

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FOSFATO TRICÁLCICO SOBRE BACILOS  
GRAM-NEGATIVOS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE Y COCOS GRAM-  
POSITIVOS.**

**ANGELA NATALIA CAMARGO CRISTANCHO  
GINETH NATALIA CARDENAS TOVAR**

**TRABAJO DE GRADO**  
**Presentado como requisito parcial para optar al título de**

**BACTERIÓLOGO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BACTERIOLOGIA  
BOGOTÁ, D. C.  
2013**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la resolución N<sup>o</sup> 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

## DEDICATORIA

*Este trabajo es dedicado a Dios por darme la vida para lograr esta victoria. A mi madre Blanca Tovar por su insuperable amor, por sus consejos, por su constante motivación y apoyo incondicional. A mi padre Oscar Cárdenas porque siempre se ha preocupado por mi formación integral y profesional y por sus continuos ejemplos de perseverancia y constancia. A mi hermanito por ser mi fuente de inspiración y por último a Andrés por el apoyo, la paciencia y el amor que me ha brindado.*

**Natalia Cárdenas Tovar**

*A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr cumplir con mis objetivos. A mi madre Susana Cristancho y a mi padre Gabriel Camargo quienes son el pilar fundamental en mi vida y siempre están conmigo en cada paso que doy brindándome los mejores consejos y demostrándome todo su amor a diario, transmitiéndome los valores que han hecho de mí el ser humano que hoy en día soy. Gracias por darme la posibilidad de estudiar una carrera y por confiar en mí, todo esto se los debo a ustedes. A Luis Carlos por sus buenos consejos, amor y apoyo incondicional y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera hacen parte de mi vida y me motivan para superarme cada día más.*

**Natalia Camargo Cristancho**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al ser que orienta nuestro existir, a Dios, que con su fuerza y amor ha permitido formarnos como seres humanos íntegros y responsables, porque fue él quien nos ayudó a superar cuanto obstáculo se nos presentó para cumplir esta meta.

A nuestros padres por sus ejemplos de superación y entrega, porque han estado con nosotras en cada paso que hemos dado, cuidándonos y dándonos fortaleza para continuar.

A nuestro director de trabajo de grado, el doctor Fredy Gamboa, por su apoyo y confianza en este trabajo, por sus conocimientos y experiencias que han logrado terminar este proceso con éxito.

A nuestros profesores a lo largo de la carrera a quienes les debemos nuestros conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza.

Finalmente, a la Universidad Javeriana por abrirnos las puertas para ser profesionales íntegras.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCION.....	8
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.....	9
3. MARCO TEORICO.....	11
4. OBJETIVOS.....	26
5. METODOLOGIA.....	27
6. RESULTADOS.....	28
7. DISCUSION.....	32
8. CONCLUSIONES.....	34
9. RECOMENDACIONES.....	35
10. BIBLIOGRAFIA.....	36
11. ANEXOS.....	44

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue demostrar de forma *in Vitro* la actividad antimicrobiana de fosfato tricálcico (FTC) solo y dopado con diferentes concentraciones de Zinc (Zn) y Magnesio (Mg) sobre bacilos gram-negativos de la familia Enterobacteriaceae y cocos gram-positivos. En el presente estudio se realizó la técnica de difusión en pozo. Los pozos fueron formados por la remoción del Agar y los materiales a evaluar fueron colocados en estos. Se realizaron montajes por triplicado con los fosfatos como con los controles. Los periodos de incubación fueron de 24 horas a 37°C. Los microorganismos usados fueron: *Escherichia coli* (CIO 3318), *Klebsiella pneumoniae* (CIO 2870), *Citrobacter freundii* (CIO 2868), *Enterobacter cloacae* (CIO 2912), *Proteus mirabilis* (CIO 3015), *Serratia marcescens* (CIO 3022), *Salmonella typhi* (CIO 3018), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (CMPUS 059) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

Los resultados demostraron que el FTC al 0.5% no presentó actividad inhibitoria sobre ninguna de las siete enterobacterias ni sobre *S. mutans* y *E. faecalis*, sin embargo, sobre *S. aureus* y *S. epidermidis* se observaron halos de inhibición de 15.3mm. Por otro lado el FTC al 1.5% no presentó actividad inhibitoria sobre ninguna de las siete enterobacterias ni sobre *S. mutans* y *E. faecalis*. Sobre *S. aureus* se observó un halo de inhibición de 16.3mm y sobre *S. epidermidis* de 20mm (ver figuras). El FTC solo no presentó actividad inhibitoria sobre ninguna de las siete enterobacterias ni sobre *S. mutans* y *E. faecalis*. Sobre *S. aureus* se observó un halo de inhibición de 12.3mm y sobre *S. epidermidis* de 12.6mm. La ciprofloxacina tuvo mayor actividad sobre bacilos gram-negativos que sobre cocos gram-positivos. El TM-STX presentó acción antimicrobiana sobre bacilos gram-negativos, excepto sobre *S. typhi*, y sobre los cocos gram positivos. La vancomicina solo presentó actividad antimicrobiana sobre los cocos gram-positivos.

La necesidad de demostrar la actividad antimicrobiana del FTC se basa en la posibilidad de poder implementar nuevas alternativas, no solo como un material biocompatible, reabsorbible y osteoconductor, sino como un material con capacidad antimicrobiana, con el que se pueda evitar el fracaso postquirúrgico debido a factores microbiológicos de los procedimientos en los cuales se utiliza, cumpliendo así una función profiláctica directamente en el hueso o en los sitios dentales.

Se pudo concluir que tanto el FTC al 0.5%, como el FTC al 1.5 % Y el FTC solo, ejercen una acción antimicrobiana sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*. Además el FTC dopado con Zn y Mg mostro una mayor actividad antimicrobiana que el FTC solo. Esto indica que dichos iones metálicos generan una acción sinérgica que mejora la acción de FTC sobre los microorganismos.

## 1. INTRODUCCIÓN

En el campo de los implantes se ha logrado producir un gama de diversos biomateriales, siendo estos materiales compatibles con los tejidos vivos con una composición química y una morfología similar a la del hueso. En la cirugía periodontal, es muy común la corrección de defectos óseos generados por diversas causas entre las cuales se encuentran la enfermedad periodontal.<sup>1,2</sup> Permitiendo así, el desarrollo de los biomateriales como sustitutos de tejidos vivos entre los cuales encontramos diferentes tipos, como los metales, los polímeros, los minerales, las proteínas, los viobidrios y las cerámicas.<sup>3-5</sup> Las cerámicas son materiales sintéticos fabricados a base de fosfatos cálcicos sintéticos. Dentro de los cuales encontramos la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), el FTC ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y el fosfato cálcico bifásico (mezcla de hidroxiapatita y  $\beta$ -fosfato tricálcico), estos son similares en su composición al mineral óseo, bioactivos, osteoconductores y capaces de formar una interface con una unión muy fuerte con el hueso vivo.<sup>6,7</sup>

Los dos sistemas de fosfato de calcio que han sido más investigados como material de implante óseo son la Hidroxiapatita (HA) y el FTC,<sup>8</sup> ambos son altamente biocompatibles, pero difieren en la respuesta biológica que generan en el sitio de implante. El FTC desaparece a medida que el hueso nuevo crece, pero la HA es más permanente. Los compuestos de FTC se han estudiado desde hace años como material de reparación ósea, y son el grupo de materiales que más se aproximan a la composición y propiedades del mineral óseo.

Los FTC vienen siendo utilizados como materiales para la regeneración ósea de alveolos post-exodoncia, consiguiendo un reborde alveolar conservado para la posterior colocación de un implante dental,<sup>9,10</sup> así como material de implante dental.<sup>11</sup>

Para esta utilización se requiere de procedimientos bucodentales invasivos los cuales conllevan a riesgo de infección,<sup>12,13</sup> lo que hace necesario la implementación de una profilaxis antibiótica administrada sistémicamente con el fin prevenir la posible aparición de una infección a nivel de la herida quirúrgica, creando así un estado de resistencia a los microorganismos mediante concentraciones antibióticas en sangre que eviten la proliferación y diseminación bacteriana.<sup>14</sup>

Por lo tanto investigar si el FTC posee algún efecto antimicrobiano generaría la posibilidad de implementar un biomaterial que además de presentar buena compatibilidad tisular y osteoconductividad posea, también una acción antimicrobiana sobre la microflora patógena generando una entrega local y controlada al hueso o sitios dentales, para prevenir así los fracasos en implantología debido a factores microbiológicos.

En las últimas décadas, un gran número de estudios se han dedicado a desarrollar la combinación del potencial de regeneración ósea intrínseca de cementos de fosfato de calcio con su capacidad para incorporar fármacos u otras moléculas activas que son importantes para diferentes necesidades terapéuticas. Como por ejemplo la incorporación de sustituciones iónicas como método para controlar la degradación y la solubilidad de los cementos así como para generar una acción antimicrobiana.<sup>15</sup>

En el presente estudio se mezcló el FTC junto a diferentes concentraciones de Zn y Mg, iones metálicos que en base a estudios realizados estimulan la acción de los osteoblastos durante la regeneración ósea. Células óseas inmaduras de origen mesenquimal son las responsables de la formación de la matriz osteoide y de la coordinación del proceso de reabsorción y formación ósea.<sup>16</sup>

Se llevó a cabo un estudio de tipo observacional descriptivo usando la técnica de difusión en pozo con el fin de demostrar la actividad antimicrobiana del FTC solo y a diferentes concentraciones de Zn y Mg (FTC al 0.5 %, FTC al 1.5%) sobre bacilos gram-negativos de la familia Enterobacteriaceae y cocos gram-positivos, mediante la formación de halos de inhibición. La recolección y tabulación de los datos se llevó a cabo por medio del programa Microsoft Excel 2010. En el presente estudio se demostró que el FTC al 0.5%, el FTC al 1.5 % Y el FTC solo, ejercen una acción antimicrobiana sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*, y, mediante la comparación de los halos promedios obtenidos frente a cada uno de los FTC se concluyó que los FTC dopados con Zn y Mg mostraron mayor actividad antimicrobiana en comparación con el FTC solo. Demostrando que los iones metálicos utilizados también generan una acción antimicrobiana potenciando así la acción del FTC sobre los microorganismos.



## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION**

En la actualidad existen diversas causas que generan defectos óseos dentales como lo son las pérdidas traumáticas, resecciones quirúrgicas, enfermedades periodontales y periimplantarias lo cual lleva a la necesidad de buscar compuestos que cumplan la función de rellenar dichos defectos entre los cuales se encuentran los fosfatos tricálcicos que ya se encuentran en una línea de investigación. Por tanto lo que se quiere plantear es demostrar la actividad antimicrobiana del fosfato tricalcico con iones metálicos como zinc y magnesio al 0,5% y al 1,5 % con el fin de que al ser utilizado como relleno óseo pueda además evitar una infección ya que es un importante riesgo en los procedimientos de implantología.

### 3. MARCO TEÓRICO

El fosfato tricálcico es un biomaterial de tipo cerámico y origen sintético que ha sido evaluado en diversas investigaciones clínicas, en las cuales se ha encontrado que es un material altamente biocompatible, osteoconductor y reabsorbibles <sup>6, 7</sup> que ofrece buenos resultados, por lo que ha sido utilizado durante las últimas décadas como sustituto óseo así como material para implantes ortopédicos y dentales debido a que su morfología esta diseñada para el proceso de regeneración ósea es decir la producción de hueso nuevo sano y suficiente. <sup>84</sup>

Los biomateriales son aquellos materiales que son compatibles con los tejidos vivos, inocuos para el organismo y que en algunas circunstancias son necesarios en el mismo para llevar a cabo determinadas funciones. En particular para los biomateriales destinados a la implantación ósea se han establecido diferentes clasificaciones. Teniendo en cuenta el tipo de reacción provocada en la interface tejido vivo-implante, se clasifican en biotolerados, bioinertes y bioactivos. <sup>3, 32</sup> Según su forma física se clasifican en densos y porosos. Según su macroporosidad y microporosidad, y en cuanto a su biodegradación en reabsorbibles y no reabsorbibles. De ellos, los clasificados como “bioactivos” han adquirido mayor relevancia y han tenido gran éxito en su aplicación práctica, ya que provocan una interacción e intercambio químico entre el implante y el tejido vivo, que da lugar a enlaces interfaciales y una perfecta osteointegración. <sup>1-3</sup>

Las cerámicas bioactivas son especialmente interesantes para la odontología de implantes debido a que la parte inorgánica del hueso receptor es más probable que crezca al lado de material químicamente similar. <sup>33</sup>

Un resumen de los materiales para implantes óseos y sus aplicaciones se describen en la figura 1

**Figura 1.** Materiales para implantes óseos y sus aplicaciones <sup>17</sup>

Composición	Tipo	Origen	Aplicaciones clínicas	Propiedades
Fosfatos de calcio Ej: Hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato de osteocálcico	Cerámico	Sintético	Regeneración ósea de sitios sin carga mecánica, relleno de defectos óseos (cementos, gránulos, recubrimientos)	Adhesión de tejido óseo (bioactividad), biodegradable, tasa de degradación variable
Fosfatos de calcio bases silicio (Biovidrios)	Vidrios cerámicos	Sintético	Regeneración ósea de sitios sin carga mecánica, relleno de	Adhesión de tejido óseo (bioactividad), biodegradable.

			defectos óseos (gránulos, recubrimientos)	
Alúmina(Oxido de aluminio)	Cerámico	Sintético	Reemplazo de articulaciones (rodilla, hombro)	Alta resistencia a la tensión, sin adhesión de tejido óseo
Titanio y sus aleaciones	Metal	Sintético	Reemplazo de hueso en sitios con carga mecánica. Prótesis dentales o de cadera, vértebras	Adhesión de tejido óseo (bioactividad) en algunos casos. Resistente a la corrosión. Alta resistencia mecánica
Acero inoxidable, aleaciones de cobalto y cromo	Metal	Sintético	Reemplazo de hueso en sitios con carga mecánica. Prótesis dentales o de cadera, vértebras y fijaciones.	Corrosión a largo plazo
Polimetilmetacrilato	Polímero	Sintético	Reemplazo de hueso en zonas con carga mecánica, relleno de defectos óseos(cemento óseo).Fijación de prótesis de cadera y vertebralplastia	No degradable
Poliésteres como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona y poliuretano	Polímero	Sintético	Fijación degradable de hueso, hilo de sutura ,relleno de defectos óseos, regeneración de tejido blando y liberación controlada de fármacos	La tasa de degradación y las propiedades mecánicas se pueden controlar variando su peso molecular.
Poliétileno de ultra alto peso molecular	Polímero	Sintético	Componente de prótesis articulares en la zona de movimiento relativo	Capacidad de lubricación
Tereftalato de polietileno	Polímero	Sintético	Cemento y relleno de defectos óseos	La tasa de degradación y las propiedades mecánicas se pueden controlar variando su peso molecular. Bioactivo
Poliétilenglicol	Polímero	Sintético	Reparación de tejidos duros y blandos	Gel acuoso inyectable y degradable
Coral	Mineral	Natural (Animal)	Relleno de defectos óseos	Alta interconexión, biodegradable
Matriz ósea desmineralizada	Proteína	Natural (Humano)	Relleno de defectos, regeneración de cartílago	Biodegradable, fuente natural de proteínas osteoinductivas
Colágeno	Proteína	Natural (Bovino)	Reparación de tejidos duros y blandos	Biodegradable.

