 320 respecto a los discos lijados con la lija de 4000. El SEM mostró la presencia de sustancias poliméricas extracelulares y las clásicas estructuras 3D similares a setas. Las biopelículas se distribuyeron en grupos por toda la superficie de los discos, pero se observaron especialmente grandes agrupaciones estafilocócicas en los bordes de los discos (Figura 4.7). Una mayor concentración de biopelículas en los bordes de los discos podría asociarse al hecho de que la barra del CBR donde se colocan los discos, al ser ligeramente más ancha, protege a los bordes del disco de la fuerza hidrodinámica del caldo de cultivo permitiendo una mayor acumulación y adhesión de bacterias en esa área.

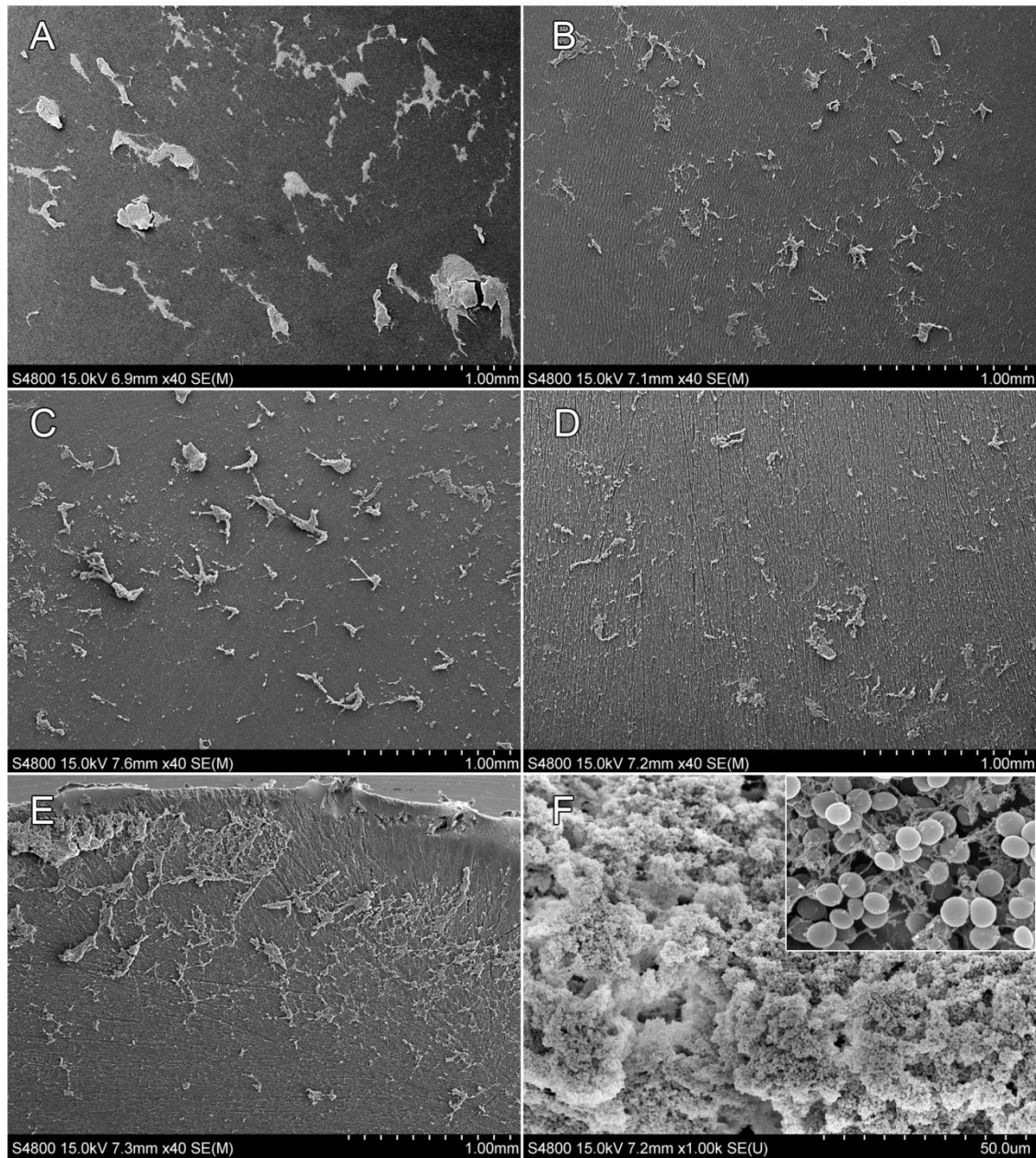


Figura 4.7. Microscopía electrónica de barrido de la biopelícula formada en la superficie de los discos de poliuretano con diferentes rugosidades: A) Sin lijar. B) Lijado con lija de 4000. C) Lijado con lija de 1200. D) Lijado con lija de 800. E) Lijado con lija de 320. F) Biopelícula y matriz polimérica extracelular formada por *Staphylococcus epidermidis*.

4.3. Efecto de la hidrofobicidad en la formación de biopelícula

Este experimento se dividió en tres partes. En primer lugar, se realizó la caracterización de la superficie de seis biomateriales: Teflón, silicona, poliuretano, policarbonato, titanio y vidrio de borosilicato. En segundo lugar, se determinó la hidrofobicidad celular de *Staphylococcus epidermidis* CECT 4184 (ATCC 35984), *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 (ATCC 27853), *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922) y *Candida albicans* NCPF 3153. Por último, se cuantificó la biopelícula generada por estos cuatro microorganismos en los seis biomateriales.

4.3.1. Caracterización de la rugosidad superficial e hidrofobicidad de los seis biomateriales empleados

Los seis biomateriales seleccionados para los ensayos con biopelículas fueron analizados en base a su rugosidad superficial y ángulo de contacto. La altura de rugosidad media, S_a , de cada material estuvo dentro del rango de 0,03-3,64 μm y el ángulo de contacto entre 20° y 112°. De acuerdo con la rugosidad, los biomateriales se clasificaron en cuatro grupos. En el primer grupo se incluiría al material más áspero, el teflón ($S_a=3,81 \mu\text{m}$), seguido del policarbonato ($S_a=0,96 \mu\text{m}$), que formaría el segundo grupo. El titanio y el poliuretano se englobarían en un tercer grupo con una rugosidad intermedia ($S_a= 0,29 \mu\text{m}$ y $S_a = 0,34 \mu\text{m}$ respectivamente). El último grupo lo formarían la silicona ($S_a=0,08 \mu\text{m}$) y el vidrio de borosilicato ($S_a=0,03 \mu\text{m}$) que mostraron ser los biomateriales de menor rugosidad (Tabla 4.5 y Figura 4.8).

Los biomateriales se pueden dividir también en cuatro grupos de acuerdo a su hidrofobicidad, siendo el teflón y la silicona los materiales más hidrófobos ($p>0,05$), seguidos del poliuretano. El policarbonato y el titanio presentaron menor hidrofobicidad y, finalmente, el borosilicato resultó ser el material más hidrófilo ($p>0,01$). El material más rugoso, teflón, fue también el más hidrófobo, al igual que el menos rugoso, vidrio de borosilicato, fue el menos hidrófobo. Sin embargo, no hay una

relación directa entre estas dos propiedades, ya que la silicona era tan hidrófoba como el teflón, pero mostraba una rugosidad muy baja (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Parámetros de rugosidad superficial de los diferentes biomateriales estudiados ordenados según su hidrofobicidad.

Biomaterial	Parámetros de rugosidad					Hidrofobicidad
	Sa (μm)	Sq (μm)	Sz (μm)	Ssk	Sku	Ángulo de contacto ($^\circ$)
Teflón	3,639	5,917	141,049	2,959	34,039	111,64 \pm 5,15
Silicona	0,158	0,295	12,474	7,133	130,384	108,05 \pm 2,69
Poliuretano	0,342	0,458	24,611	-1,849	24,542	105,33 \pm 2,20
Policarbonato	0,904	1,147	30,137	-0,175	3,527	76,63 \pm 7,02
Titanio	0,258	0,335	5,307	0,430	5,411	55,18 \pm 19,63
Borosilicato	0,030	0,074	1,310	7,285	81,787	20,88 \pm 4,82

Parámetros ISO 25178. Sa: Promedio de la altura; Sq: Raíz cuadrada de la media de las desviaciones al cuadrado;

Sz: Altura máxima de la superficie; Ssk: Grado de simetría de las alturas de la superficie con respecto a la línea

media; Sku: Medida de la nitidez del perfil de rugosidad (kurtosis)

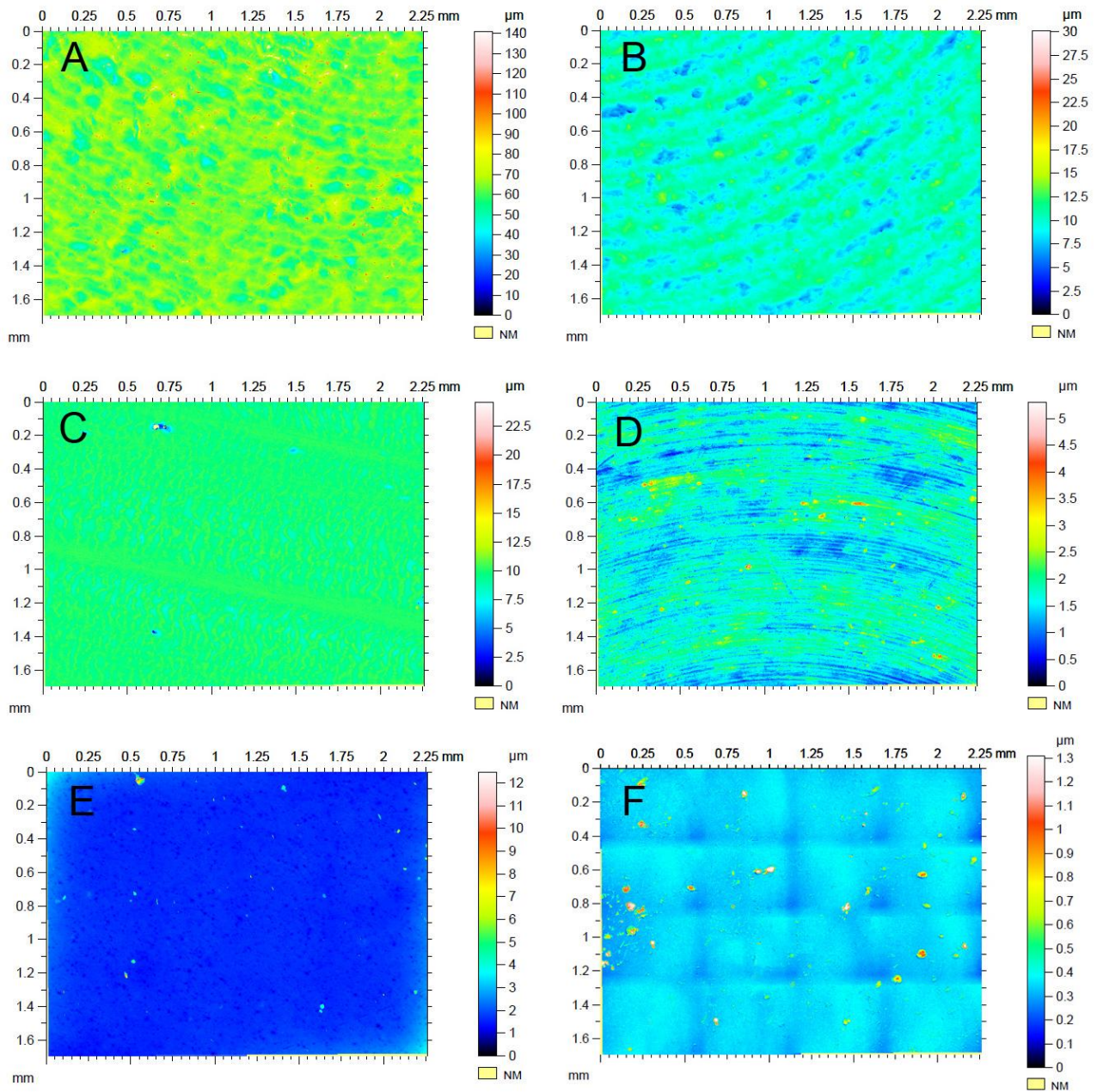


Figura 4.8. Reconstrucción 3D de la superficie de los biomateriales estudiados: A) Teflón. B) Policarbonato. C) Poliuretano. D) Titanio. E) Silicona. F) Borosilicato.

4.3.2. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular microbiana mediante el test de adherencia a N-hexadecano

La hidrofobicidad de la superficie celular de los cuatro microorganismos seleccionados fue estudiada mediante el ensayo de adhesión microbiana al hidrocarburo hexadecano. De acuerdo con Krepsky et al. (287), las cepas consideradas altamente hidrófobas presentarían valores superiores al 50%, y las moderadamente hidrófobas oscilarían entre el 20% y el 50%. Las superficies celulares hidrófilas mostrarían valores por debajo del 20%. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, con una hidrofobicidad del 56,6 % y 66,6 %, respectivamente, mostraban una hidrofobicidad media-alta de la superficie celular, mientras que *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922) y *Candida albicans* NCPF 3153 presentaron una hidrofobicidad muy baja (Figura 4.9).

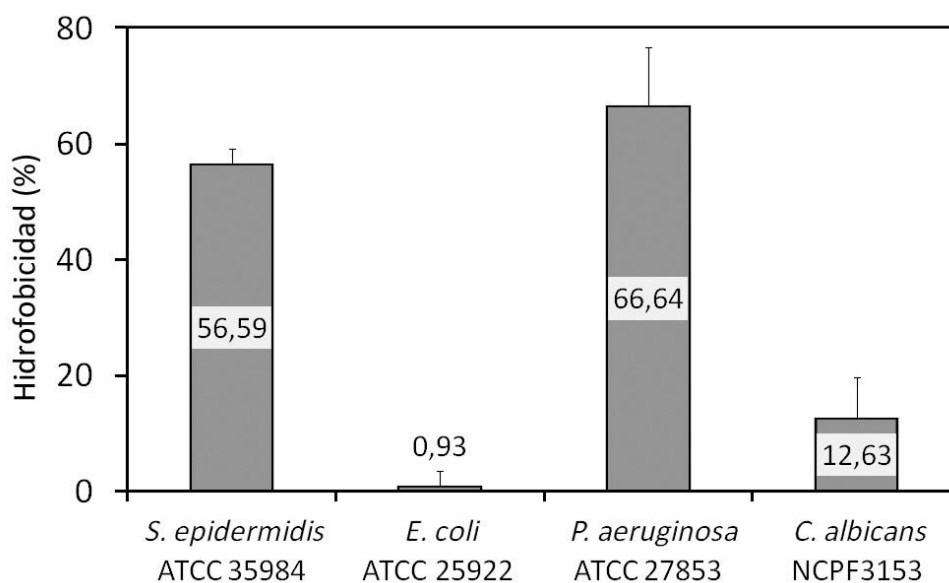


Figura 4.9. Hidrofobicidad de la superficie celular microbiana de acuerdo al test de adherencia a hexadecano.

4.3.3. Formación de biopelícula en los biomateriales estudiados

El teflón fue el material más rugoso e hidrófobo y, a su vez, donde más biopelícula microbiana se desarrolló, junto con la silicona. Por el contrario, el vidrio de borosilicato, que era el biomaterial menos rugoso y menos hidrófobo, y el titanio, permitieron un pobre desarrollo de biopelícula. En base a estos datos, el teflón y el vidrio de borosilicato fueron empleados como controles para el resto de los biomateriales en el análisis estadístico. Como la concentración y composición de los medios de cultivo eran diferentes, se comparó también la proporción entre los microorganismos sésiles adheridos a teflón por centímetro cuadrado y la concentración de microorganismos planctónicos por mililitro.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 presentó prácticamente la misma proporción de células adheridas a un centímetro cuadrado de teflón que de células planctónicas suspendidas en un mililitro de medio de cultivo (0,93) no diferenciándose estadísticamente de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (0,91). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas tanto con *Escherichia coli* CECT 434 ($p < 0,05$) como *Candida albicans* NCPF 3153 ($p < 0,001$), que mostraron una ratio menor (0,8 y 0,6, respectivamente) a lo largo de los ensayos.

La cantidad de biopelícula desarrollada por *Staphylococcus epidermidis* se asoció directamente con la clasificación de los materiales en función de su hidrofobicidad. *Staphylococcus epidermidis* se adhirió y desarrolló una biopelícula más profusa en los discos de teflón y silicona (densidad: $1,6 \times 10^8$ CFU/ml y $3,6 \times 10^7$ CFU/ml, respectivamente) que eran los materiales más hidrófobos. La biopelícula desarrollada en los materiales restantes fue significativamente inferior ($p < 0,001$). En concreto, borosilicato, titanio y policarbonato, los materiales con menor hidrofobicidad, presentaron la biopelícula menor (densidad: $3,75 \times 10^6$ UFC/ml, $5,14 \times 10^6$ UFC/ml y $6,93 \times 10^6$ UFC/ml, respectivamente) y no se encontraron diferencias significativas entre la densidad de las biopelículas desarrolladas en estos tres materiales (Figura 4.10).

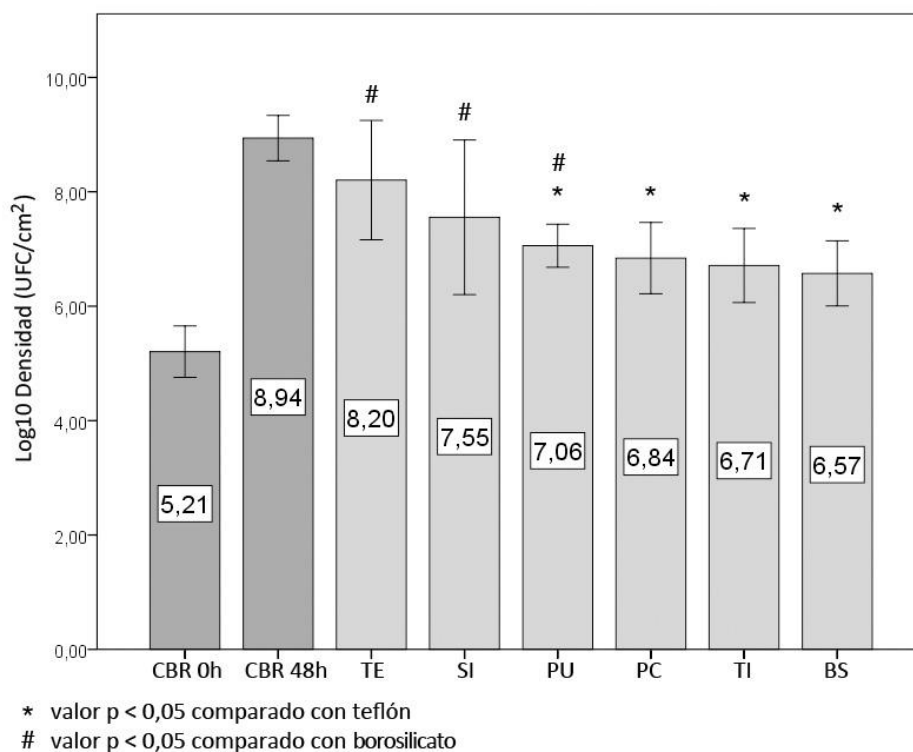


Figura 4.10. Biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. Las barras grises oscuras representan el crecimiento planctónico a las 0 horas y a las 48 horas en el CBR. Las barras grises representan la biopelícula formada en cada biomaterial.

Pseudomonas aeruginosa y *Escherichia coli* crecieron en las mismas condiciones y, a pesar de que ambas bacterias alcanzaron una densidad celular muy similar en el caldo de cultivo, la formación de biopelícula por *Pseudomonas aeruginosa* fue significativamente mayor a la de *Escherichia coli* ($p < 0,001$). Además, la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* formada en todos los materiales ensayados no era muy diferente (en torno a 3×10^7 UFC/cm²), a excepción de la desarrollada en superficies hidrófilas como el titanio y el vidrio de borosilicato donde fue menos abundante ($p < 0,05$). El borosilicato fue el biomaterial más resistente al desarrollo de biopelícula por *Pseudomonas aeruginosa* ($4,9 \times 10^6$ UFC/cm²) (Figura 4.11). Por el contrario, *Escherichia coli* presentó la biopelícula menos profusa en los discos de titanio ($p < 0,001$) y la mayor producción de biopelícula en los biomateriales más hidrófobos, como teflón, silicona y policarbonato, sin diferencias significativas (Figura 4.12).

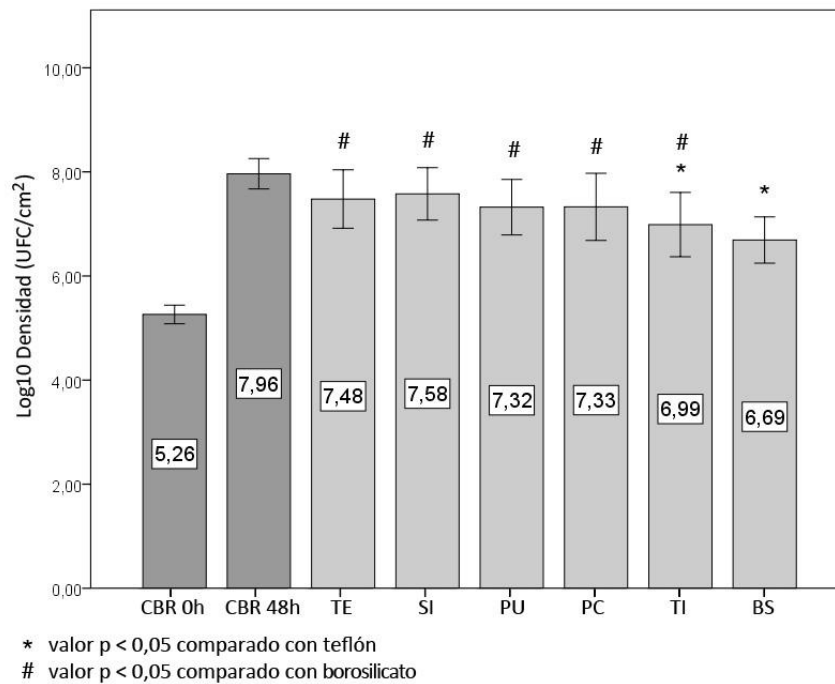


Figura 4.11. Biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las barras grises oscuras representan el crecimiento planctónico a las 0 horas y a las 48 horas en el CBR. Las barras grises representan la biopelícula formada en cada biomaterial.

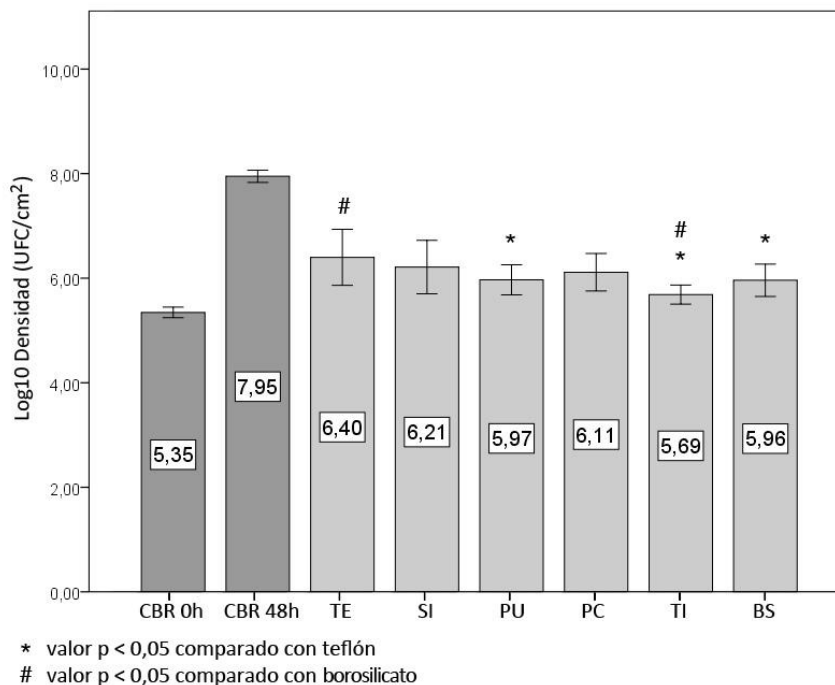


Figura 4.12. Biopelícula de *Escherichia coli* CECT 434. Las barras grises oscuras representan el crecimiento planctónico a las 0 horas y a las 48 horas en el CBR. Las barras grises representan la biopelícula formada en cada biomaterial.

En el caso de *Candida albicans* NCPF 3153, el teflón fue el material donde más biopelícula se desarrolló a las 48 horas ($p < 0,001$). Del mismo modo, el titanio fue el biomaterial que permitió la menor formación de biopelícula por *Candida albicans* ($p < 0,05$) seguido por el vidrio de borosilicato (Figura 4.13).

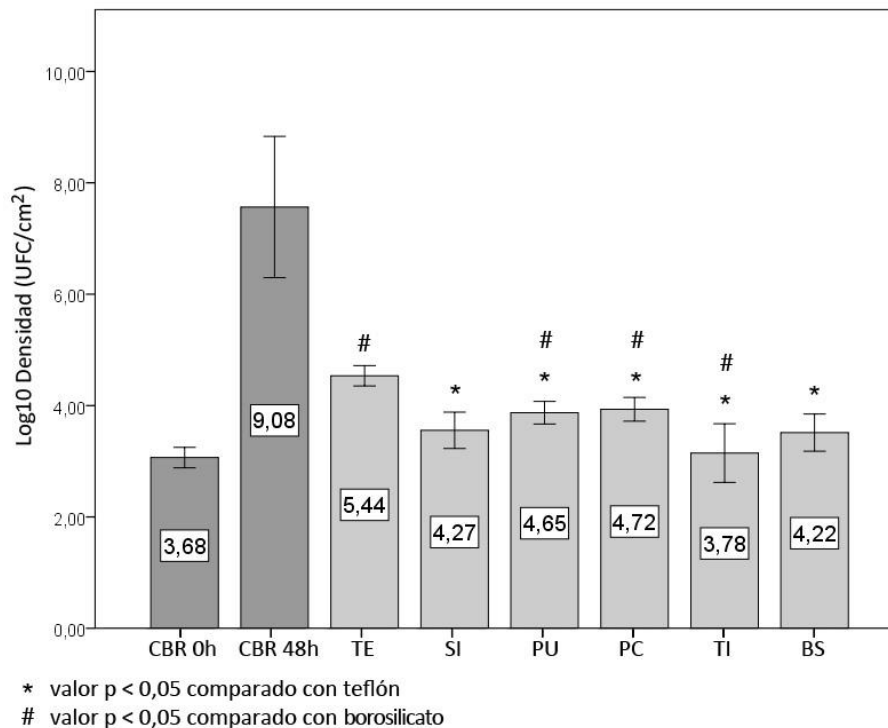


Figura 4.13. Biopelícula de *Candida albicans* NCPF 3153. Las barras grises oscuras representan el crecimiento planctónico a las 0 horas y a las 48 horas en el CBR. Las barras grises representan la biopelícula formada en cada biomaterial.

Las fotografías de microscopía electrónica de barrido muestran biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* con una densa capa microbiana y una alta producción de matriz extracelular sobre teflón (Figuras 4.14A y 4.14H). También hubo abundantes grupos de biopelículas en silicona y poliuretano. Sin embargo, en los materiales más hidrófilos se observaron muchas células aisladas que parecen estar adheridas a grietas y poros (Figura 4.14D-G).

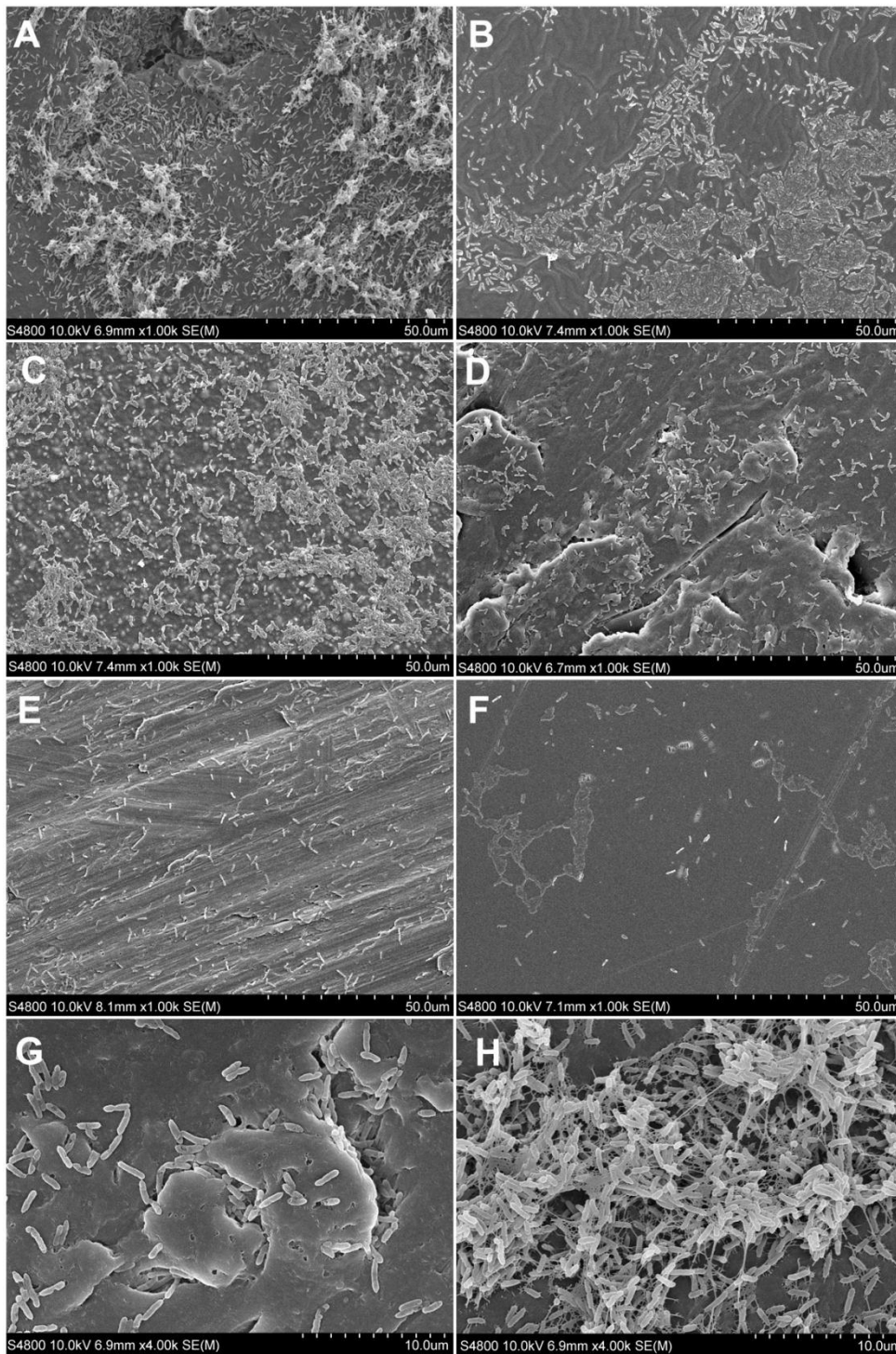


Figura 4.14. Microscopía electrónica de barrido (x1000) de la biopelícula de 48 horas de *Pseudomonas aeruginosa* formada en la superficie de los seis biomateriales: A) Teflón, B) Silicona, C) Poliuretano, D) Policarbonato, E) Titanio, F) Vidrio de borosilicato. G) *Pseudomonas aeruginosa* sobre disco de policarbonato (x4000). H) Biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* sobre disco de teflón (x4000).

4.4. Estudio de la influencia del medio de cultivo en la formación de biopelícula

4.4.1. Ensayo en placas de microtitulación de poliestireno

La producción de biopelícula de *Candida* es muy heterogénea dependiendo de la especie seleccionada. Sin embargo, a través de este ensayo se pudo observar que esa heterogeneidad variaba también en base al medio seleccionado, siendo un factor clave en la capacidad de cada cepa para producir biopelícula como muestran las Figura 4.15 y 4.16.

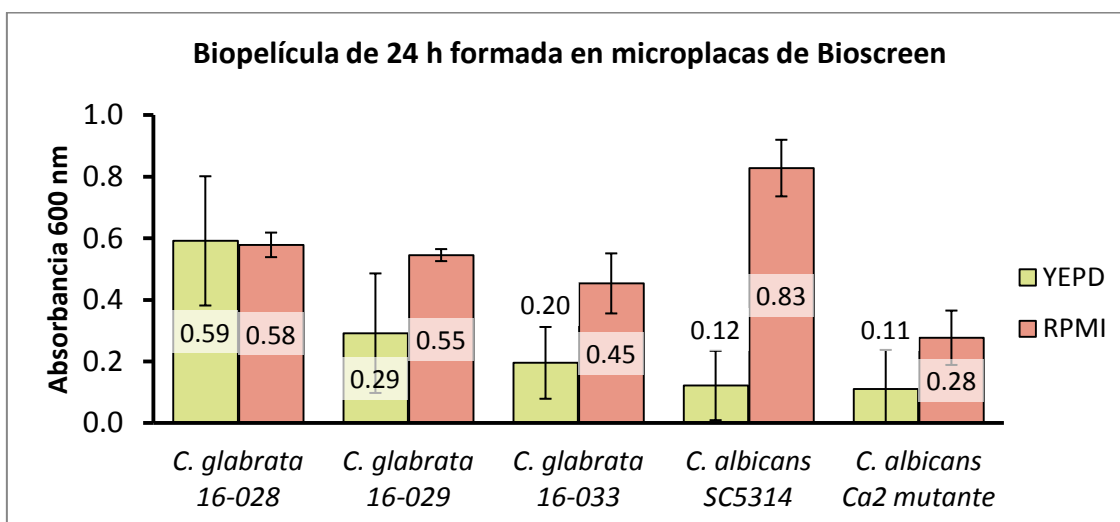


Figura 4.15. Biomasa de tres aislamientos clínicos de *Candida glabrata*, con un control positivo de biopelícula de *Candida albicans* SC5314 y un control negativo de biopelícula de *Candida albicans* Ca2. Biopelícula evaluada con tinción con cristal violeta tras 24 horas.

La absorbancia obtenida con *Candida glabrata* 16-028 es la misma tanto en medio YEPD como en RPMI ($p < 0,001$). Sin embargo, eso no ocurría con el resto de las cepas ensayadas donde el medio RPMI permitió un mayor desarrollo de biopelícula, especialmente con *Candida albicans* SC5314.

Este resultado demuestra la importancia de elegir un adecuado medio de cultivo ya que atendiendo a la biopelícula generada en YEPD podríamos concluir que *Candida*

glabrata 16-028 es altamente productora de biopelícula (absorbancia_{600nm} = 0,59) mientras que *C. glabrata* 16-029 no produciría apenas biopelícula (absorbancia_{600nm} = 0,29). Sin embargo, los resultados en RPMI nos llevarían a concluir que *Candida glabrata* 16-028 y *Candida glabrata* 16-033 generan una biopelícula muy similar (absorbancia_{600nm} = 0,58 y absorbancia_{600nm} = 0,55 respectivamente).

También se realizó este mismo experimento en otros tres ensayos en otro tipo de placas de microtitulación para confirmar el resultado. En este caso se emplearon placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano y un lector de microplacas diferente del Bioscreen. Los resultados obtenidos fueron prácticamente idénticos a los obtenidos empleando las placas y la lectura en Bioscreen (Figura 4.16).

