



Análisis microscópico de la adherencia de *Candida albicans* *in vitro* sobre resina acrílica utilizada para bases de dentaduras procesada con tres diferentes técnicas

Enrique Romo Arévalo,* Víctor Moreno Maldonado,* Silvia Antuna Bizarro,§ Teresa Fortoul Van Der Goes,§ Bertha Muñoz Hernández^{||}

RESUMEN

Antecedentes: La estomatitis protésica está asociada a la adherencia y colonización de *Candida albicans* a la base de las dentaduras y a otros cofactores, como un pH ácido, ingesta aumentada de carbohidratos, diversas enfermedades sistémicas y tratamientos farmacológicos. **Objetivo:** Analizar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), la adherencia de *Candida albicans in vitro*, sobre muestras de resina acrílica de polimetilmetacrilato usadas para bases de dentaduras, las cuales fueron procesadas con tres diferentes técnicas. **Diseño del estudio:** Se elaboraron 18 muestras de resina acrílica con tres técnicas de procesamiento, en las cuales se inoculó *Candida albicans in vitro* durante 24 y 48 h; dichas muestras se observaron mediante MEB de donde se obtuvieron fotografías a un aumento de 600x, 1,500x y 6,000x, las cuales se utilizaron como panorámica, conteo de blastoconidios y detalle, respectivamente. **Resultados:** La resina elaborada con termo-polimerizado con inyección (TPI) presenta poros de 1 a 2 micras de diámetro, a 24 h de inoculación se observan blastoconidios y formación de pseudomicelio mientras a 48 h hay numerosas células en gemación. En el auto y termo-polimerizado con inyección (ATPI) hay poros de .5 a 5 micras así como grietas de 100 micras de largo, a 24 h los blastoconidios tienen forma irregular con colapso en su superficie en tanto a 48 h hay pseudomicelios, gemación y las células siguen presentando irregularidades. En el polimerizado mediante microondas (PM) hay poros de 1 a 5 micras, a 24 h hay pseudomicelios y células en gemación, tanto que a 48 h la formación de pseudomicelios es mayor, así como la gemación. **Conclusiones:** La resina acrílica que se elaboró con la técnica de termo-polimerizado con inyección presenta la superficie con menos defectos de las tres técnicas estudiadas y no hay diferencia significativa en el número de células adheridas de 24 a 48 h de inoculación.

ABSTRACT

Antecedents: Prosthetic stomatitis is associated to the adherent and colonization of *Candida albicans* to denture bases and other cofactors such as acidic pH, high carbohydrate diet, systemic diseases as well as pharmacological treatments. **Objective:** To analyze *Candida albicans* adherence *in vitro* on different samples of polymetacrilate acrylic resin used for denture base, processed with three different techniques using scanning electron microscopy (SEM).

Study design: 18 different samples of acrylic resin were made using three different techniques. *Candida albicans* was inoculated *in vitro* for 24 and 48 hours. These samples were observed under the microscope, getting pictures of them at 600x, 1,500x and 6,000x magnification. **Results:** The resin elaborated with thermopolimerization injection (TPI) presents pores of 1-2 microns in diameter. At 24 hours after inoculation blastoconidios can be observed, as well as the formation of pseudomycelium while at 48 there are numerous cells in gemmation. In auto and thermopolimerization injection (ATPI) there are pores measuring .5-5 microns in diameter as well as cracks with 100 microns in length. At 24 hours the blastoconidios have irregular shapes while at 48 hours there are pseudomycelium, gemmation and cells present irregularities. In microwave polymerization (MP) there are pores with 1-5 microns in diameter. At 24 hours there are pseudomycelium anode cells in gemmation, while at 48 hours the pseudomycelium formation as well as gemmation is increased. **Conclusions:** Acrylic resin elaborated with the thermopolimerization injection technique presents a surface with less defects of the three studied techniques and there is no significant difference in the number of adhered cells at 24 and 48 hours after inoculation.

Palabras clave: *Candida albicans*, adherencia, polimetilmetacrilato, Estomatitis protésica, Microscopía electrónica de barrido.

Key words: *Candida albicans*, scanning electron microscopy, prosthetic stomatitis, adherence.

INTRODUCCIÓN

Las prótesis dentales parciales o totales están fabricadas generalmente de resina acrílica de polimetilmetacrilato (PMMA), el cual forma una superficie sólida que se encuentra en contacto con la mucosa bucal del paciente.¹⁻¹¹ Esta superficie puede presentar defectos (poros, grietas e irregularidades) los cuales se producen al

momento de su elaboración y varían según la técnica de procesamiento, dependiendo de diversos factores como son:

* Laboratorio de Prostodoncia Total. Facultad de Odontología, UNAM.