La colocación de implantes dentales y ortopédicos son técnicas de uso frecuente pero que están sujetas a muchos riesgos como patologías bacterianas.<sup>54</sup> En las cuales pueden estar implicadas tanto bacilos Gram-negativos como cocos Gram-positivos.

Respecto a los bacilos Gram-negativos de la familia enterobacteriaceae estos fueron incluidos en el presente estudio ya que estos microorganismos han sido identificados en patologías como la periodontitis crónica y severa<sup>85</sup> los cuales tienen como consecuencia la pérdida de piezas dentales lo que hace necesario la colocación de un implante dental. También presentan resistencia in Vitro a la mayoría de antibióticos que

se emplean como terapia para tratar la periodontitis por lo cual hace que persistan con frecuencia después de la terapia mecánica o quirúrgica periodontal.<sup>86-88</sup>

Por estos motivos y teniendo en cuenta que la flora bacteriana presente en la cavidad oral antes de la inserción del implante y el estado periodontal de los dientes continuos a la localización del implante son determinantes de la composición de la biopelícula y de la salud del implante se decidió trabajar con este grupo de bacterias.

Respecto a los cocos Gram-positivos es importante resalta que *S.aureus* y *S.epidermidis* causan la mayoría de infecciones bacterianas en cirugías de injerto Óseo<sup>89</sup> además los representantes del genero *Staphylococcus spp.* son habituales en la microbiota oral humana. Sin embargo, en algunas situaciones, como en pacientes con periodontitis bajo la administración sistémica de la penicilina y eritromicina, pueden actuar como microorganismos oportunistas y producir superinfección<sup>90</sup> Respecto a *E.faecalis* este se incluyo ya que se ha visto implicado en infecciones endodonticas persistentes.<sup>91</sup> por su parte, *S.mutans* juega un papel importante en el desarrollo de caries dental ya que es capaz de fermentar el manitol, sorbitol y otras azucares a partir de la sacarosa y a su vez producir ácidos que influyen en la descalcificación de los dientes.<sup>74</sup>

Como lo hablamos anteriormente el FTC es utilizado actualmente como sustituto óseo así como material para implantes ortopédicos y dentales debido a que su morfología esta diseñada para el proceso de regeneración ósea. Para explicar un poco mas en detalle esto, es importante hablar acerca del hueso, un tejido conectivo mineralizado especializado<sup>92</sup> conformado por células especializadas y por dos componentes: orgánico e inorgánico.

El componente organico esta compuesto principalmente por colágeno tipo I,<sup>93</sup> mientras el componente inorgánico esta compuesto por fosfato cálcico en forma de cristales de hidroxiapatita. Una perfecta combinación de las fibras de colágeno, con los cristales de fosfato calcico, le confiere a la estructura ósea la debida flexibilidad, dureza, rigidez y resistencia.<sup>94</sup>

En condiciones normales el hueso está llevando a cabo continuamente procesos de remodelación ósea. El proceso de remodelación consiste en el intercambio de tejido óseo antiguo por tejido nuevo a través de la acción de dos tipos de células: los osteoclastos que reabsorben hueso y los osteoblastos que forman hueso.<sup>95</sup>

Muchos autores consideran que en este proceso se pueden distinguir tres fases: reabsorción, reposo y formación<sup>96-98</sup> La fase de reabsorción se inicia con la diferenciación de un grupo de osteoclastos a partir de sus precursores. Estos osteoclastos erosionan o reabsorben matriz ósea en formas cónicas denominadas lagunas de Howship. Esta fase termina con la eliminación de los osteoclastos por apoptosis. La fase de reposo o inversión (reversal phase) tiene lugar cuando se ha completado la reabsorción osteoclastica, y aparecen células mononucleares en la superficie ósea (preosteoblastos). Estas células preparan la superficie para la formación de nuevo tejido óseo y proveen señales para la diferenciación y migración de

osteoblastos. La fase de formación se inicia con la diferenciación de un grupo de osteoblastos a partir de los preosteoblastos; en ella los osteoblastos van segregando matriz ósea nueva que rellena las zonas excavadas por los osteoclastos.<sup>99</sup>

Debido a ello, el hueso tiene la capacidad de autorrepararse. Sin embargo, existe un tamaño de defecto crítico, a partir del cual, el hueso no es capaz de emprender la reparación empleando los procesos de osteogénesis propios. Por tanto, cuando el defecto es de un tamaño mayor que el defecto crítico, se hace necesario el empleo de algún tipo de injerto óseo.<sup>100</sup>

Los defectos óseos dentales obedecen a causas muy variadas, como pueden ser las resecciones quirúrgicas, pérdidas traumáticas, enfermedades periodontales y periimplantarias y defectos congénitos.<sup>22</sup> Estos defectos pueden dificultar la fase quirúrgica del tratamiento implantológico al encontrar un insuficiente volumen óseo para la adecuada colocación de los implantes.

Para sustituir de la falta de hueso hoy en día se lleva a cabo la utilización de injertos de hueso autólogo es decir hueso del propio paciente este tipo de injerto este Es considerado el estándar de oro, sin embargo, posee desventajas como, morbilidad quirúrgica ocasionada en la zona donante del injerto, limitada cantidad con la que se cuenta, requerimiento de mayor tiempo quirúrgico y mayor costo.

Otra forma de sustituir la falta de hueso es la implementación de aloinjertos los cuales Consisten en tejido óseo procedente de un donante de la misma especie estos Suelen ser la segunda opción, pero tienen limitaciones, como la potencialidad para transmitir enfermedades y producir reacciones inmunológicas.<sup>100</sup>

Estas desventajas son las que han llevado a la necesidad de investigar y desarrollar diversos sustitutos óseos que puedan utilizarse con éxito en el tratamiento implantológico, siendo los sustitutos óseos sintéticos una buena alternativa. Estos engloban a un grupo de materiales derivados del hueso, clasificados en xenoinjertos y los injertos aloplásticos. Los xenoinjertos son de origen animal y los injertos aloplásticos son un grupo químicamente diverso de biomateriales sintéticos a base de calcio. Materiales obtenidos en laboratorio cuya composición esta controlada y cuya morfología esta diseñada para el proceso de regeneración óseo. Dentro de la clasificación de injertos aloplásticos se encuentran una variedad de materiales siendo los mas conocidos los de tipo cerámica también conocidas como bioceramicas, dentro del grupo de compuestos de tipo cerámica los mas estudiados actualmente son los compuestos de Fosfato tricalcico, ya que son los que mas se aproximan a la composición del mineral óseo.<sup>100</sup> Este posee una fase mineral similar a la del hueso humano en un 70%, con propiedades osteoconductoras que permiten la fijación de células formadoras de hueso y el desarrollo de redes vasculares. También proporciona un equilibrio estructural similar a la del hueso del paciente, con reabsorción y remodelación similar al proceso fisiológico.<sup>38</sup>

En las últimas décadas, un gran número de estudios se han dedicado a desarrollar la combinación del potencial de regeneración ósea intrínseca de los cementos de fosfato de calcio con su capacidad para incorporar fármacos u otras moléculas activas que son relevantes para diferentes necesidades terapéuticas. Como por ejemplo la incorporación de sustitutos iónicos como método para controlar la degradación y la solubilidad de los cementos así como para generar una acción antimicrobiana.<sup>15</sup>

EL uso de la CPC como portadores de diferentes tipos de fármacos o principios activos han sido reportados en la literatura. Se clasifican en tres grupos: fármacos de bajo peso molecular, biomoléculas de alto peso molecular y iones.<sup>101</sup>

### **Fármacos de bajo peso molecular**

Dentro de los fármacos de bajo peso molecular se encuentran los antibióticos los cuales han sido los fármacos mas ampliamente estudiado. Teniendo en cuenta la aplicación de los compuestos de fosfato de calcio en reemplazo óseo en traumatología o la odontología, el tratamiento con antibióticos está indicado profilácticamente después de la terapia quirúrgica. Esto ofrece la posibilidad de usar compuestos de fosfato de calcio no sólo como injertos óseos osteoconductoras, sino también como sistemas de administración de fármacos controlados locales.

El rendimiento de cualquier dispositivo de suministro de medicamento depende de diferentes factores, tales como la microestructura (por ejemplo, área de superficie específica, la permeabilidad, porosidad y tortuosidad), la degradación potencial de la matriz, la solubilidad del fármaco o la naturaleza de las interacciones entre el fármaco y la matriz, diferentes tipos de antibióticos han sido estudiados en los compuestos de fosfato de calcio, en particular los pertenecientes a las familias de aminoglucósidos, cefalosporinas, glicopéptidos, quinolones y las tetraciclinas.

Para la profilaxis, es importante que la liberación del fármaco desde la matriz de los compuestos de fosfato de calcio, sea lo suficientemente rápido para llegar a concentraciones por encima de concentración mínima inhibitoria (MIC) y evitar concentraciones subinhibitorias para tiempos largos, que pueden conducir a la resistencia bacteriana. Además, el tratamiento de patologías infecciosas tales como osteomielitis o periodontitis requiere más tiempo y de liberación sostenida del antibiótico .

### **Antiinflamatorios**

Un importante número de estudios también se han ocupado de la incorporación de antiinflamatorios no esteroideos. Los cuales tienen propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias, y por lo general están indicados para el tratamiento de condiciones agudas o crónicas, donde están presentes el dolor y la inflamación. Se utilizan para el alivio sintomático de condiciones tales como la artritis reumatoide, la osteoartritis, o el dolor post operatorio.

## Medicamentos anti-cancer

En el tratamiento de tumores malignos de hueso, medicamentos contra el cáncer sistémicamente se administran simultáneamente con la terapia quirúrgica. Para evitar los efectos secundarios graves de la quimioterapia oncológica sobre el hueso y otros órganos, los estudios han tenido como objetivo en el diseño de nuevos compuestos de fosfato de calcio para entregar los medicamentos dentro de los cuales se encuentran el cisplatino, doxorubicina, paclitaxel, metotrexato o mercaptopurina) a nivel local.

## Biomoléculas de alto peso molecular

Los factores de crecimiento (GF) y proteínas en general, son las estructuras mas usadas.

## Iones

La relevancia de los iones en el cuerpo humano se observa fácilmente en las muchas funciones en las que participan. La capacidad de iones para desencadenar respuestas de los tejidos óseos se abre una nueva vía en el campo de la regeneración ósea. Dos ejes principales en la entrega de los iones se pueden diferenciar: iones dirigidas a los procesos de remodelación ósea (calcio, fosfato, estroncio, silicato, zinc y magnesio) y los iones con actividad antimicrobiana (Zinc, plata) para tratar y prevenir las infecciones. Siendo un campo relativamente reciente de la investigación.<sup>101</sup>

Según Xue et.al (2008) y Li et. Al (2009) el FTC dopado con el Mg disminuye significativamente la solubilidad del material en comparación con el FTC puro. Cuando el Mg se incorpora a las cerámicas de fosfato de calcio se espera que el comportamiento *in vivo* de este material sintetizado sea similar a la del hueso mineralizado, en comparación sin dopaje con iones de Mg.<sup>44,45</sup>

Según Xue et al (2008) se preparó una cerámica de FTC dopada con Mg y Zn, y se investigó la influencia de estos en las propiedades físicas, mecánicas y biológicas del FTC. Los resultados indican que el Mg y el Zn mejoran las propiedades mecánicas y la interacción entre las células y el FTC. Así mismo se demuestra el potencial, alta resistencia mecánica y baja resorción del FTC dopado con Mg y Zn. Siendo un material prometedor para utilizar en ortopedia y odontología.<sup>44</sup>

El Mg es un importante ion divalente que participa en la activación de osteoblastos y osteoclastos, por lo tanto una deficiencia en los niveles del Mg afecta todas las etapas del metabolismo óseo provocando un bajo crecimiento del hueso, disminuyendo la actividad osteoblastica y osteoclastica.<sup>44</sup>

El Zn es también uno de los iones divalentes que se han incorporado a las cerámicas de fosfato de calcio. Este ion se encuentra en todo el cuerpo, en órganos como los huesos, los dientes y el páncreas.<sup>46</sup> Es un miembro importante de varias metaloenzimas, participando como un cofactor para más de 200 enzimas necesarias para el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y ácidos nucleicos.<sup>47</sup> El Zn es

conocido por su efecto estimulante sobre la mineralización ósea *in vitro* y actúa como un activador del metabolismo óseo.<sup>48</sup> El FTC dopado con Zn ha demostrado ser biocompatible. La liberación de pequeñas cantidades de Zn durante la resorción del material cerámico, por ejemplo estimula la acción de los osteoblastos durante la regeneración ósea.<sup>49</sup>

El Zn particularmente en la forma de ion libre, es conocido por exhibir una fuerte actividad inhibitoria y fuertes efectos antimicrobianos en diferentes bacterias,<sup>50, 51</sup> además, estos iones metálicos son superiores a los agentes antimicrobianos orgánicos en términos de resistencia al calor, la persistencia de efectos y la seguridad antimicrobiana.<sup>52</sup>

El principal factor predisponente en la etiología de las enfermedades relacionadas con los implantes es la colonización microbiana.