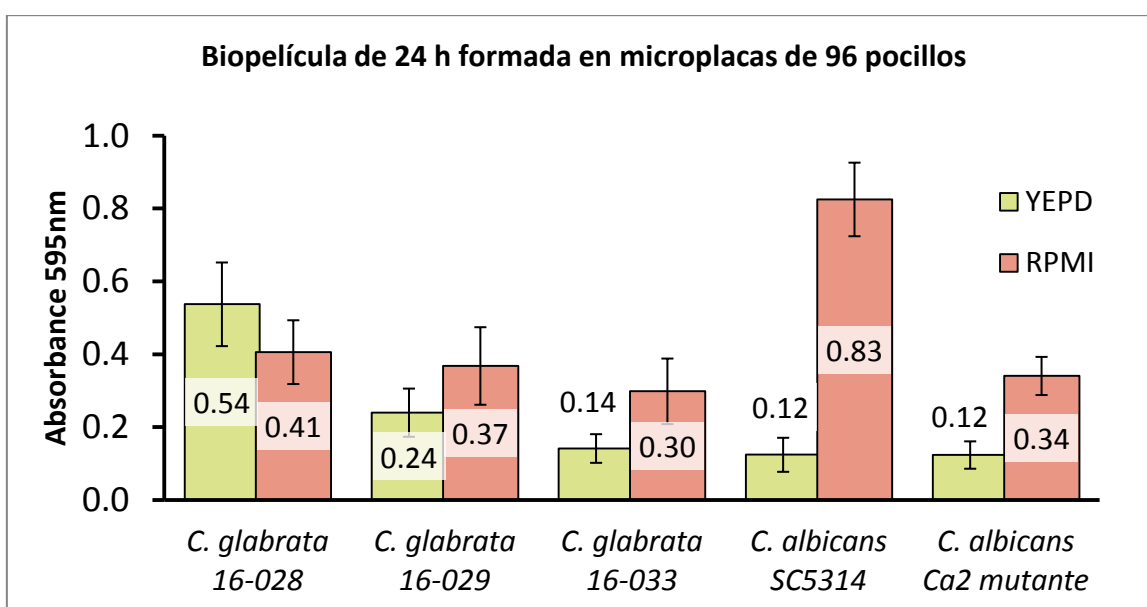
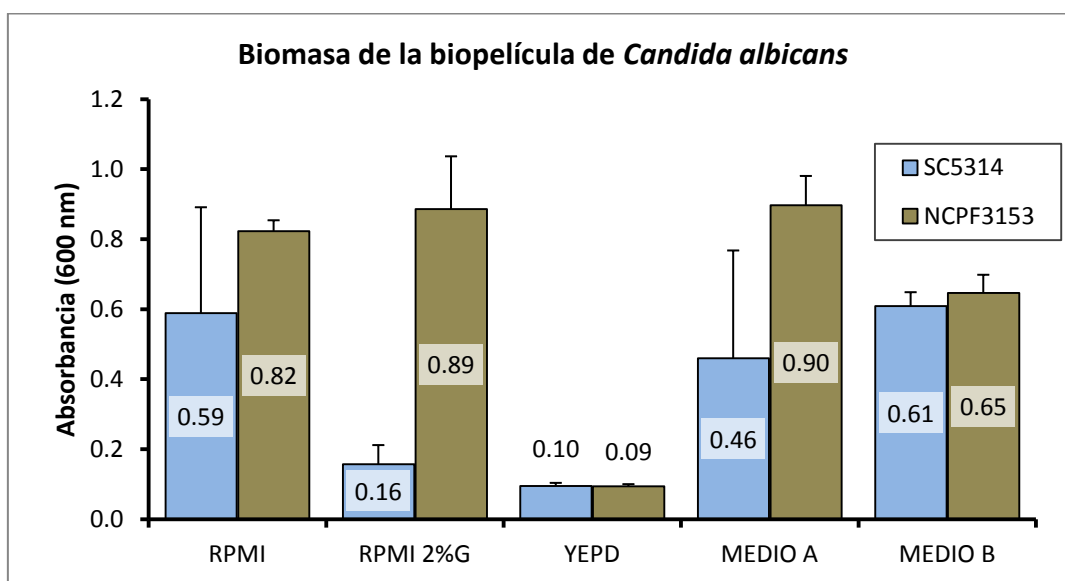


Figura 4.16. Biomasa de tres aislamientos clínicos de *Candida glabrata*, el control positivo de biopelícula de *Candida albicans* SC5314 y el control negativo de biopelícula de *Candida albicans* Ca2. La biomasa, después de una incubación de 24 horas en medio YEPD o RPMI, fue teñida con cristal violeta y la absorbancia medida a 595 nm.

La gran diferencia en la formación de biopelícula de *Candida albicans* SC5314 al usar RPMI respecto a utilizar YEPD llevó al planteamiento acerca de qué factor podría provocar esa diferencia de absorbancia, por ello se elaboraron diferentes medios con diferente concentración de sales y azúcares y se optó, no sólo por analizar su biomasa, sino también la actividad metabólica de la biopelícula (Figura 4.17).

A)



B)

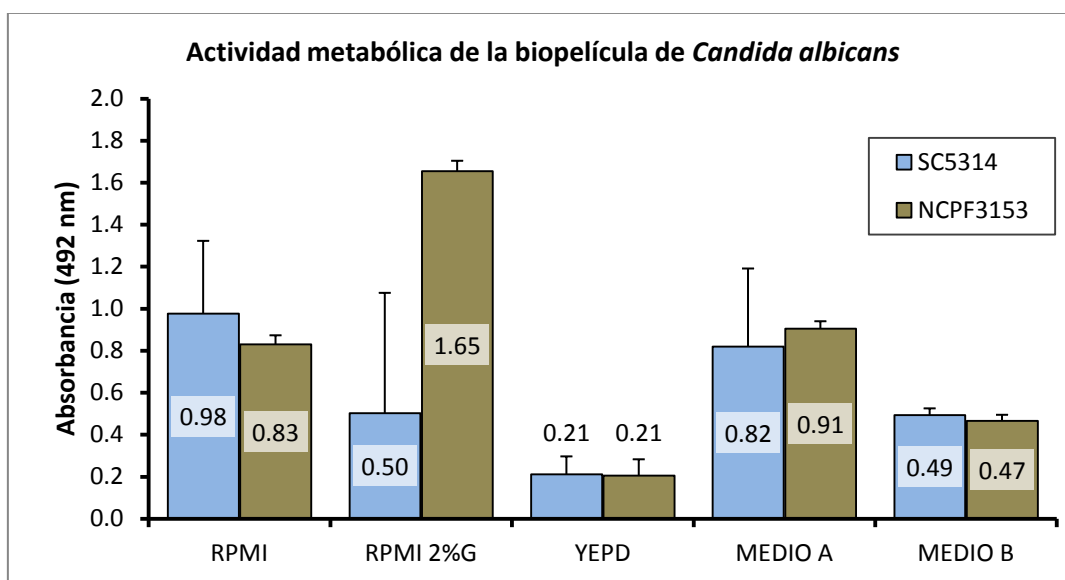


Figura 4.17. Biopelícula generada por *Candida albicans* SC5314 y *Candida albicans* NCPF3153. A) Biomasa de 24 horas cuantificada con cristal violeta. B) Actividad metabólica de 24 horas cuantificada mediante XTT.

El RPMI permitió el desarrollo de una abundante biopelícula; sin embargo, la cepa SC5314 mostró menor capacidad para adherirse al poliestireno, por lo que la barra de error en esta cepa era mayor al despegarse parte de la biopelícula fácilmente. Concretamente, en la Figura 4.18 se muestra el proceso de lavado de los pocillos con RPMI 2% Glu. La utilización de este medio tan glucosado generó una densa biopelícula

que habitualmente no se adhería al fondo del pocillo y era arrastrada con el simple hecho de volcar la placa durante los lavados (Figura 4.18A). Esta biopelícula con la forma circular del pocillo sigue intacta, pero no se encuentra lo suficientemente adherida a la superficie del pocillo y acaba desechada (Figura 4.18B).

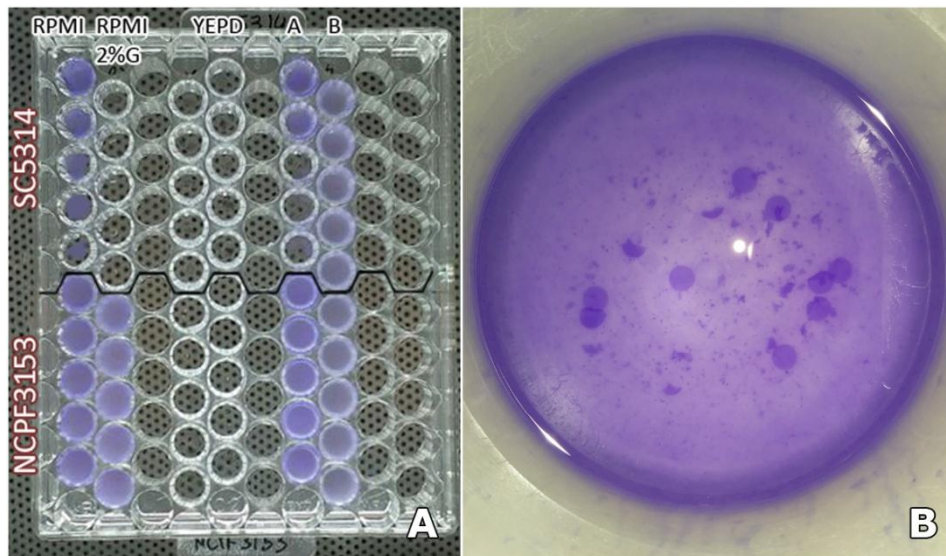
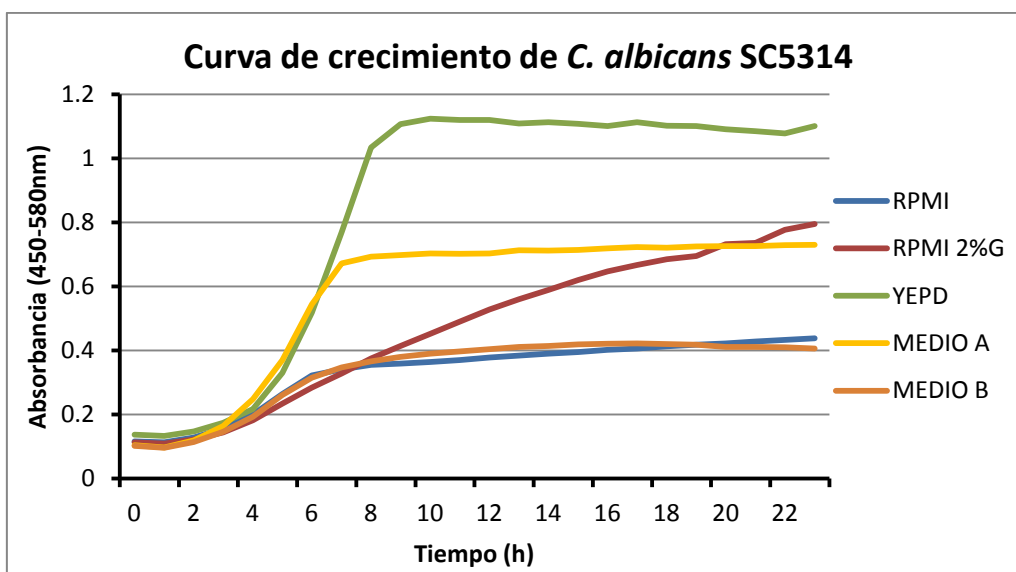


Figura 4.18. Proceso de desprendimiento de la biopelícula en medio RPMI con 2% de glucosa (RPMI 2% Glu). A) Placa teñida con cristal violeta con biopelícula desprendida en *Candida albicans* SC5314 para el medio RPMI 2% Glu. B) Vaso de precipitados con las biopelículas desechadas.

Asimismo, el crecimiento poblacional en medio YEPD fue el más alto (Figura 4.19) y, al igual que con RPMI 2% glu en la cepa SC5314, tras los lavados el fondo del pocillo quedaba transparente. En este caso no había formación de hifas ni ninguna película en el fondo del pocillo, sólo crecen células planctónicas, por lo que la dispersión de estos resultados era muy pequeña.

Un hecho interesante fue la significativa variación de resultados encontrados al modificar el medio YEPD reduciendo su contenido de nutrientes y añadiendo 0,9% de NaCl (Medio A y Medio B. Ver tabla 3.1). El Medio A permitía el desarrollo de una biopelícula similar a la obtenida en medio RPMI. Por su parte, el Medio B también aumentaba la producción de biopelícula con respecto al YEPD, aunque en menor grado (Figura 4.17).

A)



B)

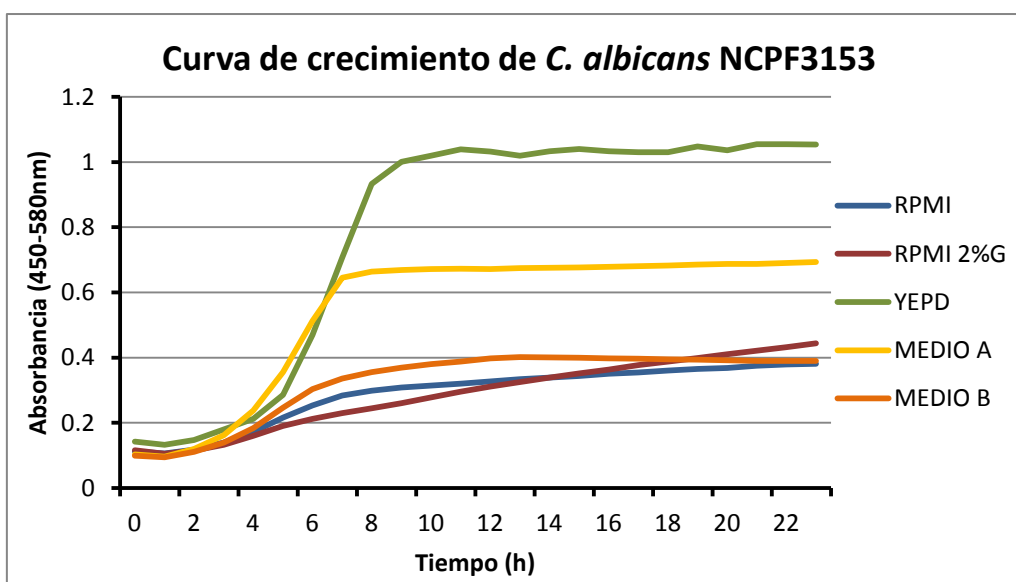


Figura 4.19. Curva de crecimiento de *Candida albicans* utilizando diferentes medios de cultivo. A) *Candida albicans* SC5314 B) *Candida albicans* NCPF3153.

Una situación similar se observaba al ensayar cuatro cepas de *Candida albicans* obtenidas de catéteres. En la figura 4.20 se puede observar como la biopelícula variaba considerablemente cuando se empleaba como medio de cultivo RPMI 2% Glu. Estas variaciones parecen depender más de la propia capacidad de adhesión de la cepa y su estado, que del propio medio en sí.

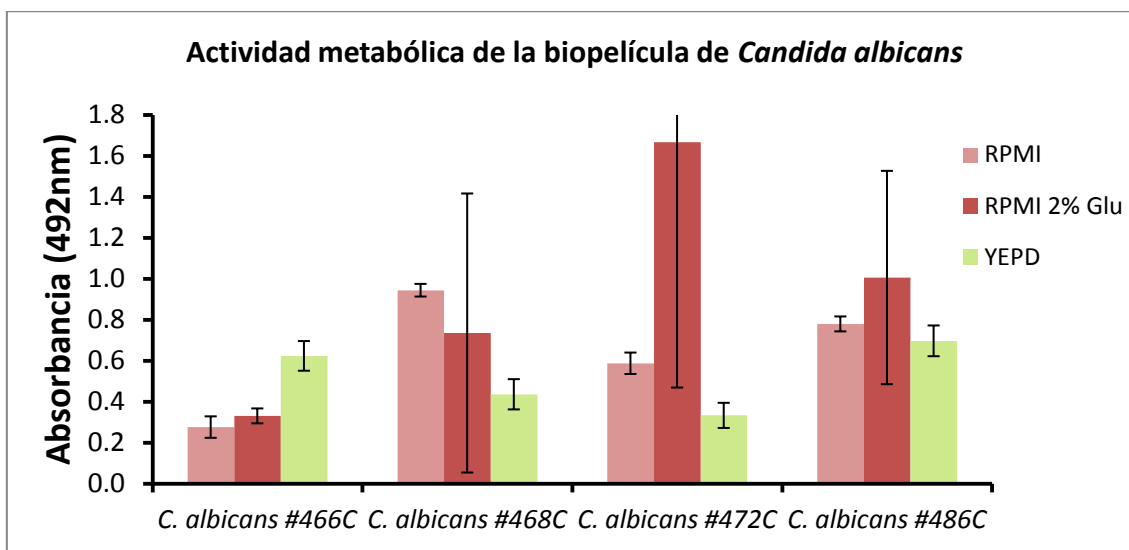


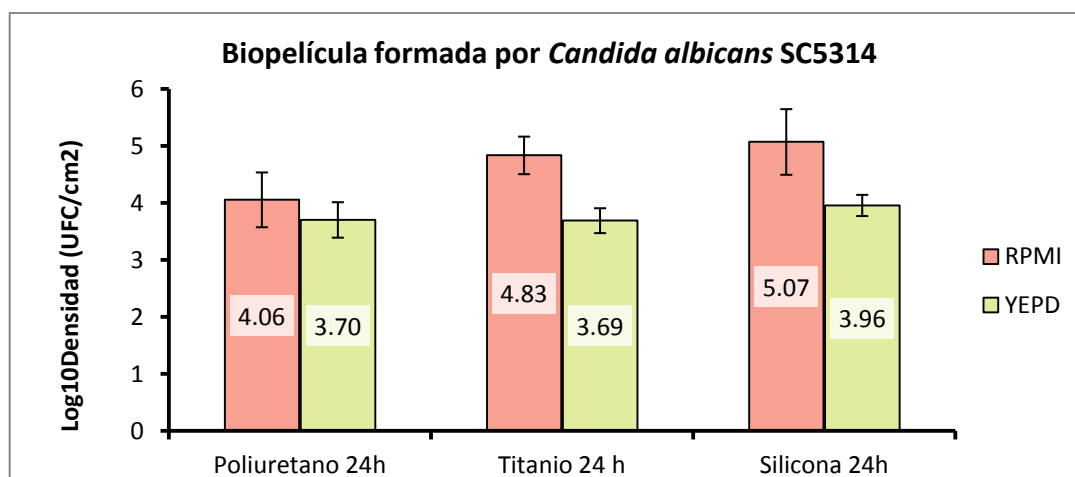
Figura 4.20. Actividad metabólica tras 24 horas de cuatro aislamientos de *Candida albicans* en tres medios diferentes: RPMI, RPMI 2% Glu y YEPD.

4.4.2. Estudio del desarrollo de biopelículas en el CBR

Una vez estudiada la influencia que pueden tener estos medios de cultivo en la formación de biopelículas sobre microplacas de poliestireno, se comparó la formación de biopelícula en los medios YEPD y RPMI en un modelo, a mayor escala y con agitación, con tres de los principales materiales empleados en los dispositivos biomédicos: poliuretano, silicona y titanio.

Los resultados obtenidos fueron acordes con los resultados de los ensayos placas de microtitulación mostrando una mayor formación de biopelícula al utilizar como medio de cultivo el RPMI (Figura 4.21).

A)



B)

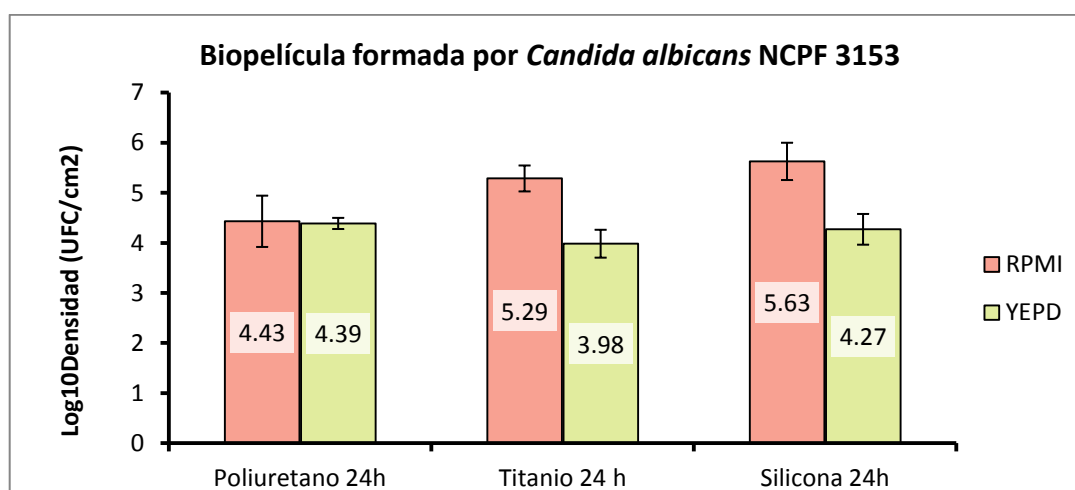


Figura 4.21. Biopelícula desarrollada en poliuretano, titanio y silicona por *Candida albicans* tras 24 horas de incubación en el BCR empleando RPMI o YEPD. A) *Candida albicans* SC5314. B) *Candida albicans* NCPF3153.

Candida albicans SC5314 incrementó más de 10 veces el número de células adheridas tanto a silicona como a poliuretano por centímetro cuadrado en medio RPMI en comparación con el medio YEPD ($p < 0,001$). En el caso de *Candida albicans* NCPF3153, el RPMI mostraba un aumento en la producción de biopelícula de más de 20 veces ($p < 0,001$), excepto sobre el poliuretano, donde tanto con YEPD como con RPMI no se encontraron diferencias significativas con ninguna de las dos cepas ($p > 0,05$).

Como se aprecia en la Figura 4.22, *Candida albicans* no produjo hifas ni desarrolló una verdadera biopelícula en el medio el YEPD. En cambio, la biopelícula formada por esta especie fúngica en medio RPMI fue densa y abundante con un gran crecimiento de hifas y biopelícula, resaltando la importancia de una adecuada selección de las condiciones a ensayar.

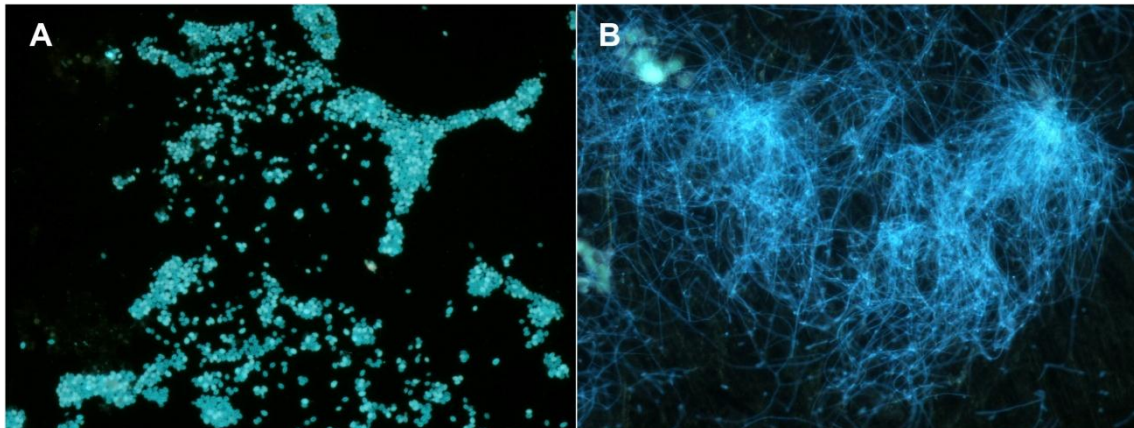


Figura 4.22. Microscopía de fluorescencia con tinción blanco de calcofluor (20x) de *Candida albicans* NCPF3153. A) Biopelícula generada en medio YEPD; B) Biopelícula generada en medio RPMI.

4.5. Inhibición del crecimiento en la biopelícula preformada

Tres de los nueve aislamientos clínicos escogidos no formaron biopelícula en ninguno de los medios de cultivo estudiados: *Candida parapsilosis* ATCC 20019, *Candida parapsilosis* CDC317 y *Candida parapsilosis* #501. *Candida parapsilosis* #582 desarrolló una biopelícula pobre en medio RPMI y *Candida parapsilosis* #651 no desarrolló biopelícula en este medio, aunque ambas cepas sí produjeron biopelícula en medio YEPD.

La actividad metabólica para el resto de las cepas fue similar, mostrando valores de intensidad de absorbancia entre 0,7 y 0,9 tanto en medio RPMI como en YEPD (Figura 4.23).

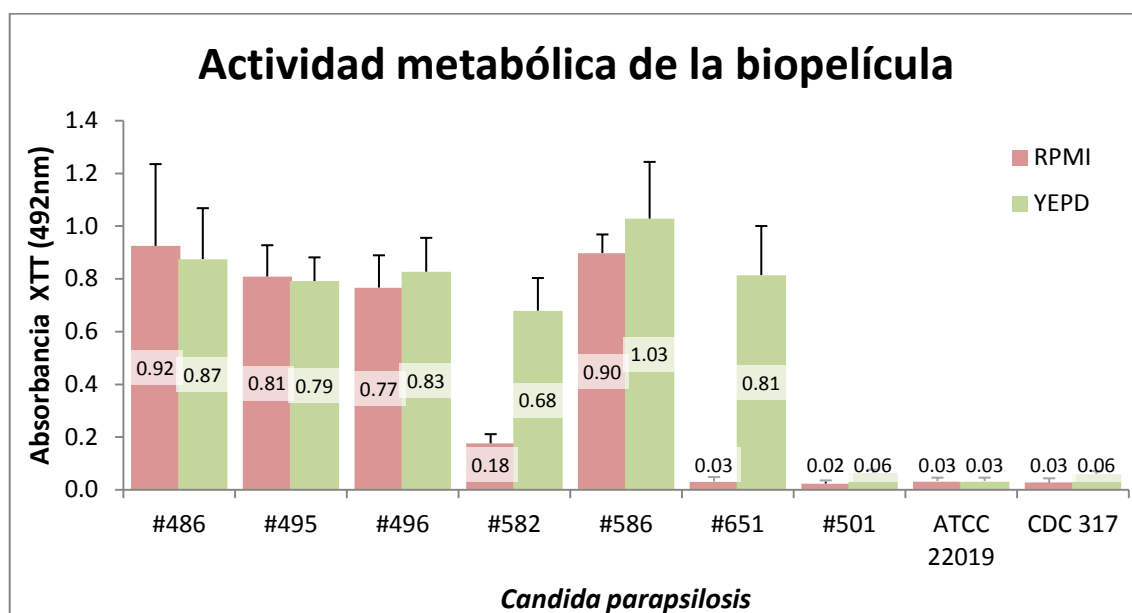
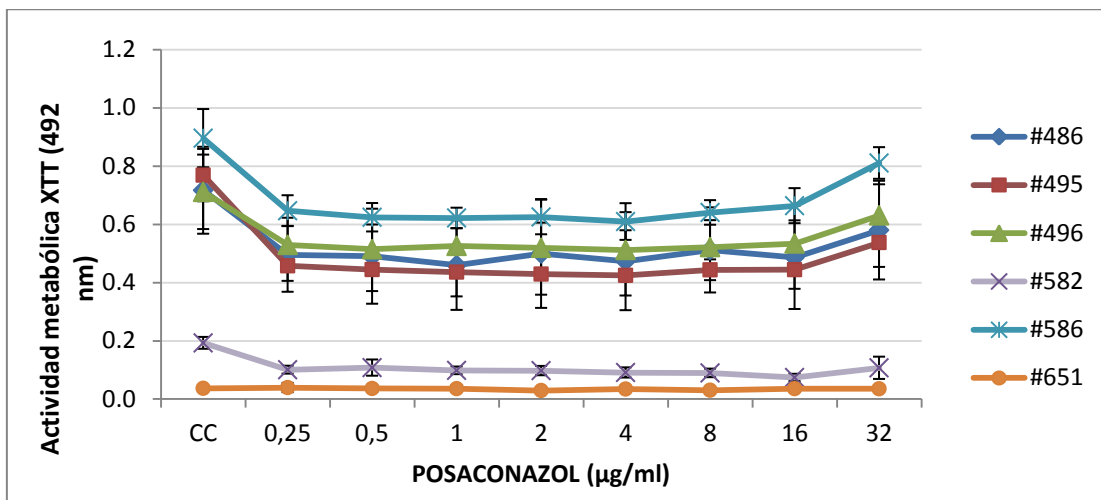


Figura 4.23. Comparación de la actividad metabólica de las biopelículas generadas por nueve aislamientos de *Candida parapsilosis* en medios RPMI y YEPD.

Posteriormente, tras añadirse los fármacos antifúngicos, se observaron importantes diferencias en la producción de biopelícula en los medios YEPD y RPMI. En primer lugar, concentraciones subinhibitorias de los fármacos antifúngicos inducían un aumento de la actividad metabólica de la biopelícula de *Candida parapsilosis* en medio YEPD en comparación con el control de crecimiento (CC). Otro efecto característico fue que el desarrollo de la biopelícula en medio RPMI tras añadir los azoles (posaconazol y voriconazol) se veía reducido al 60% independientemente de la concentración de antifúngico empleada, mientras que en YEPD no se observó ninguna inhibición de la biopelícula (Figuras 4.24 y 4.25).

A)



B)

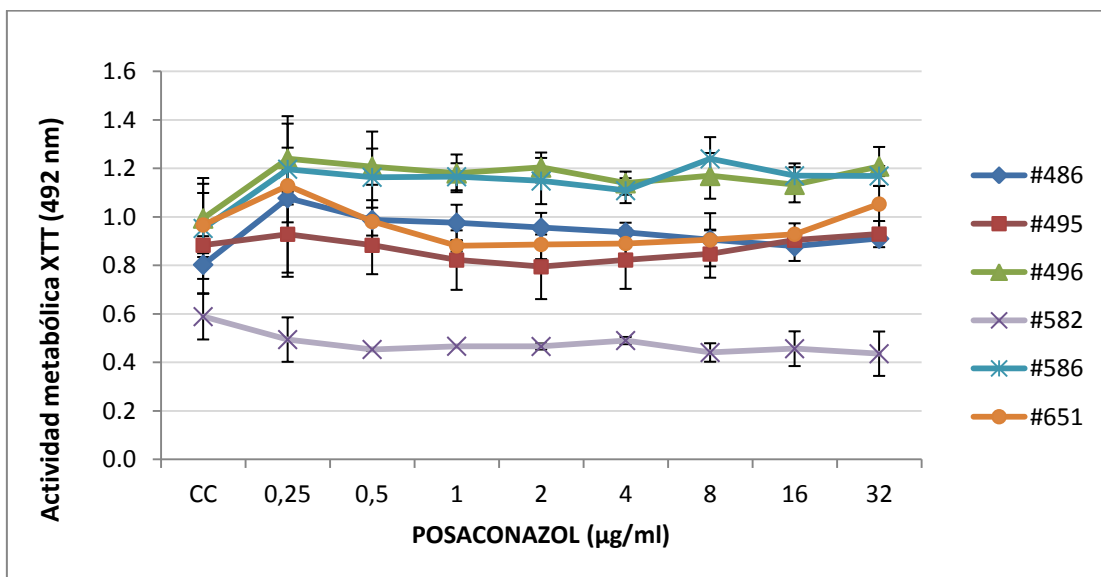
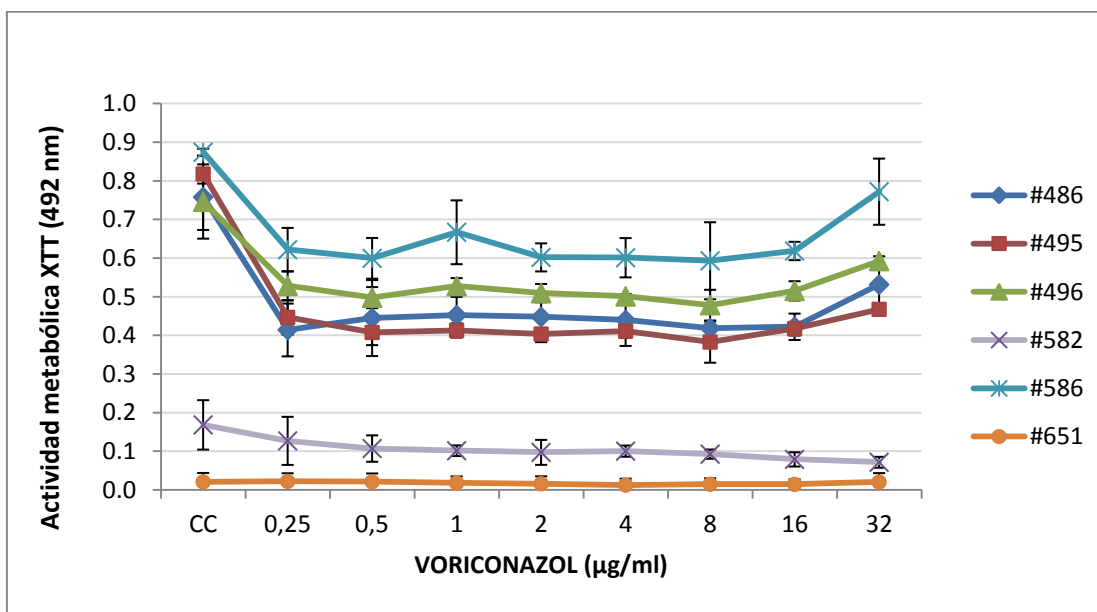


Figura 4.24. Reducción de la actividad metabólica de la biopelícula de seis cepas de *Candida parapsilosis* al ser tratadas con posaconazol. A) En medio RPMI; B) En medio YEPD.

A)



B)

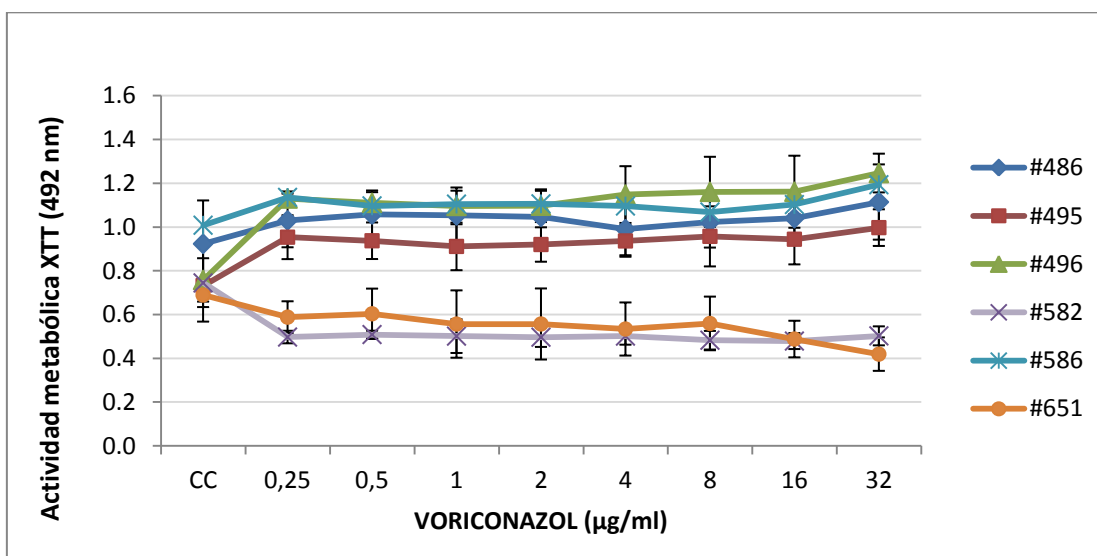
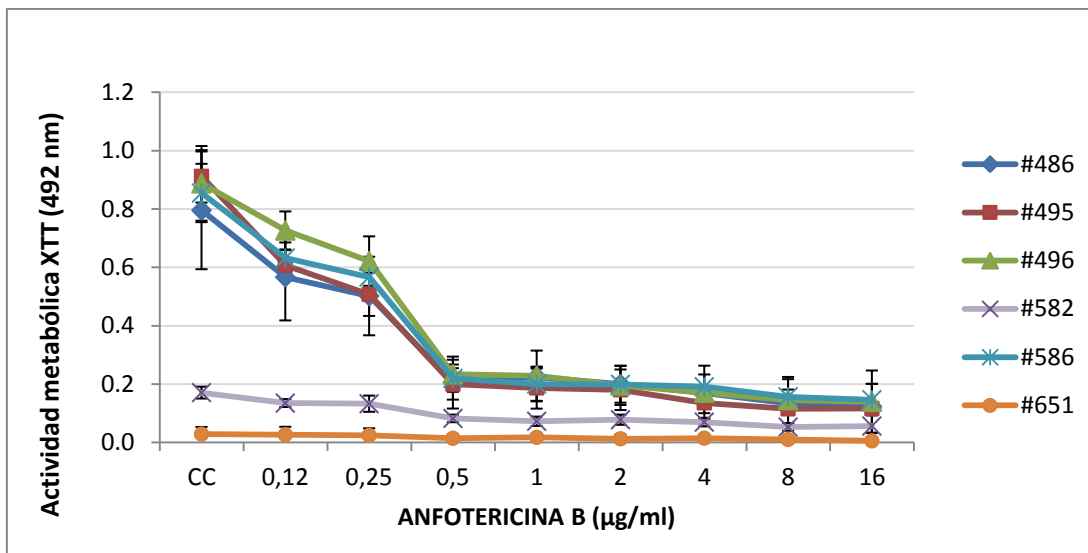


Figura 4.25. Reducción de la actividad metabólica de la biopelícula de seis cepas de *Candida parapsilosis* al ser tratadas con voriconazol. A) En medio RPMI; B) En medio YEPD.