§ Departamento de Biología Celular y Tissular. Facultad de Medicina, UNAM.

^{||} Laboratorio de Micología Médica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER.

la vaporización del monómero no reaccionado, una proporción inadecuada de polvo-líquido, presión inadecuada o insuficiente de la resina en la mufla y la inclusión de aire durante el mezclado del material. La vaporización del monómero se da cuando la temperatura de la resina, durante el procesado, alcanza o sobrepasa su punto de ebullición (100.8 °C); cuando la proporción polvo-líquido es inadecuada algunas regiones de la resina contienen más monómero que otras, durante la polimerización dichas regiones se contraen más y tienden a producir vacíos y la presión inadecuada o insuficiente puede ocasionar porosidades que no son esféricas sino que asumen formas irregulares.¹¹ Dichos defectos pueden actuar como reservorios que contribuyen a la adherencia y proliferación de microorganismos, dentro de los cuales el más frecuentemente aislado en pacientes portadores de prótesis es *Candida albicans*.¹²⁻¹⁶ *Candida albicans* es un hongo microscópico, patógeno y oportunista, causante de procesos infecciosos importantes en la cavidad bucal, dentro de los cuales se encuentra la estomatitis protésica, que es la forma clínica de la infección por *Candida albicans* en pacientes portadores de prótesis, donde el tejido epitelial que se encuentra en contacto con la prótesis está adelgazado y el tejido conjuntivo presenta inflamación excesiva; generalmente se localiza en la superficie del paladar, preferentemente en mujeres y refiriendo la sensación continua de ardor.²⁰ La proliferación de *Candida albicans* y su adherencia en el aparato protésico se relaciona con el inicio, mantenimiento y agravamiento de la estomatitis protésica.^{2,4,10,13,17-19} La fase inicial de la adhesión de *Candida albicans* a la resina acrílica es mediada por factores no específicos (hidrofobicidad superficial y fuerzas electrostáticas) y por componentes de la pared celular (manoproteínas y proteínas fibrilares) que actúan como adhesinas y reconocen receptores en células epiteliales, matriz extracelular y superficies colonizadas por estreptococos bucales.²¹⁻²⁴ Una vez adherido, el microorganismo puede reproducirse, desarrollar biopelículas, cambiar su tipo de crecimiento del estado de blastoconidio a pseudohifas e hifas verdaderas, las cuales pueden guiar su crecimiento a través de contacto por las discontinuidades de las células de la mucosa bucal, penetrar entre ellas, invadir tejidos profundos y dificultar la fagocitosis.²⁵⁻²⁷

El objetivo de este estudio fue observar mediante MEB, la adherencia de *Candida albicans* in vitro, sobre muestras de resina acrílica usadas para bases de dentaduras, procesadas con tres diferentes técnicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de especímenes. Fueron elaboradas 18 láminas de resina acrílica a base de PMMA de 7

mm x 7 mm x 4 mm: 6 láminas mediante la técnica de termo-polimerizado con inyección "TPI" (SR-IVOCAP High Impact. Ivoclar®), 6 láminas hechas con la técnica de auto y termo-polimerizado con inyección "ATPI" (PALAXPRESS. Heraeus Kulzer®) y 6 láminas con la técnica de polimerizado mediante microondas "PM" (ACRON MC GC Lab®), siguiendo las indicaciones de manufactura proporcionadas por el fabricante. Las muestras se mantuvieron durante dos días en agua destilada estéril para remover los residuos de monómero tóxico que pudieran quedar después de la polimerización, posteriormente se desinfectaron en alcohol al 70% durante cinco minutos y se lavaron con agua destilada estéril para eliminarlo.¹⁴

Microorganismo y condiciones de cultivo. Se utilizó una cepa de referencia de *Candida albicans*, proporcionada por el Instituto Pasteur de Francia, la cual se conservó en placas de cultivo agar dextrosa Sabouraud. A esta cepa se le realizaron pruebas de formación de tubo germinativo, clamidoconidio y cultivo en CHROMagar *Candida*, con el fin de comprobar la pureza de la cepa. El microorganismo fue cultivado en placas de agar dextrosa Sabouraud e incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas, de este cultivo fresco se tomó una asada microbiológica y se incorporó en 100 mL de caldo de soya tripticasa estéril, el cual se mantuvo en una incubadora elíptica toda una noche a 37°C con agitación.¹⁴