La enfermedad periodontal comprende la gingivitis que afecta los tejidos superficiales de protección periodontal y la periodontitis que ataca y destruye los elementos de sostén a través de un proceso inflamatorio iniciado por la biopelícula dental. En los Estados Unidos de América (EUA), alrededor del 25% al 30% de los sujetos mayores de 30 años, sufren de algún grado de enfermedad periodontal, desde ligera inflamación con sangrado al sondeo, hasta pérdida de inserción severa.<sup>28, 29</sup> En Colombia, se presenta una pérdida de inserción periodontal del 50.2% que incluye 1.2% de pérdida de inserción severa en sujetos con más de 30 años.<sup>30</sup>

Los pacientes que sufren enfermedades periodontales tiene mayor riesgo de poder sufrir contaminaciones bacterianas de los implantes generándose así una enfermedad periimplantaria .

El fracaso de los implantes puede ser temprano o tardío debido a diversos factores. Dentro de los factores que conllevan a un fracaso temprano de los implantes podemos citar el trauma quirúrgico y la contaminación microbiana durante el acto operatorio. Los fracasos tardíos están asociados a la acumulación de placa alrededor del implante, que conllevan a una hiperplasia gingival y periimplantitis<sup>54</sup> que son lesiones inflamatorias que se desarrollan en los tejidos alrededor de los implantes.<sup>18</sup>

Los tipos de enfermedades preimplantarias incluyen a la mucositis preimplantaria y a la periimplantitis. La mucositis preimplantaria ha sido definida como un cambio inflamatorio reversible de los tejidos blandos del periimplante sin pérdida de hueso. La periimplantitis es una reacción inflamatoria asociada con la pérdida de la función de soporte del hueso alrededor del implante.<sup>55</sup> Los signos y síntomas característicos de la periimplantitis son el sangrado al sondaje, supuración, aumento de la profundidad de sondaje, dolor a la masticación, pérdida ósea radiográfica y en casos avanzados movilidad progresiva del implante.<sup>54, 56</sup>

Los procesos patológicos que generan los fracasos de los implantes están



acompañados de un incremento en la proporción de especies patógenas asociadas con periodontitis,<sup>61</sup> tales como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., y *Prevotella intermedia / nigrescens*.<sup>62</sup>

Además se han reportado microorganismos con potentes factores de virulencia y de resistencia antibiótica en periodontitis y en lesiones periimplante, las cuales, debido a estas características, se han denominado sobre infecciosas. Las especies identificadas han sido cocos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, levaduras como *Cándida albicans*, y bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa como *Pseudomona aeruginosa*, así como bacterias Gram-negativas entéricas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae como *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., y *Klebsiella* spp.<sup>20-22</sup> En los microorganismos entéricos y no fermentadores reportados en implantes estables, se encuentran frecuencias de detección entre 8 % y 17 % y,<sup>20, 23-25</sup> en los implantes afectados, entre 27 % y 75%.<sup>20, 24, 26</sup>

Las enterobacterias se caracterizan por no formar esporas, crecer en aerobiosis y anaerobiosis, fermentan la glucosa, no producen oxidasa, y tienen una movilidad variable. Son Gram-negativas, poseen una membrana citoplasmática, una cubierta de peptidoglicano y una compleja pared celular que comprende la capsula, la cual contiene lipopolisacáridos y canales para la penetración de antibióticos y nutrientes.<sup>63</sup> Se encuentran ampliamente dispersos en la naturaleza encontrándolos en la tierra y el agua, sobre las plantas, en el tubo digestivo de seres humanos y animales, por lo tanto, los miembros de esta familia pueden estar implicados en casi cualquier tipo de enfermedad infecciosa.<sup>64</sup>

### ***Escherichia coli***

Es una de las especies más frecuentes involucradas en la sepsis por Gram-negativos y en el shock inducido por endotoxinas, esta se serotipifica sobre la base de sus antígenos de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular). Sus factores de virulencia son endotoxinas, producción de capsula, y Pili que median la adherencia a las células del huésped.

En el tratamiento antimicrobiano se aconseja la administración de subsalicilato de bismuto en infecciones por *Escherichia coli* productora de enterotoxinas. En el caso de *Escherichia coli* enteroinvasiva, está indicado el uso de antibióticos, siendo de primera elección el TM-STX.<sup>65</sup>

### ***Klebsiella pneumoniae***

Es un microorganismo que se recupera con mayor frecuencia y puede producir una forma clásica de neumonía primaria. Rara vez se encuentra en la orofaringe de las personas sanas, sin embargo, se puede presentar una prevalencia de hasta un 20% en

los pacientes hospitalizados.<sup>64</sup> Los principales factores de virulencia asociados a este microorganismo son la presencia del polisacárido capsular, lipopolisacáridos y fimbrias o adhesinas y la formación de sideroforos; todos ellos tienen gran importancia ya que contribuyen a la patogenicidad de la bacteria la cual es el resultado de la acción conjunta de varios de estos factores que permiten a la bacteria entrar y multiplicarse en el interior del hospedero, resistir a la respuesta inmune del hospedero y producir daño.<sup>66</sup>

En el tratamiento es importante tener en cuenta que todas las cepas de *Klebsiella* son resistentes a la ampicilina, debido a la producción de una betalactamasa cromosómica de tipo penicilinasas, por lo cual para su tratamiento se deben emplear combinaciones de penicilina con inhibidor, cefalosporinas, carbapenemes, fluoroquinolonas, aminoglucósidos o cotrimoxazol.<sup>67</sup>

### ***Citrobacter freundii***

El género *Citrobacter* fue descrito en 1932 por Werkman y Gillen. Se halla frecuentemente en agua, suelos y alimentos, de los animales y el hombre.<sup>68</sup> Se reconoce como agente etiológico de infecciones urinarias, quirúrgicas, de piel y tejido celular subcutáneo, bacteriemia y septicemia, meningitis y abscesos cerebrales.<sup>65, 66</sup>

Las características claves que diferencian a *Citrobacter freundii* y otros miembros sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) de las *salmonellas* son el crecimiento en cianuro de potasio (KCN), la ausencia de actividad de lisina descarboxilasa y la hidrólisis de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG).<sup>63</sup>

Esta especie presenta una betalactamasa cromosómica que le confiere resistencia a las asociaciones con inhibidores y sensibilidad variable a las cefalosporinas de segunda generación. Además presenta resistencia a cefamicinas y tiene sensibilidad intermedia a cefuroxima.<sup>69</sup>

### ***Enterobacter cloacae***

El género *Enterobacter* incluye 14 especies clasificadas de acuerdo a características bioquímicas y similitudes genómicas.<sup>67</sup> Las especies habitualmente aisladas como patógenos intrahospitalarios son *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*,<sup>68</sup> aunque estas especies se distribuyen ampliamente en agua, suelo y verduras. Forman parte de la flora entérica comensal y se cree que no ocasionan diarrea, aunque se ha aislado una cepa de *Enterobacter cloacae* productora de una toxina similar a Shiga. También se asocia con distintas infecciones oportunistas que afectan las vías urinarias y respiratorias y las heridas cutáneas; en ocasiones, producen septicemia y meningitis.<sup>63</sup>

Casi todas las cepas son resistentes cromosómicamente a la ampicilina y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, para la elección del tratamiento se

debe tener en cuenta que presenta una betalactamasa cromosómica AmpC inducible, que las puede hacer resistentes a todas las penicilinas y a las cefalosporinas de tercera generación.<sup>69</sup>

**Figura 2.** Características bioquímicas para la identificación de algunas enterobacterias<sup>63</sup>

Especie	KIA	GAS	H <sub>2</sub> S	RM	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOT	LIS	ARG	ORN	ONPG
<i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-/+	+/-	+
<i>K. pneumoniae</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
<i>E. cloacae</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	-	+/-	+	-	+	+	+
<i>C. freundii</i>	A/A	+	+	+	-	-	+	-	+/-	+	-	+/-	-/+	+
<i>Salmonella</i>	Alc/A	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+/-	+	-

KIA: agar hierro de Kligler, H<sub>2</sub>S: sulfuro de hidrogeno; RM: rojo de metilo; VP: voges – Proskauer; IND: indol; CIT: citrato; PAD: fenilalanina desaminasa; URE: ureasa; MOT: motilidad; LIS: lisina; ARG: arginina; ORN: ornitina; ONPG: o-nitrofenil-β-d-galactopiranosido  
++: reacción positiva fuerte

### ***Proteus mirabilis***

Es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria se caracteriza por su motilidad, su capacidad de fermentar maltosa y su incapacidad para fermentar lactosa. El género *Proteus* se encuentra en el suelo, el agua y los materiales contaminados de materia fecal. Las especies de *Proteus* muestran el rasgo característico de la motilidad ascendente que se observa en agar no inhibidor como una propagación ondulante del microorganismo a través de la totalidad de la superficie del agar, siempre que se observe este movimiento se debe sospechar de *P. mirabilis* ya que esta es la especie aislada con mayor frecuencia en los seres humanos, sobre todo como agente causal tanto de infecciones urinarias como de heridas.<sup>63</sup>

El flagelo de *P. mirabilis* es un factor importante para su movilidad ya que este ayuda a que el microorganismo colonice. El flagelo también está relacionado con su capacidad de formar biopelículas ayudando en su resistencia a bacterias y antibióticos. El Pili es de gran importancia ya que este ayuda a adherir a la bacteria para evitar ser expulsada por el sistema urinario.

Casi todas las cepas de *P. mirabilis* son sensibles a la ampicilina y las cefalosporinas y recientemente se ha registrado una resistencia al TM-STX y la ciprofloxacina.<sup>63</sup>

En la figura 3 se observan las características bioquímicas de la especie *P. mirabilis*

**Figura 3.** Características bioquímicas de *Proteus mirabilis*<sup>63</sup>

Especie	Ornitina	Indol	Esculina	Salicilina	Lipasa	Ramposa
<i>P. mirabilis</i>	+	-	-	-	+	-

### ***Serratia marcescens***

Es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, oxidasa negativo de la familia Enterobacteriaceae que puede encontrarse en la flora intestinal del hombre y de los animales, en el ambiente y en reservorios pobres en nutrientes como el agua potable, cañerías y llaves, así como también en insumos hospitalarios como jabones y antisépticos.<sup>70</sup>

*S. marcescens* es el miembro más importante del género *Serratia* y por lo general se asocia con distintas infecciones humanas, sobre todo neumonía y septicemia en pacientes con procesos malignos reticuloendoteliales que están recibiendo agentes quimioterapéuticos.<sup>63</sup>

En la actualidad el microorganismo es reconocido como un patógeno importante con propiedades invasivas y una tendencia a resistir a muchos antibióticos de uso frecuente como las cefalosporinas de tercera generación, los aminoglucósidos y las quinolonas.<sup>63</sup> *S. marcescens* puede ser un oportunista hospitalario importante como lo demuestra un caso reciente de meningitis infantil luego del uso de una solución desinfectante de cloruro de benzalconio contaminada.<sup>71</sup>

Los factores de virulencia que presenta este microorganismo son la adherencia y la hidrofobicidad, el lipopolisacárido y los productos extracelulares.<sup>72</sup>

En la figura 4 se muestran las características bioquímicas de *Serratia marcescens*

**Figura 4.** Características bioquímicas de *Serratia marcescens*<sup>63</sup>

Especie	DNasa	Lipasa	Lisina	Ornitina	Sacarosa	Rafinosa	Sorbitol
<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	-	+

### ***Salmonella Typhi***

Bacilo Gram-negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, anaerobio facultativo, móvil. Las *salmonellas* tienen antígenos somáticos (O) que son lipopolisacáridos y antígenos flagelares (H) que son proteínas. *S. typhi*, tiene también un antígeno capsular o de virulencia (Vi). Desde el punto de vista bioquímico por lo general son tanto lactosa como sacarosa negativas. Las características bioquímicas claves del género *Salmonella* se muestran en la figura 2.

La mayoría de los tipos de *Salmonella* no pueden ser distinguidos mediante pruebas bioquímicas, excepto *S. typhi* que tiene algunas características bioquímicas que permiten diferenciarlo de otros serotipos. Algunas cepas de *S. typhi* producen solo una pequeña cantidad de sulfuro de hidrogeno. Además las cepas de *S. typhi* son menos activas bioquímicamente que los serotipos más frecuentes y específicamente son negativas en las siguientes reacciones: citrato de Simmon; Ornitina: descarboxilasa: gas proveniente de glucosa: fermentación de ducitol, arabinosa y Ramnosa; y utilización de mucato y acetato.

La salmonelosis es una causa importante de enfermedad entérica bacteriana tanto en seres humanos como en animales. Las infecciones por *salmonellas* son causadas principalmente por la ingestión de alimentos, agua o leche contaminados con excrementos humanos o animales.<sup>63</sup>

### ***Streptococcus mutans***

Los microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus* se caracterizan por ser Gram-positivos, catalasa negativa, alfa hemolíticos, anaerobios facultativos, sin capsula y con tendencia a agruparse en cadenas o pares.