Una concentración de 0,5 µg/ml de anfotericina B redujo el crecimiento de la biopelícula al 30% (70% de inhibición) en medio RPMI. Sin embargo, se requirieron 16 µg/ml de anfotericina B para obtener resultados similares en el medio YEPD. Los

resultados mostrados en la Figura 4.26 indican que la efectividad inhibitoria de este fármaco antifúngico se reduce significativamente en YEPD.

A)



B)

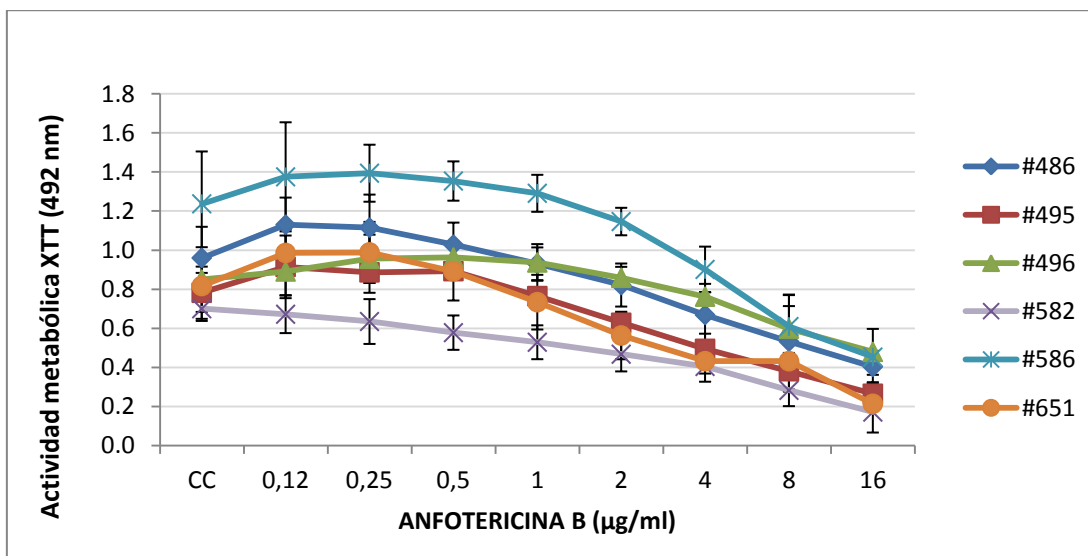
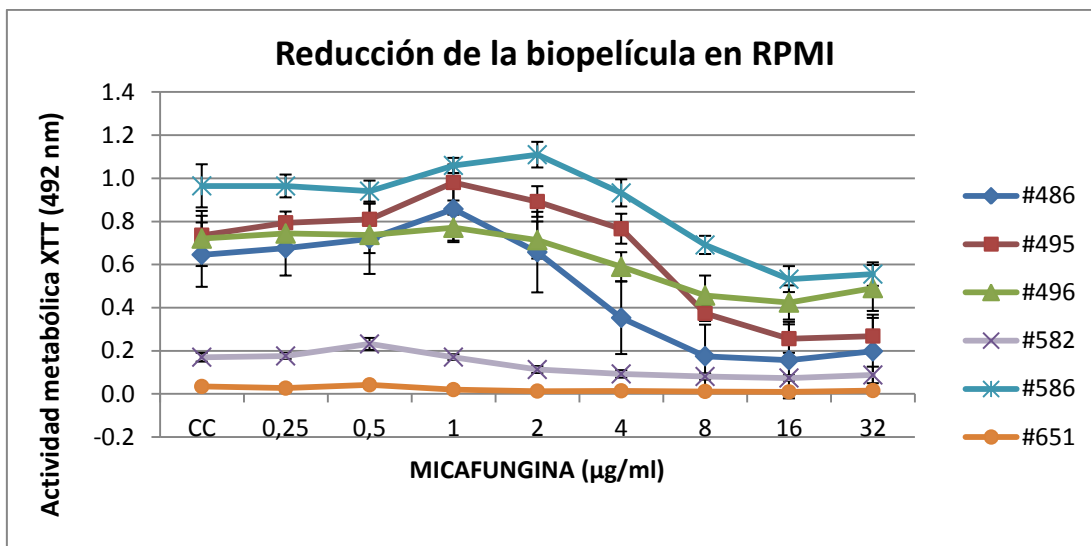


Figura 4.26. Reducción de la actividad metabólica de la biopelícula de seis cepas de *Candida parapsilosis* tratadas con anfotericina B. A) En medio RPMI; B) En medio YEPD.

Se encontró el efecto contrario con micafungina, presentando muy poca inhibición de la biopelícula en medio RPMI (hasta los 16 µg/ml de micafungina no se observó un 50% de inhibición), mientras que en medio YEPD esta equinocandina fue muy efectiva

y, a partir de 2 $\mu\text{g/ml}$ de micafungina se inhibía el desarrollo de biopelícula (Figura 4.27).

A)



B)

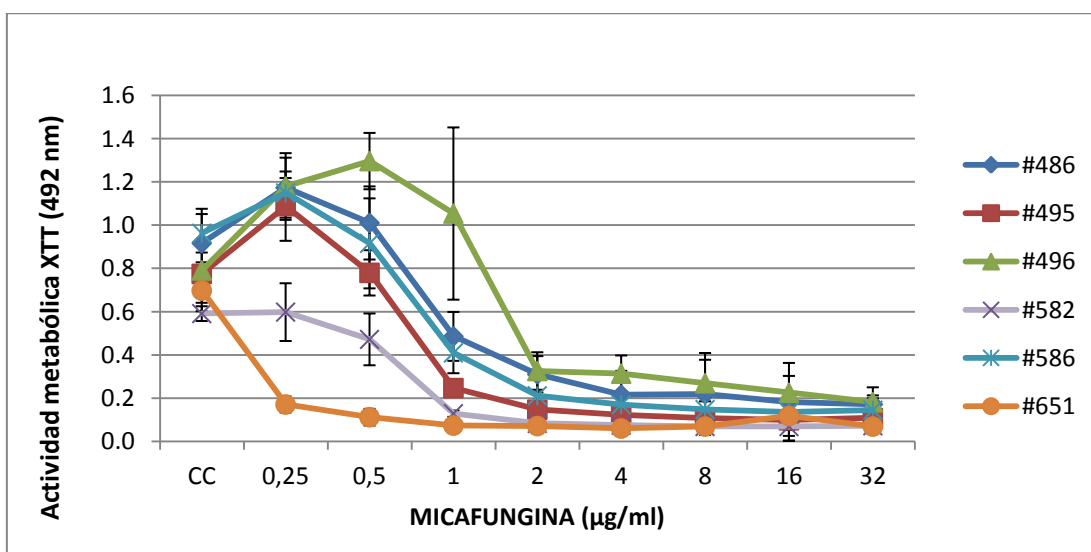


Figura 4.27. Reducción de la actividad metabólica de la biopelícula de seis cepas de *Candida parapsilosis* tratadas con micafungina. A) En medio RPMI; B) En medio YEPD.

La sensibilidad a los fármacos antifúngicos ensayados fue similar en la mayoría de las biopelículas de *Candida parapsilosis* estudiadas, mostrando un mismo patrón en sus curvas de actividad metabólica a medida que aumentaba la concentración de

fármaco antifúngico. Las excepciones fueron la cepa #486, que resultó ligeramente más sensible a la micafungina en medio RPMI que, y la cepa #651 que fue muy sensible a la micafungina en el medio YEPD desde concentraciones muy bajas (Figura 4.27).

Finalmente, para consolidar estos resultados se analizó mediante espectrofotometría la evolución de biopelícula preformada a cada hora con tres concentraciones diferentes de anfotericina B y micafungina en *Candida parapsilosis* #496 obteniéndose los mismos resultados (Figura 4.28).

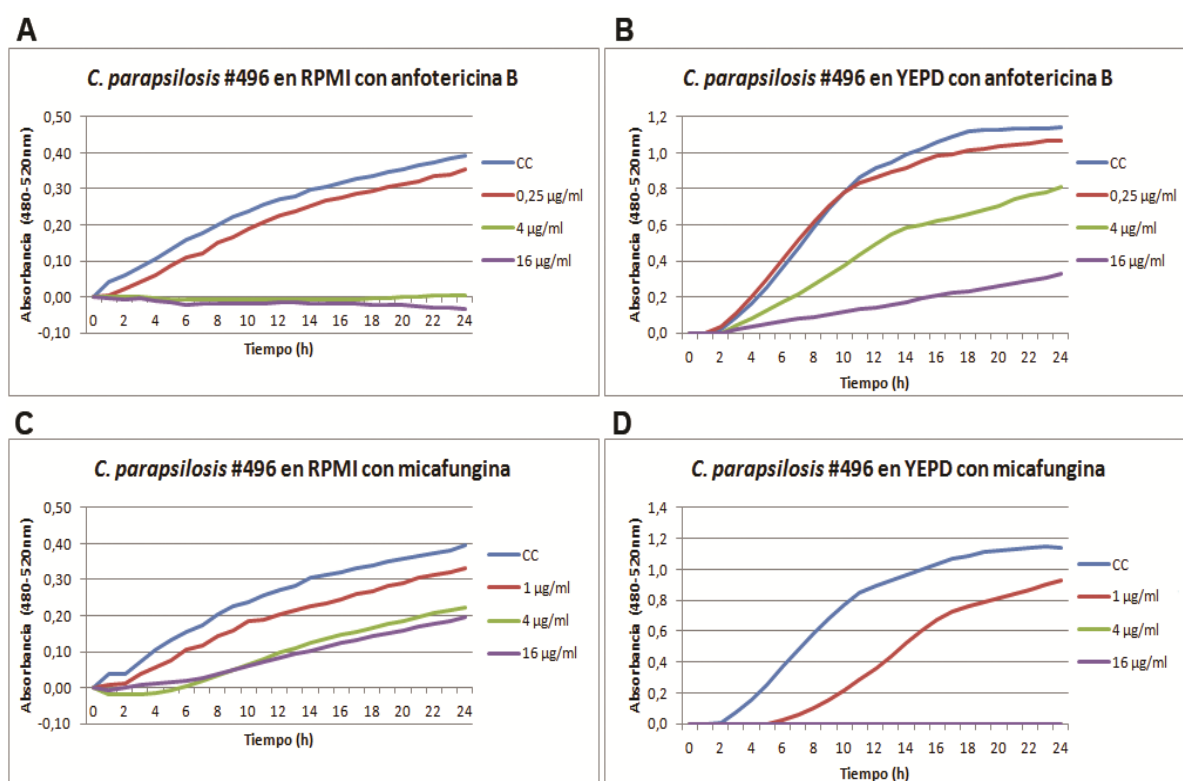


Figura 4.28. Curva de crecimiento de la biopelícula de *Candida parapsilosis* #496 en medio RPMI y medio YEPD con tres concentraciones diferentes de anfotericina B o micafungina durante 24 horas. A) RPMI +Anfotericina B. B) YEPD + Anfotericina B. C) RPMI + Micafungina. D) YEPD + Micafungina

4.6. Análisis in vitro de la adherencia de *Candida albicans* a diferentes biomateriales de prótesis dental

El disco de Cromo-Cobalto (Co-Cr) fue el material con la menor densidad de biopelícula adherida a la superficie tanto a las 24 horas (4,16 UFC/cm²) como a las 48 horas (3,85 UFC/cm²), seguido del disco de Zr (24 horas: 4,58 UFC/cm², 48 horas: 4,09 UFC/cm²) y del de Ti (24 horas: 4,76 UFC/cm², 48 horas: 5,48 UFC/cm²). No se encontraron diferencias estadísticas a las 24 y 48 horas entre la biopelícula formada por *Candida albicans* en los discos de Cr-Co o Zr, aunque se formó menor biopelícula en el disco de Co-Cr que en el de Ti. Por su parte, en los discos de Zr se desarrolló menos biopelícula que en los de Ti a las 48 horas, aunque similar a las 24 horas.

La biopelícula formada sobre los materiales restantes (resina compuesta, resina acrílica y silicona) tenía, en algunos casos, densidades hasta 20 veces superiores a las del Ti, Zr o Co-Cr. Entre estos últimos, la silicona mostró la menor densidad de biopelícula (24 horas: 5,05 UFC/cm², 48 horas: 5,50 UFC/cm²). El composite nanohíbrido (24 horas: 6,13 UFC/cm², 48 horas: 6,10 UFC/cm²) y PMMA (24 horas: 6,56 UFC/cm², 48 horas: 5,70 UFC/cm²) no mostraron diferencias estadísticas entre ellos, pero el desarrollo de biopelícula era estadísticamente mayor que en cualquier otro material del estudio tanto a las 24 como a las 48 horas ($p < 0,001$) (Figura 4.29).

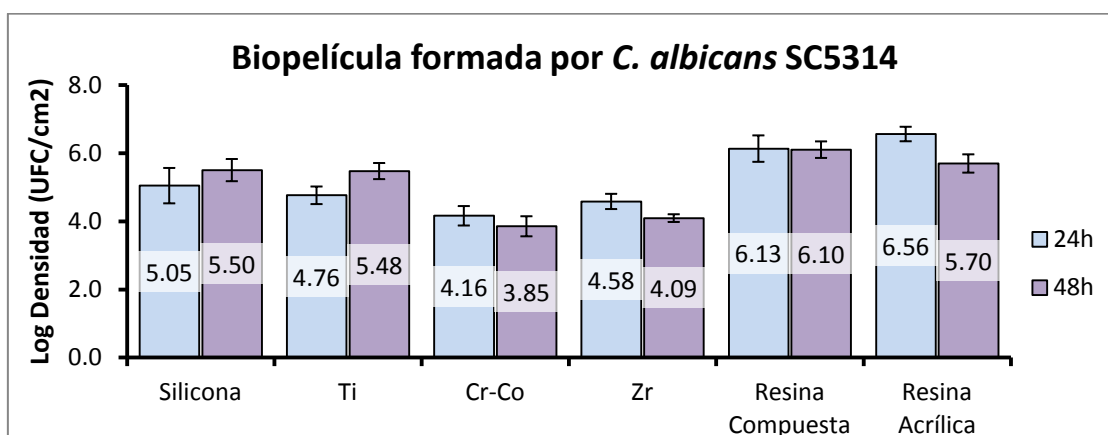


Figura 4.29. Desarrollo de biopelícula de *Candida albicans* en cada material protésico por centímetro cuadrado.

Posteriormente, se analizaron tres discos de material protésico mediante microscopía electrónica de barrido, uno de Ti y los dos que fueron parcialmente recubiertos con cerámica. El objetivo era observar si se desarrollaba una biopelícula más abundante la interfase entre el Cr-Co y cerámica o la interfase entre Zr y cerámica. Sin embargo, los resultados señalaron que en ambos discos, la densidad celular era baja y similar. Además, la interfase en el disco de Zr y cerámica no era apreciable en SEM. En cambio, sobre el disco de Ti se observó una extensa formación de hifas que producía una biopelícula más densa que la observada en los otros discos (Figura 4.30).

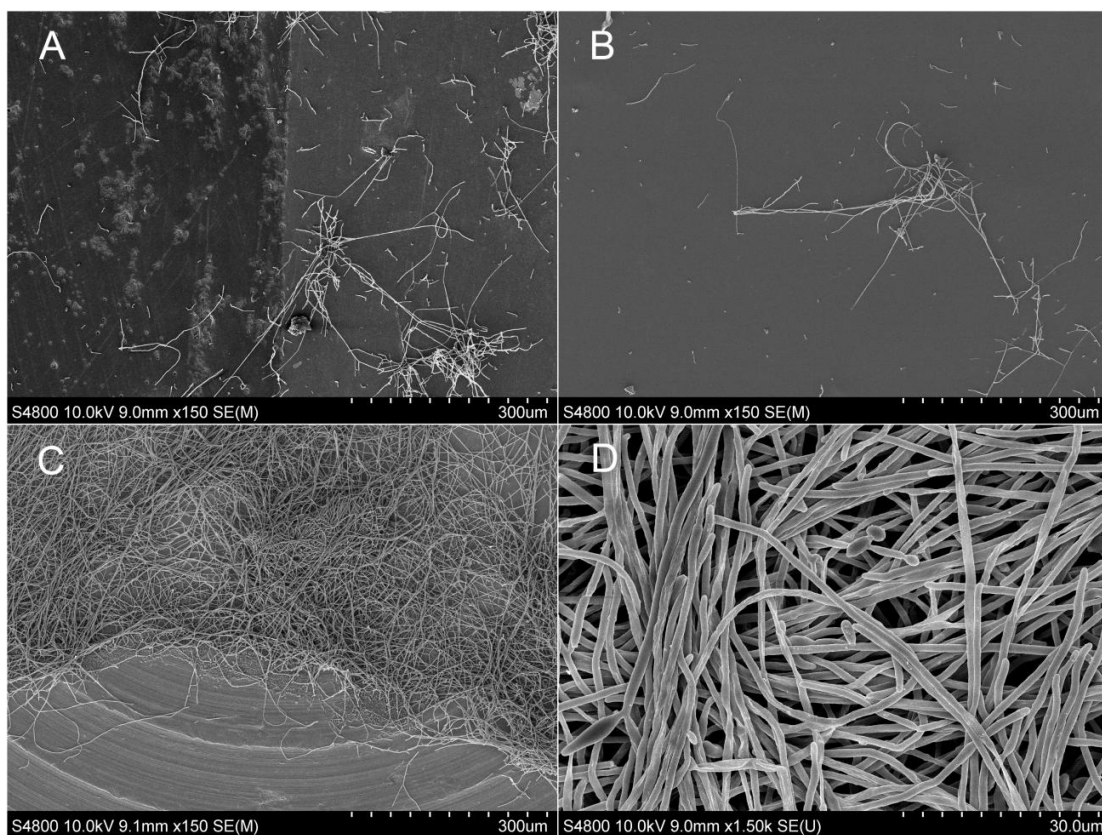


Figura 4.29. Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando la adhesión de *Candida albicans* a los diferentes biomateriales a las 48 horas. A) Disco con interfase de Cr-Co con cerámica. B) Disco con interfase de Zr y cerámica. C) Disco de Ti. D) Biopelícula formada por *Candida albicans* sobre disco de Ti (1500x).

5. DISCUSIÓN

Las biopelículas tienen especial relevancia en Medicina al formarse en dispositivos médicos implantados, incluyendo catéteres, marcapasos, dentaduras postizas y articulaciones protésicas, puesto que proporcionan una superficie de anclaje y un santuario para el crecimiento de microorganismos (219). Estas biopelículas son intrínsecamente resistentes a las terapias antimicrobianas convencionales, al sistema inmunitario del huésped y a las perturbaciones ambientales, lo que hace que las infecciones basadas en biopelículas sean un desafío clínico significativo (3).

La biomasa y viabilidad de la biopelícula pueden evaluarse mediante diferentes métodos que se basan en técnicas microbiológicas, moleculares, propiedades fisicoquímicas de la biopelícula o técnicas microscópicas (288-291). Entre los métodos microbiológicos y moleculares podemos encontrar la citometría de flujo, la PCR o el recuento de UFC en placas de agar, siendo este último método el más utilizado para estimar la viabilidad de las células de biopelícula, por lo que fue empleado también en la mayor parte de este trabajo ya que es una técnica sencilla y barata, disponible en todos los laboratorios microbiológicos. Sin embargo, este método también presenta serios inconvenientes. El primero de ellos es que la fracción de células vivas desprendidas puede no ser representativa de la población inicial de biopelícula, y otra limitación es que una subpoblación de células de biopelícula puede ser viable pero no cultivable (VBNC) y no sería detectada (292).

El recuento de UFC requiere la separación de la biopelícula de la superficie donde se encuentre adherida y su disgregación a células individuales. Clásicamente existen dos métodos no excluyentes para conseguir esto: la ultrasonicación y el raspado de la biopelícula (144,290,293,294).

El protocolo original del CBR indicaba el raspado como el método a seguir para desprender la biopelícula y cuantificarla (263). Sin embargo, la mayoría de los estudios que analizan la biopelícula mediante el CBR utilizan la ultrasonicación para realizar este proceso (144,293-296). Ambos métodos presentan sus limitaciones. El raspado manual conlleva un mayor error humano, pudiendo no accederse a todos los recovecos de la superficie del disco y dejando biopelícula aún por desprender. La ultrasonicación por su parte, es una técnica más estandarizada donde todas las muestras son tratadas por

igual. Sin embargo, presenta la desventaja de disminuir la viabilidad celular con el tiempo de ultrasonido dado que se genera un aumento considerable de temperatura y de lisis celular con altas amplitudes de ultrasonificación.

Goeres et al. (262) describieron el procedimiento de raspado durante un minuto como una técnica con relativa poca desviación estándar. Sin embargo, diversos autores coinciden en que la ultrasonificación es más eficiente que el raspado a la hora de recuperar las bacterias de una biopelícula (297,298). En nuestros resultados, ambas técnicas mostraron una capacidad semejante para desprender correctamente la biopelícula sin diferencia estadística alguna en la media de desprendimiento entre ambos métodos. Sin embargo, el raspado mostró una mayor dispersión en los resultados que podría deberse al propio error humano al no raspar correcta y homogéneamente la superficie de los discos.

La eliminación de la biopelícula mediante ultrasonificación depende en gran medida de la intensidad de la energía de sonicación y, en menor medida, de la frecuencia de esta (299). Para frecuencias ultrasónicas bajas (20-40 kHz), se forman grandes burbujas de cavitación que generan una alta energía cuando colapsan. Sin embargo, a frecuencias más altas (580 kHz), el ciclo acústico es más corto con un tiempo menor para la formación de burbujas de cavitación; por lo tanto, las burbujas de cavitación son más pequeñas y colapsan con baja energía (300).

También se ha reconocido que la duración de la ultrasonificación es el factor más determinante en la viabilidad de los microorganismos. De hecho, cuanto mayor es la duración de la exposición al ultrasonido, mayor es la probabilidad de que los microorganismos mueran (298). Un estudio previo mostró una reducción significativa en el número de células bacterianas viables después de 15 minutos de tratamiento a bajas frecuencias (300). En otro modelo in vitro llevado a cabo por Kobayashi et al. emplearon la ultrasonificación para desprender la biopelícula de *Staphylococcus aureus* de unas muestras de acero inoxidable y demostraron que un tiempo de ultrasonificación entre uno y cinco minutos era ideal para desprender la biopelícula (301). Así, entre los diferentes protocolos de sonicación, los más utilizados para eliminar bacterias de cuerpos extraños se basan en el uso de entre uno y cinco minutos de duración de ultrasonificación (302-305).

A pesar de que hemos observado en este estudio de Tesis doctoral diferencias estadísticamente significativas entre el uso del vórtex y la ultrasonificación de la biopelícula con un 60% de amplitud, el recuento de la biopelícula desprendida apenas variaba con independencia del método empleado. Nuestros resultados coinciden con los de Freitas et al. (306) que proponían que una agitación con vórtex intensa podía ser usada en lugar de la ultrasonificación ya que generaban un desprendimiento similar. Por otra parte, también se ha descrito que la ultrasonificación con un 60 o 70 % de amplitud obtendría una mayor eficiencia (298).

Existen también métodos físicos para cuantificar la biopelícula como el cálculo de la biomasa total de la biopelícula obtenida a partir de mediciones de peso seco y húmedo de una superficie, antes y después de la formación de la biopelícula (291), o la medición de la impedancia microbiológica (ECIS). Paredes et al. (307) utilizaron esta técnica para cuantificar la biopelícula en el CBR.

Otro de los métodos empleados en la realización de esta Tesis son métodos químicos que utilizan tintes o fluorocromos capaces de unirse o adsorberse a los componentes de la biopelícula. La tinción con CV es la técnica más frecuentemente utilizada en ensayos con placas de microtitulación (308) ya que permite su utilización con una amplia gama de microorganismos en diferentes condiciones simultáneamente. Además, no requiere separar los microorganismos de la superficie donde se ha formado la biopelícula. Sin embargo, tiene ciertas limitaciones. Entre estas se encuentran, la incapacidad de diferenciar entre células vivas, células muertas y matriz extracelular, la baja reproducibilidad debida tanto a los procesos de lavado como a que parte de la biomasa teñida puede ser originada por la sedimentación de células planctónicas no lavadas, la naturaleza inespecífica del CV que no permite la diferenciación de especies presentes en comunidades polimicrobianas, la ausencia de un protocolo estandarizado, a pesar de su uso generalizado, que resulta en una amplia variedad de protocolos de tinción (309).

Nuestra experiencia coincide con lo expuesto por Gómez-Suárez et al. (310) que concluyeron que procesos como el lavado de la biopelícula implican el contacto con una interfaz aire-líquido en movimiento, lo que lleva al desprendimiento de un número impredecible de microorganismos adheridos. Así, en nuestros resultados este hecho es

especialmente notorio en medio RPMI ya que se crea una película muy densa y el rozamiento con esta interfase de aire-líquido acaba por desprender la biopelícula completamente, en algunos casos con una dispersión de los datos excesivamente grande.

Otros métodos químicos ampliamente utilizados son los enzimáticos que determinan la viabilidad de la población microbiana cuyo principio básico es la reducción, mediante deshidrogenasas, de compuestos como el XTT o MTT (sales de tetrazolio) a formazan generando un color naranja o morado que se puede medir con un espectrofotómetro (288). Sin embargo, a pesar de no cuantificar las células muertas (lo cual puede considerarse una ventaja en ciertos ensayos con fármacos antimicrobianos), presenta ciertos inconvenientes como el alto precio de los compuestos, el tiempo que consume la técnica y que no todas las especies microbianas metabolizan estas sales de la misma manera por lo que hacer comparaciones entre especies puede ser complicado (311).

Nuestros resultados al ensayar *Candida albicans* mostraron una buena correspondencia entre el XTT y el CV, tanto en la media de la biopelícula obtenida como en la dispersión de los datos, y las pocas diferencias encontradas posiblemente sean debidas en su mayor parte a lo comentado sobre los lavados realizados de las biopelículas. Teniendo en cuenta estas limitaciones, en los ensayos de inhibición de biopelícula por fármacos antifúngicos únicamente se empleó la medición por XTT ya que el ensayo se basaba en una biopelícula previamente formada, donde la biomasa formada no se vería afectada pero sí su viabilidad.

Finalmente, existen varias técnicas microscópicas para detectar la biomasa de biopelícula y la viabilidad celular como la microscopía óptica, confocal, electrónica o microscopía de fuerza atómica (AFM) (312).

Entre todas las técnicas microscópicas, la LSCM se ha postulado desde principios de los años 1990 como la técnica microscópica más versátil y poderosa para descifrar la estructura espacial de la biopelícula y las funciones asociadas, ya que se pueden localizar microorganismos específicos dentro de una comunidad compleja empleando una hibridación fluorescente in situ (FISH) con oligonucleótidos específicos o modificando genéticamente los microorganismos para hacerlos autofluorescentes, por

ejemplo, mediante la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP). En el contexto de las biopelículas mixtas o polimicrobianas, ha permitido el análisis de la interferencia entre especies y la identificación de determinantes moleculares clave implicados en la formación de biopelículas. Brigmon et al. (289) utilizaron esta técnica para cuantificar la densidad de *Pseudomonas aeruginosa* que se formaba en los discos del CBR y su organización estructural mediante tinción con naranja de acridina.

Sin embargo, en la realización de esta Tesis doctoral la microscopía óptica no pudo ser llevada a cabo debido a que los discos donde se formaba la biopelícula eran gruesos y opacos en su mayoría. En el caso de la LSCM, no resultó útil debido a que parte de los materiales estudiados absorbían el fluorocromo impidiendo distinguir las células de la biopelícula de la superficie donde se adherían. Por estos motivos, se optó por complementar el recuento de UFC con el empleo de la SEM, que es la metodología más empleada al trabajar con biopelículas en dispositivos biomédicos usando el CBR (293,295,296,313,314).

Además de la metodología con la que se cuantificó y caracterizó la biopelícula también se pusieron a punto las condiciones en las que iba a operar el CBR. El protocolo para el CBR fijaba una fase de 24 horas sin aporte nuevo de nutrientes al reactor que denominaban *batch* seguida de otra fase de entrada continua de nutrientes hasta las 48 horas. En los ensayos de puesta a punto se observó que tanto *Staphylococcus aureus* como *Candida albicans* no presentaban diferencias significativas entre mantener el reactor sin renovar el medio de cultivo las 48 horas, o con flujo continuo de nutrientes. No hemos encontrado ningún estudio que realice esta comparación para contrastarla con nuestros resultados. Como en nuestros estudios no estaba programado generar una biopelícula de más de 48 horas y considerando que la utilización de tubos de silicona y bidones de nutrientes y residuos conllevaba un mayor riesgo de contaminación, se optó por realizar los ensayos con el CBR sin renovar el medio de cultivo continuamente, pero con agitación del medio presente las 48 horas de duración del ensayo.

Williams et al. (315) utilizaron el CBR para cuantificar la biopelícula formada por *Staphylococcus aureus* en unas membranas difiriendo sus resultados con los nuestros en cuatro logaritmos. La biopelícula obtenido con el CBR en modo continuo y tras 48

horas presentaba un logaritmo de 9 mientras que la biopelícula obtenida en nuestros ensayos fue de cinco. Esta diferencia podría deberse a la diferente metodología y a los parámetros evaluados, concretamente, el medio de cultivo que utilizaron, BHI, era más rico que el TSB diluido que empleamos nosotros, además la temperatura ensayada no fueron los 37 °C del cuerpo humano sino 28,5 °C y finalmente la superficie donde se desarrolló la biopelícula eran membranas de polietere tercetona (PEEK). Igualmente, Buckingham-Meyer et al. (316) utilizando un protocolo muy similar al nuestro con *Staphylococcus aureus* obtuvieron un logaritmo de 8,3 UFC/cm²; sin embargo, también utilizaron un medio 10 veces más concentrado de TSB. La razón por la que utilizamos una concentración tan baja en los estudios preliminares se debía a que el protocolo original la empleaba. Sin embargo, ese protocolo estaba enfocado al ensayo con *Pseudomonas*, que tiene unos requerimientos nutricionales diferentes de *Staphylococcus*. Finalmente, en base a estos experimentos preliminares, decidimos adaptar cada microorganismo al medio más empleado en la literatura sin intentar alejarnos mucho del protocolo original. *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se ensayaron en medio TSB (0,3g/l), *Staphylococcus epidermidis* con TSB (30g/l) y *Candida albicans* tanto con TSB (30g/l) como con medio RPMI. Además, se utilizó la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, productora de biopelícula, con la que los resultados se asemejaban más a los obtenidos por otros autores en el biorreactor CDC.

Un factor importante a tener en cuenta es la topografía de superficie de los materiales donde se desarrolla la biopelícula. Las superficies rugosas parecen facilitar la colonización microbiana ya que protegen a los microorganismos de tensiones y fuerzas de arrastre como pueden ser el paso de orina, el torrente sanguíneo o los flujos salivales en esas superficies (317,318).

Algunos estudios sugieren una correlación positiva entre la rugosidad del material y la biopelícula formada, llegando incluso a la conclusión de que la rugosidad es un factor determinante en la adhesión bacteriana (239,247). Zaugg et al. (239) analizaron la biopelícula generada en cuatro superficies basadas en titanio que fueron procesadas de diferente manera y con distinta rugosidad superficial (Sa). Los discos se dispusieron mediante una férula dental en el paladar de 16 voluntarios durante 24 horas para finalmente ver la cantidad de biopelícula generada y la dificultad de eliminarla

posteriormente. Estos autores llegaron a la conclusión de que la disminución de la hidrofobicidad facilitaba la formación de biopelícula, pero que el factor más influyente era la rugosidad. Además comprobaron que era más complejo eliminar la biopelícula de los materiales más rugosos debido a que grandes cantidades de biopelícula inicial quedaban aún retenidas en los surcos micrométricos del material. Braem et al. (235) realizaron un experimento similar consistente en introducir discos de titanio dentro de una microplaca de 12 pocillos con *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* en medio TSB. A los discos se les había alterado la rugosidad (Sa), hidrofobicidad y porosidad mediante pulido, arenado, tratamiento con plasma o deposición electroforética. En este caso, los autores observaron que la disminución de la hidrofobicidad era una buena estrategia para reducir la carga bacteriana en los discos y que una mayor rugosidad incrementaba significativamente la adhesión de los estafilococos, ya que sobre los tres materiales más rugosos se desarrollaban mayores biopelículas. Amoroso et al. (247) pulieron la superficie de unos discos de titanio, los trataron con plasma de argón y también con xilano para modificar su hidrofobicidad y rugosidad (Ra). Observaron una reducción significativa de la adhesión a los materiales clasificados como "muy lisos"; sin embargo, no se encontró que las variaciones en la hidrofobicidad de la superficie del material afectaran a la adhesión bacteriana.

No obstante, otros estudios afirman que no existe una relación clara entre la rugosidad y la formación de biopelícula. En un estudio realizado por Ferreira Ribeiro et al. (319), diez individuos portaron durante 24 horas en sus bocas discos de titanio que habían sido tratados con ácidos o láseres para generar diferentes topografías en su superficie (Ra). Al cabo de ese tiempo cuantificaron las bacterias adheridas al material tanto mediante un ensayo enzimático con MTT como por PCR a tiempo real y concluyeron que las diferencias en la topografía de superficie no interferían en la adhesión y formación de biopelícula. Otro estudio llevado a cabo por Jindal et al. (320) analizaba la biopelícula formada por bacterias formadoras de esporas en pequeños cuadrados de acero inoxidable que habían sido tratados con distintas cubiertas cambiando sus propiedades químicas y su rugosidad. Tras el recuento de las UFC obtenidas tras el raspado del biofilm de las muestras y su siembra en placas de agar BHI, concluyeron que la formación de biopelícula no guardaba relación con la

rugosidad del material. Del mismo modo, Gyo et al. (321) ensayaron con discos hechos de resina que mezclaban con teflon (PTFE, politetrafluoroetileno) en distinta proporción modificando su hidrofobicidad y rugosidad (Ra). Estos discos fueron incorporados en un biorreactor con *Streptococcus mutans* durante cinco horas y 24 horas y observaron que no existía una correlación significativa entre las propiedades superficiales del material y la acumulación bacteriana.

Como se puede observar la relevancia de la rugosidad en la formación de la biopelícula está todavía en discusión y también plantea la cuestión de cuál es la rugosidad real de un material. Algunos artículos definen la rugosidad de sus materiales con el parámetro Ra, otros con el parámetro Rq y otros con el parámetro Sa (Ver apartado 1.7.1). Incluso aunque sólo se usaran los parámetros tridimensionales de rugosidad, a pesar de las directrices ya existentes con la ISO 25178, el estudio de la influencia de la rugosidad en la adhesión bacteriana es un tema muy complejo en el que las comparaciones con otros estudios deben realizarse con mucha precaución. Realmente, ninguna superficie tiene un Sa inherente, el valor depende del instrumento, de las condiciones de filtrado e incluso del objetivo utilizado (322).

Así, la rugosidad medida mediante AFM en numerosos artículos tiende a ser a escala nanométrica, siendo común analizar áreas de unas pocas micras con alta resolución. Sin embargo, antes de realizar la investigación es importante conocer en qué escala estamos interesados. Si analizamos áreas de pocas micras con alta resolución, la rugosidad obtenida a escala nanométrica puede no ser muy representativa del proceso de anclaje y formación de biopelículas por bacterias o dar resultados no coherentes con otros estudios en la literatura. De hecho, algunos autores han propuesto que una rugosidad inferior a $0,2 \mu\text{m}$ no debería afectar a la adhesión bacteriana debido al mayor tamaño de las bacterias (247,248,260,323-325). Sin embargo, seguramente todos los niveles de topografía pueden tener cierta relevancia en la adhesión de bacterias, a nivel nanométrico puede ser importante para el anclaje de fimbrias u otro tipo de adhesinas, a nivel micrométrico para el anclaje de toda la bacteria o un grupo de bacterias, y en niveles superiores, con la ondulación y la forma del material, la biopelícula puede verse protegida de fuerzas de arrastre en dispositivos como catéteres (326,327). Es decir, habría que plantearse hasta que punto

es correcto analizar la rugosidad a una escala concreta y filtrar y olvidarse del efecto de la topografía real como conjunto. La presente Tesis doctoral no puede dar una respuesta a estas cuestiones, pero se ha definido la escala adecuada respecto a lo que se quiere investigar, la escala micrométrica, principalmente porque la mayoría de las bacterias oscilan entre 0,5 y 3 μm de diámetro. Además sería conveniente estandarizar un mismo protocolo de medición de rugosidad superficial para los estudios de biopelículas microbianas sobre materiales.

Como se ha mencionado, la mayoría de los estudios que analizan el efecto de la rugosidad en la formación de biopelícula emplean discos de titanio. Esto es debido a que comúnmente los implantes prótesis y dentales se basan en titanio donde la rugosidad es un factor muy importante no sólo en posibles colonizaciones microbianas sino también en la biointegración con el tejido del huésped por los fibroblastos (328). Sin embargo, los estudios que analizan el efecto de la rugosidad en polímeros comunes de dispositivos médicos como la silicona, teflón, policarbonato o poliuretano son muy escasos. En general, se mide la rugosidad como un factor adicional sin ser el objeto de la investigación, lo que impide sacar conclusiones válidas al mezclarse la rugosidad con otros factores como cubiertas hidrófilas, funcionalizaciones de la superficie con fármacos antimicrobianos, etc (248,324). Por este motivo, uno de los objetivos de la presente Tesis doctoral fue determinar las diversas rugosidades obtenidas tras un mismo procesado de un único material sin funcionalizar (poliuretano) y ver su influencia en la adhesión y formación de biopelícula.

Nuestros resultados refrendan a los obtenidos por Zaugg et al. (239), Braem et al. (235) y Amoroso et al. (247) que observaron que la rugosidad favorece la adhesión microbiana y la formación de biopelícula. De este modo, el desarrollo de la biopelícula estafilocócica fue significativamente menor en los discos lijados con una rugosidad (S_a) inferior al diámetro de la bacteria (discos de 0,38 μm) que en discos con rugosidades mayores (0,51 μm , 1,1 μm y 1,9 μm). Además, el disco con la mayor biopelícula resultó ser el más rugoso. Por el contrario, el disco original que no fue lijado presentó más biopelícula que el disco lijado con la lija de 4000 granos a pesar de tener un S_a similar. Esta observación aparentemente paradójica ha sido previamente reportada por Puckett et al. (329) en discos que habían sido tratados con un haz de electrones para

generar mayor nanorugosidad y que disminuían la adhesión por parte de *Staphylococcus epidermidis* en comparación con el disco original «liso». En otro estudio de Wu et al. (330), el número de células adheridas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se redujo en un factor de más de 10 en superficies rugosas no modificadas en comparación con superficies más lisas que habían sido electropulidas. Otro ejemplo, es el estudio de Whitehead et al. (327) en el que a pesar de presentar una rugosidad (en términos de Ra) muy similar, los diferentes diámetros de poro generados en la superficie del material retuvieron diferentes cantidades de microorganismos. Como se ha mencionado anteriormente, ningún parámetro por sí solo describe completamente la topografía de una superficie.

La gran mayoría de los estudios que relacionan el efecto de la rugosidad sobre la formación de la biopelícula únicamente cuantifican valores como el Ra o Sa (239,327,328,331). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos parámetros sólo muestran desviaciones de altura con respecto a la línea media, y que perfiles de rugosidad muy diferentes, con un comportamiento diferente, pueden dar lugar al mismo Ra/Sa o Rq/Sq. Por esta razón, es de vital importancia acompañar este parámetro con otros datos que puedan definir mejor la topografía del material. Si en nuestro estudio únicamente se dispusiera del parámetro Sa sería conveniente excluir el disco original de la comparación ya que no ha sido procesado como los otros discos y presenta una topografía totalmente diferente al resto. Un parámetro interesante es Ssk que representa el grado de simetría de las alturas de la superficie alrededor del plano medio, es decir, el predominio de picos con $Ssk > 0$, o el predominio de cavidades o surcos con $Ssk < 0$. La superficie obtenida con la lija de grano 4000 presenta un Ssk superior a 2, mientras que en la superficie no modificada es cercana a -2, esto podría explicar las diferencias en la formación del biopelícula ya que una rugosidad (Sa) inferior al diámetro de una bacteria con una prevalencia de picos en su superficie podría implicar una disminución de la superficie de contacto con la bacteria siendo menos probable la adhesión del microorganismo al material y facilitando su eliminación en lavados o por fuerzas de arrastre.

Con esa idea, en los últimos años se están logrando importantes avances mediante la nanoestructuración de la topografía de un material a partir de nanopilares en su

superficie. Estos nanopilares tienen un distanciamiento menor que el diámetro de una bacteria lo que afecta tanto a la superficie de contacto con el microorganismo como a la humectabilidad del material y, por lo tanto, influyen en la adhesión bacteriana y el desarrollo de biopelículas sin modificar las propiedades químicas del biomaterial (332). Xu et al. (333) texturizaron la superficie de unas muestras de poliuretano generando pilares submicrométricos y analizaron la formación de biopelícula por parte de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 y *Staphylococcus aureus* cepa Newman en un reactor de discos rotatorios. Observaron hasta un 80% en la reducción de la adhesión bacteriana en las superficies texturizadas en comparación con los controles lisos. De la misma manera, Vadillo-Rodríguez et al. (334) mostraron que una rugosidad uniforme a escala nanométrica resultaba en una superficie menos atractiva para la adhesión estafilocócica que una superficie lisa. Otros estudios similares como los llevados a cabo por Wu et al. (335) o Dickson et al. (336) afirman no sólo que estos patrones superficiales pueden reducir la adhesión de microorganismos sino que también pueden provocar la muerte de la bacteria por mecanismos aún no comprendidos.

Por otra parte, la humectabilidad también puede verse afectada por factores como la topografía de la superficie, la naturaleza química del líquido, la temperatura y la hidrofobicidad o la naturaleza química del material *per se* (337). Sin embargo, cuando la gota está en el llamado «estado de Wenzel» (284) podemos determinar el ángulo de contacto teórico (θ_Y) que tendría el material si fuera completamente liso a partir del parámetro Sdr. Al hacer esto, los cuatro tipos de discos lijados deberían producir un mismo θ_Y . Sin embargo, los ángulos no coincidieron entre sí, lo que puede deberse a la existencia de burbujas de aire en el material por donde el agua no penetró. En esos casos no se puede aplicar la ecuación de Wenzel, y por ello no se ha podido restar el efecto de la rugosidad en la medición del ángulo de contacto.

Nuestro estudio encontró diferencias estadísticamente significativas en la formación de biopelícula en el rango de rugosidad ensayado. Sin embargo, estas diferencias no son suficientes para verse reflejadas en la práctica clínica, donde también están implicadas otras propiedades del material, del huésped o del microorganismo. Además, cabe señalar que no había ningún agente antimicrobiano en el material sometido a ensayo, siendo un mismo material con diferentes valores de Sa

que oscilaban entre 0,3 μm y 2 μm . Por todo ello, la reducción de la rugosidad de superficie es un factor más a tener en cuenta y que puede ayudar a inhibir en cierta medida el desarrollo de biopelículas previniendo la aparición de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos.

Sin embargo, si atendemos a los ensayos de formación de biopelícula sobre diferentes biomateriales en el reactor CBR, nuestros resultados sugieren que el efecto de la rugosidad parece ser superado por otras propiedades asociadas a los materiales estudiados, como la hidrofobicidad. Al analizar los resultados obtenidos con el titanio se puede observar que, a pesar de ser un material con una rugosidad intermedia, resultó ser el más resistente a la formación de biopelícula por parte de *Candida albicans* y *Escherichia coli* ($p < 0,05$). Igualmente, la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* no mostró diferencias significativas cuando se desarrollaba en los discos de vidrio de borosilicato y los de titanio, siendo los materiales con menor biopelícula desarrollada y menor ángulo de contacto. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, el titanio fue el segundo material en el que se observó menor biopelícula. Asimismo, tanto la silicona como el teflón, materiales muy hidrofóbicos pero totalmente opuestos en rugosidad, fueron mucho más susceptibles a la adhesión bacteriana y formación de biopelícula.

De este modo, si se atiende a la hidrofobicidad se puede observar un cierto patrón en el desarrollo de las biopelículas, cuantificándose mayor biopelícula en los materiales más hidrófobos como el teflón y la silicona, y menor biopelícula en materiales hidrófilos como el borosilicato y el titanio. Sin embargo, en este aspecto la literatura de nuevo muestra discrepancias, con investigaciones que concluyen que la rugosidad es el principal factor para la adhesión y el desarrollo de biopelículas (239,247,338,339) así como estudios que afirman que es la hidrofobicidad el factor más influyente (320,324,325,340). Otros autores han considerado ambas propiedades, rugosidad e hidrofobicidad, como importantes para la adhesión y el desarrollo de biopelícula (321,328), o siendo su importancia dependiente de la especie o incluso la cepa microbiana empleada (341).

Nuestros resultados concuerdan con los de Xu et al. (342) quienes reportaron que al modificar un poliuretano hidrófobo para obtener una superficie más hidrófila se

reducía la biopelícula formada por *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 en un medio que contenía un 25% de plasma humano y 50% de TSB. Sin embargo, también hay evidencias que indican que *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 es más propenso a desarrollar biopelículas en superficies hidrófilas (238,324,343).

Tanto *Escherichia coli* ATCC 25922 como *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mostraron un comportamiento similar al de *Staphylococcus epidermidis* con mayor formación de biopelícula en materiales hidrófobos, como teflón o silicona. No obstante, Pontes et al. (344) encontraron que *Escherichia coli* ATCC 25922 generó la misma biopelícula independientemente de la hidrofobicidad de la superficie. Andersen et al. (345) observaron una preferencia de *Escherichia coli* por los materiales hidrófilos. Igualmente, nuestros resultados con *Candida albicans* mostraron una mayor afinidad de esta levadura por el teflón, confirmando los resultados reportados por Frade et al. (346) que probaron el mismo tipo de discos de policarbonato y teflón con 10 aislamientos clínicos de *Candida albicans*. Li et al. (325) recubrieron discos de titanio con saliva, observando una reducción de la hidrofobicidad de los discos y la consiguiente disminución en la formación de biopelícula de *Candida albicans* tras 48 horas. Siguiendo esta misma línea, también se decidió estudiar la formación de biopelícula por *Candida albicans* en otros materiales empleados para implantes dentales como Zr, Cr-Co, PMMA y resina compuesta nanohíbrida.

Todos los materiales utilizados en implantología dental deben cumplir idealmente dos premisas. Por una parte, una alta biocompatibilidad, y por otra, la mayor resistencia posible a la colonización por microorganismos (347). Para mejorar estas condiciones y desarrollar nuevas estrategias de prevención de complicaciones biológicas y mecánicas, es fundamental centrar la investigación en la comprensión de los procesos de adhesión y colonización de estos materiales. Frecuentemente, por razones éticas, para evitar el uso de animales en los estudios in vivo de enfermedades bucales, se utilizan diversos modelos artificiales de biopelícula para reproducir las condiciones bucales (246,348,349). Algunos de estos modelos han probado la formación de biopelícula sobre la superficie de implantes, comparando diferentes materiales o tratamientos superficiales (348,350). Sin embargo, la formación de biopelícula sobre pilares dentales (*abutments*) transmucosos o sobre la porción

transmucosa de los implantes protésicos ha sido menos estudiada (351,352). Con frecuencia las patologías periimplantarias comienzan en los tejidos orales duros y blandos en contacto directo con estos materiales progresando posteriormente hasta el hueso (352,353). Por este motivo, se ha profundizado en el conocimiento de la formación de biopelícula sobre los materiales empleados para pilares dentales y prótesis, en lugar del implante en sí mismo.

La formación de biopelícula está directamente condicionada por las características físicas y químicas de los materiales. La rugosidad superficial, la energía libre de superficie y el ángulo de contacto son parámetros que pueden influir en la adhesión y la formación de biopelículas (348,354,355). Todos estos parámetros determinan la interacción de las proteínas y células con las superficies bióticas y abióticas. Además, la saliva contiene varias sustancias que pueden modificar las propiedades de la superficie (355). La presencia de nutrientes y la complejidad de las interrelaciones de los cientos de especies orales son también factores que pueden influir en el desarrollo de las biopelículas (356). A pesar de todo lo anterior, los modelos *in vitro* de biopelículas monomicrobianas siguen siendo de gran importancia cuando se realizan en condiciones controladas, ya que permiten comprender de una manera sencilla las interacciones superficie-microorganismo, estudiar el efecto causado al modificar la superficie del material y detectar posibles actividades antimicrobianas o, al contrario, la inducción del crecimiento microbiano.

En nuestro estudio, se ha empleado un modelo ampliamente utilizado en medicina para evaluar diferentes dispositivos y materiales médicos (144,357). Hasta donde sabemos, la metodología basada en biorreactores no se ha utilizado anteriormente para probar la formación de biopelícula sobre materiales protésicos o pilares dentales. Con el fin de enfocar nuestros resultados a una aplicación práctica, se prepararon los discos de acuerdo a los protocolos seguidos por los laboratorios dentales.

Nuestros resultados muestran que en discos de Co-Cr y Zr se desarrollaron biopelículas menos densas. Las aleaciones Co-Cr tienen una amplia gama de aplicaciones en Odontología debido a sus buenas propiedades mecánicas, buena biocompatibilidad y menor precio (358). Las desventajas son su mayor corrosión en

ambientes ácidos, las dificultades para obtener un acabado y pulido óptimos, el conocimiento limitado de su longevidad y una menor biocompatibilidad que las aleaciones de metales nobles (358,359). Los pilares dentales y las prótesis de Co-Cr se pueden obtener por fundición o fresado siguiendo diferentes procedimientos de fabricación y su frecuencia de uso varía enormemente de un país a otro (358-360). Souza et al. (361) evaluaron y compararon la densidad y los aspectos morfológicos de las biopelículas adheridas a Co-Cr, porcelana a base de feldespato, Ti grado IV y Zr. A diferencia de nuestros resultados, detectaron una mayor acumulación de biopelículas orales en materiales basados en Co-Cr que en Ti, Zr o porcelana, especialmente después de 48 horas. Sin embargo, utilizaron una metodología completamente diferente basada en un modelo de cultivo mixto estático y empleando diferentes protocolos de acabado y pulido de muestras. De la misma manera, utilizando un enfoque completamente diferente al nuestro, Jordan et al. (362) investigaron la adhesión a una muestra de Co-Cr electropulida generada por fundido selectivo por láser (SLM) y al Ti de grado V (Ti-6Al-4V) con especies bacterianas relevantes en periodontología y observaron mediante CLSM una mayor adhesión de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* en Co-Cr que en Ti.

La resistencia del Zr a la formación de biopelículas ha sido probada por diferentes autores (363-365). Muchos de estos estudios fueron diseñados para evaluar la adherencia de *Candida albicans* a diversas superficies de implantes (325,348,366). De esta manera, Bürgers et al. (348) evaluaron la adhesión de la levadura a tres implantes de Ti comercializados con texturas diferentes y a un implante de Zr. Los implantes de Zr mostraron una formación similar de biopelícula de *Candida albicans* a implantes de Ti mecanizados, arenados y grabados con ácido. También observaron que la mucina salival podría servir como receptor para la adhesión de la levadura, mientras que la albúmina podría actuar bloqueando el proceso de adhesión. Este efecto de la mucina salival sobre el desarrollo de biofilms sobre los materiales dentales también ha sido confirmado in vitro por Li et al (325). Estos autores analizaron la formación de biopelícula de *Candida albicans* en siete materiales de uso común en implantología recubiertos y no recubiertos con saliva mediante SEM: poliestireno recubierto con colágeno tipo I, hidroxiapatita, Zr, Ti cp grado II, resina acrílica, polietileno tereftalato

(PET), una aleación de Co-Cr y una aleación de oro-plata-paladio. De todas ellas, el Zr mostró la mayor capacidad para impedir la adhesión, ya sea sin recubrimiento o con recubrimiento de saliva. Otros estudios también han referido al Zr como un material más resistente a la adhesión y formación de biopelícula en comparación con el Ti (363-365).

El Ti y sus aleaciones son, sin duda, los materiales más estudiados en implantología en cuanto a la formación de biopelículas. Aunque se han observado diferencias considerables entre los estudios de diferentes autores (325,341,363,367), su resistencia a la adhesión es generalmente similar a la de Zr y Co-Cr. La heterogeneidad de los resultados se debe probablemente a diversos factores. Por un lado a la propia naturaleza de las muestras, como el tipo de Ti empleado (según las normas internacionales ASTM II, IV o V), tratamientos y recubrimientos superficiales, protocolos de acabado y pulido, así como protocolos de esterilización (325,348,364,365). A su vez, las diferencias también pueden estar directamente relacionadas con el diseño de los estudios. Bevilacqua et al. (350) observaron que las diferencias cuantitativas de biopelícula encontradas in vitro en superficies de Ti con diferente acabado y rugosidad no predecían las tasas de colonización in vivo.

Apenas se han desarrollado estudios que evalúen la capacidad de adhesión de microorganismos a resinas acrílicas en comparación con otros materiales de uso común en implantología oral. Sin embargo, tanto nuestros resultados como los de Li et al. (325) han demostrado que las resinas tienen una baja resistencia a la formación de biopelícula en comparación con otros materiales. Una aplicación clínica obvia de esta observación podría ser evitar o limitar la presencia de biopelículas en el área subgingival, a la hora de diseñar prótesis híbridas y temporales. Modelos de formación de biopelículas mixtas sobre nuevos materiales como la PEEK en comparación con el PMMA, el Ti o el Zr han mostrado resultados prometedores según lo observado por Hahnel et al. (366). Sin embargo, se necesitan estudios clínicos para confirmar estos resultados preliminares.

A partir de las observaciones realizadas por microscopía electrónica, cabe destacar las diferencias observadas en las zonas de unión entre Co-Cr, Zr y la cerámica Ls2. La unión entre la cerámica Co-Cr y la cerámica Ls2 fue la que presentó la mayor

tasa de irregularidades, defectos y microporos. Estos microporos fueron las áreas donde se pudo observar la mayor densidad de biopelícula. A pesar de que los discos analizados tienen una superficie plana que facilita el acabado y el pulido, y han sido fabricados con extremo cuidado, las uniones reales en coronas y puentes a menudo no son tan fáciles de acabar, por lo que es probable que contengan un mayor número de microporos y defectos. En un intento de prevenir enfermedades periimplantarias, sería deseable diseñar pilares y prótesis manteniendo la interfaz metal-cerámica lo más alejada posible de los implantes. Por el contrario, la unión Zr-cerámica Ls2 fue la más homogénea y libre de irregularidades superficiales. En este punto de unión no se observó ningún otro crecimiento del biofilm, lo que podría ser de interés a la hora de diseñar prótesis, especialmente por la faceta estética. La explicación a toda esta diversidad de resultados entre materiales y sus propiedades podría estar relacionada con múltiples factores como la metodología utilizada para determinar la rugosidad, hidrofobicidad o cuantificación de la biopelícula, así como el propio diseño de los experimentos (cepas ensayadas, inóculo, composición del medio de cultivo, temperatura, pH, las propiedades físico-químicas del material donde se formará la biopelícula, etc.).

En relación a la cepa ensayada, un factor a tener en consideración sería la hidrofobicidad de la superficie celular de los microorganismos. A pesar de la existencia de determinantes de hidrofobicidad característicos de cada especie, se han sugerido varios componentes comunes que contribuirían a la hidrofobicidad de la superficie bacteriana como son los ácidos lipoteicoicos, las proteínas y lípidos de la membrana externa, varias fimbrias u oligosacáridos centrales. Concretamente, en bacterias entéricas, como *Escherichia coli*, las fimbrias juegan un papel importante en la hidrofobicidad de la superficie de la célula y en su fijación, probablemente superando la barrera inicial de repulsión electrostática que existe entre la célula y la superficie del material (368). Las bacterias grampositivas presentan también diversas estrategias para adherirse al endotelio, mediante proteínas de matriz extracelular que sirven de puente para la colonización o mediante diversas adhesinas que reconocen elementos de la superficie de las células hospedadoras, como vitronectina, fibrinógeno o fibronectina (178). Por su parte, la supresión de la proteína CSH1p de *Candida albicans*

supone una reducción del 75% de la hidrofobicidad superficial y una reducción de la adhesión a fibronectina (369). Otras adhesinas importantes en *Candida* son las pertenecientes a la familia de las ALS, que aumentan la agregación de levaduras y la adhesión al epitelio (370).

Bajo las condiciones en las que ensayamos, nuestros resultados muestran una alta hidrofobicidad celular en *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, y menor en *Escherichia* y *Candida*, lo cual coincide con un estudio similar realizado por Mirani et al. (371) donde también se ensayaron 17 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante el ensayo de unión microbiana a hexadecano determinándose también que *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* presentaban mayor hidrofobicidad en su superficie y un crecimiento relativamente lento, mientras que los aislamientos de *Escherichia coli* exhibían una superficie hidrófila y crecían más rápido. Otra de las conclusiones es que debido a su alta hidrofobicidad y a la lenta tasa de crecimiento, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* generaban una fuerte formación de biopelícula y mayor persistencia que *Escherichia coli*. Sin embargo, diferentes cepas de una misma especie pueden presentar diferentes determinantes de hidrofobicidad en su superficie celular y existen, además, varios estudios (372,373) que indican que una misma cepa puede pasar de fenotipos hidrófobos a hidrófilos en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (temperatura, composición de los nutrientes, etc.) o según la fase de crecimiento en la que se encuentren. Esto hace complicado asociar de forma general una especie de microorganismo con un perfil de hidrofobicidad concreto.

Para analizar más profundamente estos detalles, uno de los cambios ambientales que se estudió en este trabajo de Tesis de doctorado fue la influencia del medio de cultivo en la formación de biopelícula y en la actividad de diversos fármacos antifúngicos. La adición de compuestos a medios de cultivo para observar cambios en el comportamiento de *Candida*, como pueden ser la formación de biopelículas o el desarrollo de hifas, es un tema habitual de investigación (348,374,375). Sin embargo, son escasos los estudios que se centran simplemente en reflejar las consecuencias que tiene el empleo de diferentes medios de cultivo clásicos, como el YEPD o el RPMI, lo que provoca que se use un medio u otro sin tener en cuenta si es el adecuado para el

objetivo planteado. Por esta razón, nuestros experimentos en placas de microtitulación y en el CBR intentaron indagar más en este aspecto.

El medio YEPD es un medio rico con gran contenido en glucosa (20 g/l) lo cual genera un gran crecimiento celular de todas las cepas de *Candida* ensayadas, aunque únicamente en las primeras diez horas desde que se inocula, a partir de ese momento la célula fúngica entra en fase estacionaria. En ocasiones este crecimiento se traduce en una mayor biopelícula como se observó con *Candida glabrata* 16-028, *Candida parapsilosis* #582 y *Candida parapsilosis* #651. Sin embargo, puede ocurrir lo contrario, como observamos con la mayoría de las cepas de *Candida albicans* ensayadas. Esto contrasta con el estudio realizado por Pereira et al. (376) que referían que una mayor concentración de glucosa favorecía la formación de una mayor biopelícula. Sin embargo, en este estudio se empleaba únicamente RPMI con diferentes concentraciones de glucosa, sin tener en consideración el resto de la composición del medio. De este modo, el crecimiento en medio RPMI 2% Glu, a pesar de tener el mismo contenido en glucosa que el medio YEPD, no inducía su misma curva de crecimiento sigmoidea sino que el crecimiento era lento pero continuado a lo largo de los días asemejándose a una línea recta. Estas diferencias en el ritmo de división celular podrían ser debidas a que, en lugar de producirse una rápida división celular levaduriforme, ciertas especies de *Candida albicans* en medio RPMI dedican su maquinaria celular al desarrollo de hifas tal y como se aprecia en las imágenes obtenidas en el CBR, donde en el medio YEPD no se formaban hifas, pero sí en el medio RPMI. A su vez, la formación de hifas también se encuentra relacionada con una mayor cuantificación de biopelícula (374,377). Un resultado similar fue encontrado por Hsieh et al. (378) al investigar la capacidad del ácido taurocólico para promover la formación de hifas en *Candida albicans*. Estos autores observaron que en medio RPMI el crecimiento celular se asemejaba a lo que ocurriría dentro de los tejidos con la formación de hifas mientras que en medio YEPD el crecimiento era en forma de células planctónicas.

En un intento de determinar el componente del RPMI que provocaba esta diferencia se modificó el medio YEPD para asemejar más su contenido en sales y glucosa al medio RPMI. Se crearon dos medios nuevos basados en YEPD denominados

medio A y medio B, ambos medios fueron diluidos 1:10 para igualar la concentración de glucosa a 2 g/L y se les añadió una concentración de sal similar a la existente en el RPMI. La diferencia entre el medio A y B radicaba en que el medio B además de estar diluido no contenía extracto de levadura. Ambos medios estimularon el aumento de la biomasa de la biopelícula. Sin embargo, no realizamos un estudio microscópico de la biopelícula por lo que queda por determinar si esos medios provocan también un mayor desarrollo de hifas. No obstante, nuestros resultados también mostraron que algunas especies de *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis* generaban una mayor biopelícula en medio YEPD. Tan et al. (379) encontraron que algunas especies de *Candida* diferentes de *Candida albicans* desarrollaban una biopelícula significativamente menor cuando crecían en medio RPMI que cuando crecían con los medios BHI y YEPD.

En los ensayos en placas de microtitulación con medio RPMI 2% Glu se detectó mayor biomasa que con cualquier otro medio. Sin embargo, la adhesión de la cepa no aumentaba en la misma proporción. En algunos pocillos el entramado de hifas formado quedaba adherido al fondo, mientras que en otros, el propio peso de la biopelícula hacía que fuera arrastrado con el proceso de lavado. Esto generaba una barra de error de varios logaritmos y los resultados eran difíciles de interpretar. Aún no existen estudios sobre este tema por lo que se deberían realizar experimentos con más cepas para dilucidar estas observaciones que nos hacen reflexionar acerca de cuáles deben ser las condiciones adecuadas para el estudio de las biopelículas y la correcta definición de biopelícula.

Precisamente, una de las ventajas de utilizar el CBR en ensayos con biopelículas reside en que los discos están dispuestos verticalmente y con un estrés hidrodinámico continuo por lo que la biopelícula no se forma a partir de células depositadas en el fondo, generándose una biopelícula que está unida con mayor fuerza a la superficie. En estos ensayos también se observó un mayor desarrollo de biopelícula al emplear el medio RPMI. Además el tipo de material también influía ya que en poliuretano se produjo la misma cantidad de biopelícula independientemente del medio de cultivo empleado.

Una vez comprobado el efecto del medio de cultivo en la formación de biopelícula, se analizó su interacción en la actividad de antifúngicos clásicos como azoles, polienos y candinas. De este modo, cuando se investigó en RPMI la actividad metabólica de biopelículas de *Candida parapsilosis* se encontró que el tratamiento con azoles, como el voriconazol y el posaconazol, era ineficaz, ya que la actividad de la biopelícula no se reduce al 50%, ni siquiera a concentraciones superiores a 32 µg/ml, resultado refrendado también por Valentín et al. (380). Sin embargo, todas las concentraciones ensayadas, desde la más baja a la más alta, presentan un mismo grado de inhibición constante que mantiene reducida la actividad metabólica alrededor del 70% de su capacidad. Este mismo hecho fue observado en otros estudios donde también analizaron la reducción de la actividad metabólica con azoles en *Candida parapsilosis* (381,382). Existe algún tipo de interacción entre el RPMI y los azoles ya que este resultado no fue encontrado al utilizar como medio de cultivo el YEPD; sin embargo, no se ha encontrado una explicación concreta a este suceso en la literatura.

La anfotericina B y la micafungina son más efectivas aunque su actividad también es dependiente del medio de cultivo empleado para el ensayo. Por una parte, la anfotericina B consigue reducir la actividad metabólica de la biopelícula de *Candida parapsilosis* a concentraciones muy bajas en RPMI. Sin embargo, se requería una concentración 30 veces superior en YEPD para obtener un resultado similar. Aunque no se compararon diferentes medios, un estudio llevado a cabo por Krishnan et al. (383) refirió que en medio YEPD el efecto de la anfotericina B en la viabilidad de *Aspergillus fumigatus* era muy bajo respecto a otros tratamientos. Igualmente no se ha encontrado ninguna referencia que explique este comportamiento en *Candida*, pero una posible explicación consistiría en que el medio YEPD es un medio rico, y a diferencia del RPMI, su contenido no está completamente controlado por lo que la anfotericina B podría interactuar con componentes presentes en el extracto de levadura o en la peptona.

Por otra parte, la micafungina muestra el comportamiento contrario. En medio RPMI la actividad antifúngica se ve marcadamente reducida ya que ni siquiera con 32 µg/ml la mayoría de cepas llegan a alcanzar el 50% de inhibición de la biopelícula mientras que en medio YEPD a una concentración de 2 µg/ml todas las cepas muestran

una casi total reducción de su biopelícula. Un resultado similar se puede encontrar en un estudio realizado por Kucharíková et al. (384) en el que se observaba una mayor tolerancia a equinocandinas en medio RPMI respecto al medio YNB, lo cual atribuían a que en medio RPMI se generaba una biopelícula más gruesa que dificultaba la efectividad del fármaco tanto por la dificultad en su difusión como por el mayor aumento de la diana a inhibir. Este hecho parece tener relación también con la especie de *Candida* ensayada ya que diversos estudios que evaluaron la sensibilidad de las biopelículas de *Candida* a micafungina mostraron que, aunque es activa contra biopelículas de *Candida albicans* o *Candida glabrata*, puede no serlo contra *Candida parapsilosis* (381,385).

6. CONCLUSIONES

1. Se han determinado los parámetros óptimos del CBR para el estudio de biopelículas bacterianas y fúngicas desarrolladas por *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.
2. Existe una relación directa entre la rugosidad de la superficie y el desarrollo de biopelícula estafilocócica cuando los materiales han sido procesados del mismo modo.
3. Los parámetros de amplitud, como Sa, Ra, Sq o Rq, no bastan por sí solos para predecir la resistencia o predisposición de un biomaterial a la formación de biopelículas.
4. La hidrofobicidad es un factor más influyente que la rugosidad superficial del biomaterial en el desarrollo de biopelículas.
5. Las biopelículas microbianas se desarrollan más fácilmente en los biomateriales más hidrófobos, como el teflón y la silicona.
6. El efecto inhibitor de las biopelículas de *Candida* por la micafungina es menor cuando se emplea el medio RPMI. Sin embargo, la anfotericina B es menos activa contra las biopelículas en medio YEPD.
7. El Co-Cr y el Zr son los materiales protésicos de uso odontológico sobre los que se desarrolla una menor densidad de biopelícula de *Candida albicans*.
8. En las resinas compuestas de uso en Odontología se desarrollan biopelículas de *Candida albicans* más profusas que en Co-Cr o Zr.
9. La composición del medio de cultivo es importante en el estudio del desarrollo de biopelículas de *Candida* en biomateriales por su efecto significativo sobre el crecimiento, la formación de biopelícula y la actividad de los fármacos antifúngicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(4):322-32.
- (2) An D, Parsek MR. The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr Opin Microbiol* 2007;10(3):292-6.
- (3) Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 2002;8(9):881-90.
- (4) Santos Pontes D, Santos Aquino de Araujo R, Dantas N, Scotti L, Tullius M, Olimpio de Moura R, et al. Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2018;18(1):42-74.
- (5) Birkenhauer E, Neethirajan S, Weese JS. Collagen and hyaluronan at wound sites influence early polymicrobial biofilm adhesive events. *BMC Microbiology*;14:191.
- (6) Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005;436(7054):1171-5.
- (7) Ishak N, Tikhomirova A, Bent SJ, Ehrlich GD, Hu FZ, Kidd SP. There is a specific response to pH by isolates of *Haemophilus influenzae* and this has a direct influence on biofilm formation. *BMC Microbiology* 2014;14:47.
- (8) Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:207-28.
- (9) Ball AS, Chaparian RR, van Kessel J,C. Quorum Sensing Gene Regulation by LuxR/HapR Master Regulators in Vibrios. *J Bacteriol* 2017;199(19):e00105-17.
- (10) Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2014;18:96-104.
- (11) Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiology Spectrum* 2015;3(2):MB-0001-2014.
- (12) Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002;295:1487.
- (13) Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek MR, Wozniak DJ. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Conditional Psl Variants Reveals Roles for the Psl Polysaccharide in Adhesion and Maintaining Biofilm Structure Postattachment. *J Bacteriol* 2006;188(23):8213-21.
- (14) Yang L, Nilsson M, Gjermansen M, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Mol Microbiol* 2009;74(6):1380-92.
- (15) Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* 2004;51(3):675-90.
- (16) Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, Tolker-Nielsen T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Mol Microbiol* 2010;75(4):815-26.

- (17) Ryan RP, Lucey J, O'Donovan K, McCarthy Y, Yang L, Tolker-Nielsen T, et al. HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 2009;11(5):1126-36.
- (18) Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 2004;53(4):1123-34.
- (19) Tischler AD, Camilli A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* 2004;53(3):857-69.
- (20) García B, Latasa C, Solano C, Portillo FG, Gamazo C, Lasa I. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* 2004;54(1):264-77.
- (21) Goymer P, Kahn SG, Malone JG, Gehrig SM, Spiers AJ, Rainey PB. Adaptive Divergence in Experimental Populations of *Pseudomonas fluorescens*. II. Role of the GGDEF Regulator WspR in Evolution and Development of the Wrinkly Spreader Phenotype. *Genetics* 2006;173(2):515-526.
- (22) Kirillina O, Fetherston JD, Bobrov AG, Abney J, Perry RD. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* 2004;54(1):75-88.
- (23) Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 1987;325(6101):279-81.
- (24) Chambers JR, Sauer K. Small RNAs and their role in biofilm formation. *Trends Microbiol* 2013;21(1):39-49.
- (25) Tolker-Nielsen T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobsen CS, Molin S. Development and Dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. *J Bacteriol* 2000;182(22):6482-9.
- (26) Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 2003;48(6):1511-24.
- (27) Wolfaardt GM, Lawrence JR, Robarts RD, Caldwell SJ, Caldwell DE. Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(2):434-46.
- (28) Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott H. Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 2017/05;49(1):711-45.
- (29) Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 2008;68(1):223-40.
- (30) Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 2008;10(9):2331-43.