La identificación de *Streptococcus mutans* se basa en la fermentación de carbohidratos ya que las características macroscópicas observadas en el cultivo no permiten hacer una diferenciación de las especies de *Streptococcus*. En la figura 5 se observan las características bioquímicas de *Streptococcus mutans*.<sup>73</sup>

Esta bacteria juega un papel muy importante en el desarrollo de la caries dental, ya que es capaz de fermentar el manitol, sorbitol y otros azúcares a partir de la sacarosa y a su vez produce ácidos que influyen en la descalcificación de los dientes.<sup>74</sup>

**Figura 5.** Características bioquímicas de *Streptococcus mutans*<sup>73</sup>

Especie	Esculina	Inulina	Manitol	Rafinosa	Sorbitol
<i>S. mutans</i>	+	+	+	+	+

Sus factores de virulencia son la formación de biopelículas, sistemas de exclusión de protones y expulsión de ácidos.<sup>75</sup> Los factores de cariogenicidad son síntesis de polisacáridos intracelulares, síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles y fructanos, movilización de polisacáridos intracelulares por glucógeno fosforilasa y extracelulares por dextranasas y fructanasas, poder acidogénico, acidófilo y acidurico, inicio de crecimiento a pH 5 y corto efecto post-pH, importante capacidad adhesiva por las proteínas parietales que posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos , y agregativa y cohagregativa a través de mútanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos y producción de bacteriocinas con actividad sobre otras bacterias Gram-positivas que podrían tener una

significación ecológica, aunque no está demostrado *in vivo* su importancia como factor selectivo de la microbiota.<sup>76</sup>

### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es el patógeno humano más importante entre los *Staphylococcus*. Se encuentra en el medio ambiente externo y coloniza las fosas nasales, los pliegues cutáneos intertriginosos, el peritoneo, las axilas, y la vagina. Aunque forma parte de la microflora humana normal puede causar infecciones oportunistas.<sup>63</sup>

Es un microorganismo Gram-positivo, catalasa positiva, se presenta como cocos en racimo y es fermentador de glucosa. La producción de coagulasa y la fermentación de manitol son las características mínimas para diferenciar *Staphylococcus aureus* de otras especies de *Staphylococcus*.<sup>77</sup>

Los factores de virulencia con los que cuenta *Staphylococcus aureus* son polisacáridos capsulares, peptidoglicano y ácidos teicoicos, proteína A, enzimas como la catalasa las cuales funcionan para inactivar el peróxido de hidrogeno y los radicales libres tóxicos formados por el sistema de la mieloperoxidasa dentro de las células fagocíticas después de la ingestión de los microorganismos, hemolisinas ( $\alpha$  hemolisina,  $\beta$  hemolisina,  $\delta$  hemolisina, y hemolisina), toxinas y superantígenos (enterotoxinas estafilocócicas).<sup>63</sup>

En la figura 6 se observan las características fenotípicas para la identificación de *Staphylococcus aureus*.

**Figura 6.** Características bioquímicas de *Staphylococcus aureus*<sup>63</sup>

Especie	Novobiocina	Glu	Mal	Sac	lac	Mant	Mans	Ara	Xil	Raf	Cel
<i>S. aureus</i>	S	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Glu: glucosa, Mal: maltosa, Sac: sacarosa, lac: lactosa, Mant: manitol, Mans: manosa, Ara: arabinosa, Xilosal, Raf: rafinosa, Cel: celobiosa  
S: sensible

### ***Enterococcus faecalis***

Es una bacteria Gram-positiva de la familia Enterococcaceae que habita en el tracto gastrointestinal y la vagina, causa infecciones urinarias complicadas, bacteremias, endocarditis, infecciones intraabdominales y pelvianas, infecciones de heridas y tejidos blandos, sepsis neonatal y pocas veces meningitis. Las infecciones urinarias constituyen la infección enterocócica más frecuente e incluyen cistitis, pielonefritis, prostatitis, absceso perinefrico e infecciones complicadas con bacteremias. La mayoría

de estas son de origen intrahospitalario o se asocian con anomalías estructurales e instrumentación de las vías urinarias.<sup>63</sup>

La resistencia de los enterococos a distintos antibióticos contribuye a su patogenicidad. Estos microorganismos muestran poca resistencia intrínseca a los aminoglucósidos y las lincosamidas, tienen concentración mínima inhibitoria (CIM) relativamente alta para cefalosporinas y penicilinas y son resistentes a la acción de las sulfamidas.<sup>63</sup>

Los factores que determinan la virulencia no se conocen muy bien. Algunas cepas de *E. faecalis* producen una citolisina / hemolisina que actúa sobre los eritrocitos humanos, de conejos, equinos y bovinos y tiene una importante toxicidad demostrada en los modelos de endoftalmitis y endocarditis en el conejo. La sustancia de agregación es una proteína de unión de superficie por plásmidos que promueve el agrupamiento de los microorganismos para facilitar el intercambio de los plásmidos, algunos estudios sugieren que la sustancia de agregación puede participar en la fijación de *E. faecalis* a los neutrófilos y las células epiteliales intestinales cultivadas.<sup>63</sup>

En la figura 7 se muestran las características fenotípicas de *Enterococcus faecalis*

**Figura 7.** Características fenotípicas de *E. faecalis*<sup>63</sup>

Especie	GLU	MNTL	SORB	ARAB	SBTL	RAF	SAC	PYRV	MGP
<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	-

GLU: glucosa; MNTL: manitol; SORB: sorbosa; ARAB: arabinosa; SBTL: sorbitol; RAF: rafinosa; SAC: sacarosa; PIRV: piruvato; MGP: metil- $\alpha$ -D-glucopiranosida

### ***Staphylococcus epidermidis***

Es el microorganismo coagulasa negativo más aislado con frecuencia. Casi todas las infecciones causadas por esta bacteria son adquiridas a nivel hospitalario. Este microorganismo ha sido aislado y documentado como patógeno en infecciones urinarias, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones de varios dispositivos de prótesis, infecciones de derivación de líquido cefalorraquídeo, infecciones relacionadas con diálisis peritoneal e infecciones oftálmicas.

La adherencia específica de la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* a superficies plásticas parece ser mediada en gran parte por un polisacárido adhesina llamado PS/A, esta adhesina puede bloquear la adherencia del microorganismo productor de PS/A a los catéteres plásticos *in vitro* y los anticuerpos dirigidos contra PS/A parecen bloquear también la adherencia a los biomateriales.

Durante los últimos años ha surgido la resistencia de los estafilococos coagulasa negativos a mucha clase de antibióticos, incluida la resistencia a las penicilinas resistentes a la penicilinas (oxacilina, meticilina). El uso cada vez mayor de

vancomicina ha llevado al surgimiento de estafilococos coagulasa negativos con sensibilidad disminuida a la vancomicina.<sup>63</sup>

En la figura 8 se muestran las características fenotípicas para la diferenciación de *Staphylococcus epidermidis*

**Figura 8.** Características fenotípicas de *S. epidermidis*<sup>63</sup>

Especie	Coagulasa	Ureasa	Polimixina B	Novobiocina	Glucosa	Maltosa
<i>S. epidermidis</i>	-	+	R	S	+	+

R: resistente; S: sensible



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Establecer la actividad antimicrobiana de fosfato tricálcico sobre bacilos Gram-negativos de la familia Enterobacteriaceae y cocos Gram-positivos

### **4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar la actividad antimicrobiana de fosfato tricálcico con diferentes concentraciones de zinc y Magnesio sobre bacilos Gram-negativos de la familia Enterobacteriaceae y cocos Gram-positivos
- Comparar los halos de inhibición producidos con los antibióticos con los producidos con el fosfato tricálcico solo y a diferentes concentraciones

## 5. METODOLOGIA

### **Viabilidad de las bacterias**

Con el fin de reconstituir y confirmar la viabilidad de las once bacterias para los ensayos, las cepas en estado liofilizado fueron resuspendidas en caldo infusión cerebro corazón (BHI) e incubadas a 37°C durante 14 a 24 horas en aerobiosis (H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>; 10:10:80). Después de su crecimiento en el caldo BHI fueron aisladas en agar tripticosa de soya (TSA) y llevadas a incubación durante 24 horas a 37°C en aerobiosis. Este proceso permitió la activación y el crecimiento de las cepas obteniéndose un cultivo puro para la evaluación frente a los FTC.

### **Protocolo de evaluación de la actividad antimicrobiana de los fosfatos por el método de difusión en pozo.**

Para demostrar la actividad antimicrobiana del FTC de origen colombiano (Medellín) sobre los microorganismos utilizados se validó el protocolo de la técnica de difusión en pozo.<sup>78</sup> Con el fin de obtener un mejor crecimiento de las bacterias se realizó un pre enriquecimiento en caldo BHI, el cual, fue incubado a 37°C durante 24 horas. A partir de este se realizó una resuspensión en solución salina al 0.85% y se ajustó a la escala de 0.5 de McFarland que corresponde a una concentración de microorganismos de  $1 \times 10^6$  UFC/ml; de esta suspensión se tomaron 100ul y se agregaron a 20ml de agar Muller Hilton (medio estéril y líquido a 50°C +/-) y posteriormente se mezclaron de 5 – 6 veces en forma giratoria y se sirvieron en cajas de Petri hasta que estos solidificaran por completo. Después de su solidificación se procedió a hacer sobre el agar los pozos con pipeta Pasteur estéril; estos pozos tenían un diámetro de 5mm y 4 – 5mm de profundidad. Finalmente, Sobre los pozos se adiciono el FTC solo y dopado con Zinc y Magnesio al 0.5 y 1.5%.

Después de aplicar los fosfatos, todas las cajas se llevaron a incubación a 37°C de 24 – 72 horas.

Paralelamente al montaje de los fosfatos se montaron controles negativos y controles positivos; entre estos ciprofloxacina, TM-STX y vancomicina, los cuales fueron inoculados y procesados de la misma manera que con los fosfatos.

Todas las pruebas se montaran por triplicado y se midieron los halos de inhibición producidos por los fosfatos y por los controles como promedio.

## 6. RESULTADOS

### Actividad inhibitoria de FTC al 0.5%

El FTC al 0.5% no presento actividad inhibitoria sobre ninguna de las siete enterobacterias ni sobre *S. mutans* y *E. faecalis*, sin embargo, sobre *S. aureus* y *S. epidermidis* se observaron halos de inhibición de 15.3mm con una desviación de  $\pm 0.57$  (ver figuras 15 y 16)

### Actividad inhibitoria de FTC al 1.5%

El FTC al 1.5% no presento actividad inhibitoria sobre ninguna de las siete enterobacterias ni sobre *S. mutans* y *E. faecalis*. Sobre *S. aureus* se observó un halo de inhibición de 16.3mm con una desviación de  $\pm 0.57$  y sobre *S. epidermidis* de 20mm. (Figura 15 y 16)

### Actividad inhibitoria de FTC solo

El FTC solo no presento actividad inhibitoria sobre ninguna de las siete enterobacterias ni sobre *S. mutans* y *E. faecalis*. Sobre *S. aureus* se observó un halo de inhibición de 12.3mm y sobre *S. epidermidis* de 12.6mm con una desviación estándar de  $\pm 0.57$ . (Figura 15 y 16)

### Actividad inhibitoria de ciprofloxacina

La ciprofloxacina tuvo mayor actividad sobre bacilos Gram-negativos que sobre cocos Gram-positivos. En los bacilos Gram-negativos se observaron halos de inhibición entre 26.3 y 42.3mm. Sobre cocos Gram-positivos el halo de inhibición máximo fue de 25mm. (Figura 15 y 16)

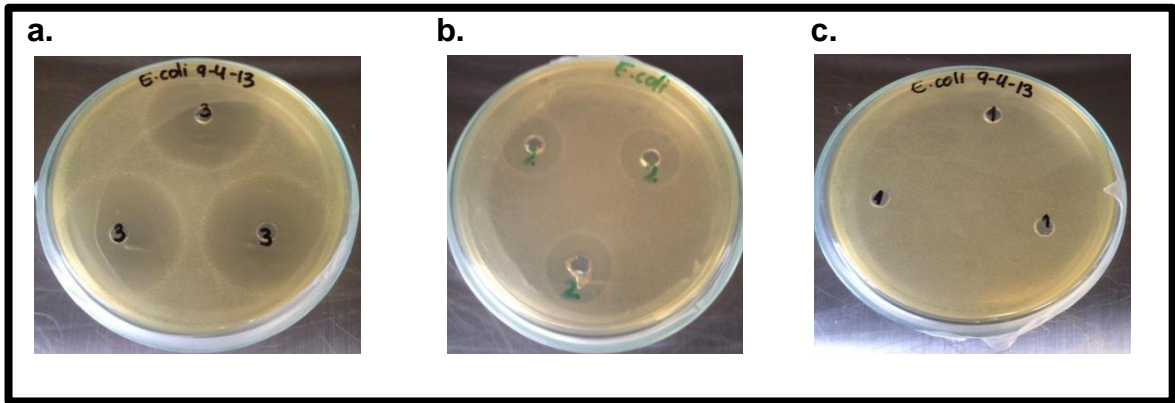
### Actividad inhibitoria de TM-STX

El TM-STX presento acción antimicrobiana sobre bacilos Gram-negativos, excepto sobre *Salmonella typhi*, y sobre los cocos Gram-positivos. (Figura 15 y 16)

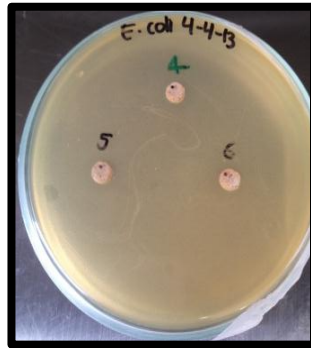
### Actividad inhibitoria de vancomicina

Solo presento actividad antimicrobiana sobre los cocos Gram-positivos, observándose un halo de inhibición mínimo de 16.6mm y un halo máximo de 20.3mm. (Figura 15 y 16)

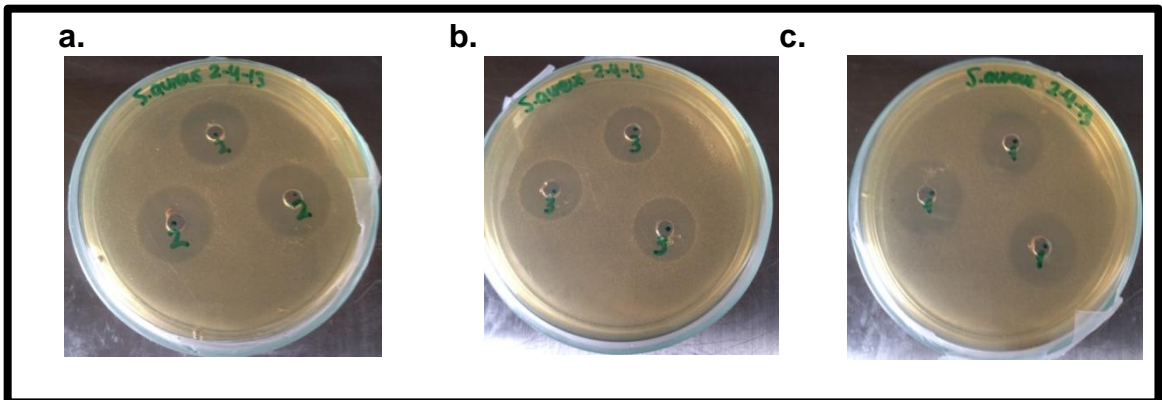
**Figura 9.** Actividad inhibitoria de ciprofloxacina (a), TM-STX (b), y vancomicina (c) sobre *Escherichia coli*