- (31) Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 2001;358(9276):135-8.
- (32) Sutherland IW. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 2001;9(5):222-7.
- (33) Jurcisek JA, Bakaletz LO. Biofilms Formed by Nontypeable *Haemophilus influenzae* In Vivo Contain both Double-Stranded DNA and Type IV Pilin Protein. *J Bacteriol* 2007;189(10):3868-75.
- (34) Martí M, Trotonda MP, Tormo-Más MÁ, Vergara-Irigaray M, Cheung AL, Lasa I, et al. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microb Infect* 2010;12(1):55-64.
- (35) Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, et al. Low Levels of β -lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 2012;3(4):e00198-12.
- (36) Beenken KE, Mrak LN, Griffin LM, Zielinska AK, Shaw LN, Rice KC, et al. Epistatic Relationships between *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLOS ONE* 2010;5(5):e10790.
- (37) Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999;67(10):5427-33.
- (38) Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;75(1):125-32.
- (39) Kokai-Kun J, Chanturiya T, Mond JJ. Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *J Antimicrob Chemother* 2009;64(1):94-100.
- (40) O'Gara JP. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2007;270(2):179-88.
- (41) Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D. Characterization of the Importance of Polysaccharide Intercellular Adhesion/Hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the Pathogenesis of Biomaterial-Based Infection in a Mouse Foreign Body Infection Model. *Infect Immun* 1999;67(5):2627-32.
- (42) Boles BR, Thoendel M, Roth AJ, Horswill AR. Identification of Genes Involved in Polysaccharide-Independent *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLoS ONE* 2010;5(4):e10146.
- (43) Conrady DG, Brescia CC, Horii K, Weiss AA, Hassett DJ, Herr AB. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(49):19456-61.
- (44) Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, et al. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2008;191(3):832-43.

- (45) Trottonda MP, Manna AC, Cheung AL, Lasa I, Penadós J,R. SarA Positively Controls Bap-Dependent Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2005;187(16):5790-8.
- (46) Ebner P, Prax M, Nega M, Koch I, Dube L, Yu W, et al. Excretion of cytoplasmic proteins (ECP) in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 2015;97(4):775-89.
- (47) Foulston L, Elsholz AKW, DeFrancesco AS, Losick R. The Extracellular Matrix of *Staphylococcus aureus* Biofilms Comprises Cytoplasmic Proteins That Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing pH. mBio 2014;5(5):e01667-14.
- (48) Schwartz K, Sekedat MD, Syed AK, O'Hara B, Payne DE, Lamb A, et al. The AgrD N-Terminal Leader Peptide of *Staphylococcus aureus* Has Cytolytic and Amyloidogenic Properties. Infect Immun 2014;82(9):3837-44.
- (49) Okshevsky M, Meyer RL. Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. J Microbiol Methods 2014;105:102-4.
- (50) Vorkapic D, Pressler K, Schild S. Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. Curr Genet 2016;62(1):71-9.
- (51) Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology 2007;153(Pt 7):2083-92.
- (52) Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, et al. Modulation of eDNA Release and Degradation Affects *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation. PLoS ONE 2009;4(6):e5822.
- (53) Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, et al. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;104(19):8113-18.
- (54) Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, et al. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107(32):14407-12.
- (55) Dengler V, Foulston L, DeFrancesco AS, Losick R. An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2015;197(24):3779-87.
- (56) Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural Stability of *Burkholderia cenocepacia* Biofilms Is Reliant on eDNA Structure and Presence of a Bacterial Nucleic Acid Binding Protein. PLoS ONE 2013;8(6):e67629.
- (57) Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, et al. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. Mucosal Immunol 2011 Nov;4(6):625-637.

- (58) Salgado-Pabón W, Herrera A, Vu BG, Stach CS, Merriman JA, Spaulding AR, et al. Staphylococcus aureus β -toxin Production is Common in Strains With the β -toxin Gene Inactivated by Bacteriophage. J Infect Dis 2014;210(5):784-72.
- (59) Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in *Staphylococcus aureus* biofilms. Mol Microbiol 2016;99(1):123-34.
- (60) Gallo P, Rapsinski G, Wilson R, Oppong G, Sriram U, Goulian M, et al. Amyloid-DNA Composites of Bacterial Biofilms Stimulate Autoimmunity. Immunity 2015;42(6):1171-84.
- (61) Wang S, Liu X, Liu H, Zhang L, Guo Y, Yu S, et al. The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. Environmental Microbiology Reports 2015;7(2):330-40.
- (62) Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. APMIS 2017;125(4):272-5.
- (63) Henrici AT. Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. J Bacteriol 1933;25(3):277-27.
- (64) Zobell CE, Allen EC. The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. J Bacteriol 1935;29(3):239-51.
- (65) Taylor PK, Yeung ATY, Hancock REW. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. J Biotechnol 2014;191:121-130.
- (66) Kokare C, Chakraborty S, Khopade A, Mahadik KR. Biofilm: Importance and applications. Indian Journal of Biotechnology 2009;8(2):159-68.
- (67) Bixler GD, Bhushan B. Biofouling: lessons from nature. Philos Transact A Math Phys Eng Sci 2012;370(1967):2381.
- (68) Wahl M. Marine Epibiosis .1. Fouling and Antifouling - Some Basic Aspects. Marine Ecology Progress Series 58 1989;1-2:175-189.
- (69) Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. Progress in Organic Coatings 2004;50(2):75-104.
- (70) Petrone L. Molecular surface chemistry in marine bioadhesion. Adv Colloid Interface Sci 2013;195:1-18.
- (71) Lane A, Willemsen PR. Collaborative effort looks into biofouling. Fish Farming Int 2004;12:34-5.
- (72) Fitridge I, Dempster T, Guenther J, de Nys R. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. Biofouling 2012;28(7):649-669.

(73) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)[internet]. Annual epidemiological report. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections 2014. 2016; Consultado en 05/17; Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-annual-epidemiological-report.pdf>.

(74) European Centre for Disease Prevention and Control (eCDC) [internet]. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2008. Report on the state of communicable diseases in the EU and EEA/EFTA countries. Consultado en 05/17; Disponible en: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0812_SUR_Annual_Epidemiological_Report_2008.pdf.

(75) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual Epidemiological report for 2016 Healthcare-associated infections in intensive care units. 2018; Consultado en 05/17; Disponible en: https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-HAI_0.pdf.

(76) Joo H, Otto M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chem Biol 2012;19(12):1503-13.

(77) Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. Pharmacol Ther 2015;145:19-34.

(78) Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis 2008;7(2):123-7.

(79) Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report 2016. Maryland. 2016.

(80) Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. Future Microbiol 2010 Nov;5(11):1663-74.

(81) Hatch RA, Schiller NL. Alginate Lyase Promotes Diffusion of Aminoglycosides through the Extracellular Polysaccharide of Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1998;42(4):974-7.

(82) Parad RB, Gerard CJ, Zurakowski D, Nichols DP, Pier GB. Pulmonary Outcome in Cystic Fibrosis Is Influenced Primarily by Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Immune Status and Only Modestly by Genotype. Infect Immun 1999;67(9):4744-50.

(83) Simpson JA, Smith SE, Dean RT. Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. Free Radic Biol Med 1989;6(4):347-53.

(84) Mulet X, Maciá M,D., Mena A, Juan C, Pérez J,L., Oliver A. Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Bactericidal Activity and Selection of nfxB Mutants. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(4):1552-60.

(85) Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer JN. Evidence of Bacterial Biofilms in Human Chronic Sinusitis. ORL 2004;66(3):155-58.

- (86) Ramadan HH. Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;14(3):183-6.
- (87) Singhal D, Psaltis AJ, Foreman A, Wormald PJ. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol Allergy* 2010;24(3):169-74.
- (88) Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial Biofilms on the Sinus Mucosa of Human Subjects With Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006;116(7):1121-6.
- (89) Foreman A, Psaltis AJ, Tan LW, Wormald PJ. Characterization of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2009;23(6):556-61.
- (90) Garzoni C, Francois P, Huyghe A, Couzinet S, Tapparel C, Charbonnier Y, et al. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics* 2007;8:171.
- (91) Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: Implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Research* 2006;24(1):87-93.
- (92) Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Gotz F. Why are pathogenic *Staphylococci* so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2005;55(3):778-77.
- (93) Psaltis AJ, Wormald PJ, Ha KR, Tan LW. Reduced levels of lactoferrin in biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2008;118(5):895-901.
- (94) Galli J, Calo L, Ardito F, Imperiali M, Bassotti E, Passali GC, et al. Damage to ciliated epithelium in chronic rhinosinusitis: what is the role of bacterial biofilms? *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117(12):902-8.
- (95) Vergara-Irigaray M, Maira-Litrán T, Merino N, Pier GB, Penadés J,R., Lasa I. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Microbiology* 2008;154:865-77.
- (96) Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(2):470-6.
- (97) Cerca N, Jefferson KK, Maira-Litran T, Pier DB, Kelly-Quintos C, Goldmann DA, et al. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. *Infect Immun* 2007;75(7):3406-3413.
- (98) Cassell G, Archer G, Beam T, et al. Report of the ASM task force on antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;12(Suppl 1):1-23.
- (99) Infante-Rivard C, Fernandez A. Otitis media in children: frequency, risk factors, and research avenues. *Epidemiol Rev* 1993;15(2):444-65.

- (100) Rayner MG, Zhang Y, Gorry MC, Chen Y, Post JC, Ehrlich GD. Evidence of bacterial metabolic activity in culture-negative otitis media with effusion. *JAMA* 1998;279(4):296-9.
- (101) Gallaher TK, Wu S, Webster P, Aguilera R. Identification of biofilm proteins in non-typeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiol* 2006;6:65.
- (102) Murphy TF, Kirkham C. Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol* 2002;2:7.
- (103) Starner TD, Zhang N, Kim G, Apicella MA, McCray PB, Jr. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(2):213-20.
- (104) Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 2006;296(2):202-11.
- (105) Bouchet V, Hood DW, Li J, Brisson JR, Randle GA, Martin A, et al. Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(15):8898-903.
- (106) Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* 2002 Apr 3;287(13):1710-1715.
- (107) Greiner LL, Watanabe H, Phillips NJ, Shao J, Morgan A, Zaleski A, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 2019 produces a biofilm containing N-acetylneuraminic acid that may mimic sialylated O-linked glycans. *Infect Immun* 2004;72(7):4249-60.
- (108) Lee M, Pawlowski K, Luong A, Furze A, Sargent Roland P. Biofilm presence in humans with chronic suppurative otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;141(5):567-71.
- (109) Brackman G, Coenye T. In Vitro and In Vivo Biofilm Wound Models and Their Application. *Adv Exp Med Biol* 2016;897:15-32.
- (110) Clinton A, Carter T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. *Lab Med* 2015;46(4):277-84.
- (111) Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007;127(3):514-25.
- (112) Hoen B, Duval X. Clinical practice. Infective endocarditis. *N Engl J Med.* 2013; 368(15):1425-33.
- (113) Allegranzi B, Bagheri Nejad S, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2011;377(9761):228-41.
- (114) Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis. *The Lancet* 2016;387(10021):882-93.

- (115) Widmer E, Que Y, Entenza JM, Moreillon P. New concepts in the pathophysiology of infective endocarditis. *Curr Infect Dis Rep* 2006;8(4):271-9.
- (116) Wagenlehner FME, Pilatz A, Bschiepfer T, Diemer T, Linn T, Meinhardt A, et al. Bacterial prostatitis. *World J Urol* 2013;31(4):711-716.
- (117) Videcnik Zorman J, Maticic M, Jeverica S, Smrkolj T. Diagnosis and treatment of bacterial prostatitis. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2015;24(2):25-9.
- (118) Weidner W FAU - Schiefer,,H.G., FAU SH, Krauss HF, Jantos C FAU - Friedrich,,H.J., FAU FH, Altmannsberger M. Chronic prostatitis: a thorough search for etiologically involved microorganisms in 1,461 patients. *Infection* 1991;19 Suppl 3:S119-25.
- (119) Bundrick W, Heron SP, Ray P, Schiff WM, Tennenberg AM, Wiesinger BA, et al. Levofloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of chronic bacterial prostatitis: a randomized double-blind multicenter study. *Urology* 2003;62(3):537-41.
- (120) Nickel JC, Olson ME, Costerton JW. Rat model of experimental bacterial prostatitis. *Infection* 1991;19 Suppl 3:S126-30.
- (121) Soto SM, Smithson A, Martinez JA, Horcajada JP, Mensa J, Vila J. Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Relationship With Prostatitis, Urovirulence Factors and Antimicrobial Resistance. *The Journal of Urology* 2007;177(1):365-8.
- (122) Machado A, Cerca N. Influence of Biofilm Formation by *Gardnerella vaginalis* and Other Anaerobes on Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis* 2015;212(12):1856-1861.
- (123) Livengood CH. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol* 2009;2(1):28-37.
- (124) Swidsinski A, Verstraelen H, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Mendling W, Halwani Z. Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. *PLoS One* 2013;8(1):e53997.
- (125) Patterson JL, Girerd PH, Karjane NW, Jefferson KK. Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2007;197(2):170.e1-170.e7.
- (126) Machado A, Almeida C, Salgueiro D, Henriques A, Vaneechoutte M, Haesebrouck F, et al. Fluorescence in situ Hybridization method using Peptide Nucleic Acid probes for rapid detection of *Lactobacillus* and *Gardnerella spp.* *BMC Microbiol* 2013;13:82.
- (127) Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene [internet]. ESTUDIO EPINE - EPPS 2016. 2017; Consultado en 06/2017; Disponible en: <http://hws.vhebron.net/epine>.
- (128) Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7(2):277-81.
- (129) Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Bozic KJ, Berry D, Parvizi J. Prosthetic joint infection risk after TKA in the Medicare population. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468(1):52-6.

- (130) Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466(7):1710-15.
- (131) Tsaras G, Osmon DR, Mabry T, Lahr B, St Sauveur J, Yawn B, et al. Incidence, secular trends, and outcomes of prosthetic joint infection: a population-based study, olmsted county, Minnesota, 1969-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012;33(12):1207-12
- (132) Berbari EF, Osmon DR, Carr A, Hanssen AD, Baddour LM, Greene D, et al. Dental procedures as risk factors for prosthetic hip or knee infection: a hospital-based prospective case-control study. *Clin Infect Dis* 2010;50(1):8-16.
- (133) Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle C,J., et al. New Definition for Periprosthetic Joint Infection: From the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop* 2011;469(11):2992-2994.
- (134) Arnold WV, Shirliff ME, Stoodley P. Bacterial biofilms and periprosthetic infections. *J Bone Joint Surg Am* 2013;95(24):2223-2229.
- (135) Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Hoiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(10):791-808.
- (136) Patel R, Alijanipour P, Parvizi J. Advancements in Diagnosing Periprosthetic Joint Infections after Total Hip and Knee Arthroplasty. *The Open Orthopaedics Journal* 2016;10:654-661.
- (137) Liaw K, Delfini RH, Abrahams JJ. Dental Implant Complications. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* 2015;36(5):427-433.
- (138) Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, Stadlinger B. Peri-Implant Infections of Oral Biofilm Etiology. *Adv Exp Med Biol.* 2015;830:69-84
- (139) Lee A, Wang HL. Biofilm related to dental implants. *Implant Dent* 2010;19(5):387-393.
- (140) MOMBELLI A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2002;28(1):177-189.
- (141) Mermel LA. Prevention of intravascular catheter-related infections. *Ann Intern Med* 2000;132(5):391-402.
- (142) Gahlot R, Nigam C, Kumar V, Yadav G, Anupurba S. Catheter-related bloodstream infections. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2014;4(2):162-167.
- (143) Hollenbeak CS. The cost of catheter-related bloodstream infections: implications for the value of prevention. *J Infus Nurs* 2011;34(5):309-313.
- (144) Murga R, Miller JM, Donlan RM. Biofilm formation by gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model. *J Clin Microbiol* 2001;39(6):2294-2297.

- (145) Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-464.
- (146) Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie E, Bodey GP. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* 1993;168(2):400-407.
- (147) Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;49(1):1-45.
- (148) Lebeaux D, Fernandez-Hidalgo N, Chauhan A, Lee S, Ghigo JM, Almirante B, et al. Management of infections related to totally implantable venous-access ports: challenges and perspectives. *Lancet Infect Dis* 2014;14(2):146-159.
- (149) Mermel LA, McCormick RD, Springman SR, Maki DG. The pathogenesis and epidemiology of catheter-related infection with pulmonary artery Swan-Ganz catheters: a prospective study utilizing molecular subtyping. *Am J Med* 1991;91(3B):197S-205S.
- (150) Randolph AG, Cook DJ, Gonzales CA, Pribble CG. Ultrasound guidance for placement of central venous catheters: a meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1996;24(12):2053-2058.
- (151) Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, Weist K, et al. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveill* 2012;17(46):20316.
- (152) Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med* 2014;370(13):1198-1208.
- (153) Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010;50(5):625-663.
- (154) Nicolle LE. Urinary Catheter-Associated Infections. *Infectious Disease Clinics of North America* 2012;26(1):13-27.
- (155) Stickler DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol* 2008;5(11):598-608.
- (156) Nicolle LE. The chronic indwelling catheter and urinary infection in long-term-care facility residents. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22(5):316-321.
- (157) Matsukawa M, Kunishima Y, Takahashi S, Takeyama K, Tsukamoto T. Bacterial colonization on intraluminal surface of urethral catheter. *Urology* 2005;65(3):440-444.
- (158) Warren JW, Tenney JH, Hoopes JM, Muncie HL, Anthony WC. A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. *J Infect Dis* 1982;146(6):719-723.

- (159) A report from the NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. American Journal of Infection Control 2004;32(8):470-485.
- (160) Díaz LA, Llauradó M, Rello J, Restrepo MI. Prevención no farmacológica de la neumonía asociada a ventilación mecánica. Archivos de Bronconeumología 2010;46(4):188-195.
- (161) Rello J, Diaz E. Pneumonia in the intensive care unit. Crit Care Med 2003 Oct;31(10):2544-2551.
- (162) Alp E, Voss A. Ventilator associated pneumonia and infection control. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2006;5:7.
- (163) Palomar M, Álvarez - Lerma F, Olaechea P, Insauisti Josu, López-Poyelo MJ. Estudio nacional de vigilancia de infecciones nosocomiales en servicios de medicina intensiva (ENVIN-HELICS)[internet]. Informe 2010. 2010; Consultado en 07/2017; Disponible en: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/Informe%20ENVIN-UCI%202010.pdf>.
- (164) Palomar M, Alvarez-Lerma F, Olaechea P, Gimeno Costa R, Gracia Arnillas MP, Seijas Betolaza I, et al. Estudio nacional de vigilancia de infecciones nosocomiales en servicios de medicina intensiva (ENVIN-HELICS)[internet]. Informe 2016. 2016; Consultado en 07/2017; Disponible en: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/Informe%20ENVIN-UCI%202016.pdf>.
- (165) Habets J, Tanis W, Reitsma JB, van den Brink R,B.A., Mali WPTM, Chamuleau SAJ, et al. Are novel non-invasive imaging techniques needed in patients with suspected prosthetic heart valve endocarditis? A systematic review and meta-analysis. Eur Radiol 2015 01/15;25(7):2125-2133.
- (166) Tornos P. Management of prosthetic valve endocarditis: a clinical challenge. Heart 2003 03;89(3):245-246.
- (167) Almirante B, Miró J,M. Infections associated with prosthetic heart valves, vascular prostheses, and cardiac pacemakers and defibrillators]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008;26(10):647-664.
- (168) Wang A, Athan E, Pappas PA, al e. Contemporary clinical profile and outcome of prosthetic valve endocarditis. JAMA 2007;297(12):1354-1361.
- (169) Palomar M, Álvarez F, Alba M, León C. Protocolo prevención de las bacteriemias relacionadas con catéteres venosos centrales (BRC) en las UCI españolas [internet]. 2015; Consultado en 07/2017; Disponible en: <https://www.seguridaddelpaciente.es/es/proyectos/financiacion-estudios/proyecto-bacteriemia-zero>
- (170) Hsu V. Prevention of health care-associated infections. Am Fam Physician 2014;90(6):377-382.
- (171) Palomar M, Alvarez-Lerma F, Olaechea P, Gimeno Costa R, Gracia Arnillas MP, Seijas Betolaza I, et al. Estudio nacional de vigilancia de infecciones nosocomiales en servicios de medicina intensiva (ENVIN-HELICS). Informe 2017. 2018; Available at: <http://semicyuc.org/temas/investigacion/registros/envin>, 2018.

- (172) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Healthcare-associated infections acquired in intensive care units - Annual Epidemiological Report 2016. 2018; Available at: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/infections-acquired-intensive-care-units-annual-report-2016>. Accessed 10/19, 2017.
- (173) Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Seminars in Immunopathology 2011;34(2):201-214.
- (174) Liu Y, Yang S, Li Y, Xu H, Qin L, Tay J. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. Journal of Biotechnology 2004;110(3):251-256.
- (175) Ludecke C, Jandt KD, Siegismund D, Kujau MJ, Zang E, Rettenmayr M, et al. Reproducible biofilm cultivation of chemostat-grown *Escherichia coli* and investigation of bacterial adhesion on biomaterials using a non-constant-depth film fermenter. PLoS One 2014;9(1):e84837.
- (176) Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib J, Uekotter A, Peters G. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology 2003;149(Pt 10):2769-2778.
- (177) Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Mol Microbiol 1997;24(5):1013-1024.
- (178) Clarke SR, Foster SJ. Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*. Advances in Microbial Physiology 2006;51:187-224.
- (179) Pei L, Flock J. Lack of fbe, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen coated surfaces. Microbial Pathogenesis 2001;31(4):185-193.
- (180) Sellman BR, Timofeyeva Y, Nanra J, Scott A, Fulginiti JP, Matsuka YV, et al. Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG increases following exposure to an in vivo environment. Infect Immun 2008;76(7):2950-2957.
- (181) Arrecubieta C, Lee MH, Macey A, Foster TJ, Lowy FD. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. J Biol Chem 2007;282(26):18767-18776.
- (182) Arrecubieta C, Toba FA, von Bayern M, Akashi H, Deng MC, Naka Y, et al. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, contributes to the initiation of ventricular assist device driveline-related infections. PLoS Pathog 2009;5(5):e1000411.
- (183) Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. Mol Microbiol 2010;75(1):187-207.
- (184) Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. Mol Microbiol 2005;55(6):1883-1895.

- (185) Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Gotz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 1998;273(29):18586-18593.
- (186) Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;43(6):1367-1378.
- (187) Li H, Xu L, Wang J, Wen Y, Vuong C, Otto M, et al. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immun* 2005;73(5):3188-3191.
- (188) Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 2007;28(9):1711-1720.
- (189) Banner MA, Cunniffe JG, Macintosh RL, Foster TJ, Rohde H, Mack D, et al. Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J Bacteriol* 2007;189(7):2793-2804.
- (190) Macintosh RL, Brittan JL, Bhattacharya R, Jenkinson HF, Derrick J, Upton M, et al. The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes. *J Bacteriol* 2009;191(22):7007-7016.
- (191) Tormo MA, Knecht E, Gotz F, Lasa I, Penades JR. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* 2005;151(Pt 7):2465-2475.
- (192) Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Gotz F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(5):2663-2676.
- (193) Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, et al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2004;186(14):4665-4684.
- (194) Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM, et al. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 2007;189(11):4223-4233.
- (195) Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 2008;4(4):e1000052.
- (196) Wang R, Khan BA, Cheung GY, Bach TH, Jameson-Lee M, Kong KF, et al. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest* 2011;121(1):238-248.
- (197) Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology* 2011;19(9):449-455.
- (198) Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 1996;14(3):98-105.

- (199) Reisner A, Maierl M, Jorger M, Krause R, Berger D, Haid A, et al. Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2014;196(5):931-939.
- (200) Andreu A. Pathogenesis of urinary tract infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23 Suppl 4:15-21.
- (201) Beloin C, Roux A, Ghigo J. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:249-289.
- (202) Wood TK. Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol* 2009;11(1):1-15.
- (203) Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol* 2016;121(2):309-319.
- (204) Vogeleer P, Tremblay YD, Mafu AA, Jacques M, Harel J. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2014;5:317.
- (205) Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(9):623-633.
- (206) Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 2013;67(3):159-173.
- (207) Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirology* 2010;15(7):1037-1056.
- (208) Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses* 2006 ;36(2):78-91.
- (209) Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(22):8487-8492.
- (210) Hogardt M, Heesemann J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology* 2010;300(8):557-562.
- (211) Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 2011;13(7):1666-1681.
- (212) Kulasakara H, Lee V, Brencic A, Liberati N, Urbach J, Miyata S, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(8):2839-2844.
- (213) Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* 2010;75(4):827-842.

- (214) O'Connor JR, Kuwada NJ, Huangyutitham V, Wiggins PA, Harwood CS. Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Mol Microbiol* 2012;86(3):720-729.
- (215) Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology* 2007;10(6):644-648.
- (216) Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol* 2017;27(6):1053-1064.
- (217) Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals* 2014;42(1):1-7.
- (218) Kim SK, Lee JH. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol* 2016 Feb;54(2):71-85.
- (219) Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol* 2015;69:71-92.
- (220) Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP* 2014;18:S81-S85.
- (221) Belduz N, Kamburoglu A, Yilmaz Y, Tosun I, Belduz M, Kara C. Evaluation of *Candida albicans* biofilm formation on various dental restorative material surfaces. *Niger J Clin Pract* 2017;20(3):355-360.
- (222) Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;183(18):5385-5394.
- (223) Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology* 2012;15(4):406-412.
- (224) Chaffin WL. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008 Sep;72(3):495-544
- (225) Granger BL. Insight into the Antiadhesive Effect of Yeast Wall Protein 1 of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 2012;11(6):795-805.
- (226) Sandini S, Stringaro A, Arancia S, Colone M, Mondello F, Murtas S, et al. The MP65 gene is required for cell wall integrity, adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiol* 2011;11:106-2180-11-106.
- (227) Singleton DR, Masuoka J, Hazen KC. Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity. *J Bacteriol* 2001;183(12):3582-3588.
- (228) Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 8):999-1008.
- (229) Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis* 2010;202(1):171-175.

(230) Hawser SP, Baillie GS, Douglas LJ. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol 1998;47(3):253-256.

(231) Daniels KJ, Park Y, Srikantha T, Pujol C, Soll DR. Impact of Environmental Conditions on the Form and Function of *Candida albicans* Biofilms. Eukaryotic Cell 2013;12(10):1389-1402.

(232) Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Kohler JR, et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. PLoS Pathog 2010;6(3):e1000828.

(233) Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, Schock U, et al. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. PLoS Genet 2012;8(12):e1003118.

(234) Robbins N, Uppuluri P, Nett J, Rajendran R, Ramage G, Lopez-Ribot JL, et al. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. PLoS Pathog 2011 Sep;7(9):e1002257.

(235) Braem A, Van Mellaert L, Mattheys T, Hofmans D, De Waelheyns E, Geris L, et al. Staphylococcal biofilm growth on smooth and porous titanium coatings for biomedical applications. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2014;102(1):215-224.

(236) de Avila ED, Lima BP, Sekiya T, Torii Y, Ogawa T, Shi W, et al. Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium implant material. Biomaterials 2015;67:84-92.

(237) Ferreira Ribeiro C, Cogo-Müller K, Franco GC, Silva-Concílio LR, Sampaio Campos M, de Mello Rode S, et al. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. Arch Oral Biol 2016;69:33-39.

(238) Xu LC, Siedlecki CA. *Staphylococcus epidermidis* adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces. Biomed Mater 2014 ;9(3):035003.

(239) Zaugg LK, Astasov-Frauenhoffer M, Braissant O, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Zitzmann NU. Determinants of biofilm formation and cleanability of titanium surfaces. Clin Oral Implants Res 2016; 28(4):469-475.

(240) Anitha VC, Lee JH, Lee J, Banerjee AN, Joo SW, Min BK. Biofilm formation on a TiO(2) nanotube with controlled pore diameter and surface wettability. Nanotechnology 2015;26(6):065102.

(241) Assaidi A, Ellouali M, Latrache H, Mabrouki M, Timinouni M, Zahir H, et al. Adhesion of *Legionella pneumophila* on glass and plumbing materials commonly used in domestic water systems. Int J Environ Health Res 2018;29:1-9.

(242) Saurí J, Suñé-Negre JM, Díaz-Marcos J, Vilana J, Millán D, Ticó JR, et al. Relationships between surface free energy, surface texture parameters and controlled drug release in hydrophilic matrices. Int J Pharm. 2015;478(1):328-340

(243) Mitutoyo. Quick guide to surface roughness measurement. 6th ed.; 2016.

- (244) Grupo de Tecnología Mecánica de la Universidad Nacional de Mar del Plata. Rugosidad superficial. 2017; Available at: <http://www3.fi.mdp.edu.ar/tecnologia/archivos/TecFab/10.pdf>, 2017.
- (245) Michigan Metrology L. 3D Filtering (Areal Filtering). 2019; Available at: https://www.michmet.com/3d_filtering.htm, 2019.
- (246) Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Ximénez-Fyvie LA, Schwartz Z, Boyan BD. Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro. Clin Oral Implants Res 2012;23(3):301-307.
- (247) Amoroso PF, Adams RJ, Waters MG, Williams DW. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. Clin Oral Implants Res 2006;17(6):633-637.
- (248) Cao T, Tang H, Liang X, Wang A, Auner GW, Salley SO, et al. Nanoscale investigation on *E. coli* adhesion to modified silicone surfaces. Methods Mol Biol 2011;736:379-388.
- (249) Xu L, Wo Y, Meyerhoff ME, Siedlecki CA. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation by dual functional textured and nitric oxide releasing surfaces. Acta Biomaterialia 2017;51:53-65.
- (250) Millsap KW, Reid G, Mei HCvd, Busscher HJ. Cluster analysis of genotypically characterized *Lactobacillus* species based on physicochemical cell surface properties and their relationship with adhesion to hexadecane. Can J Microbiol 1997;43(3):284-291.
- (251) Reid G, Bialkowska-Hobrzanska H, van der Mei HC, Busscher HJ. Correlation between genetic, physico-chemical surface characteristics and adhesion of four strains of *Lactobacillus*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1999;13(2):75-81.
- (252) Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiology Reviews 1999;23(2):179-230.
- (253) Geoghegan M, Andrews JS, Biggs CA, Eboigbodin KE, Elliott DR, Rolfe S, et al. The polymer physics and chemistry of microbial cell attachment and adhesion. Faraday Discuss 2008;139:85-103.
- (254) Blanco MT, Sacristan B, Lucio L, Blanco J, Perez-Giraldo C, Gomez-Garcia AC. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol 2010;27(4):195-199.
- (255) van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Appl Environ Microbiol 1987;53(8):1893-1897.
- (256) Tang H, Cao T, Liang X, Wang A, Salley SO, McAllister J, et al. Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2009;88A(2):454-463.

- (257) Riedl CR, Witkowski M, Plas E, Pflueger H. Heparin coating reduces encrustation of ureteral stents: a preliminary report. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2002;19(6):507-510.
- (258) Tenke P, Riedl CR, Jones GL, Williams GJ, Stickler D, Nagy E. Bacterial biofilm formation on urologic devices and heparin coating as preventive strategy. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:S67-S74.
- (259) Xu LC, Siedlecki CA. *Staphylococcus epidermidis* adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces. *Biomed Mater* 20149(3):035003
- (260) Morozov IA, Mamaev AS, Osorgina IV, Lemkina LM, Korobov VP, Belyaev AY, et al. Structural–mechanical and antibacterial properties of a soft elastic polyurethane surface after plasma immersion N2+ implantation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;62:242-8.
- (261) Donlan RM, Priede JA, Heyes CD, Sanii L, Murga R, Edmonds P, et al. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(8):4980-4988.
- (262) Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* 2005;151:757-62.
- (263) United States Environmental Protection Agency. EPA MLB SOP MB-19: Growing a Biofilm using the CDC Biofilm Reactor. 2017; Available at: <https://www.epa.gov/pesticide-analytical-methods/antimicrobial-testing-methods-procedures-mb-19>.
- (264) Ali O, Makou M, Papadopoulos T, Eliades G. Laboratory evaluation of modern plastic brackets. *Eur J Orthod* 2012;34(5):595-602.
- (265) Brown DE. Using plumber's teflon tape to enhance bonding procedures. *Dent Today* 2002;21(1):76-8.
- (266) Dunn WJ, Davis JT, Casey JA. Polytetrafluoroethylene (PTFE) tape as a matrix in operative dentistry. *Oper Dent* 2004;29(4):470-2.
- (267) Filipecki J, Kocela A, Korzekwa W. Study of free volumes of polymer hydrogel and -silicone-hydrogel contact lenses by means of the positron annihilation lifetime spectroscopy method. *Polim Med* 2014;44(4):255-60.
- (268) Garner SJ, Nobbs AH, McNally LM, Barbour ME. An antifungal coating for dental silicones composed of chlorhexidine nanoparticles. *J Dent* 2015;43(3):362-372.
- (269) Seckold T, Walker S, Dwyer T. A comparison of silicone and polyurethane PICC lines and postinsertion complication rates: a systematic review. *J Vasc Access* 2015;16(3):167-177.
- (270) Tobin CR. The Teflon Intravenous Catheter: Incidence of Phlebitis and Duration of Catheter Life in the Neonatal Patient. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 1988;17(1):35-42.
- (271) Diamanti MV, Del Curto B, Pedferri M. Anodic oxidation of titanium: from technical aspects to biomedical applications. *J Appl Biomater Biomech* 2011;9(1):55-69.

- (272) Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface* 2010 6;7 Suppl 5:S515-27.
- (273) Ding X, Yang C, Lim TP, Hsu LY, Engler AC, Hedrick JL, et al. Antibacterial and antifouling catheter coatings using surface grafted PEG-b-cationic polycarbonate diblock copolymers. *Biomaterials* 2012;33(28):6593-6603.
- (274) Souza NF, Vilar RV, Almeida MA, Miguel JA, Cal-Neto JP. Primer on the base of polycarbonate brackets: should we apply it or not? *Prog Orthod* 2010;11(1):37-40.
- (275) Venkataraghavan K, Chan J, Karthik S. Polycarbonate crowns for primary teeth revisited: restorative options, technique and case reports. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2014 Apr-Jun;32(2):156-159.
- (276) Wendel HP, Hauser N, Briquet F, Ziemer G. Hemocompatibility of medical connectors with biopassive or bioactive surface coatings. *J Biomater Appl* 2002;17(1):5-17.
- (277) Govrin-Yehudain J, Dvir H, Preise D, Govrin-Yehudain O, Govreen-Segal D. Lightweight breast implants: a novel solution for breast augmentation and reconstruction mammoplasty. *Aesthet Surg J* 2015;35(8):965-971.
- (278) Liu X, Huang W, Fu H, Yao A, Wang D, Pan H, et al. Bioactive borosilicate glass scaffolds: improvement on the strength of glass-based scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20(1):365-372.
- (279) Parthasarathy KS, Cheng YN, McAllister JP, Shen Y, Li J, Deren K, et al. Biocompatibilities of sapphire and borosilicate glass as cortical neuroprostheses. *Magn Reson Imaging*. 2007;25(9):1333-40.
- (280) Blanquer A, Hynowska A, Nogues C, Ibanez E, Sort J, Baro MD, et al. Effect of Surface Modifications of Ti40Zr10Cu38Pd12 Bulk Metallic Glass and Ti-6Al-4V Alloy on Human Osteoblasts In Vitro Biocompatibility. *PLoS One* 2016;11(5):e0156644.
- (281) Poggio C, Dagna A, Chiesa M, Colombo M, Scribante A. Surface roughness of flowable resin composites eroded by acidic and alcoholic drinks. *J Conserv Dent* 2012;15(2):137-40.
- (282) Sassoni E, Andreotti S, Bellini A, Mazzanti B, Bignozzi MC, Mazzotti C, et al. Influence of mechanical properties, anisotropy, surface roughness and porosity of brick on FRP debonding force. *Composites Part B: Engineering* 2017;108:257-69.
- (283) Artigas R. 3D Measuring Microscope Combines Confocal and Interferometry Techniques [internet]. 2008; Consultado en 05/2018; Disponible en: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/3d-measuring-microscope-combines-confocal-and-interferometry-techniques>.
- (284) Peltonen J, Järn M, Areva S, Linden M, Rosenholm JB. Topographical Parameters for Specifying a Three-Dimensional Surface. *Langmuir* 2004;20(22):9428-9431.
- (285) Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 1980;9(1):29-33.

- (286) Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol 2001;18(4):163-170.
- (287) Krepsky N, Rocha Ferreira RB, Ferreira Nunes AP, Casado Lins UG, Costa e Silva Filho F, de Mattos-Guaraldi AL, et al. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. Curr Microbiol 2003;46(4):280-286.
- (288) Ramage G. Comparing apples and oranges: considerations for quantifying candidal biofilms with xtt [2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2h-tetrazolium-5-carboxanilide] and the need for standardized testing. J Med Microbiol 2016;65(4):259-260.
- (289) Brigmon RL, Berry C, Singh RN, and Narayan RJ. Applications of Biotechnology in Development of Biomaterials: Nanotechnology and Biofilms. Journal of the South Carolina Academy of Science 2011;9:33-36.
- (290) Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. Microbiology 2005;151:757-62.
- (291) Trulear MG, Characklis WG. Dynamics of biofilm processes. Journal (Water Pollution Control Federation) 1982:1288-1301.
- (292) Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Frontiers in microbiology 2014;5:258.
- (293) Parra-Ruiz J, Vidailac C, Rose WE, Rybak MJ. Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(10):4329-4334.
- (294) del Pozo JL, Rouse MS, Mandrekar JN, Sampedro MF, Steckelberg JM, Patel R. Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(1):35-40.
- (295) Gilmore BF, Hamill TM, Jones DS, Gorman SP. Validation of the CDC biofilm reactor as a dynamic model for assessment of encrustation formation on urological device materials. J Biomed Mater Res 2010;93B(1):128-40.
- (296) Williams DL, Woodbury KL, Haymond BS, Parker AE, Bloebaum RD. A modified CDC biofilm reactor to produce mature biofilms on the surface of peek membranes for an in vivo animal model application. Curr Microbiol 2011;62(6):1657-63.
- (297) Bjerkan G, Witso E, Bergh K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. Acta Orthop 2009;80(2):245-50.
- (298) Vargas A, Duque Z, de Romero M. Sonication parameters for detachment and study of biocorrosion's biofilms. Rev Téc Ing Univ Zulia 2007;30:216-24.
- (299) Pitt WG. Removal of oral biofilm by sonic phenomena. Am J Dent 2005;18(5):345-52.

- (300) Joyce E, Phull S, Lorimer J, Mason T. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrason Sonochem* 2003;10(6):315-18.
- (301) Kobayashi N, Bauer TW, Tuohy MJ, Fujishiro T, Procop GW. Brief ultrasonication improves detection of biofilm-formative bacteria around a metal implant. *Clin Orthop Relat Res* 2007 Apr;457:210-13.
- (302) McDowell A, Patrick S. Evaluation of nonculture methods for the detection of prosthetic hip biofilms. *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 2005;437:74-82.
- (303) Sampedro MF, Huddleston PM, Piper KE, Karau MJ, Dekutoski MB, Yaszemski MJ, et al. A biofilm approach to detect bacteria on removed spinal implants. *Spine* 2010;35(12):1218-24.
- (304) Oliva A, Belvisi V, Iannetta M, Andreoni C, Mascellino MT, Lichtner M, et al. Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* detected with sonication of the device. *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4669-71.
- (305) 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;357(7):654-63.
- (306) Freitas AI, Vasconcelos C, Vilanova M, Cerca N. Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms. *J Basic Microbiol* 2014;54(7):750-57.
- (307) Paredes J, Becerro S, Arizti F, Aguinaga A, Del Pozo JL, Arana S. Real time monitoring of the impedance characteristics of Staphylococcal bacterial biofilm cultures with a modified CDC reactor system. *Biosensors and Bioelectronics* 2012;38(1):226-32.
- (308) 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 ;22(6):996-1006.
- (309) Stepanović S, Vuković D, hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 2018/10;115(8):891-9.
- (310) Gomez-Suarez C, Busscher HJ, van der Mei HC. Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(6):2531-37.
- (311) Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):506.
- (312) Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 2017;43(3):313-51.

(313) Hadi R, Vickery K, Deva A, Charlton T. Biofilm removal by medical device cleaners: comparison of two bioreactor detection assays. *Journal of Hospital Infection* 2010;74(2):160-67.

(314) Williams DL, Bloebaum RD. Observing the biofilm matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 grown using the CDC biofilm reactor. *Microsc Microanal* 2010;16(2):143-52.

(315) Williams DL, Woodbury KL, Haymond BS, Parker AE, Bloebaum RD. A modified CDC biofilm reactor to produce mature biofilms on the surface of peek membranes for an in vivo animal model application. *Curr Microbiol* 2011 Jun;62(6):1657-63.

(316) Buckingham-Meyer K, Goeres DM, Hamilton MA. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *Journal of Microbiological Methods* 2007;70(2):236-44.

(317) 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;8:37-57.

(318) Bollenl CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dental Materials* 1997;13(4):258-69.

(319) Ferreira Ribeiro C, Cogo-Müller K, Franco GC, Silva-Concílio LR, Sampaio Campos M, de Mello Rode S, et al. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Archives of Oral Biology* 2016;69:33-9.

(320) Jindal S, Anand S, Huang K, Goddard J, Metzger L, Amamcharla J. Evaluation of modified stainless steel surfaces targeted to reduce biofilm formation by common milk sporeformers. *Journal of Dairy Science* 2016;99(12):9502-13.

(321) Gyo M, Nikaido T, Okada K, Yamauchi J, Tagami J, Matin K. Surface response of fluorine polymer-incorporated resin composites to cariogenic biofilm adherence. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(5):1428-35.

(322) Leach R, Haitjema H. Bandwidth characteristics and comparisons of surface texture measuring instruments. *Meas Sci Technol* 2010;21(3).

(323) Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:68-81.

(324) Koseki H, Yonekura A, Shida T, Yoda I, Horiuchi H, Morinaga Y, et al. Early staphylococcal biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: in vitro study. *PLoS One* 2014;9(10):e107588.

(325) Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J Dent* 2012;40(8):686-92.

(326) Mitik-Dineva N, Wang J, Mocanasu RC, Stoddart PR, Crawford RJ, Ivanova EP. Impact of nano-topography on bacterial attachment. *Biotechnol J* 2008;3(4):536-44.

- (327) Whitehead KA, Colligon J, Verran J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2005;41:129-38.
- (328) Zhao B, van der Mei HC, Subbiahdoss G, de Vries J, Rustema-Abbing M, Kuijter R, et al. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. *Dental Materials* 2014;30(7):716-27.
- (329) Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials* 2010;31(4):706-13.
- (330) Wu S, Altenried S, Zogg A, Zuber F, Maniura-Weber K, Ren Q. Role of the Surface Nanoscale Roughness of Stainless Steel on Bacterial Adhesion and Microcolony Formation. *ACS Omega* 2018;3(6):6456-64.
- (331) Di Giulio M, Traini T, Sinjari B, Nostro A, Caputi S, Cellini L. *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation in different titanium surfaces, an in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 2016;27(7):918-25.
- (332) Tripathy A, Sen P, Su B, Briscoe WH. Natural and bioinspired nanostructured bactericidal surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* 2017;248:85-104.
- (333) Xu L, Siedlecki CA. Submicron-textured biomaterial surface reduces staphylococcal bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomaterialia* 2012;8(1):72-81.
- (334) Vadillo-Rodríguez V, Guerra-García-Mora AI, Perera-Costa D, González-Martín ML, Fernández-Calderón MC. Bacterial response to spatially organized microtopographic surface patterns with nanometer scale roughness. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2018;169:340-7.
- (335) Wu S, Zuber F, Maniura-Weber K, Brugger J, Ren Q. Nanostructured surface topographies have an effect on bactericidal activity. *J Nanobiotechnology* 2018;16(1):20-018-0347-0.
- (336) Dickson MN, Liang EI, Rodriguez LA, Vollereaux N, Yee AF. Nanopatterned polymer surfaces with bactericidal properties. *Biointerphases* 2015;10(2):021010.
- (337) Ashokkumar S, Adler-Nissen J, Møller P. Factors affecting the wettability of different surface materials with vegetable oil at high temperatures and its relation to cleanability. *Applied Surface Science* 2012;263:86-94.
- (338) Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Faust J, Bächle M, Follo M, Wolkewitz M, et al. Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2010;95B(1):101-9.
- (339) Preedy E, Perni S, Nipic D, Bohinc K, Prokopovich P. Surface roughness mediated adhesion forces between borosilicate glass and gram-positive bacteria. *Langmuir* 2014;30(31):9466-76.
- (340) Gomes LC, Silva LN, Simões M, Melo LF, Mergulhão FJ. *Escherichia coli* adhesion, biofilm development and antibiotic susceptibility on biomedical materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2015;103(4):1414-1423.

- (341) Wassmann T, Kreis S, Behr M, Buegers R. The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. *International Journal of Implant Dentistry* 2017;3:32.
- (342) Xu L, Siedlecki CA. Protein adsorption, platelet adhesion, and bacterial adhesion to polyethylene-glycol-textured polyurethane biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017;105(3):668-678.
- (343) Tang H, Cao T, Liang X, Wang A, Salley SO, McAllister J, et al. Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009;88A(2):454-463.
- (344) Pontes C, Alves M, Santos C, Ribeiro MH, Gonçalves L, Bettencourt AF, et al. Can Sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? *Int J Pharm* 2016;513(1–2):697-708.
- (345) Andersen TE, Kingshott P, Palarasah Y, Benter M, Alei M, Kolmos HJ. A flow chamber assay for quantitative evaluation of bacterial surface colonization used to investigate the influence of temperature and surface hydrophilicity on the biofilm forming capacity of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 2010;81(2):135-40.
- (346) Frade JP, Arthington-Skaggs BA. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. *Mycoses* 2011;54(4):e154-e162.
- (347) Brunello G, Brun P, Gardin C, Ferroni L, Bressan E, Meneghello R, et al. Biocompatibility and antibacterial properties of zirconium nitride coating on titanium abutments: An in vitro study. *PloS one* 2018;13(6):e0199591-e0199591.
- (348) Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomaterialia* 2010;6(6):2307-13.
- (349) Song WS, Lee J, Park SH, Um H, Lee SY, Chang B. Comparison of periodontitis-associated oral biofilm formation under dynamic and static conditions. *Journal of periodontal & implant science* 2017;47(4):219-30.
- (350) Bevilacqua L, Milan A, Del Lupo V, Maglione M, Dolzani L. Biofilms Developed on Dental Implant Titanium Surfaces with Different Roughness: Comparison Between In Vitro and In Vivo Studies. *Curr Microbiol* 2018;75(6):766-72.
- (351) Canullo L, Penarrocha-Oltra D, Soldini C, Mazzocco F, Penarrocha M, Covani U. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading. *Clin Oral Implants Res* 2015;26(4):426-34.
- (352) Avila E, De Molon R, Vergani C, Molo F, Salih V. The Relationship between Biofilm and Physical-Chemical Properties of Implant Abutment Materials for Successful Dental Implants. *Materials (Basel).* 2014;7(5):3651-62
- (353) Albrektsson T, Canullo L, Cochran D, De Bruyn H. "Peri-Implantitis": A Complication of a Foreign Body or a Man-Made "Disease". *Facts and Fiction. Clin Implant Dent Relat Res* 2016;18(4):840-849.

- (354) Li Y, Guo T, Zhao J, Wang J. Effects of polishing methods on *Candida albicans* adhesion on cast pure titanium surfaces. *Implant Dent* 2013;22(5):546-51.
- (355) van Dijk J, Herkstroter F, Busscher H, Weerkamp A, Jansen H, Arends J. Surface-free energy and bacterial adhesion. An in vivo study in beagle dogs. *J Clin Periodontol* 1987;14(5):300-304.
- (356) Kommerein N, Doll K, Stumpp NS, Stiesch M. Development and characterization of an oral multispecies biofilm implant flow chamber model. *PLoS One* 2018;13(5):e0196967.
- (357) Rudney J.D., Chen R., Lenton P., Li J., Li Y., Jones R.S., et al. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J Appl Microbiol* 2012;113(6):1540-53.
- (358) Kassapidou M, Franke Stenport V, Hjalmarsson L, Johansson CB. Cobalt-chromium alloys in fixed prosthodontics in Sweden. *Acta Biomater Odontol Scand.* 20 17;3(1):53-62.
- (359) Teigen K, Jokstad A. Dental implant suprastructures using cobalt-chromium alloy compared with gold alloy framework veneered with ceramic or acrylic resin: a retrospective cohort study up to 18 years. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(7):853-60.
- (360) Hjalmarsson L. On cobalt-chrome frameworks in implant dentistry. *Swed Dent J Suppl* 2009;(201):3-83.
- (361) Souza JC, Mota RR, Sordi MB, Passoni BB, Benfatti CA, Magini RS. Biofilm Formation on Different Materials Used in Oral Rehabilitation. *Braz Dent J* 2016;27(2):141-147.
- (362) Jordan RP, Marsh L, Ayre WN, Jones Q, Parkes M, Austin B, et al. An assessment of early colonisation of implant-abutment metal surfaces by single species and co-cultured bacterial periodontal pathogens. *J Dent* 2016 Oct;53:64-72.
- (363) Roehling S, Astasov-Frauenhoffer M, Hauser-Gerspach I, Braissant O, Woelfler H, Waltimo T, et al. In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. *J Periodontol* 2017;88(3):298-307.
- (364) Nascimento CD, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2014;25(3):337-43.
- (365) Al-Radha ASD, Dymock D, Younes C, O'Sullivan D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *Journal of Dentistry* 2012;40(2):146-153.
- (366) Salihoglu U, Boynuegri D, Engin D, Duman AN, Gokalp P, Balos K. Bacterial adhesion and colonization differences between zirconium oxide and titanium alloys: an in vivo human study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26(1):101-7.
- (367) Hahnel S, Wieser A, Lang R, Rosentritt M. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. *Clin Oral Implants Res* 2015;26(11):1297-1301.
- (368) Corpe W. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. *Adsorption of Microorganisms to Surfaces: John Wiley & Sons* 1980; p. 105–44.

- (369) Singleton DR, Fidel Jr. PL, Wozniak KL, Hazen KC. Contribution of cell surface hydrophobicity protein 1 (Csh1p) to virulence of hydrophobic *Candida albicans* serotype A cells. FEMS Microbiol Lett 2005;244(2):373-7.
- (370) Aoki W, Kitahara N, Miura N, Morisaka H, Kuroda K, Ueda M. Profiling of adhesive properties of the agglutinin-like sequence (ALS) protein family, a virulent attribute of *Candida albicans*. FEMS Immunol Med Microbiol 2012;65(1):121-4.
- (371) Mirani ZA, Fatima A, Urooj S, Aziz M, Khan MN, Abbas T. Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. Iran J Basic Med Sci 2018;21(7):760-9.
- (372) Hazen BW, Hazen KC. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. Infect Immun 1988;56(9):2521-5.
- (373) Bujdáková H, Didiášová M, Drahovska H, Černáková L. Role of cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* biofilm. Cent Eur J Biol. 2013;8:259-62.
- (374) Manoharan RK, Lee J, Lee J. Efficacy of 7-benzoyloxyindole and other halogenated indoles to inhibit *Candida albicans* biofilm and hyphal formation. Microb Biotechnol 2018;11(6):1060-9.
- (375) Fernández-Rivero ME, Del Pozo J,L., Valentín A, de Diego AM, Pemán J, Cantón E. Activity of Amphotericin B and Anidulafungin Combined with Rifampicin, Clarithromycin, Ethylenediaminetetraacetic Acid, N-Acetylcysteine, and Farnesol against *Candida tropicalis* Biofilms. Journal of fungi (Basel) 2017;3(1):16.
- (376) Pereira L, Silva S, Ribeiro B, Henriques M, Azeredo J. Influence of glucose concentration on the structure and quantity of biofilms formed by *Candida parapsilosis*. FEMS Yeast Res 2015;15(5):fov043.
- (377) Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microb Infect 2016;18(5):310-21.
- (378) Hsieh S, Brunke S, Brock M. Encapsulation of Antifungals in Micelles Protects *Candida albicans* during Gall-Bladder Infection. Frontiers in microbiology 2017 02/01;8:117-117.
- (379) Tan Y, Leonhard M, Ma S, Schneider-Stickler B. Influence of culture conditions for clinically isolated non-albicans *Candida* biofilm formation. Journal of Microbiological Methods 2016;130:123-8.
- (380) Valentín A, Cantón E, Pemán J, Martínez JP. Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus *Candida*. J Antimicrob Chemother 2012;67(10):2418-23.
- (381) Choi HW, Shin JH, Jung SI, Park KH, Cho D, Kee SJ, et al. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(4):1520-23.
- (382) Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, et al. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(1):357-60.

(383) Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. A comparative study of fungicidal activities of voriconazole and amphotericin B against hyphae of *Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemother 2005;55(6):914-20.

(384) Kucharikova S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdakova H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. J Med Microbiol 2011;60:1261-69.

(385) Prazynska M, Bogiel T, Gospodarek-Komkowska E. In vitro activity of micafungin against biofilms of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis* at different stages of maturation. Folia Microbiol (Praha) 2018;63(2):209-16.

8. ANEXO



Original Research

Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development

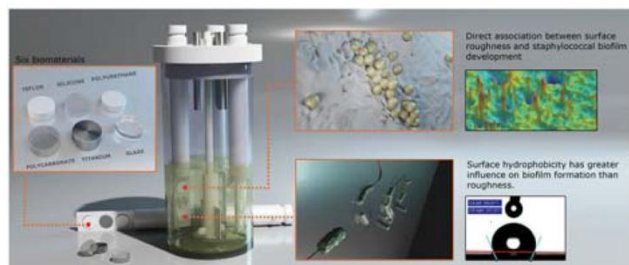
Iker De-la-Pinta¹ · Mónica Cobos² · Julen Ibarretxe³ · Elizabeth Montoya⁴ · Elena Eraso¹ · Teresa Guraya⁵ · Guillermo Quindós¹

Received: 9 April 2019 / Accepted: 10 June 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Most hospitalized patients are carriers of biomedical devices. Infections associated with these devices cause great morbidity and mortality, especially in patients in intensive care units. Numerous strategies have been designed to prevent biofilm development on biodevices. However, biofilm formation is a complex process not fully clarified. In the current study, roughness and hydrophobicity of different biomaterials was analyzed to assess their influences on the biofilm formation of four leading etiological causes of healthcare-associated infections, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*, using a CDC biofilm reactor. Hydrophobic materials allowed the formation of more abundant and profuse biofilms. Roughness had effect on biofilm formation, but its influence was not significant when material hydrophobicity was considered.

Graphical Abstract



1 Introduction

There were an estimated 687,000 healthcare-associated infections (HAI) in 2015 at the United States and about 72,000 hospital patients died from them during their hospitalizations [1]. In the European Union, more than 4,000,000 patients suffer from HAI every year [2]. Many HAI are related to biofilm development on biomedical devices, such as ventilator-associated pneumonia, catheter-associated urinary tract infections or surgical-site infections [3].

Teflon, titanium, polyurethane, silicone, polycarbonate or borosilicate glass are current components of medical and surgical devices colonized during HAIs [4–7]. Surface hydrophobicity and roughness of these biomaterials play important roles in the initial microbial adhesion and the subsequent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* or

✉ Guillermo Quindós
guillermo.quindos@ehu.eus

¹ Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, UFI 11/25, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao, Spain

² Departamento de Ciencia y Tecnología de Polímeros, Facultad de Química, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, San Sebastián, Spain

³ Departamento de Física aplicada I, Escuela de Ingeniería de Bilbao, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao, Spain

⁴ Leartiker Polymer R&D, Leartiker, Markina-Xemein, Spain

⁵ Departamento de Ingeniería Minera y Metalúrgica y Ciencia de los Materiales, Escuela de Ingeniería de Bilbao, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao, Spain

EFFECT OF BIOMATERIALS HYDROPHOBICITY AND ROUGHNESS ON BIOFILM DEVELOPMENT

Iker De-la-Pinta¹, Mónica Cobos², Julen Ibarretxe³, Elizabeth Montoya⁴, Elena Eraso¹,
Teresa Guraya⁵ and Guillermo Quindós¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, UFI 11/25, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao, Spain

²Departamento de Ciencia y Tecnología de Polímeros, Facultad de Química, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, San Sebastián, Spain

³Departamento de Física aplicada I, Escuela de Ingeniería de Bilbao, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao, Spain

⁴Leartiker Polymer R&D, Leartiker, Markina-Xemein, Spain

⁵Departamento de Ingeniería Minera y Metalúrgica y Ciencia de los Materiales, Escuela de Ingeniería de Bilbao, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao, Spain

Corresponding author: Dr. Guillermo Quindós, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, UFI 11/25, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Apartado 699, E-48080 Bilbao, Spain. Tel.:+34 94 601 2854; Fax: +34 94 601 3495; E-mail: guillermo.quindos@ehu.eus

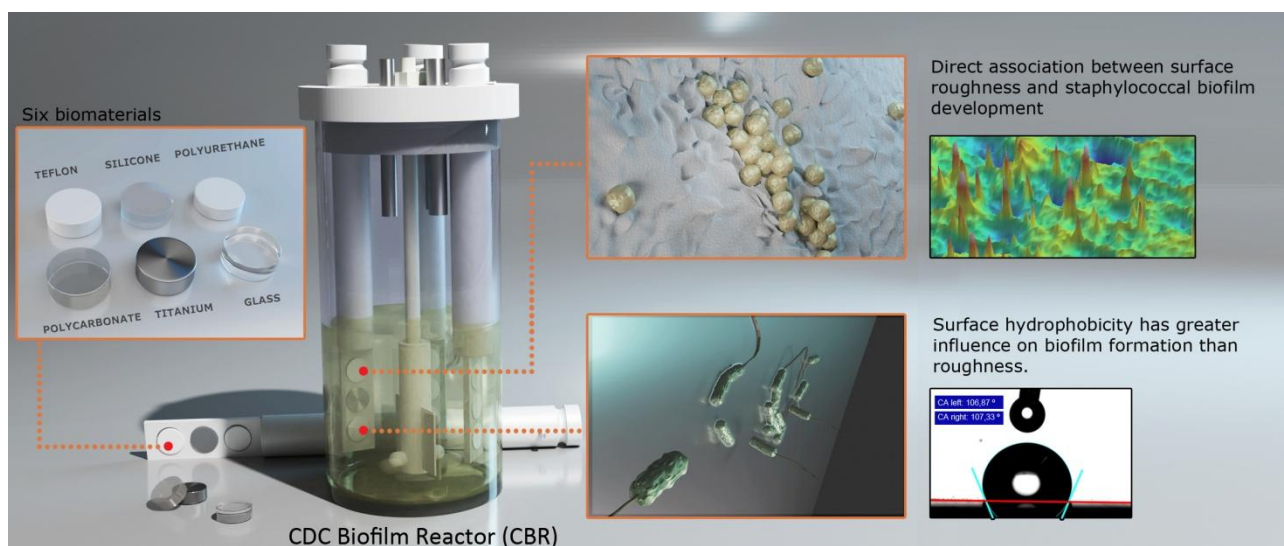
ABSTRACT

Most hospitalized patients are carriers of biomedical devices. Infections associated with these devices cause great morbidity and mortality, especially in patients in intensive care units. Numerous strategies have been designed to prevent biofilm development on biodevices. However, biofilm formation is a complex process not fully clarified.

In the current study, roughness and hydrophobicity of different biomaterials was analyzed to assess their influences on the biofilm formation of four leading etiological causes of healthcare-associated infections, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*, using a CDC biofilm reactor.

Hydrophobic materials allowed the formation of more abundant and profuse biofilms. Roughness had effect on biofilm formation, but its influence was not significant when material hydrophobicity was considered.

Key Words: Roughness, hydrophobicity, biofilm, CDC Biofilm Reactor, biomaterials



INTRODUCTION

There were an estimated 687,000 healthcare-associated infections (HAI) in 2015 at the United States and about 72,000 hospital patients died from them during their hospitalizations (1). In the European Union, more than 4,000,000 patients suffer from HAI every year (2). Many HAI are related to biofilm development on biomedical devices, such as ventilator-associated pneumonia, catheter-associated urinary tract infections or surgical-site infections (3).

Teflon, titanium, polyurethane, silicone, polycarbonate or borosilicate glass are current components of medical and surgical devices colonized during HAIs (4-7). Surface hydrophobicity and roughness of these biomaterials play important roles in the initial microbial adhesion and the subsequent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Candida albicans*, causing recalcitrant infections to treatment (8). However, there is still no agreement on how biomaterials hydrophobicity and roughness determine biofilm development.

To the best of our knowledge, this is the first study that analyzes the influence of both properties, roughness and hydrophobicity, on biofilm development on biomedical devices by means of the CDC Biofilm Reactor (CBR), a reproducible model for studying biofilm simulating factors and forces that undergo biofilms in dynamics humanized environments under body flows (9).

MATERIALS & METHODS

Study design

The current study was performed in two phases. In the first phase, the effect of generating different superficial roughness in polyurethane disks on *S. epidermidis* biofilm development was evaluated, while in the second phase, the hydrophobicity and roughness

of six different biomaterials were characterized in order to determine their influence on biofilm by means of the CBR with four microorganisms.

Microorganisms

Three well-described bacterial species and one clinically relevant yeast were used: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. epidermidis* ATCC 35984 and *C. albicans* NCPF 3153. Microorganisms were stored at -80 °C on cryoballs (Microbank, Biolab Diagnostics, Canada). During the assay, microorganisms were cultured in brain-heart infusion (BHI) medium and grown overnight at 37 °C in an orbital incubator. Cultures were centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS). Inoculum was adjusted at 0.5 McFarland (approximately $1-5 \times 10^8$ CFU/ml for bacteria and $1-5 \times 10^6$ CFU/ml for *C. albicans*).

CDC biofilm reactor (CBR)

Biofilms were developed in CBR 90-1 (BioSurface Technologies Corp., Bozeman, MT, USA) as described by Goeres et al. (10). CBR consisted of a one-liter glass vessel with a polyethylene top that supports eight independent and removable polypropylene rods. Each rod holds three removable disks used as surfaces for biofilm development (Fig. 1). One milliliter of inoculum was injected into the reactor containing 0.3 g of tryptic soy broth (TSB) per liter for *E. coli* and *P. aeruginosa*, 30 g/l of TSB for *S. epidermidis* or yeast extract peptone dextrose (YEPD) broth for *C. albicans*. CBR stood on a digital stir plate set at 37 ± 1 °C and 120 rpm for inducing a fluid shear onto the disk surfaces.



Fig. 1. CDC Biofilm Reactor over the digital hot/stir plate.

Disks and disk cleaning procedure

The biofilm growth surface consisted of disks of different materials with a diameter of 1.27 cm and a height of 0.3 cm. Commercially available titanium, polycarbonate, silicone, borosilicate and Teflon disks were obtained from BioSurface Technologies Corp. Disks were sterilized and sonicated according to the standard ASTM E2562-16 (11). Sterile polyurethane disks were manufactured by Leartiker, S. Coop (Markina-Xemein, Spain).

Polyurethane disks were grinded using a semi-automated grinding-polishing machine (Tegrapol-11/Tegraforce-1, Struers Inc, Cleveland, OH, USA). Surface roughness preparation was controlled using grinding SiC papers with several grits (320, 800, 1200 and 4000). Fixed times and forces were used for each sandpaper, and roughness was measured to check that resulting surface had the same roughness. Afterward polyurethane disks were sterilized using ethylene oxide.

Roughness and hydrophobicity measurements

Surface roughness was determined by a Leica dual core 3D microscope Leica DCM 3D (Leica Microsystems, L'Hospitalet de Llobregat, Spain) analyzing a surface of 2 mm x 1.2 mm by the Leica Map DCM 3D software (12, 13). The parameters Sa, Sq, Sz, Ssk, Sku and Str were calculated (UNE ISO, 25178-2:2013) (14). Sa is the arithmetical mean height of the surface. Sq is the root mean square height of the surface. Sz is the maximum height of the surface. Ssk is the *degree of symmetry of the surface heights about the mean plane (skewness)*. *Sku is a measure of the sharpness of the roughness profile (kurtosis)*. Finally, Sdr or developed interfacial area ratio is the percentage of additional surface area contributed by the texture as compared to an ideal plane the size of the measurement region. The Sdr of a completely level surface is zero being a hybrid parameter affected by both texture amplitude (peaks height) and spacing.

Contact angle, commonly used to evaluate the surface hydrophobicity, was determined using a goniometer (OCA 15EC, Dataphysics, Filderstadt, Germany). Briefly, droplets of distilled water were placed in both faces of the disks and ten readings of different areas were taken to determine average values for each disk. Drop shape image was processed by an image analysis system (SCA software, Dataphysics, Filderstadt, Germany) that calculated both left and right contact angles from the shape of the drop with an accuracy of $\pm 0.1^\circ$.

Cell surface hydrophobicity was assessed by the microbial adhesion assay to hydrocarbons (MATH) described by Rosenberg et al. (15) based on the percentage decrease in absorbance of the lower aqueous phase when adding hexadecane to a bacterial suspension in PBS. According to Krepsky et al. (16), strains considered highly hydrophobic had values $> 50\%$, and those moderately hydrophobic ranged from > 20 to $< 50\%$. Hydrophilic surfaces were those whose values were under 20%.

Quantification of biofilm biomass

Three disks of each material were removed from the CBR. Disks were rinsed in PBS to remove planktonic cells and placed into tubes containing 25 ml of PBS. Biofilm detachment was carried out by 30 s of vortex mixing, 2 min of sonication (VCX 130, Sonics Materials, USA) at 50% of amplitude followed by 30 s of vortex mixing. Resulting cell suspensions were sequentially diluted and 100 μ l were plated onto PCA plates or onto SDA plates for yeast. Plates were incubated for 24 h at 37 ± 1 °C.

Data analysis

Biofilm burden was presented as mean of the logarithm of *colony-forming units (CFU)* per cm^2 of material. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni or Games-Howell's correction depending on the homogeneity of variances (Levene test) and significant differences were determined ($p < 0.05$). The statistical software SPSS 24 (IBM SPSS Statistic, Chicago, USA) was used. All assays were performed at least in triplicate and experiments were repeated at least three times at different days.

RESULTS

Influence of roughness in biofilm formation by *S. epidermidis*

Characterization of surface roughness and hydrophobicity of polyurethane disks

Original disk showed the lowest roughness ($S_a = 0.34$ μm). The grinding of the disks with different grit numbers was used to modify their roughness. The lowest grit number produced a higher roughness (320 grit, $S_a = 1.90$ μm), while the highest grit number resulted in a smoother surface (4000 grit, $S_a = 0.38$ μm). 3D roughness reconstruction of grinded disks is shown in Fig. 2. By modifying the roughness of the material, the contact angle is also affected, decreasing its wettability (Table 1).

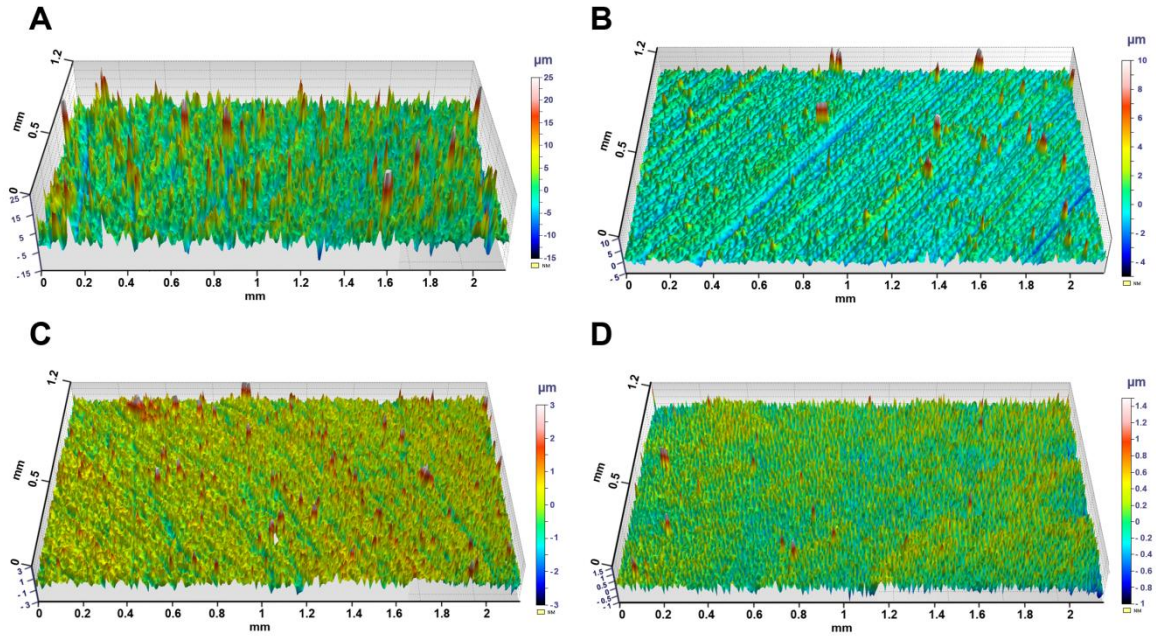


Fig. 2. 3D roughness reconstruction of grinded disks. A) Surface of disks grinded with 320 grit SiC paper. B) Surface of disks grinded with 800 grit SiC paper. C) Surface of disks grinded with 1200 grit SiC paper. D) Surface of disks grinded with 4000 grit SiC paper.

Table 1. Surface roughness parameters and contact angle of unmodified and grinded disks.

Grit size	Sa (μm)	Sq (μm)	Sz (μm)	Ssk	Sku	Sdr (%)	Contact angle (°), θY	Contact angle (°), θm
W/o grinding	0.34	0.46	24.6	-1.85	24.54	1.87	103.84 ± 0.93	103.58 ± 0.91
320	1.88	2.46	22.08	-0.16	4.11	14.68	130.09 ± 2.80	124.15 ± 2.24
800	1.08	1.51	19.79	0.97	9.36	9.76	130.89 ± 3.59	126.59 ± 3.09
1200	0.51	0.66	9.27	-0.24	5.00	3.43	119.05 ± 1.76	118.00 ± 1.69
4000	0.38	0.59	8.52	2.10	19.09	1.94	108.41 ± 4.48	108.04 ± 4.39

ISO 25178 Height parameters. Sa: Arithmetic average of the value of the height. Sq: Root mean square height of the surface. Sz: Maximum height of the surface (maximum height of the peaks + maximum height of the valleys). Ssk: Degree of symmetry of the surface heights about the mean plane (skewness). Sku: Measure of the sharpness of the roughness profile (kurtosis). θY expresses the measured contact angle and θm expresses the theoretically contact angle in a flat surface.

Biofilm formed by *S. epidermidis* on polyurethane disks

Roughness affected *S. epidermidis* biofilm burden only in grinded disks (Fig. 3). The smallest biofilm burden with a logarithm of bacterial density of 6.65 ($p = 0.010$) was observed on the disk with the lowest roughness ($Sa = 0.38 \mu\text{m}$). Higher biofilm formation

was on the disk with the highest roughness ($S_a = 1.88 \mu\text{m}$) with a logarithm of 7.45 ($p = 0.009$). However, there were no significant differences in biofilm between disks with intermediate roughness ($S_a = 0.51 \mu\text{m}$ and $1.08 \mu\text{m}$, $p = 1.000$). Interestingly, the original disk without grinding (roughness $0.34 \mu\text{m}$) was not the surface with the least biofilm formed.