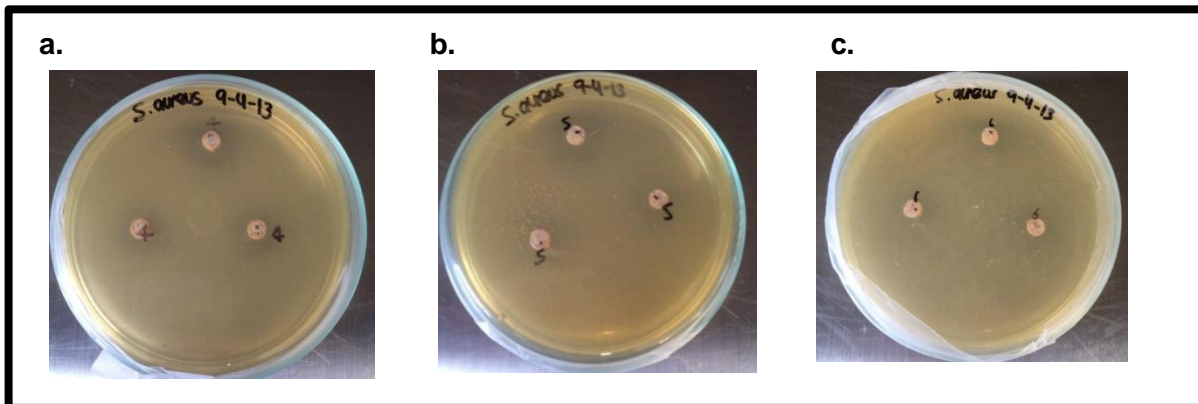
**Figura 10.** Actividad inhibitoria de FTC al 0.5% (pozo 4), FTC al 1.5% (pozo 5), FTC solo (pozo 6) sobre *Escherichia Coli*



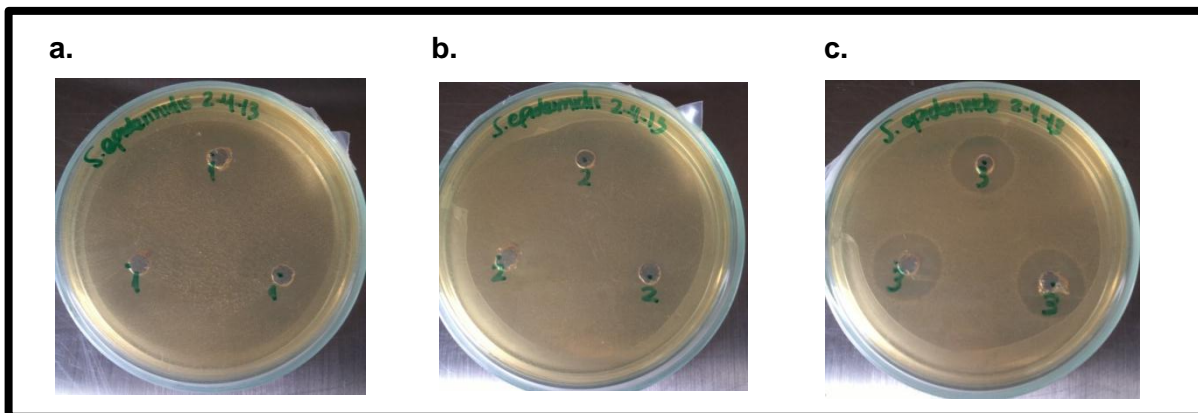
**Figura 11.** Actividad inhibitoria de ciprofloxacina (a), TM-STX (b), y vancomicina (c) sobre *Staphylococcus aureus*



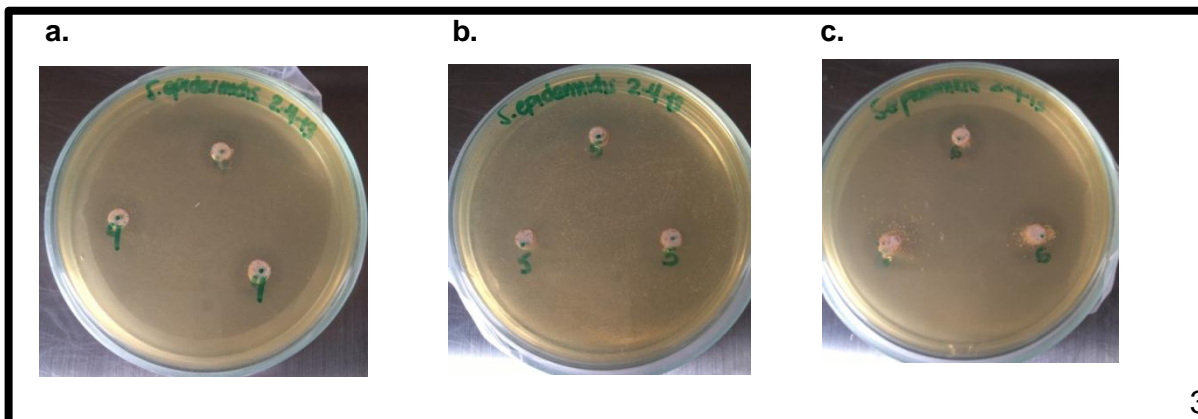
**Figura 12.** Actividad inhibitoria de FTC al 0.5% (a), FTC al 1.5% (b) y FTC solo (c) sobre *Staphylococcus aureus*



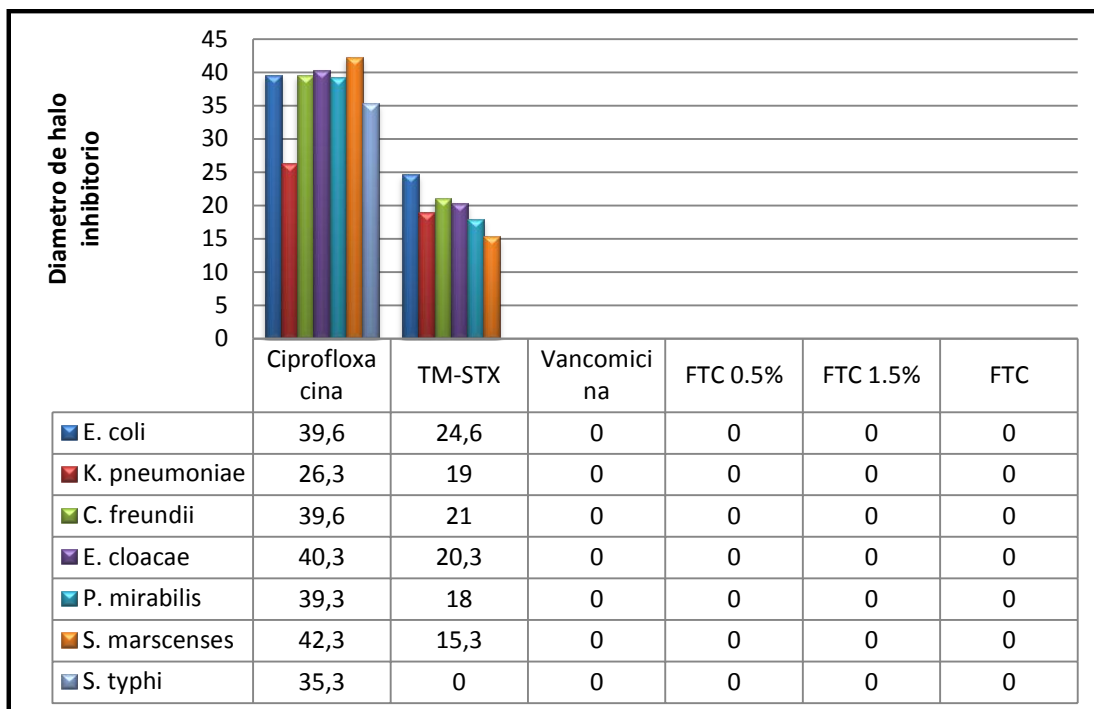
**Figura 13.** Actividad inhibitoria de ciprofloxacina (a), TM-STX (b), y vancomicina (c) sobre *Staphylococcus epidermidis*



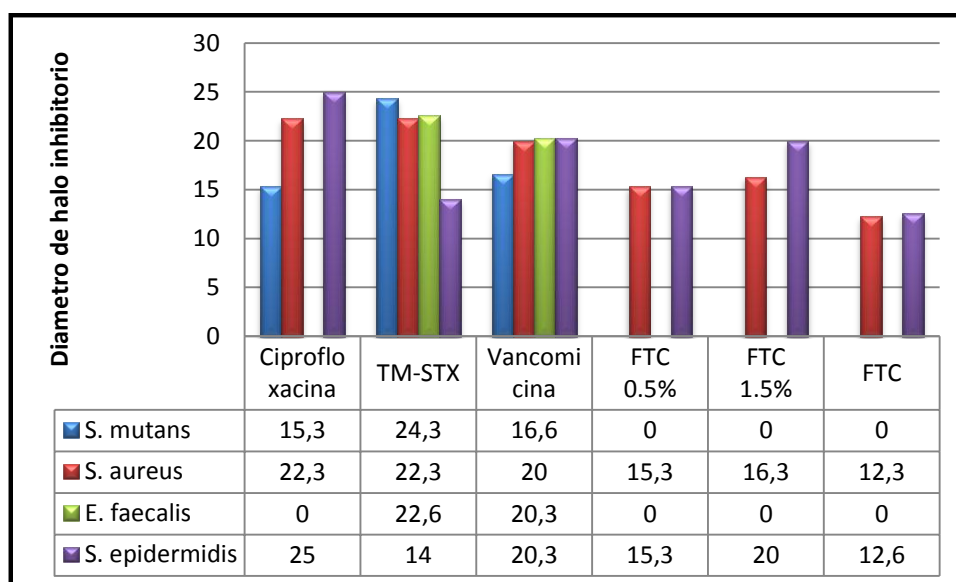
**Figura 14.** Actividad inhibitoria de FTC al 0.5% (a), FTC al 1.5% (b) y FTC solo (c) sobre *Staphylococcus aureus*



**Figura 15.** Diámetro promedio de halo de inhibición para las enterobacterias



**Figura 16.** Diámetro promedio de halo de inhibición para los cocos Gram-positivos



## 7. DISCUSION

En el presente estudio no se encontró actividad antimicrobiana de los fosfatos sobre bacilos Gram-negativos ni sobre *S. mutans* y *E. faecalis*, pero si sobre cocos Gram-positivos como *S. mutans* y *S. epidermidis*.

El FTC ha sido utilizado como material de implantes óseos y dentales,<sup>34,35</sup> debido a que es altamente biocompatible, reabsorbible y osteoconductor. Este ha sido utilizado durante las últimas décadas para la reparación de defectos óseos, ya que permite por sus características fisicoquímicas mantener en óptimas condiciones el espacio rellenado con gran éxito en diversas áreas de la biología, medicina y odontología en procesos de cirugía e implantología oral.<sup>9, 36, 37</sup> Este posee una fase mineral similar a la del hueso humano en un 70%, con propiedades osteoconductoras que permiten la fijación de células formadoras de hueso y el desarrollo de redes vasculares. También proporciona un equilibrio estructural similar a la del hueso del paciente, con reabsorción y remodelación similar al proceso fisiológico.<sup>38</sup>

Según Matsumoto et.al (2009) se preparó beta fosfato tricálcico (b-FTC) dopado con iones metálicos monovalentes como la plata (Ag +) y divalentes como el Zinc y el Cobre (Zn<sup>2+</sup> + o Cu<sup>2+</sup>) con el fin de comprobar la actividad antimicrobiana de AgZn-FTC y AgCu-FTC sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antimicrobiana, mecanismos y citotoxicidad *in vitro* fueron investigados. Los resultados demostraron la acción antimicrobiana de AgZn-FTC y AgCu-FTC sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* la cual fue mayor en comparación con (Ag-FTC) y b-FTC puro. Los investigadores concluyeron que dicha actividad antimicrobiana sugiriere una posible interacción entre las bacterias y los iones y entre las bacterias y los radicales libres generados por los agentes antibacterianos.<sup>11</sup> Estos hechos respaldan los resultados obtenidos en el presente estudio, en el cual se confirma que iones divalentes como Zn y Mg hacen que se potencie la actividad antimicrobiana del FTC.

El FTC solo presento un halo de inhibición menor, que fue superado a medida que aumentaban las concentraciones de Zn y Mg.