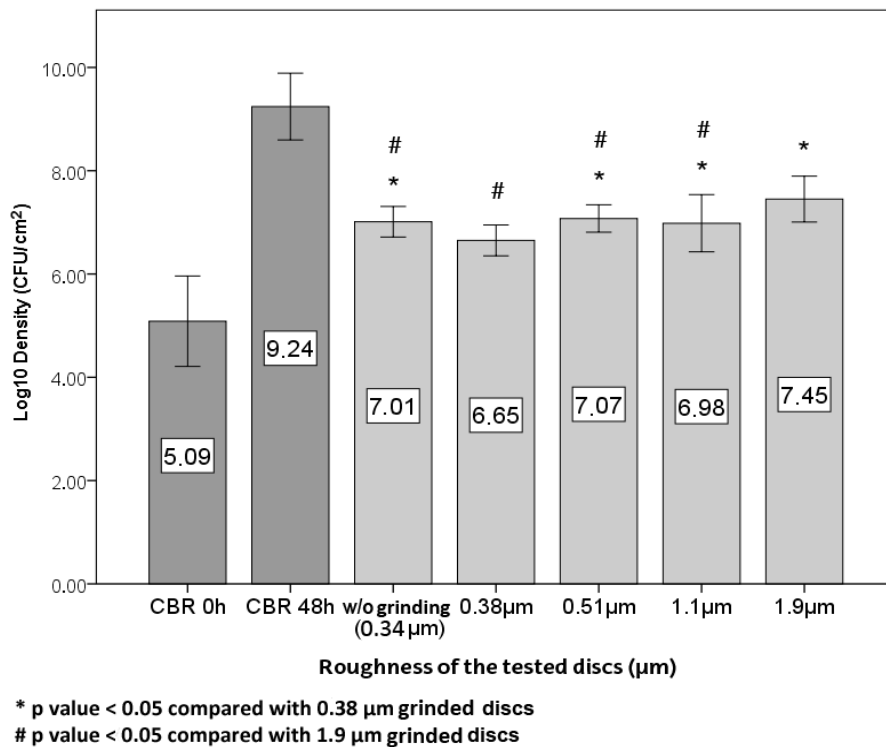


Fig. 3. Biofilm formed according to different roughness. Dark grey bars represent the planktonic growth in the CDC Biofilm Reactor at 0 h and 48 h. Light grey bars represent the biofilm produced by *S. epidermidis* ATCC 35984 on polyurethane disks after 48 h.

Structure and differences in *S. epidermidis* biofilm distribution in all grinded disks were confirmed by SEM. Representative images of staphylococcal adhesion on grinded surfaces are shown in Fig. 4. The disks grinded with 320 and 800 grit papers showed long and deep grooves along entire surface. In contrast, disks grinded with 1200 and 4000 grit sandpapers

showed a smoother surface. There were biofilms with a significant network of matrix on all disks, being more numerous on those ones with rougher surfaces. Staphylococcal adhesion and biofilm development were influenced by surface texture of polyurethane, as increased bacterial adhesion and larger bacterial aggregates were observed on the roughest patterned surfaces. Larger amounts of biofilm were found on the disks grinded with 320 grit paper compared to the disks grinded with 4000 grit paper. Biofilms after 48 h showed extracellular polymeric substances and 3D mushroom-like structures. Biofilms were distributed in clusters all over the surface of the disks, but large microbial clusters were observed at edges (Fig. 4). Higher concentration of biofilm at the edges of disks could be associated with the fact that CBR bar where the discs are placed could protect these edges from broth shear force, allowing a greater bacterial accumulation.

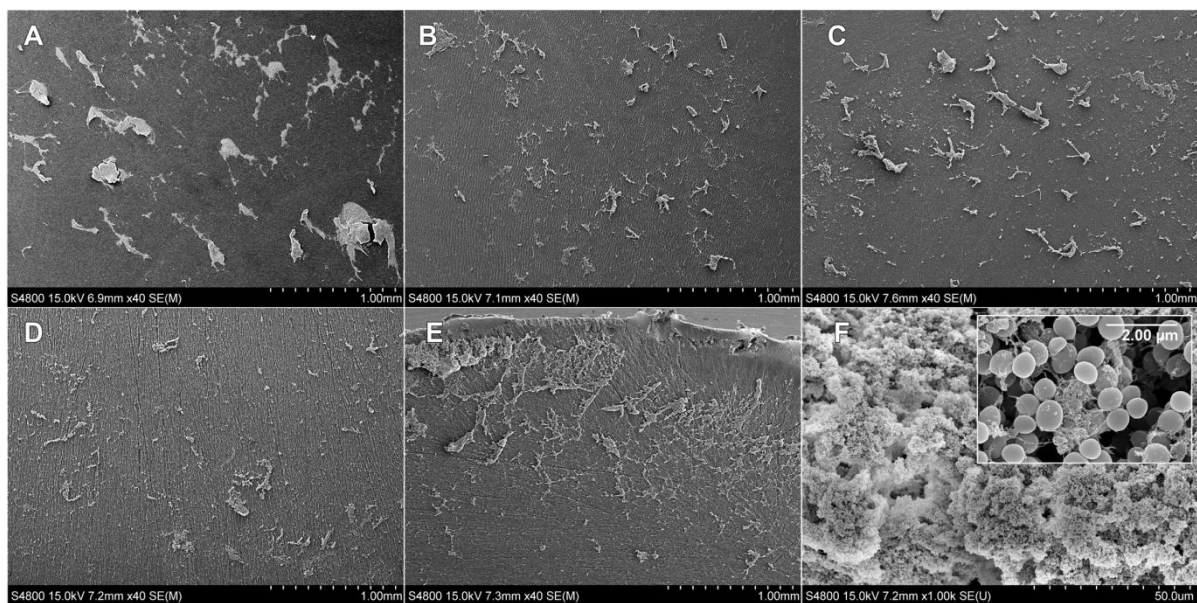


Fig. 4. Scanning electron microscopy of biofilm on the surface of polyurethane disks with different roughness. A) Without grinding. B) Grinded with 4000 grit SiC paper. C) Grinded with 1200 grit SiC paper. D) Grinded with 800 grit SiC paper. E) Grinded with 320 grit SiC paper. F) *S. epidermidis* and extracellular polymeric matrix.

Influence of hydrophobicity in biofilm formation

Characterization of surface roughness and hydrophobicity

Surface roughness and contact angles of all materials tested were determined. Sa surface roughness was within the range of 0.03–3.81 μm and their contact angles between 20° and 112° (Table 1). Biomaterials were categorized in four groups according to their roughness, being Teflon ($S_a = 3.81 \mu\text{m}$) the roughest, followed by polycarbonate ($S_a = 0.96 \mu\text{m}$). Titanium and polyurethane showed an intermediate roughness. Silicone ($S_a = 0.08 \mu\text{m}$) and borosilicate glass ($S_a = 0.03 \mu\text{m}$) showed the lowest surface roughness (Table 2, Fig. 5).

Table 2. Surface roughness parameters of the different disks measured by 3D microscope Leica DCM 3D and sorted by their hydrophobicity.

Biomaterial	Roughness parameters					Hydrophobicity Contact angle (°)
	Sa (μm)	Sq (μm)	Sz (μm)	Ssk	Sku	
Teflon	3.81	5.04	35.33	-0.60	4.51	111.64 \pm 5.15
Silicone	0.08	0.11	1.12	-1.59	8.47	108.05 \pm 2.69
Polyurethane	0.34	0.46	24.61	-1.85	24.54	103.84 \pm 0.93
Polycarbonate	0.96	1.22	10.18	-0.15	3.34	76.63 \pm 7.02
Titanium	0.29	0.36	2.53	0.07	3.40	55.18 \pm 19.63
Borosilicate glass	0.03	0.07	0.76	5.87	52.91	20.88 \pm 4.82

ISO 25178 Height parameters. Sa: Arithmetic average of the value of the height. Sq: Root mean square height of the surface. Sz: Maximum height of the surface (maximum height of the peaks + maximum height of the valleys). Ssk: *Degree of symmetry of the surface heights about the mean plane (skewness)*. Sku: Measure of the sharpness of the roughness profile (kurtosis).

Biomaterials could be divided in four groups according to their hydrophobicity, being Teflon and silicone ($p = 0.670$) the most hydrophobic materials, followed by polyurethane with no statistical differences with silicone ($p = 0.597$). Polycarbonate and titanium had less hydrophobicity ($p = 0.000$). Finally, borosilicate was quite hydrophilic ($p = 0.000$). Interestingly, the roughest material was also the most hydrophobic, just as the least rough was the least hydrophobic too. However, silicone was just as hydrophobic as Teflon and showed a very low roughness, below 0.1 μm (Table 2).

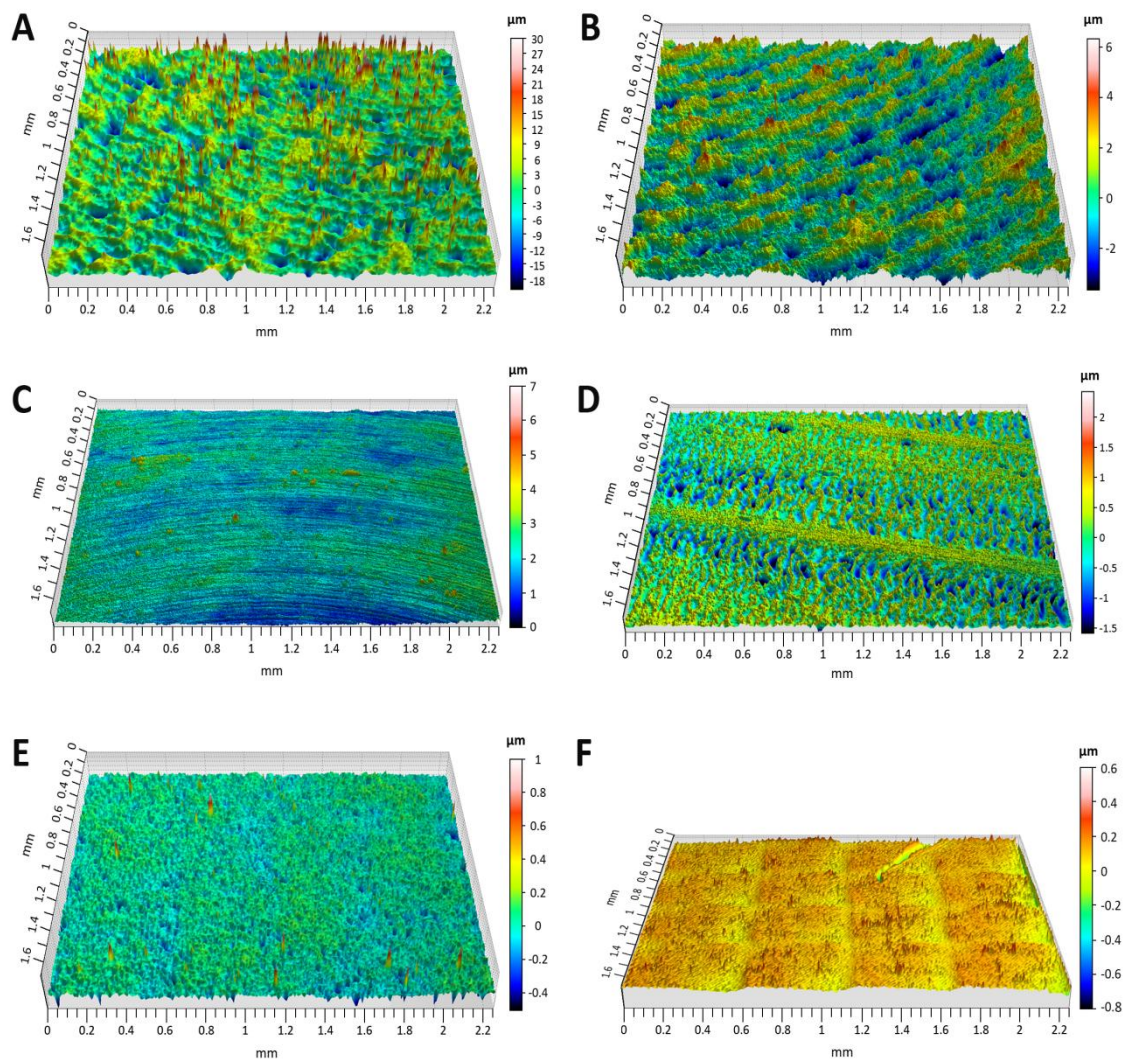


Fig. 5. 3D roughness representation of biomaterial surfaces. A) Teflon. B) Polycarbonate. C) Titanium. D) Polyurethane. E) Silicone. F) Borosilicate glass.

Microbial adherence to N-hexadecane test (MATH)

S. epidermidis and *P. aeruginosa*, with a hydrophobicity of 56.6% and 66.6%, respectively, showed medium-high levels of cell surface hydrophobicity (Fig. 6). Conversely, *E. coli* (0.93%) and *C. albicans* (12.63%) displayed a very low hydrophobicity.

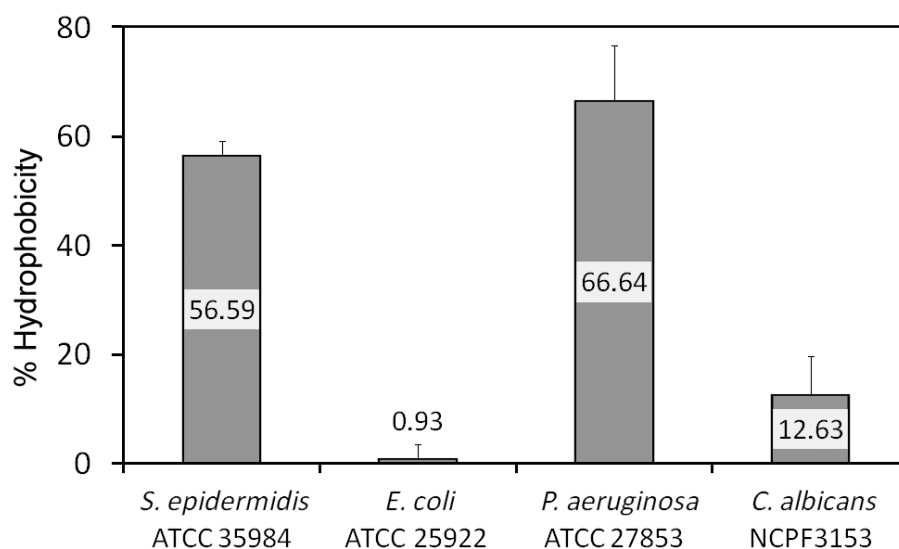


Fig. 6. Microbial surface hydrophobicity

Biofilm formation

Teflon, the roughest and most hydrophobic material, is where most bacterial biofilm was produced, along with silicone. Conversely, borosilicate, the least rough and hydrophobic material, and titanium were where less biofilm developed. According to this fact, Teflon and borosilicate glass were used as comparators for the rest of biomaterials for statistics.

We compared the ratio of the sessile/planktonic logarithm of microorganisms per square centimeter of Teflon, as the concentration and composition of culture media were different. *S. epidermidis* generated practically the same amount of biofilm in a square

centimeter of Teflon that staphylococcal planktonic cells suspended in the culture medium (0.92). Similarly, the ratio of sessile and planktonic microorganisms of *P. aeruginosa* was also high (0.93). However, both *E. coli* and *C. albicans* showed a lower ratio (0.8 and 0.6, respectively).

The number of adhering *S. epidermidis* cells was directly associated with hydrophobicity classification of materials. *S. epidermidis* adhered and developed a more profuse biofilm on Teflon and silicone disks (density 1.6×10^8 CFU/ml and 3.6×10^7 CFU/ml, respectively), the most hydrophobic materials. Biofilms developed on the remaining materials were less profuse ($p = 0.000$): lesser biofilm was developed on borosilicate, titanium and polycarbonate, materials with lower hydrophobicity, than on Teflon (density 3.75×10^6 CFU/ml, 5.14×10^6 CFU/ml and 6.93×10^6 CFU/ml, respectively). There were no significant differences between biofilms developed in the latter materials ($p > 0.450$) (Fig. 7A).

E. coli and *P. aeruginosa* grew under the same conditions and, despite the fact that both bacteria grew similar in broth (8.91×10^7 CFU/ml and 9.12×10^7 CFU/ml respectively), *P. aeruginosa* biofilm was denser than that of *E. coli*. *P. aeruginosa* biofilms were not different between Teflon, silicone, polyurethane and polycarbonate ($\approx 3 \times 10^7$ CFU/ml, $p > 0,080$), however, biofilm developed on hydrophilic surfaces were smaller ($p < 0.006$). Borosilicate was the biomaterial most resistant to *P. aeruginosa* biofilms (4.9×10^6 CFU/ml, $p < 0,019$) (Fig. 7B). Conversely, titanium was the most resistant to *E. coli* adhesion and biofilm formation ($p < 0.001$). Highest biofilm production was observed on the more hydrophobic biomaterials, Teflon, silicone and polycarbonate disks, without significant differences among them (Fig. 7C). For *C. albicans*, Teflon is where more biofilm was developed after 48 h ($p = 0.000$). Likewise, titanium was the most resistant to *C. albicans* biofilm formation despite its roughness ($p < 0.012$), followed by borosilicate glass (Fig. 7D).

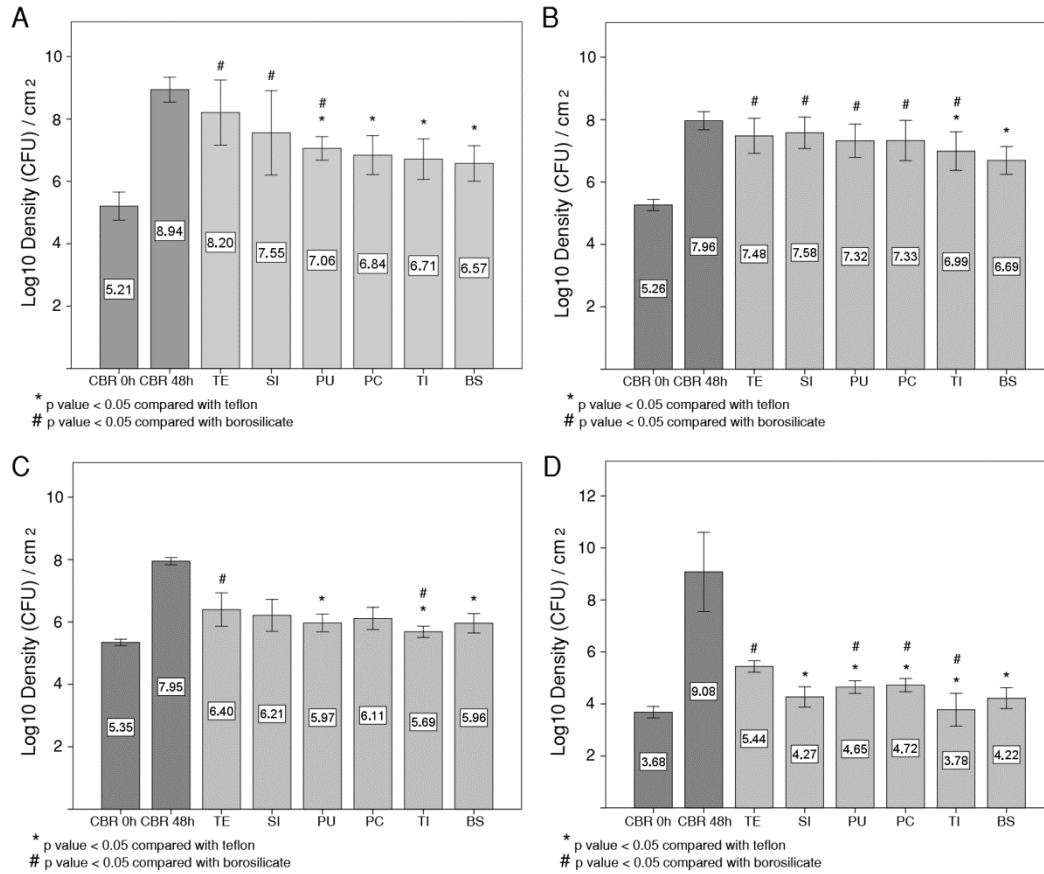


Fig. 7. Biofilm formed after 48 h of incubation on the different biomaterials. Dark grey bars represent the planktonic growth in the CDC Biofilm Reactor at 0 h and 48 h. Light grey bars represent the biofilm produced by A) *S. epidermidis* ATCC 35984. B) *P. aeruginosa* ATCC 27853. C) *E. coli* ATCC 25922. D) *C. albicans* NCPF 3153. Materials were sorted by their hydrophobicity.

SEM images of *P. aeruginosa* biofilms showed a dense microbial cell layer with profuse extracellular matrix on Teflon (Fig. 8A, 8I). There were also abundant clusters of biofilms on silicone and polyurethane. However, there were many isolated cells, which appear to be trapped in their cracks and pores, on more hydrophilic materials (Fig. 8G, 8H).

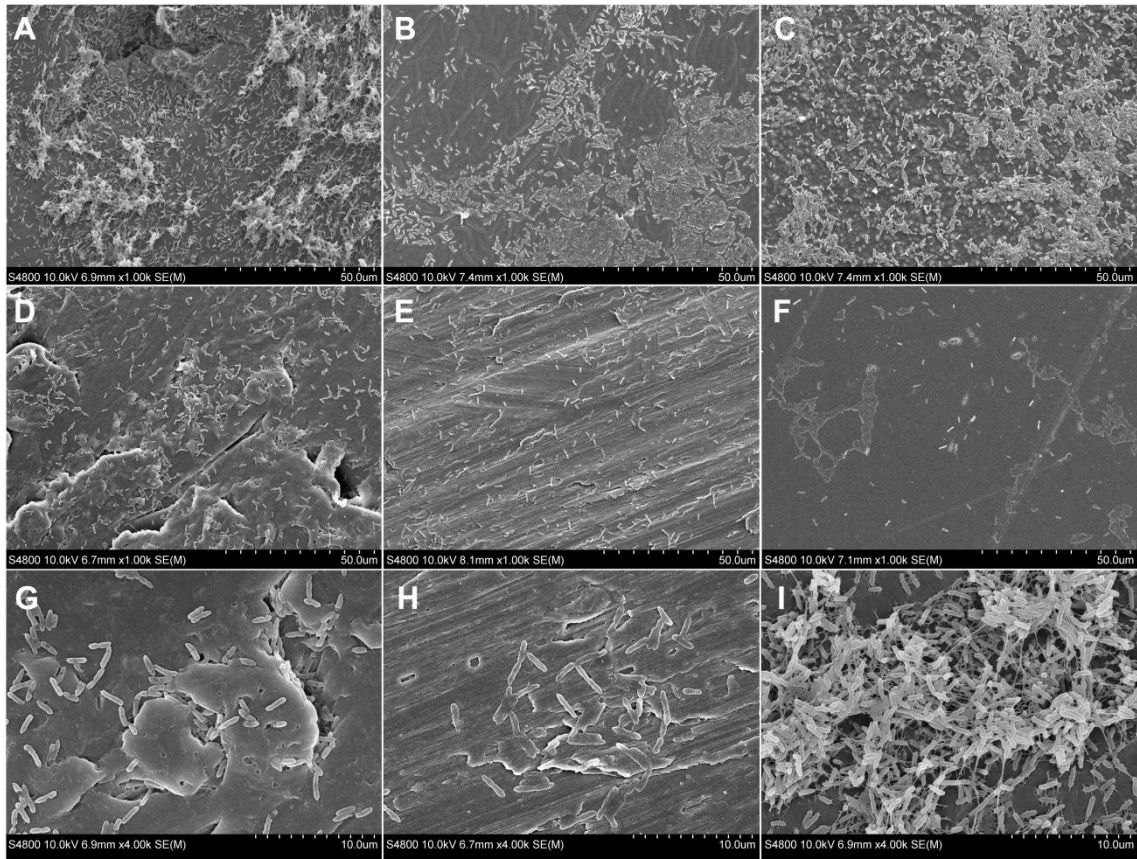


Fig. 8. Scanning electron microscopy of *P. aeruginosa* biofilm at 48 h on the surface of the six biomaterials: A) Teflon (x1000). B) Silicone (x1000). C) Polyurethane (x1000). D) Polycarbonate (x1000). E) Titanium (x1000). F) Borosilicate glass (x1000). G) Polycarbonate (x4000). H) Titanium (x4000). I) Teflon (x4000).

DISCUSSION

Some studies have suggested a positive correlation between material roughness and biofilm formation, or have concluded that roughness is a major factor for bacterial adhesion (17, 18). Conversely, others suggest that roughness is an insignificant factor (19-21).

In the current study, surface roughness influenced both wettability and biofilm formation in grinded polyurethane disks. Among grinded disks, staphylococcal biofilms

was significantly less abundant on disks with a surface roughness average below the diameter of the bacteria ($0.38\ \mu\text{m}$) than on disks with larger roughness ($0.51\ \mu\text{m}$, $1.1\ \mu\text{m}$ and $1.9\ \mu\text{m}$). Likewise, more abundant biofilm was formed on the most roughly shaped disk. Reduction in bacterial adhesion was apparently related to decrease in the availability of surface contact area for interaction.

Interestingly, the unmodified disk without grinding, despite presenting a similar S_a , allowed a higher development of bacterial biofilm than the disks grinded with 4000 grit sandpaper. This apparently paradoxical observation has been previously reported in a study in which an increase of nanoroughness of a titanium surface decreased *S. epidermidis* adhesion compared to unmodified disks (22). In other study, the number of *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* adhered cells was reduced by a factor of more than 10 on untreated rough surfaces compared with electropolished smoother surfaces (23). Disks with less roughness do not always induce less biofilm formation, since not only roughness average (S_a) but different surface topography play important roles in material behavior. An interesting parameter is S_{sk} , which represents the degree of surface heights symmetry about the mean plane. S_{sk} indicates predominance of peaks (i.e. $S_{sk} > 0$) or valleys ($S_{sk} < 0$). The surface obtained with the 4000 grit sandpaper shows a S_{sk} superior to 2, whereas in the unmodified surface it is close to -2, this could explain the differences in the biofilm formation since a roughness (S_a) inferior to the diameter of a bacterium with a prevalence of peaks in its surface involves a decrease of the surface of contact with the bacterium being less likely the adhesion to the material and facilitating its elimination in washes or by a dragging force. Xu and Siedlecki (24) demonstrated that a roughness-controlled surface by nanopillars decreased the adhesion of *S. epidermidis* and *S. aureus* to polyurethane and inhibited biofilm formation. Reduced wettability and decreased availability of contact area could contribute to a reduction in bacterial adhesion to hydrophobic textured surfaces. In

the same way, Vadillo-Rodriguez et al. (25) observed that uniform nanoscale roughness rendered a surface less attractive for staphylococcal adhesion than a smooth one.

Wettability can be affected by factors such as surface topography, chemical nature of liquid, temperature and hydrophobicity or chemical nature of material *per se* (26). However, when the droplet is in Wenzel state (27) we can determine the theoretical contact angle (θ_Y) that the material would have if it were completely smooth from the Sdr parameter. However, when we did this, calculated angles for the four different roughness did not coincide with each other, which may be due to the existence of air bubbles in the material where water did not penetrate, so the Wenzel equation cannot be applied.

Our study found significant biofilm differences in tested range of roughness. This could not be reflected in clinical practice where there are also involved other properties of material, host and microorganism. However, it should be noted that there was not any antimicrobial agent in the material tested: the same material with different Sa ranging from 0.3 μm to 2 μm . For this reason, reducing surface roughness is a factor to be taken into account and may help to inhibit biofilm development and prevention of HAIs to some extent.

Regarding hydrophobicity of bacteria, the results obtained using the CBR are in line with previous studies performed on microtiter plates where microbial strains with higher cell surface hydrophobicity yielded more biofilm (16). *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*, the species most adherent to hexadecane, developed more abundant biofilms on all disks than *E. coli* and *C. albicans* with lower hydrophobicity.

Our results suggest that the effect of roughness seems to be surpassed by other properties associated to the studied materials, such as hydrophobicity. For instance, titanium is a material with an intermediate roughness but it was the most resistant to *C. albicans* and *E. coli* biofilms ($p < 0.05$). *S. epidermidis* biofilm burden did not show significant

differences on titanium or borosilicate glass disks, the materials with less biofilm developed. For *P. aeruginosa*, titanium was the second material where less biofilm was observed. Likewise, silicone, presenting a very low roughness, and Teflon, the roughest material, were much more susceptible to bacterial adhesion. Furthermore, the most hydrophobic materials permitted the most abundant biofilm development. Similarly, less abundant biofilms were observed in the most hydrophilic materials, borosilicate and titanium.

Nevertheless, literature is controversial, with reports concluding that roughness is the main factor for microbial adhesion and biofilm development (17, 18, 28) and studies stating that hydrophobicity is the most influential factor (20, 21). However, most authors consider both properties, roughness and hydrophobicity, important for adhesion and biofilm formation (29, 30) depending their importance on the specific microorganism (31).

Our results regarding *S. epidermidis* ATCC 35984 are in agreement with those of Xu et al. (32) who reported that the conversion of hydrophobic polyurethane to a more hydrophilic surface showed a reduction of bacterial biofilm in media containing 25% human plasma and 50% TSB. However, there are also evidences indicating that *S. epidermidis* ATCC 35984 is more prone to developing biofilms on hydrophilic surfaces (20, 24, 33). *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 showed similar behavior to that of *S. epidermidis* with increased biofilm formation in hydrophobic materials, such as Teflon or silicone. However, Pontes et al. (34) found that *E. coli* ATCC 25922 generated the same biofilm regardless of surface hydrophobicity. Andersen et al. (35) observed a preference of this bacterium for hydrophilic materials. Equally, *C. albicans* showed greater affinity for Teflon confirming the results reported by Frade et al. (36) that tested the same type of polycarbonate and Teflon disks with 10 clinical isolates of *C. albicans*. Li et al. (37) coated titanium disks with saliva observing a reduction of the hydrophobicity of the disks and the subsequently lower biofilm formation after 48 h.

A possible explanation of this diversity of results could be related to multiple factors, such as the methodology used to determine roughness, hydrophobicity and to quantify the biofilm, as well as the strains assayed, the conditions of the culture medium, or the physicochemical properties of the material tested. Therefore, when designing a new material for a biomedical device, the most similar conditions to the actual microenvironment where it is being used should be imitated in the assays to draw sound conclusions.

In conclusion, our results suggest that there is a direct association between surface roughness and the development of staphylococcal biofilm on discs of different roughness. Surface topography influenced bacterial adhesion, regardless of its Sa value. Despite the reduced number of strains, this work demonstrates that *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* present a higher biofilm formation capacity than *Escherichia coli* or *Candida albicans* in the proposed medium and it is suggested that the hydrophobicity of biomaterials is more decisive than the roughness in biofilm formation, with hydrophobic surfaces, such as teflon or silicone, showing the highest biofilm formation, in contrast to titanium and glass which were the materials most resistant to microbial colonization.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Francisco José Álvarez and Dr. Hector Lafuente from BioCruces Health Research Institute for their excellent technical assistance as well as Dra. Ane Miren Zaldua from Leartiker Polymer R&D for the provision of the polyurethane disks. Our gratitude is extended to the Analytical and High-Resolution Microscopy Service of the Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (Sgiker) for the SEM imaging. Iker De-la-Pinta received a scholarship from the ZabaldUz program (Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea). This work was supported by the Consejería de Educación,

Universidades e Investigación of the Gobierno Vasco-Eusko Jaularitza [GIC 15/78 IT-990-16] and the Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea [UFI 11/25].

DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

We have no specific conflicts of interest related to the current manuscript but declare the following: Guillermo Quindós has received research grants from Astellas Pharma, Pfizer, Merck Sharp & Dohme, and Scynexis. Guillermo Quindós has served on advisory/consultant boards for Merck, Sharp & Dohme, and Scynexis, and he has received speaker honoraria from Abbvie, Astellas Pharma, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, and Scynexis. Elena Eraso has received grant support from Astellas Pharma and Pfizer SLU. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed above.

REFERENCES

1. Centers for Disease Control and Prevention. HAI and Antibiotic Use Prevalence Survey. 2018; Available at: <https://www.cdc.gov/hai/data/portal/index.html>
2. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual epidemiological report Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections 2014. 2016; Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-annual-epidemiological-report.pdf>
3. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol.* 2015;64:323-34.
4. Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface.* 2010;7:S515-27.
5. Liu X, Huang W, Fu H, Yao A, Wang D, Pan H, et al. Bioactive borosilicate glass scaffolds: improvement on the strength of glass-based scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20:365-72.
6. Zhang W, Zhang Z, Chen S, Macri L, Kohn J, Yelick PC. Mandibular Jaw Bone Regeneration Using Human Dental Cell-Seeded Tyrosine-Derived Polycarbonate Scaffolds. *Tissue engineering.Part A.* 2016;22:985-93.

7. Seckold T, Walker S, Dwyer T. A comparison of silicone and polyurethane PICC lines and postinsertion complication rates: a systematic review. *J Vasc Access*. 2015;16:167-77.
8. Desrousseaux C, Sautou V, Descamps S, Traoré O. Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. *J Hosp Infect*. 2013;85:87-93.
9. del Pozo JL, Rouse MS, Mandrekar JN, Sampedro MF, Steckelberg JM, Patel R. Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:35-40.
10. Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology*. 2005;151:757-62.
11. ASTM E2562 -17: Standard Test Method for Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Grown with High Shear and Continuous Flow using CDC Biofilm Reactor; 2017. Available from: <https://www.astm.org/Standards/E2562.htm>.
12. Blanquer A, Hynowska A, Nogues C, Ibanez E, Sort J, Baro MD, et al. Effect of Surface Modifications of Ti40Zr10Cu38Pd12 Bulk Metallic Glass and Ti-6Al-4V Alloy on Human Osteoblasts In Vitro Biocompatibility. *PLoS One*. 2016;11:e0156644.
13. Sassoni E, Andreotti S, Bellini A, Mazzanti B, Bignozzi MC, Mazzotti C, et al. Influence of mechanical properties, anisotropy, surface roughness and porosity of brick on FRP debonding force. *Composites Part B: Engineering*. 2017;108:257-69.
14. ISO 25178-2:2012. Geometrical product specifications (GPS)-Surface texture: Areal - Part 2: Terms, definitions and surface texture parameters; 2012. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:25178:-2:ed-1:v1:en>.
15. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 1980;9:29-33.
16. Krepsky N, Rocha Ferreira RB, Ferreira Nunes AP, Casado Lins UG, Costa e Silva Filho F, de Mattos-Guaraldi AL, et al. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr Microbiol*. 2003;46:280-6.
17. Amoroso PF, Adams RJ, Waters MG, Williams DW. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17:633-7.
18. Zaugg LK, Astasov-Frauenhoffer M, Braissant O, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Zitzmann NU. Determinants of biofilm formation and cleanability of titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2016;27(7):918-925.
19. Ferreira Ribeiro C, Cogo-Müller K, Franco GC, Silva-Concílio LR, Sampaio Campos M, de Mello Rode S, et al. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Archives of Oral Biology*. 2016 September 2016;69:33-9.
20. Koseki H, Yonekura A, Shida T, Yoda I, Horiuchi H, Morinaga Y, et al. Early staphylococcal biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: in vitro study. *PLoS One*. 2014;9:e107588.