Los mecanismos por los cuales los agentes antimicrobianos inorgánicos, tales como iones metálicos ejercen una actividad antimicrobiana sobre microorganismos son sólo parcialmente conocidos.<sup>79</sup> Los iones de metal antimicrobianos pueden afectar la membrana externa bacteriana induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana, lo que provoca una liberación progresiva de moléculas de lipopolisacáridos y proteínas de membrana, y, finalmente, la muerte celular.<sup>80</sup> Otra posibilidad es que la acción antimicrobiana esté relacionada con la formación de radicales hidroxilo (OH) y aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) Estos radicales libres degradan las estructuras intracelulares

y extracelulares, interfieren con el sistema de transporte de electrones, y generan daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).<sup>81, 82</sup>

Según Gálvez et al (2006) se evaluó la actividad bactericida de una pasta terapéutica compuesta de fosfato tricálcico mediante el método de difusión en agar y técnica de excavación placa cultivo, frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Obteniendo resultados satisfactorios Sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*. El halo de inhibición obtenido frente a *S. epidermidis* en dicho estudio fue de 12 mm, en el presente estudio los halos promedio obtenidos con el FTC solo sobre este microorganismo fueron muy similares 12,6mm. Teniendo en cuenta que el halo de inhibición en el estudio citado fue obtenido sin la realización de dopaje con iones metálicos al FTC, obteniéndose de este modo un comportamiento antimicrobiano de baja actividad el cual como se demostró en nuestro estudio se puede mejorar con la adición o dopaje de iones al FTC.<sup>83</sup>



## 8. CONCLUSIONES

Se demostró que el FTC con Zn y Mg al 0.5%, 1.5% y el FTC solo ejercen una acción antimicrobiana sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*

Mediante la comparación de los halos promedios obtenidos frente a cada FTC se concluyó que los FTC dopados con Zn y Mg mostraron mayor actividad antimicrobiana en comparación con el FTC solo. Demostrando que los iones metálicos utilizados también generan una acción sinérgica antimicrobiana mejorando así la acción del FTC sobre los microorganismos.

La actividad antimicrobiana que posee la mezcla del fosfato tricálcico con iones metálicos lo convierte en un sustituto óseo con capacidad de prevenir infecciones Oseas causadas por microorganismos Gram-positivos.

La implementación del FTC mezclado con iones metálicos disminuiría el costo de los tratamientos usados para prevenir infecciones Oseas producidas en el implante, además de la mejoraría la calidad de vida del paciente.

La evidencia del efecto inhibitorio de FTC sobre *Staphylococcus aureus* es importante ya que es una de las bacterias más importantes en infecciones generadas en el implante dental.

Los resultados obtenidos muestran que el FTC dopado con Zn y Mg puede ser utilizado a nivel clínico en el área de odontología y ortopedia

El objetivo de dopar el FTC con Zn y Mg es estabilizar la estructura del fosfato tricálcico y por lo tanto a mejorar sus propiedades mecánicas.

En la bibliografía se encuentra poca información acerca de la evaluación de la actividad inhibitoria de FTC sobre las enterobacterias, por lo cual el alcance de la investigación fue evaluar el espectro antimicrobiano sobre las enterobacterias ya que estas se encuentran en pacientes con periodontitis las cuales pueden llegar a generar un fracaso en el proceso post-quirúrgico.

## 9. RECOMENDACIONES

Los mecanismos de las acciones inhibitoras de los agentes antimicrobianos inorgánicos, tales como iones metálicos antimicrobianos sobre microorganismos son sólo parcialmente conocidos por lo que se requieren más estudios en dicho tema. Además se hace necesario generar nuevos estudios con ensayos tanto *in-vitro* como *in-vivo* en los que se determinen las cantidades adecuadas de iones metálicos para el dopaje de FTC que confieran excelentes actividades antibacterianas y que eviten citotoxicidad.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. González, R., Guerra, J. Materiales bioactivos para implantes óseos. Características y aplicaciones. La Habana:Editorial CNIC,1993:10-25.
2. Carranza, F. Histologic study of healing of human periodontal after placement porous hydroxiapatite implants. J Periodontol 1987. 58:683-8
3. Strub, J., Gaberthül, R., Firestone, A. Comparison of tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man. J Periodontol. 1979. 50(12):624-9
4. Krojci, B. Clinical evaluation of porous and nonporous hydroxiapatite in the treatment of human periodontal body defects. J Periodontol 1987. 58(8):521-8.
5. Nery, E., Lynch, K. Preliminary clinical studies of bioceramic in periodontal osseous defects. J Periodontol. 1978. 49(10):523-7
6. Giannoudis, PV., Dinopoulos, H., Tsiridis, E. Bone substitutes: an update. Injury. 2005. 36 Suppl 3:S20-7
7. LeGeros, R. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res. 2002. (395):81-98
8. Schrooten, J., Helsen, J. Adhesion of bioactive glass coating to Ti6A14V oral implant. Biomaterials 2000. 21(14):1461-69.)
9. Ellingsen, J., Thomsen, P., Lyngstadaas, P. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. Periodontology 2000. 2006; 41: 136-56
10. Jensen, O., Garlini, G., Bilk, D., Peters, F. Use of alloplasts for sinus floor grafting. En: Jensen OT. The sinus bone graft (2a ed). Quintessence: Chicago 2006. pag: 201-9
11. Matsumoto, N., Sato, K., Yoshida, K., Hashimoto, K., Toda, Y. Preparation and characterization of b-tricalcium phosphate co-doped with monovalent and divalent antibacterial metal ions. 2009. 3157–3164
12. Prescription des antibiotiques en odontologie et stomatologie. Recommandations et argumentaire. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de la Santé. 2001 (www.afssaps.sante.fr)( French Health Products Safety Agency (Afssaps))

13. Prescribing antibiotics in odontology and stomatology. Recommendations by the French Health Products Safety Agency. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003. 17:725-9.)
14. Gutiérrez, J., Vicente, A., Bascones, R., Llamas, J., Llena, A., Morales, B., Noguerol, P., Planells, J., Prieto, J., Salmerón, I. Documento de consenso sobre la utilización de profilaxis antibiótica en cirugía y procedimientos dentales. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*. 2006;28,3
15. Ginebra, M., Canal, C., Espanol, M., Pastorino, D., Montufar, E. Calcium Phosphate cements as drug delivery materials. *Advence Drug Delivery Reviews*. 2012.1090-1110
16. Fawcett D. Tratado de histología. 2a ed. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid. 1995. 217p – 260p.
17. Ikada, D. Challenges in tissue engineering. En *Journal of the Royal Society Interface*. 2006. 3(10):589-601
18. Zitzmann, N., Berglundh, T. Definition and prevalence of periimplant diseases. *J Clin Periodontol*. 2008. 35:286-91
19. Berglundh, T., Persson, L., Klinge, B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal of Clinical Periodontology*. 2002. 29(Suppl 3), 197–212 discussion 232–233
20. Leonhardt, A., Renvert, S., Dahlén, G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res*. 1999. 10:339-45
21. Betancourt, M., Arce, R., Botero, J., Jaramillo, A., Cruz, C., Contreras, A. Microorganismos poco usuales en surcos y bolsas periodontales. *Colombia Médica*. 2006. 37: 6-14
22. Pye, A., Lockhart, D., Dawson, M., Murray, C, Smith A. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect*. 2009. 72:104-10
23. Quirynen, M., Teughels. Microbiologically compromised patients and impact on oral implants. *Periodontol 2000*. 2003. 33:119-28
24. Mombelli, A. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clin Oral Implants Res*. 1990. 1:1-7
25. Botero, J., González, A., Mercado, R., Olave, G., Contreras, A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosalesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol*. 2005. 76:1490-5
26. Alcoforado, G., Rams, T., Feik, D., Slots, J. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. *J Parodontol*. 1991. 10:11-8

27. Bascones A. Etiopatogenia de la enfermedad periodontal. En: Tratado de Odontología. T3. Madrid: Trigo Ediciones; 1998. pp. 3319-30
28. Albandar, J., Brunelle, J., Kingman, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. J Periodontol 1999. 70: 13-29
29. Albandar, J. Periodontal diseases in North America. Periodontol 2000. 2002. 29: 31-69.)
30. Ministerio de Salud. Estudio Nacional de Salud Oral ENSAB III. *Extensión y severidad de la enfermedad periodontal*. Bogotá: Ministerio de Salud; 1999
31. Kenney, E., Lekovic, V., Hant, T., Carranza, F., Dimitrijovich, B. The use of a porous hydroxiapatite implant in periodontal defects. J Periodontol. 1995. 66:82-8
32. Arias, J., Aller, M. Propedéutica quirúrgica. Preoperatorio, operatorio, postoperatorio. Editorial Tebar. 2004. 551p
33. Muddugangadhar, B., Amarnath, G., Tripathi, S., Dikshit, S. Biomaterials for Dental Implants: An Overview. International Journal of Oral Implantology and Clinical Research. 2011. 2(1):13-24
34. Kotani, S., Fujita, Y., Kitsugi, T., Nakamura, T., Yamamuro, T., Ohtsuki, C. Bone bonding mechanism of b-tricalcium phosphate. J Biomed Mater Res. 1991. 25:1303-15
35. Yonezaki, H., Hayashi, T., Nakagawa, T., Kurosawa, H., Shibuya, K., Ioku, K. Influence of surface microstructure on the reaction of the active ceramics in vivo. J Mater Sci: Mater Med. 1998. 9(7):381-4
36. Vaccaro, A. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. Orthopedics. 2002. 25: 571 -8
37. Xu, H., Takagi, S., Sun, L., Hussain, L., Chow, L., Guthrie, W., Yen, J. Development of a nonrigid, durable calcium phosphate cement for use in periodontal bone repair. J Am Dent Assoc. 2006. 137: 1131 – 8
38. Herrera, F., Abril, A., Medina, F., Duplat, L. Artrodesis cervical anterior con cajas de fusión intercorporal de carbono tipo bengal, placas Slim loc y fosfato tricálcico. Revista colombiana de ortopedia y traumatología. 2008. Volumen 22 - No 1
39. Friedman, C., Costantino, P., Takagi, S., Chow, L. Bone Source hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction, J. Biomed. Mater. Res. 1998. 43: 428-432

40. Kamerer, D., Hirsch, B., Snyderman, C., Costantino, P., Friedman, C. Hydroxyapatite cement: a new method for achieving watertight closure in transtemporal surgery, *Am. J. Otol.* 1994. 15: 47–49
41. Constantz, B., Ison, I., Fulmer, M., Poser, R., Smith, S., VanWagoner, M. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science.* 1995. 267: 1796–1799
42. Ginebra, M. Cements as bone repair materials, in: J.A. Planell (Ed.), *Bone repair biomaterials*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2009, pp. 271–308.
43. Ishikawa, K., Karashima, S., Takeuchi, A., Matsuya, S. Apatite foam fabrication based on hydrothermal reaction of  $\alpha$ -tricalcium phosphate foam. *Key Eng. Mater.* 2008 361–363: 319–322
44. Xue, W., Dahlquist, K., Banerjee, A., Bandyopadhyay, A., Bose, S. Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants. *Matter med.* 2008. 19:2669-2677
45. Li, X., Ito, A., Sogo, Y., Wang, X., Legeros, R. Solubility of Mg-containing b-tricalcium phosphate at 25<sup>0</sup>C. *Acta Biomaterialia.* 2009. Vol. 5:508-517
46. Tas, A., Korkusuz, F., Timucin, M., Akkas, N. An investigation on the chemical synthesis and high temperature sintering behaviour of calcium hydroxiapatite (HA) and tricalcium phosphate(TCP) bioceramics. *J. Mater. Sci., Mater.Med.* 1997. 8:91-96
47. Suita, S., Ikeda, K., Nagasaki, A., Hayashidea, Y. Zinc deficiency during total parenteral nutrition in childhood. *Journal of pediatric surgery.* 1978. 13:5-9
48. Yamaguchi, M., Oishi, H., Suketa, Y. Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. *Biochemical Pharmacology.* 1987. 36:4007-4012
49. Ito, A., Kawamura, H., Otsuka, M., Ikeuchi, M., Ohgushi, H., Ishikawa, K., Onuma, K., Kanzaki, N., Sogo, Y., Ichinose, N. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. *Mat.Sc.and Eng.C.* 2002. 22:21-25
50. Jeong, H., Jae, H., Jungho, H. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparti- cles. *Sci Total Environ* 2007. 37:3572–5.
51. Zhao, G., Stevens, S. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion. *Biometals.* 1998. 11:27–32
52. Kourai, H. Current situation and future of inorganic antimicrobial agent. *J Inorg Mater Jpn (Muki-Material).* 1999;6:428–36
53. Smyth, C., Mathews, H., Halpenny, M., Brandys, H., Colman, G. Biotyping, serotyping and phage typing of Streptococcus faecalis isolated from dental plaque in the human mouth. *J Med Microbiol.* 1987. 23: 45-54

54. Quirynen, M., Soete, M., Van Steenberghe, D. Infectious risks for oral implants: a review of the literatura. *Clin Oral Impl Res.* 2002. 1-19
55. Albrektsson, T., Isidor, F. Consensus report of sesión IV. In: Lang NP, Karring T (Eds). *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology.* London: Quintessence Publishing. 1994. 365-69
56. Sánchez, M., Gay, C. Periimplantitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004. 9 Suppl: S63-74
57. Delgado, M., Sánchez, E., Garcés, M., Rumeu, J., Berini, L., Gay, E. Enfermedad periimplantaria. Etiología, fisiopatología y diagnóstico. Revisión de la literatura. *Arch Odontoestomatol.* 1999. 2: 53-67
58. Leonhardt, A., Berglundh, T., Ericsson, I. Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1992. 3:112-119
59. Gattani, D., Salman, T. Peri-implant diseases: pathogenesis and treatment. *International Journal of Clinical Implant Dentistry.* 2010. 2(1): 23-30
60. Mombelli, A., Buseer, D., Lang, N. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. *Oral Microbiol Immunol.* 1998. 3:113-20
61. López, L. Infecciones relacionadas con los implantes dentarios. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008. 26:589-92
62. Quirynen, M., Teughels. Microbiologically compromised patients and impact on oral implants. *Periodontol 2000.* 2003. 33:119-28
63. Koneman, E. *Koneman Diagnostico microbiológico.* Sexta edición. Editorial medica panamericana. Buenos Aires. 2006. 205p, 226p, 227p, 242p, 243p, 249p, 251p, 252p, 253p, 255p, 256p, 257p, 595 – 602p, 606 – 609p, 619p, 622p, 667p, 669p
64. Farmer, J., Davis, B., Hickman-Brenner, F., Mc Whorter, A., Huntley-Carter, G., Asbury, M. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1985.21: 46-76
65. Ewing, W., Davis, B. Biochemical characterization of *Citrobacter diversus* (Burkey) Werkman and Gillen and designation of the neotype strain. *Int J Syst Bacteriol.* 1972. 22: 12-18
66. Lopardo, H., Pellegrino, P., Grinberg, J., Pinheiro, J., Rubeglio, E. Diferenciación de las nuevas especies de *Citrobacter* provenientes de urocultivos de un Hospital

Pediátrico. Libro de resúmenes del I Congreso Internacional de Infectología y Microbiología Clínica.1997. 161

67. Abbot S (1999) Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, and Berratia. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover F, Tenover F, Tenover F, Yolken (Ed), Manual of Clinical Microbiology. 7th edition. ASM Press, Washington, Estados Unidos de América, p. 475-482

68. Sanders, E., Sanders, C. Enterobacter: a pathogen poised to flourish at the turn of the century. Clin. Microbiol. 1997. 10: 220-241

69. Vives, M., Difabio, M. Tratamiento de las infecciones por enterobacterias. Medicine. 2010. 10(51):3432-9

70. Dossi, M., Escalona, M., Serrano, C., Silva, A., Juliet, C., Fernandez, A., Leiva, V., Fernandez, J. Serratia marcescens: Descripción de un brote de infección intrahospitalaria. Rev Chil Infect. 2002. 19(4): 262-266

71. Schlesinger, Y., Schlesinger, M. Togaviridae: the viruses and their replication. Eds. Fields Virology. Ed. 4. Philadelphia. 2001. 1581-1602

72. Hejazi, A., Falkiner, F. Serratia marcescens. J med Microbiol. 1997. 46: 903-912

73. Pedraza, D., Hernandez, Y. Diseño y valoración de un medio de cultivo selectivo para Streptococcus mutans. Tesis Pregrado. Facultad de ciencias. Pontificia universidad javeriana, Bogota D.C. 2006. 4p

74. Hamada, S. Biology, Immunology and cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiology and molecular Biology Reviews. 2008. 331 – 384

75. Rocha, R., Lozano, P., Martinez, Y. Mecanismos de patogenicidad e interaccion parasito hospedero. Primera edicion Benemerita Universidad Autonoma de Puebla. Puebla. Mexico. 2004. 129p, 246p

76. Liebana, J. Microbiología oral. Segunda edicion. McGraw-Hill interamericana. Granada, España. 2002. Pag. 334 – 335

77. Gonzales, E., Antiparra, R., Villareal, F. Aislamiento e identificacion de una cepa de Staphylococcus aureus meticilino resistente y catalasa negativa. Red de revistas científicas de America latina, el Caribe, España y Portugal. 2009. 45 – 46

78. Dobner, M., Schwaiger, S., Jenewein, I., Stuppeneear, H. Antibacterial activity of Leontopodium alpinum. Journal of ethnopharmacology. 2003, 89, (23): 301-303

79. Jun, S., Eunye, K., Kyeong, N., Jong, H., Sung, J., Hu, J. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine. 2007;3:95–101



80. Amro, N., Kotra, L., Wadu-Mesthrige, K., Bulychev, A., Mobashery, S., Liu, G. High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: Structural basis for permeability. *Langmuir* 2000;16:2789–96
81. Horie, M., Shibata, H., Kawano, Y., Hiratsuka, T. Sterilization of microorganisms by photocatalyst of thermal sprayed TiO<sub>2</sub> coatings. *J Jpn Therm Spray Soc* 1999;36:82–7
82. Sunada, K., Watanabe, T., Hashimoto, K. Studies on photokilling of bacteria on TiO<sub>2</sub> thin film. *J Photochem Photobiol A* 2003: 227–33
83. Gálvez, L., Roque, M., Villavicencio, J., Petkova, M., Madrid, M. Pasta terapeutica Anti-A. Producto( 2da parte) *Revista Científica Odontología Sanmarquina*. 2006 9(2)
84. Muñoz, M. Estudio de la aplicación clínica del B.fosfato tricalcico en alvéolos frescos postextracción humanos: estudio clínico e histológico. Tesis Doctoral, Universidad complutense de Madrid Facultad de odontología , Departamento de estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial) .2011
85. Ardila, C., Guzman, I. Microorganismos inusuales en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica Facultad de Odontología. Universidad de Antioquia. Colombia
86. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Otero A, Jaramillo A, Silva N, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol*. 2008; 35:106-13.
87. Barbosa FCB, Mayer MPA, Saba-Chuifi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2001; 16:306-10
88. Souto R, Colombo AP. Prevalence of Enterococcus faecalis in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol*. 2008; 53:155-60.
89. Meurice, E., Rguiti, E., Brutel, A., Hornez, J., Leriche, A., Descamps, M., Bouchart, F. New antibacterial microporous CaP materials loaded with phages for prophylactic treatment in bone surgery *J Mater Sci: Mater Med* (2012) 23:2445–2452
90. Helovuo, H.; Hakkarainen, K.; Paunio, K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol. Immunol.*, 8: 75- 79, 1993
91. Pardi, G., Guilarte, C., Cardozo, E., Briceño, E. Detección de Enterococcus faecalis en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. *Acta Odontológica Venezolana - VOLUMEN 47 No 1 / 2009*
92. ( Fernandez, I., Tresguerres, M., Alobera, A., Pingarron, M., Blanco, L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue.

Medicina oral patología oral y cirugía bucal, ISSN 1698-4447, 11(1), 32-36 2006. Referenciado en 111, 112

93. (J. D. Termine. Bone Matrix Proteins and Mineralization Process. En Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, second edition, ISBN 0-7817-0083-3. Raven Press, Favus M. J., New York, 21-24 (1993).

94. Fonseca, A., Garzon, D. Implementación del modelo de remodelación ósea de Komarova para el estudio de la sensibilidad del proceso de remodelamiento óseo ante cambios en factores locales. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 2009, pp.107-132.

95. (Muñoz, M. Estudio de la aplicación clínica del B.fosfato tricalcico en alvéolos frescos postextracción humanos: estudio clínico e histológico. Tesis Doctoral, Universidad complutense de Madrid Facultad de odontología , Departamento de estomatología III Medicina y Cirugía Bucofacial .2011

96. Marco G. Cecchinia, Antoinette Wetterwalda, Gabri van der Pluijmb and George N. Thalmanna. Molecular and Biological Mechanisms of Bone Metastasis. EAU- EBU, ISSN 1871-2592, 3(4), 214-226 2005. Referenciado en 109, 112, 116, 118)

97. S. Serrano, J. Aubia y M. L. Mariñoso. Bases histológicas de la histomorfometría ósea. En Patología Osea Metabólica, ISBN 84-8536-002-8. Barcelona: Doyma, 55-70 (1990). Referenciado en 112, 113, 114, 115

98. D. J. Hadjidakis and I. I. Androulakis. Bone Remodeling. Annals New York Academy of Sciences, ISSN 0077-8923, 1092, 385-396 (2006). Referenciado en 112, 114)

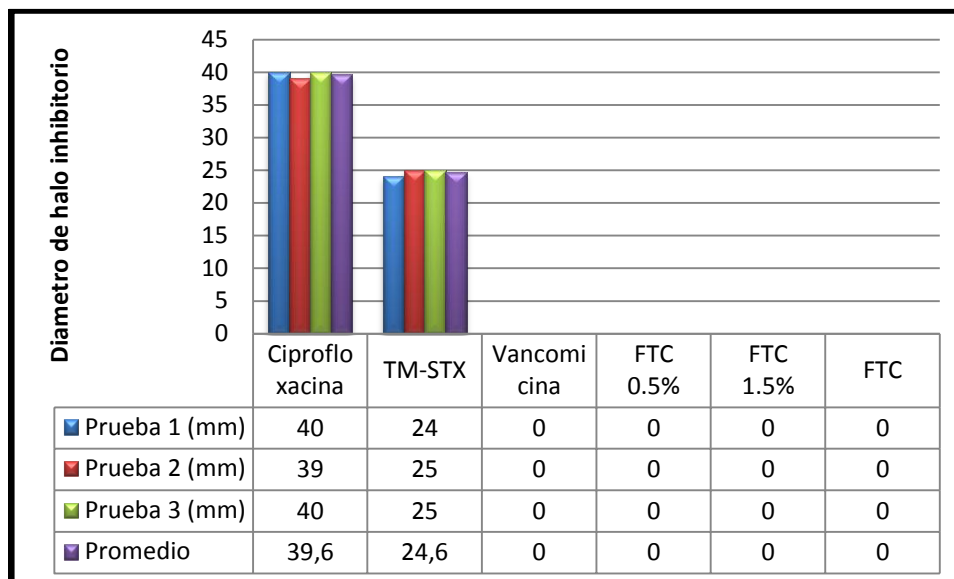
99. D. J. Hadjidakis and I. I. Androulakis. Bone Remodeling. Annals New York Academy of Sciences, ISSN 0077-8923, 1092, 385-396 2006. Referenciado en 112, 114)

100. Muñoz, M. Estudio de la aplicación clínica del B.fosfato tricalcico en alvéolos frescos postextracción humanos: estudio clínico e histológico. Tesis Doctoral, Universidad complutense de Madrid Facultad de odontología , Departamento de estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial) .2011).

101. Ginegra, M., Canal, C., Espanol, M., Pastorino, D., Montufar, E., Calcium phosphate cements as drug delivery materials. Advanced Drug Delivery Reviews 64 (2012) 1090-1110

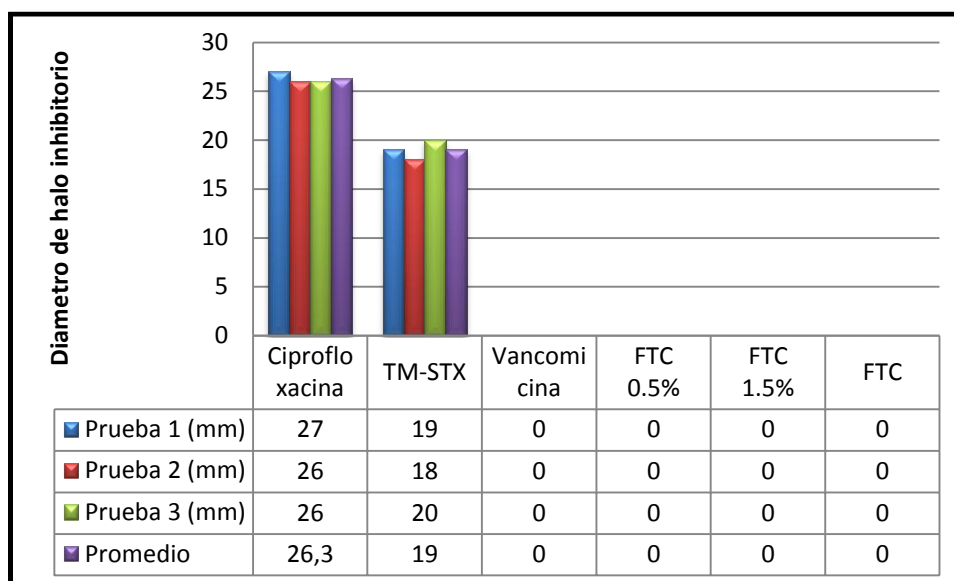
## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Escherichia coli*