21. Jindal S, Anand S, Huang K, Goddard J, Metzger L, Amamcharla J. Evaluation of modified stainless steel surfaces targeted to reduce biofilm formation by common milk sporeformers. *Journal of Dairy Science*. 2016;99:9502-13.
22. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*. 2010;31:706-13.
23. Wu S, Altenried S, Zogg A, Zuber F, Maniura-Weber K, Ren Q. Role of the Surface Nanoscale Roughness of Stainless Steel on Bacterial Adhesion and Microcolony Formation. *ACS Omega*. 2018;3:6456-64.
24. Xu LC, Siedlecki CA. *Staphylococcus epidermidis* adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces. *Biomed Mater*. 2014 Jun;9(3):035003
25. Vadillo-Rodríguez V, Guerra-García-Mora AI, Perera-Costa D, González-Martín ML, Fernández-Calderón MC. Bacterial response to spatially organized microtopographic surface patterns with nanometer scale roughness. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018;169:340-7.
26. Ashokkumar S, Adler-Nissen J, Møller P. Factors affecting the wettability of different surface materials with vegetable oil at high temperatures and its relation to cleanability. *Applied Surface Science*. 2012;263:86-94.
27. Peltonen J, Jürn M, Areva S, Linden M, Rosenholm JB. Topographical Parameters for Specifying a Three-Dimensional Surface. *Langmuir*. 2004;20:9428-31.
28. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Faust J, Bächle M, Follo M, Wolkewitz M, et al. Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2010;95B:101-9.
29. Zhao B, van der Mei HC, Subbiahdoss G, de Vries J, Rustema-Abbing M, Kuijter R, et al. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. *Dental Materials*. 2014;30:716-27.
30. Gyo M, Nikaido T, Okada K, Yamauchi J, Tagami J, Matin K. Surface response of fluorine polymer-incorporated resin composites to cariogenic biofilm adherence. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:1428-35.
31. Wassmann T, Kreis S, Behr M, Buegers R. The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. *International Journal of Implant Dentistry*. 2017;3:32.
32. Xu L, Siedlecki CA. Protein adsorption, platelet adhesion, and bacterial adhesion to polyethylene-glycol-textured polyurethane biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2015; 105:668-78.
33. Tang H, Cao T, Liang X, Wang A, Salley SO, McAllister J, et al. Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009;88A:454-63.
34. Pontes C, Alves M, Santos C, Ribeiro MH, Gonçalves L, Bettencourt AF, et al. Can Sphorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? *Int J Pharm*. 2016;513:697-708.
35. Andersen TE, Kingshott P, Palarasah Y, Benter M, Alei M, Kolmos HJ. A flow chamber assay for quantitative evaluation of bacterial surface colonization used to investigate the influence of temperature and surface hydrophilicity on the biofilm

- forming capacity of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods*. 2010;81:135-40.
36. Frade JP, Arthington-Skaggs BA. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. *Mycoses*. 2011;54:e154-62.
 37. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J Dent*. 2012;40:686-92.

CANDIDA ALBICANS BIOFILMS ON DIFFERENT MATERIALS FOR MANUFACTURING IMPLANT ABUTMENTS AND PROSTHESES

Asier Eguia¹, Ane Arakistain^{1,2}, Iker De-la-Pinta², José López-Vicente¹, Elena Sevillano², Guillermo Quindós², and Elena Eraso²

¹Departamento de Estomatología II, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao, Spain

²Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Bilbao, Spain

Running title: **Biofilms on materials of abutments and prostheses**

Correspondence: Elena Eraso, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Enfermería, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU. Apartado 699, 48080 Bilbao, Spain. E-mail: elena.eraso@ehu.eus

ES, GQ, and EE have received research grant support from the Consejería de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza (GIC15 78 IT-990-16), the Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, MINECO (SAF2017-86188-P) and the Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU (UFI 11/25).

Abstract

Objectives: Morphological, physical and chemical properties of both implants and prostheses can determine the biofilm formation on their surface and increase the risk of biological complications. The aim of this study was to evaluate the capacity of biofilm formation of *Candida albicans* on different materials used to manufacture abutments and prostheses.

Study design: Biofilm formation was analyzed on cp grade II titanium, cobalt-chromium alloy and zirconia, silicone, acrylic resin (polymethylmethacrylate) and nano-hybrid composite. Some samples were partially covered with lithium disilicate glass ceramic to study specifically the junction areas. *C. albicans* was incubated in a biofilm reactor at 37 °C with agitation. The biofilm formation was evaluated at 24 and 48 hours. In addition, the morphology of the biofilm was evaluated by scanning electron microscopy.

Results: *C. albicans* developed biofilms on the surface of all materials tested. Cobalt-chromium alloy showed the lowest density of adhered biofilm, followed by zirconia and titanium. Silicone and resin showed up to 20 times higher density of biofilm. A higher biofilm formation was observed when junctions of materials presented micropores or imperfections.

Conclusions: The biofilm formed in the three materials used in the manufacture of abutments and prostheses showed no major differences, being far less dense than in the resins. Two clinical recommendations can be made: to avoid the presence of resins in the subgingival area of implant prostheses and to design prostheses placing cobalt-chromium alloy/ceramic or titanium/ceramic junctions as far as possible from implants.

Key words: Dental implants; Cobalt-chromium alloy; Titanium; Zirconia.

Introduction

Modern implant Dentistry is a predictable and safe alternative for replacing missing teeth.¹ Improvements in treatment protocols and in design and properties of implants and prostheses have drastically reduced initially observed osseointegration-related failures.² Nowadays, the great challenge for implant dentistry is to reduce the still high rate of late biological complications such as peri-implant mucositis or peri-implantitis.^{1,2}

Peri-implant mucositis and peri-implantitis are biofilm-related diseases that occur depending on different factors, in which the individual susceptibility plays a major role. The development of these diseases can be triggered or modulated by many additional mechanisms with varying degrees of available evidence.¹⁻³ Morphological and physicochemical characteristics of both implants and prostheses directly influence the formation of biofilm on their surface and subsequently the risk of biological complications.⁴ Biofilm formation is directly conditioned by the physical and chemical characteristics of the materials.^{5,6,7} Additionally, saliva contains several substances that can modify surface properties.⁷ The presence of nutrients and the complexity of microbial interrelations of the hundreds of oral different microorganisms are also factors that can influence in the development of biofilms.⁸ In addition, there are other factors related to the host that affect the formation and maturation of oral biofilm, such as hygiene degree, systemic conditions or pathologies or tobacco consumption.⁴

Properties of the materials employed to manufacture abutments and prostheses can be as important as the properties of the implants, to achieve the most desirable conditions: biocompatibility and resistance to microbial colonization.⁹ Research on relations between materials used to manufacture dental implants and biofilm development on their surfaces is extensive.^{1,4} Nevertheless, research employing abutments and prostheses materials is recent and scarce.¹⁰

Abutments and prostheses are in direct contact with soft tissues where peri-implant inflammatory diseases start and afterwards spread to bone.^{1,3} Microscopic and macroscopic physicochemical and morphological characteristics of the first 2-3 mm over the implant-prosthesis connection are the key areas conditioning treatment success.^{11,12} This key-area is in direct contact with connective and

epithelial tissues and even with the bone, depending on the implant-prostheses connection design. Therefore, the type of material selected for this area and its manufacturing and finishing processes are critical to ensure biocompatibility and infection preclusion.

Titanium (Ti) and cobalt-chromium alloys (Co-Cr), and zirconium dioxide (ZrO₂) are among the most commonly used materials in implantology to manufacture definitive abutments or the transmucosal portion of dentures.¹⁰ Biofilm formation process on these surfaces have not been fully clarified and some controversies still persist. Hence, new approaches to improve the features of abutments and dentures manufactured with these materials are desirable to ensure biocompatibility, to reduce the subgingival biofilm formation and, subsequently, to minimize the prevalence of biological complications.

In this work we have studied the *in vitro* ability of *Candida albicans* biofilm formation over materials commonly employed in Dentistry, using a culture model to simulate oral conditions. The main objective was to evaluate the quantitative differences in the colonization and adhesion of *C. albicans* over different materials used to manufacture abutments and dentures. Moreover, we have analyzed the characteristics of the colonization patterns on every different surface by scanning electron microscopy.

Material and methods

The fungal strain used for this study was *C. albicans* SC5314 (Berkhout, ATCC® MYA-2876, Manassas, USA). The study was designed conform to the requirements for biosafety level 2 and approved by the Research Ethics Committee for Biological Agents and Genetic Modified Organisms of the University of the Basque Country, UPV/EHU (Reference: M30_2015_248).

Sample preparation

The materials selected for the study were commercially pure titanium grade II (Ti), yttria-stabilized zirconia (ZrO₂), and a cobalt-chromium alloy (Co-Cr). Silicone, nano-hybrid restorative composite and polymethylmethacrylate (PMMA) were also included as materials usually present in oral prostheses. Main characteristics of the materials are summarized in Table 1.

A set of 12 discs of each material was used to quantify the formation of biofilm at 24 h and 48 h and for scanning electron microscopy (SEM) analysis. Additionally, 3 discs, the ones made of Ti, ZrO₂ and Co-Cr, were half covered with lithium disilicate (Ls2) glass ceramic (IPS, Ivoclar, Amherst, USA) to study specifically the junction between both materials by SEM (Figure 1).

All discs had a diameter of 12.7 mm (0.50 in) and a thickness of 3.8 mm (0.15 in). The Ti disc coupons (RD128-TI) were used as supplied by the provider (Biosurfaces technologies Co., Bozeman, USA). Co-Cr discs were obtained by lost wax casting. Then a finishing and polishing process was applied to them in a dental laboratory, trying to simulate the actual manufacturing process of the implant prostheses. A pre-polishing was performed with carbide finishing burs and increasing grit rubber wheels (Komet, Brasseler, Germany). Final polishing was carried out with buffing wheels and 5/2.5 µm diamond polishing paste (Komet). ZrO₂ discs were produced with a 5 axis milling machine (Zenotec®, Ivoclar vivadent, Schaan, Liechtenstein). After milling, ZrO₂ discs were sintered at 1,400 °C, glazed and finished with the same buffing wheels and polishing paste used with Co-Cr discs. PMMA and composite discs were manually prepared according to manufacturer's instructions. In these cases, Sof-Lex® Contouring and Polishing Discs (3M, Maplewood, USA) were additionally used in the polish procedure. Silicone was tested in disc coupons (RD128-Si) as provided by the manufacturer (Biosurfaces technologies Co.), without any additional procedure. In the three discs that were partially covered with Ls2 glass ceramic, glazing of the ceramic was performed before polishing both surfaces with the same protocol described for ZrO₂ and Co-Cr discs, as the ultimate goal was to reproduce realistic conditions of use of these materials in the mouth. Discs were UV sterilized during 30 min to avoid damage to thermos-sensitive materials such as resins.



Figure 1. Discs half-covered with Ls2 ceramic prepared to observe the features of the junction area by SEM.

Culture medium preparation

The medium selected for initial *C. albicans* growth was YEPD (yeast extract 1%, peptone 2% and glucose/dextrose 2%). The study of biofilm adhesion and formation was performed in a medium rich in glucose and amino acids: RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) with L-glutamine and without NaHCO_2 , buffered to pH 7 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (Sigma-Aldrich). Saline phosphate buffer (PBS, Sigma-Aldrich) was used for cell cleaning and during the sonication and vortex mixing processes. Sabouraud dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) was used in the counting procedure of the cells detached from the materials.

Inoculum preparation

Several colonies of *C. albicans* SC5314 were suspended in 5 ml of YEPD and incubated for 24 h at 37 °C. Cells were then centrifuged for 9 min at 3500 rpm and washed with PBS twice. The suspension was adjusted to 10^6 cells/ml by counting on a hemocytometer. One ml of the inoculum was mixed to 500 ml of RPMI and added to the bioreactor.

Bioreactor preparation

CDC Biofilm Reactor® (Biosurfaces technologies Co.) consists on a one-liter glass vessel with a polyethylene lid that supports eight independent and removable polypropylene rods, and with a gas exchange port. Each rod can accommodate three sample discs. The culture medium circulated through the vessel a by magnetic stirring. Before starting, the bioreactor and all its components were autoclaved at 121 °C for 15 min. Once the disc samples were assembled on the rods and the lid fixed in aseptic conditions, the culture medium and inoculum were added and incubated at 37 °C with 100-125 rpm agitation for a total time of 24-48 h.

Collection and analysis of results

To estimate the number of cells adhering to the surface, sample discs were removed from the bioreactor vessel after 24 h and 48 h of incubation and placed into conical tubes with 30 ml of PBS each. Biofilm detachment was carried out by 30 s of vortex mixing, 2 min of sonication (VCX 130, Sonics Materials, USA) at 50% of amplitude followed by 30 s of vortex mixing. Resulting cell suspensions were sequentially diluted and 100 µl of the dilution were inoculated onto Sabouraud agar plates and incubated for 24 h at 37 °C.

Biofilm burden was presented as the mean of the logarithm of colony-forming units (CFU) per cm² of disc. Density average of biofilm on the discs of each material was calculated, both at 24 h and 48 h. All procedures were conducted in triplicate in two separate days.

Statistics

Biostatistical analysis was carried out using SPSS 24 statistical software (IBM SPSS Statistics, IBM, Armonk, USA). Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk normality tests were used to determine if the analyzed data had a normal distribution. ANOVA and Tukey's range test were used to analyze differences among means. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Electron microscopy

In order to analyze the characteristics and patterns of the biofilms formed by *C. albicans* on the surface of the studied materials, three extra sets of discs were prepared following the same methodology. After removing the discs from the coupon holders at 48 h, they were fixed in 2%

glutaraldehyde and were sent to the Analytical and High-Resolution Microscopy in Biomedicine Service of the University of The Basque Country UPV/EHU (SGiker) to proceed with the sample preparation for SEM. Briefly, the samples were washed and dehydrated with a series of ethanol solutions. Then they were dried and placed on supports to be covered with gold in an argon atmosphere. The images were obtained with the Hitachi S4800 model microscope, filament voltage 10.0 kV (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan).

Results

Biofilm densities on each material were transformed to a logarithmic basis to simplify data management. According to biofilm development, materials could be divided in two groups. Biofilms developed on Co-Cr, ZrO₂ or Ti were significantly less dense than that observed on silicone, nano-hybrid composite or PMMA.

Lowest density of biofilm at 24 h (4.16 ± 0.29 CFU/cm² –mean \pm standard deviation-) and at 48 h (3.85 ± 0.29 CFU/cm²) was observed on Co-Cr followed by biofilm on ZrO₂ (24 h: 4.58 ± 0.22 CFU/cm², 48 h: 4.09 ± 0.11 CFU/cm²) and on Ti (24 h: 4.76 ± 0.26 CFU/cm², 48 h: 5.48 ± 0.24 CFU/cm²). There were no statistical differences between *C. albicans* biofilm developed on Co-Cr or ZrO₂, although less biofilm was formed on Co-Cr than on Ti ($p = 0.008$). ZrO₂ showed less biofilm than Ti at 48 h ($p < 0.001$), but similar to Ti at 24 h ($p = 0.796$).

The biofilm formed on silicone, nano-hybrid composite or PMMA, had densities up to 20 times higher than on Ti, ZrO₂ or Co-Cr. Biofilm on silicone showed lower density (24 h: 5.05 ± 0.52 CFU/cm², 48h: 5.50 ± 0.32 CFU/cm²) than nano-hybrid composite (24 h: 6.13 ± 0.39 CFU/cm², 48 h: 6.10 ± 0.24 CFU/cm²) or PMMA (24 h: 6.56 ± 0.21 CFU/cm², 48 h: 5.70 ± 0.27 CFU/cm²). However, there were no statistical differences between them. All the results are summarized in Figure 2.

Biofilms developed on Ti showed a significant increase between 24 h and 48 h incubations, while biofilms on Co-Cr and ZrO₂ remained similar at both incubation times. Nano-hybrid composite

maintained similar levels of biofilm density at both reading times. Conversely, biofilms on silicone increased at 48 h and biofilms on PMMA decreased significantly.

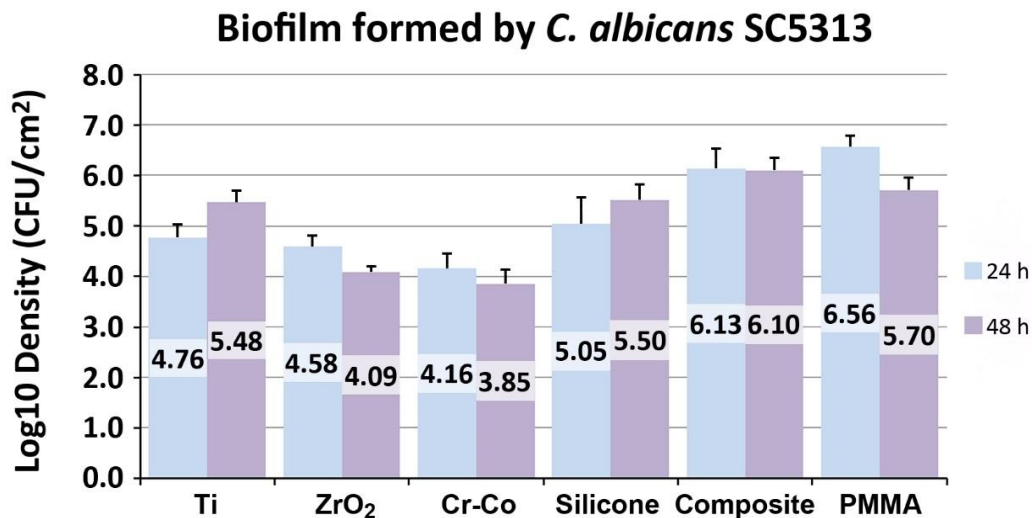


Figure 2. Density of biofilm formed at 24 h and 48 h on each material studied

Biofilm formation on Ti, ZrO₂ and Co-Cr showed similar patterns and characteristics when observed by SEM at 48 h: On ZrO₂ and Co-Cr scattered pseudohyphae clusters of variable sizes and scarce blastoconidia were observed. However, on Ti and PMMA biofilms showed a denser network of hyphae and pseudohyphae where the fungal network almost covered the complete surface of discs (Figure 3). When the junction between Ti, ZrO₂ or Co-Cr and the Ls2 ceramic was studied, the number of hyphae clusters was remarkable lower on Ls2 ceramic surfaces than on the surfaces of discs of other materials. Very interestingly, more abundant and denser hyphae clusters were attached to the surface in those areas of the junctions where pores, defects or greater roughness were seen (Figure 4). Junction between ZrO₂ and Ls2 ceramic was the most homogenous and free of surface irregularities and no more biofilm growth was observed in that specific area.

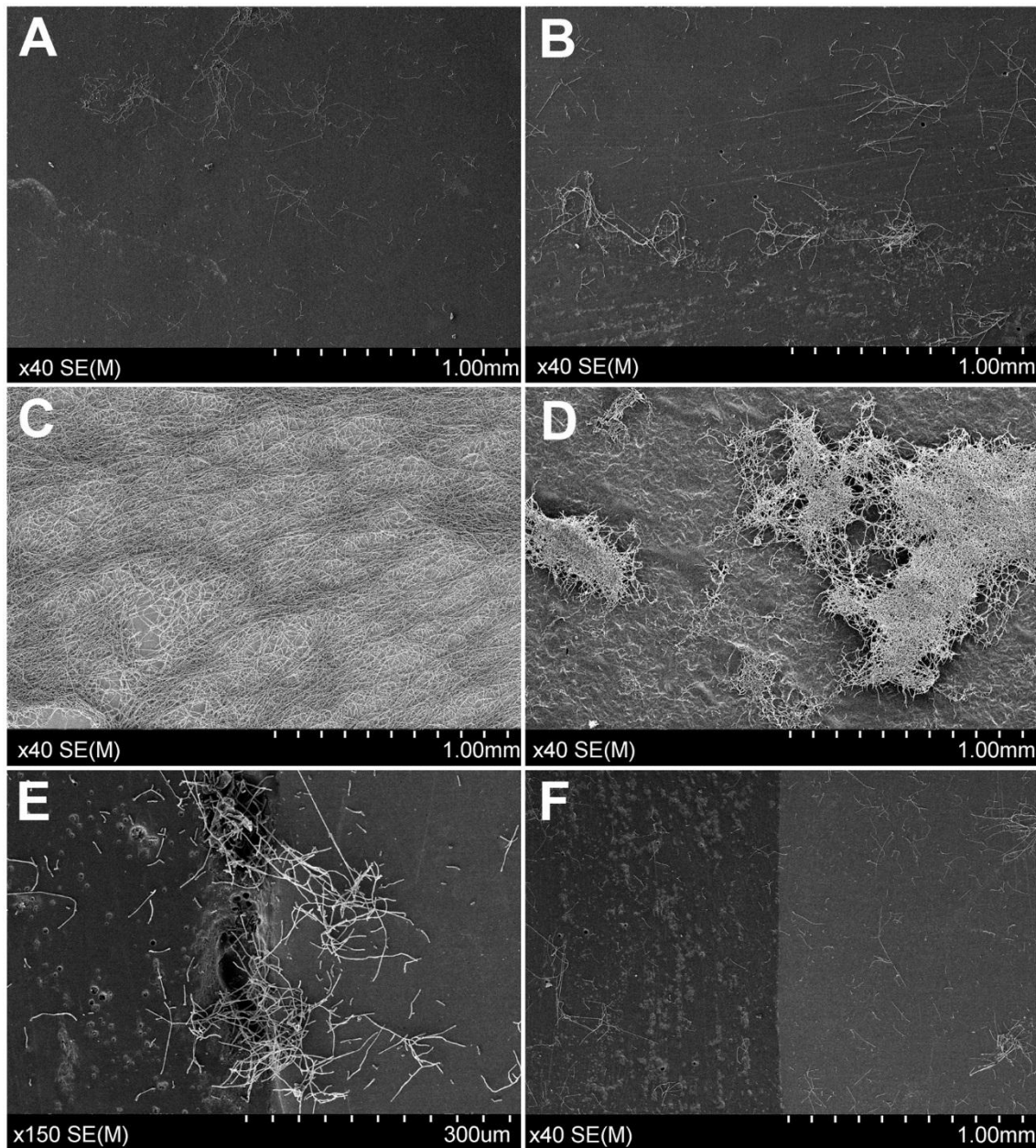


Figure 3 SEM images of biofilm development on different materials and times of incubation: A) ZrO_2 at 48 h; B) Co-Cr at 48 h; C) Ti at 48 h; D) PMMA at 48 h. E) SEM images of junction between Co-Cr and Ls2 ceramic: Areas of micropores, imperfections or greater roughness presented more and much denser hyphae clusters attached to the surface; F) SEM images of junction between Co-Cr and Ls2 ceramic: Areas free of defects at the junctions did not show relevant presence of biofilm

Discussion

Oral cavity surfaces are prone to develop biofilms.¹³ Controlling oral biofilms is an everlasting major concern for clinicians, researchers and dental material manufacturers, since biofilms are involved in short and long term success of implant treatments.^{3,4} Although modern implantology is predictable and has high success rates, peri-implantitis prevalence has increased at the same time as the number of implants placed.^{3,4} All materials used in dental implantology should ideally meet two premises: high biocompatibility and high resistance to microbial colonization. To improve these conditions and to develop new strategies to prevent biological and mechanical complications, it is essential to focus research on understanding the processes of adhesion and colonization on the different materials employed in implantology. *In vivo* studies of oral diseases are frequently associated with ethical concerns; that is why diverse artificial biofilm models are usually used to reproduce oral conditions.¹⁴ Some models have tested biofilm formation on implants surfaces, comparing different materials or/and surface treatments.^{5,15} However, biofilm on transmucosal abutments or on the transmucosal portion of implant prostheses has been scarcely studied^{16,17} although in most cases peri-implant pathologies begin in the soft and hard tissues in direct contact with these materials to further progress to bone.^{1,16} In the current study, knowledge about biofilm formation over the materials employed to manufacture abutments and dentures and not only over implants have been widened.

Mono-species artificial biofilm model systems are of great importance, when performed under controlled conditions, to understand the surface-microorganism interactions, to evaluate the effects of surface modifications and to detect antimicrobial activity or microbial growth induction of the materials. We used a widely employed biofilm model to test different materials related to medical devices.^{18,19} To the best of our knowledge, the bioreactor-based methodology has not been used before to test the biofilm formation over abutment/prosthetic materials. In contrast to other previous works^{5,6,20}, we prepared the sample discs following the protocols developed in the dental laboratories in order to be able to come to conclusions to the clinical practice.

In our study, the least dense biofilms were developed on Co-Cr and ZrO₂. In spite of the differences in the methodology employed our observations on the favorable properties of the

ZrO₂ are in order to those of Li *et al.*²¹ These authors analyzed *C. albicans* biofilm formation on seven materials commonly used in implantology by SEM. These seven materials that were studied uncoated and saliva-coated included type-I collagen coated polystyrene, hydroxyapatite, ZrO₂, cp grade II Ti, acrylic resin, polyethylene terephthalate (PET), Co-Cr alloy and gold-silver-palladium alloy. From all of them, ZrO₂ showed the lowest susceptibility to adhesion either uncoated or saliva-coated. Furthermore, other studies have been designed to evaluate the adherence of *C. albicans* to diverse implant surfaces and not specifically the materials used to manufacture prostheses^{5,22,23}. In this way, Bürgers *et al.*⁵ evaluated yeast adhesion to three differentially textured commercialized Ti implants and one ZrO₂ implant. They found the lowest formation of biofilm on sand-blasted Ti surface implants. ZrO₂ implants showed similar levels of *C. albicans* biofilm formation to machined Ti and sand-blasted and acid-etched Ti implants. They also observed that salivary mucin could serve as a receptor for yeast adhesion whereas albumin could act blocking the adhesion process. This effect of salivary mucin on the development of biofilms over dental materials has also been observed *in vitro* by Li *et al.*²¹

Co-Cr alloys have a wide range of applications in dentistry owing to their good mechanical properties, good biocompatibility and lower price.²⁴ However, there are disadvantages, such as their higher corrosion in acidic environments, the difficulties to get an optimal finishing and polishing, the limited knowledge of their longevity and a lower biocompatibility than precious alloys.^{24,25} Co-Cr abutments and prostheses can be obtained by casting or milling, following different manufacture procedures and the frequency of its use varies greatly among different countries.²⁴⁻²⁶ This could be one of the factors that explains the controversial results when studying biofilm formation on Co-Cr. Other differences could be probably due to differences in the preparation of the samples, microbiological procedures and the measurement of biofilm formation. Surprisingly, Co-Cr discs in our study showed the least amount of biofilm formation, contrary to what was observed Souza *et al.*²⁷ They evaluated and compared the density and the morphological aspects of biofilms on Co-Cr alloy, feldspar-based porcelain, cpTi grade IV and yttrium-stabilized zirconia. They detected a higher accumulation of oral biofilms on Co-Cr based materials than that on Ti, ZrO₂, or porcelain, especially after 48 h. Nevertheless, the methodology used in their study was different to the one

followed in this study, based on multi-species static culture model using different sample finishing and polishing protocols. Jordan *et al.*²⁸ investigated the adherence to electropolished Co-Cr produced by selective laser melting and to milled Ti grade V (Ti-6Al-4V) of periodontal relevant bacterial species. Interestingly, they observed by confocal laser scanning fluorescence microscopy a higher adherence of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* on Co-Cr than on Ti.

Ti and its alloys are undoubtedly the most studied materials in implant dentistry regarding biofilm formation. Our study and other studies showed that its resistance to adhesion is generally similar to that of ZrO₂ and Co-Cr, although some notable differences have been noticed.^{7,15,16} Heterogeneity of results is probably due to diverse factors as the nature of the samples, including the type of Ti employed (according to ASTM international standards II, IV or V), surface treatments and coatings, finishing and polishing protocols or sterilization protocols. In turn, other differences seem to be directly related to the design of the studies. A different approach to evaluate this issue was developed by Bevilacqua *et al.*¹⁵ that, using confocal laser scanning microscopy, compared *in vivo* and *in vitro* the biofilm formation on Ti surfaces of different roughness. These authors observed that quantitative differences among different roughness surfaces were not predictive of microbial colonization rates *in vivo*.

ZrO₂ and Ti surface modifications have direct effect on biofilm formation. Thus, *C. albicans* biofilm formation could be reduced by techniques such as silica-coating or silanization.²² Hydrophobic and hydrophilic strains of *C. albicans* are able to adhere to a plethora of ligands through complex mechanisms colonizing a great variety of oral niches.²⁹ Hence, wettability is a very important factor when designing biofilm formation studies and also when interpreting the results of previous research.

Resins have a low resistance to biofilm formation compared to other materials.²¹ In our study nano-hybrid composite or PMMA showed worse behaviour than metals and ceramics which supports the observations of Li *et al.*²¹ An obvious clinical application of this observation could be to avoid or limit their presence in the subgingival area when designing hybrid and temporary prostheses. Multispecies biofilm formation models on new materials such as polyetheretherketone (PEEK),

compared to PMMA, Ti or ZrO₂, have shown promising results as observed by Hahnel *et al.*²⁰ However clinical studies are necessary to confirm these preliminary results.

Another important factor to consider when comparing results in relation to the formation of biofilms is the sterilization method used with the samples. Han *et al.*²³ investigated the effect of four different sterilization methods on *P. gingivalis* and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. The surface free energy, surface chemistry and wettability were differently affected by sterilization methods. The dry heat sterilization treatment reduced the formation of biofilms, while irradiations with ultraviolet light (UV) or X rays increased their development. Our UV-based sterilization protocol was exactly the same for all the samples to avoid bias. The choice of this method was based on the fact that some materials such as resins could be damaged by other methods.

Differences observed using electron microscopy in the junction zones between Ti / Co-Cr / ZrO₂ and Ls2 ceramic should be highlighted. The junction between Co-Cr and Ls2 ceramic showed the highest rate of irregularities, crevices, ridges and micropores. Micropores were areas where highest biofilm density was observed. Obviously, the study discs had a flat surface which facilitates finishing and polishing, and had been manufactured with extreme care. Real junctions in crowns and bridges are frequently not so easy to finish, and contain even more micropores and imperfections. In an attempt to prevent peri-implantary diseases, and in light of these results, it would be desirable to design abutments and prostheses maintaining metal-ceramic junctions as far as possible from implants. On the contrary, the junction ZrO₂-Ls2 ceramic was the most homogenous and nearly free of surface irregularities. No further growth of biofilm was observed in this type of junction. This property could be of interest when designing prostheses, especially in the aesthetic area.

Conclusion

The lowest dense biofilms were developed on Co-Cr and ZrO₂ discs. However, there were no major differences between them and Ti. Biofilm formed was up to 20 times greater on resins. Junction areas in the sample discs accumulated densest biofilms except in the ZrO₂-Ls2 junction. Two clinical recommendations arise from current results: The presence of resins in the subgingival area of implant prostheses should be avoided, and in the prostheses design Cr-Co / Ti and ceramic junctions should be placed as far as possible from implants.

Acknowledgments

ES, GQ, and EE have received research grant support from the Consejería de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza (GIC15 78 IT-990-16), the Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, MINECO (SAF2017-86188-P) and the Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU (UFI 11/25). The authors report no conflicts of interest related to this study. The authors thank for technical and human support provided by Ramón Santamaría (Corus dental) and Analytical and High-Resolution Microscopy Service in Biomedicine of SGIker-UPV/EHU.

References

1. Albrektsson T, Canullo L, Cochran D, De Bruyn H. Peri-implantitis: A complication of a foreign body or a man-made "disease". Facts and fiction. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016;18:840-9.
2. Buser D, Sennerby L, De Bruyn H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. *Periodontol 2000*. 2017;73:7-21.
3. Albrektsson T, Chrcanovic B, Östman PO, Sennerby L. Initial and long-term crestal bone responses to modern dental implants. *Periodontol 2000*. 2017;73:41-50.
4. De Bruyn H, Christiaens V, Doornewaard R, Jacobsson M, Cosyn J, Jacquet W, et al. Implant surface roughness and patient factors on long-term peri-implant bone loss. *Periodontol 2000*. 2017;73:218-27.
5. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater*. 2010;6:2307-13.
6. Li Y, Guo T, Zhao J, Wang J. Effects of polishing methods on *Candida albicans* adhesion on cast pure titanium surfaces. *Implant Dent*. 2013;22:546-51.
7. van Dijk J, Herkströter F, Busscher H, Weerkamp A, Jansen H, Arends J. Surface-free energy and bacterial adhesion. An in vivo study in beagle dogs. *J Clin Periodontol*. 1987;14:300-4.
8. Kommerein N, Doll K, Stumpp NS, Stiesch M. Development and characterization of an oral multispecies biofilm implant flow chamber model. *PLoS One*. 2018;13:e0196967.
9. Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontol 2000*. 2017;73:22-40.
10. Xing R, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Taxt-Lamolle S, Haugen HJ. The influence of surface nanoroughness, texture and chemistry of TiZr implant abutment on oral biofilm accumulation. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26:649-56.
11. Galindo-Moreno P, León-Cano A, Ortega-Oller I, Monje A, Suárez F, ÓValle F, et al. Prosthetic abutment height is a key factor in peri-implant marginal bone loss. *J Dent Res*. 2014;93(7 Suppl):80S-5S.
12. Galindo-Moreno P, Fernández-Jiménez A, O'Valle F, Monje A, Silvestre FJ, Juodzbaly G, et al. Influence of the crown-implant connection on the preservation of peri-implant bone: a retrospective multifactorial analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30:384-90.
13. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res*. 2010;89:657-65.
14. Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:28.

15. Bevilacqua L, Milan A, Del Lupo V, Maglione M, Dolzani L. Biofilms developed on dental implant titanium surfaces with different roughness: Comparison between in vitro and in vivo studies. *Curr Microbiol.* 2018;75:766-72.
16. de Avila ED, de Molon RS, Vergani CE, de Assis Mollo F Jr, Salih V. The relationship between biofilm and physical-chemical properties of implant abutment materials for successful dental implants. *Materials (Basel).* 2014;7:3651-62.
17. Canullo L, Penarrocha-Oltra D, Soldini C, Mazzocco F, Penarrocha M, Covani U. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26:426-34.
18. Williams DL, Woodbury KL, Haymond BS, Parker AE, Bloebaum RD. A modified CDC biofilm reactor to produce mature biofilms on the surface of peek membranes for an in vivo animal model application. *Curr Microbiol.* 2011;62:1657-63.
19. Yoon HY, Lee SY. Establishing a laboratory model of dental unit waterlines bacterial biofilms using a CDC biofilm reactor. *Biofouling* 2017;33:917-26.
20. Hahnel S, Wieser A, Lang R, Rosentritt M. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26:1297-301.
21. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J Dent.* 2012;40:686-92.
22. Villard N, Seneviratne C, Tsoi JK, Heinonen M, Matinlinna J. *Candida albicans* aspects of novel silane system-coated titanium and zirconia implant surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26:332-41.
23. Han A, Tsoi JKH, Matinlinna JP, Zhang Y, Chen Z. Effects of different sterilization methods on surface characteristics and biofilm formation on zirconia in vitro. *Dent Mater.* 2018;34:272-81.
24. Kassapidou M, Franke Stenport V, Hjalmarsson L, Johansson CB. Cobalt-chromium alloys in fixed prosthodontics in Sweden. *Acta Biomater Odontol Scand.* 2017;3:53-62.
25. Teigen K, Jokstad A. Dental implant suprastructures using cobalt-chromium alloy compared with gold alloy framework veneered with ceramic or acrylic resin: a retrospective cohort study up to 18 years. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23:853-60.
26. Hjalmarsson L. On cobalt-chrome frameworks in implant dentistry. *Swed Dent J Suppl.* 2009;201:3-83.
27. Souza JC, Mota RR, Sordi MB, Passoni BB, Benfatti CA, Magini RS. Biofilm formation on different materials used in oral rehabilitation. *Braz Dent J.* 2016;27:141-7.
28. Jordan RP, Marsh L, Ayre WN, Jones Q, Parkes M, Austin B, et al. An assessment of early colonisation of implant-abutment metal surfaces by single species and co-cultured bacterial periodontal pathogens. *J Dent.* 2016;53:64-72.

29. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. Crit Rev Oral Biol Med. 1999;10:359-83.