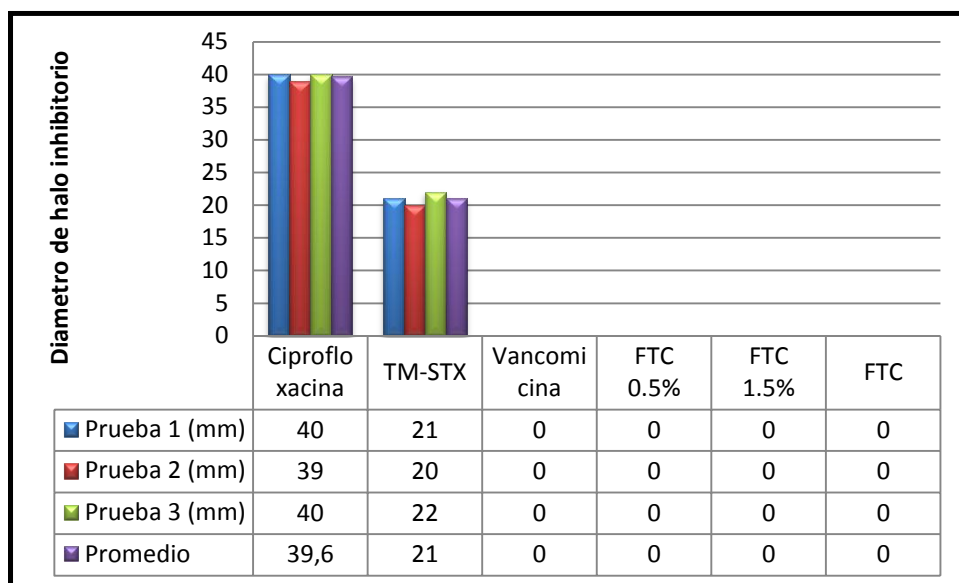
Ensayo realizado por triplicado

### Anexo 2. Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Klebsiella pneumoniae*



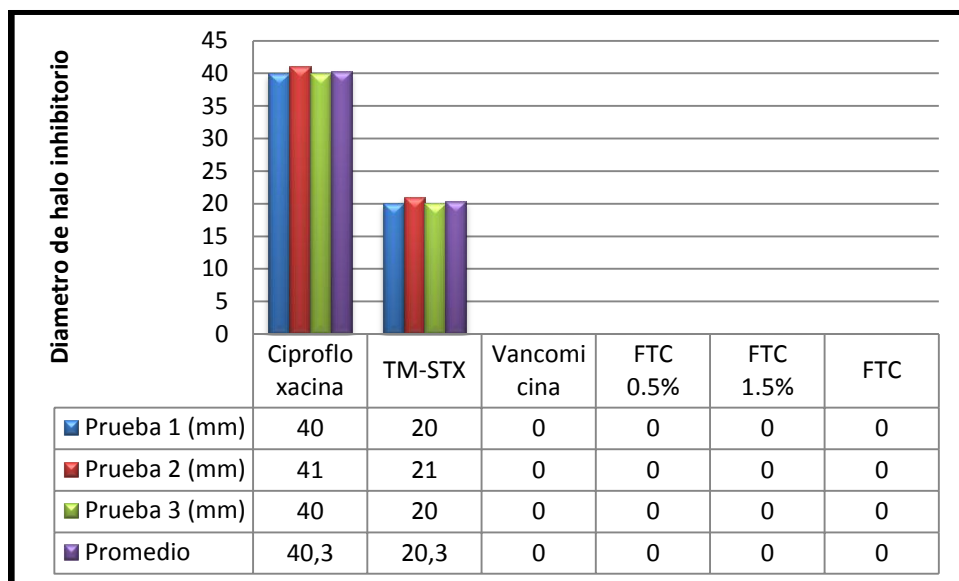
Ensayo realizado por triplicado

**Anexo 3.** Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Citrobacter freundii*



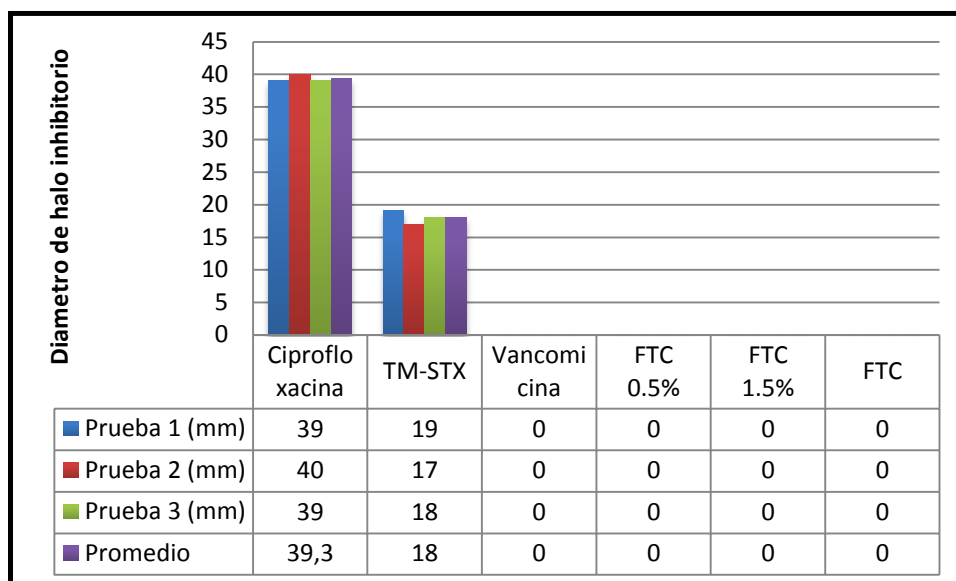
Ensayo realizado por triplicado

**Anexo 4.** Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Enterobacter cloacae*



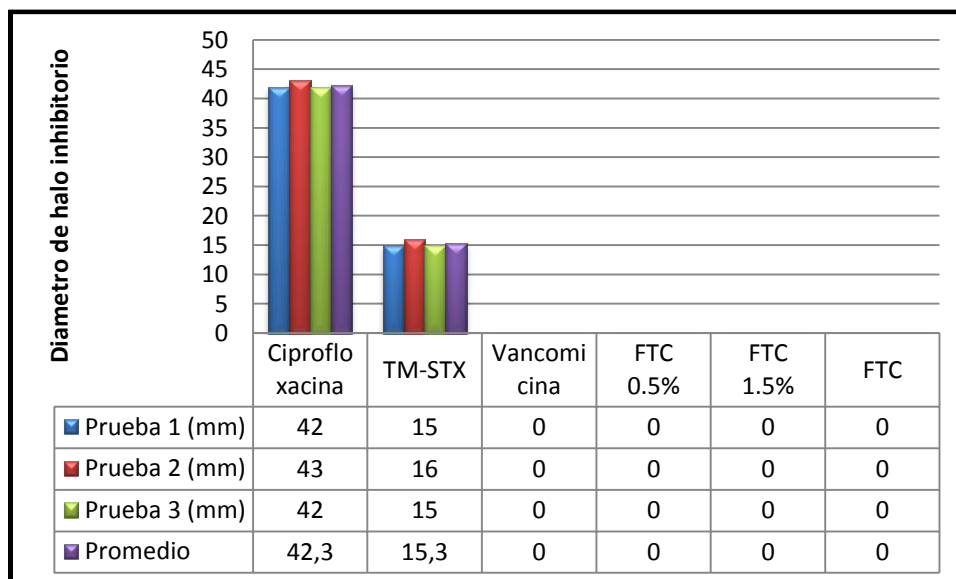
Ensayo realizado por triplicado

**Anexo 5.** Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Proteus mirabilis*



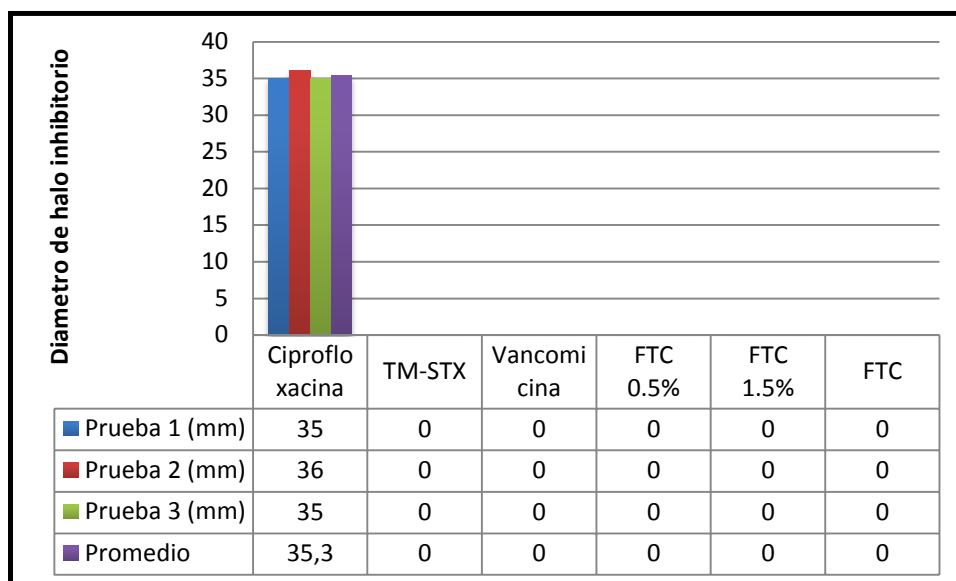
Ensayo realizado por triplicado

**Anexo 6.** Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Serratia marcescens*



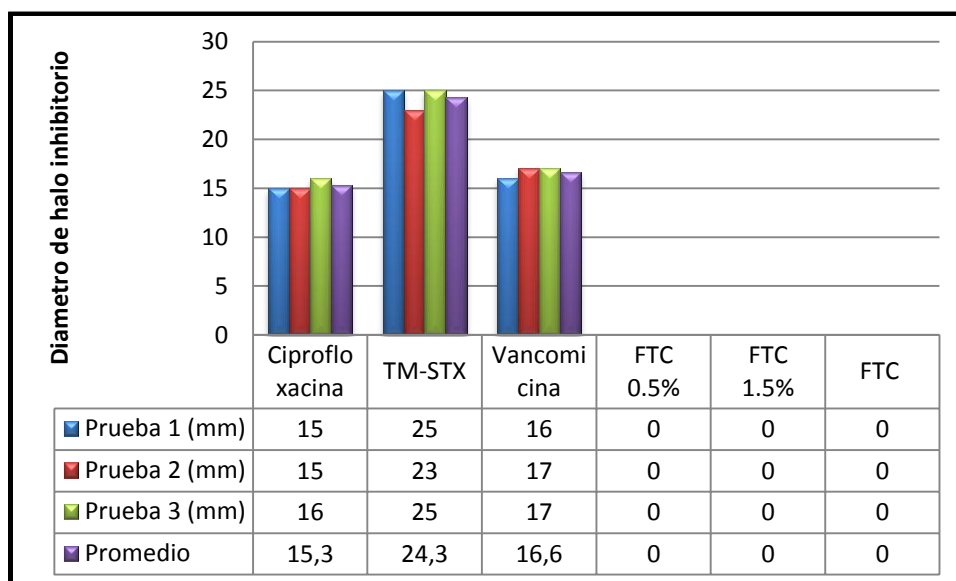
Ensayo realizado por triplicado

**Anexo 7.** Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Salmonella typhi*



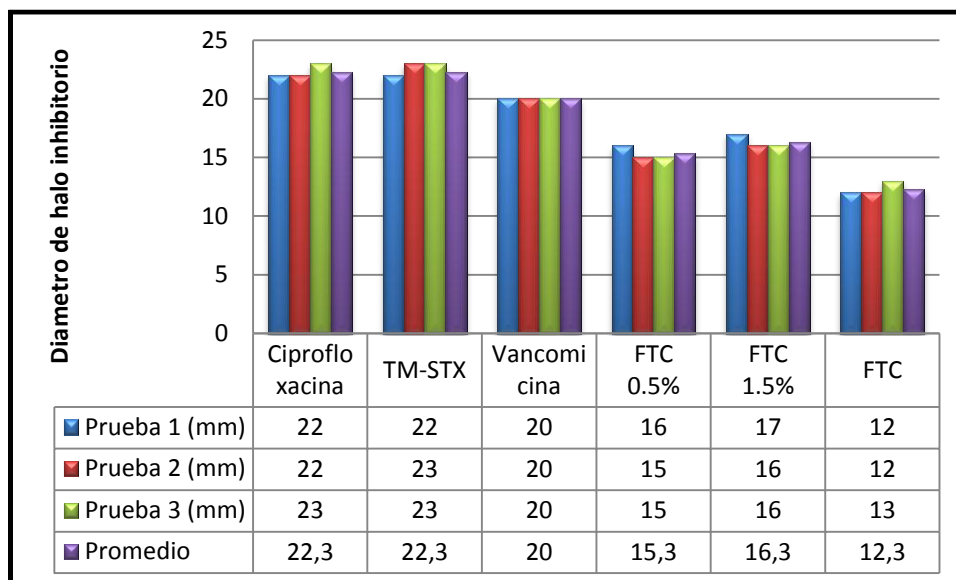
Ensayo realizado por triplicado

**Anexo 8.** Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Streptococcus mutans*



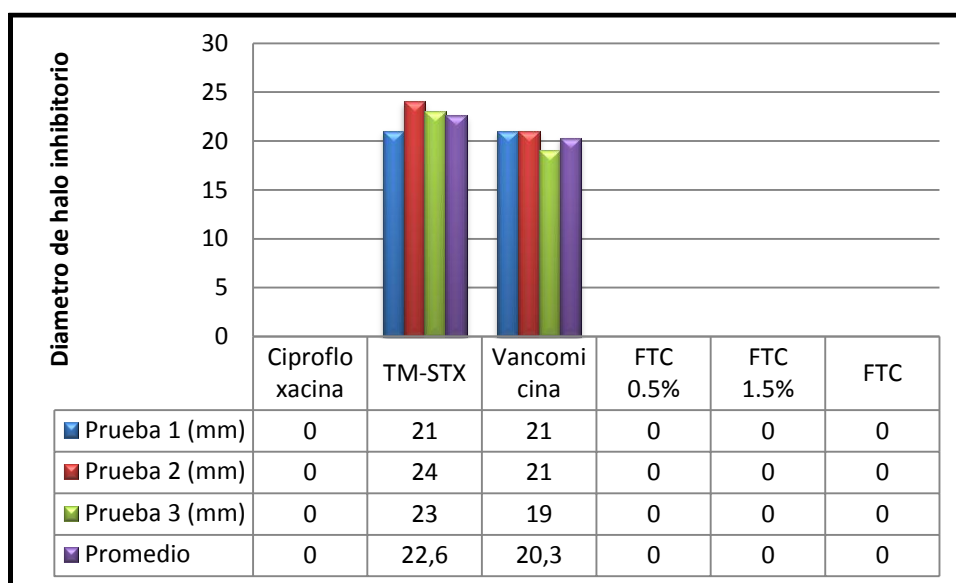
Ensayo realizado por triplicado

**Anexo 9.** Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Staphylococcus aureus*



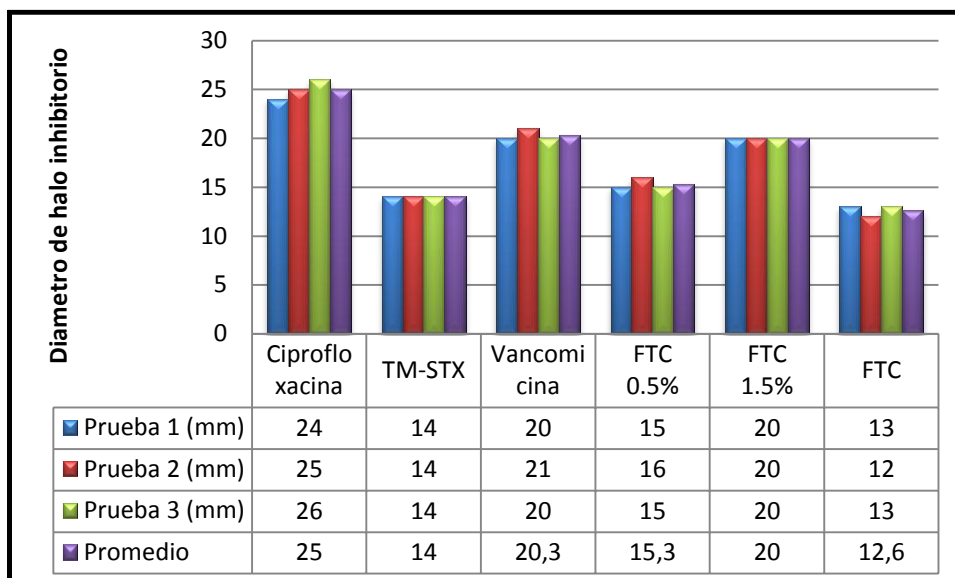
Ensayo realizado por triplicado

**Anexo 10.** Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Enterococcus faecalis*



Ensayo realizado por triplicado

**Anexo 11.** Actividad inhibitoria de fosfatos y antimicrobianos sobre *Staphylococcus epidermidis*



Ensayo realizado por triplicado