El cultivo fue centrifugado 10 minutos a 1,000 rpm, posteriormente se retiró el caldo de soya tripticasa y los blastoconidios que están en el sedimento se lavaron dos veces con solución salina estéril. Al sedimento lavado se le agregó 2 mL de caldo de soya tripticasa estéril para resuspender los blastoconidios. Este concentrado se fue agregando a 100 mL de caldo de soya tripticasa estéril hasta que se obtuvo una suspensión del microorganismo a 0.8 OD520 (1 x 10⁷ blastoconidios/mL).²²

Ensayo de adherencia. Los especímenes se introducen en placas de cultivo celular de 24 pozos con 1.5 mL de la suspensión de *Candida albicans* y son incubadas a 37°C con agitación (60 rpm), durante 24 y 48 h. Transcurridos estos tiempos las muestras se lavaron con PBS (NaCl 8 g, KCl .2 g, KH₂PO₄ 2 g, KH₂PO₄-12H₂O 2.89 g, H₂O_{Dest} 1 litro, pH 7.4) para remover las células no adheridas y se fijaron durante 5 min en alcohol absoluto, posteriormente son montadas en balines de latón y ionizadas con una capa de oro-paladio durante 3 min a 1,500 KV y a 10µA. Se realizaron observaciones con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM35CF, donde se obtuvieron fotografías a un aumento de 600x, 1,500x y 6,000x, que se utilizaron para observar las características de

la superficie del PMMA y la adherencia del microorganismo.

Análisis estadístico. Se realizó la cuantificación de las células adheridas mediante el programa estadístico Sigma Stat Ver 3.1. Las pruebas para este estudio se realizaron por triplicado en tres diferentes ocasiones.

RESULTADOS

La resina acrílica que se elaboró con la técnica de termo-polimerizado con inyección presenta en general una superficie uniforme, así como poros de 1 a 2 micras de diámetro que se encuentran separados entre sí a una distancia de 10 a 15 micras (*Figura 1-A*). En inoculación a 24 h hay en promedio la adherencia de blastoconidios maduros que se encuentran en gemación y miden de 2 a 3.5 micras de diámetro (*Figura 2-A*). A 48 h de inoculación se observan blastoconidios de 2 a 3.8 micras, en gemación y formandoseudomicelio (*Figura 3-A*).

En la resina acrílica elaborada con la técnica de auto y termo-polimerizado con inyección se observa en general una superficie con poros de .5 a 5 micras, los cuales se encuentran agrupados (*Figura 1-B*). En inoculación a 24 h se observan en promedio blastoconidios en gemación que tienen forma irregular con colapso en su superficie, dichas células miden de 2.5 a 4 micras; además en la resina acrílica hay grietas de 100 micras de largo (*Figura 2-B*). A 48 h de inoculación hay blastoconidios con irregularidades en su superficie que están en gemación y formanseudomicelios; además en la resina acrílica se observan grietas de 100 micras (*Figura 3-B*).

En la resina acrílica procesada con polimerizado mediante microondas se observa en general una superficie con poros irregulares de 1 a 5 micras de diámetro, los cuales se encuentran dispersos en toda la muestra (*Figura 1-C*). A las 24 h de inoculación hay en promedio blastoconidios maduros de 2.4 a 4 micras, en gemación y formandoseudomicelios (*Figura 2-C*). En inoculación a 48 h la formación deseudomicelios es mayor, así como la cantidad de blastoconidios en gemación, en comparación con la muestra a 24 h (*Figura 3-C*).

No hubo diferencia estadísticamente significativa en la adherencia entre los tres sistemas de procesamiento en el estudio, el único sistema que muestra una diferencia significativa es Acron entre 24 y 48 h (t Student $p < 0.05$ PM 24 h vs PM 48 h), el cual demuestra un aumento en el número de blastoconidios adheridos de 24 a 48 h.

Los promedios de blastoconidios adheridos al PMMA en las tres técnicas de procesamiento y a los dos

tiempos de inoculación se presentan en el *cuadro 1* y se resumen en la *figura 4*. La variación en el número de blastoconidios adheridos en el TPI y ATPI de 24 a 48 h no es significativa. El sistema de PM presenta una variación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos de 24 y 48 h, t Student $p < 0.05$ PM 24 h vs PM 48 h (*Figura 4*).

DISCUSIÓN

La fase temprana de la colonización comienza por los factores intrínsecos fisicoquímicos de las propiedades superficiales de la resina acrílica y los mecanismos activo y pasivo de la adhesión microbiana, este estudio analizó la adhesión y sus características desde el punto de vista de la colonización sobre el PMMA procesado con tres diferentes técnicas.

En este análisis fue posible observar las características de la adherencia de *Candida albicans* a la superficie del PMMA procesado con tres diferentes técnicas y en dos periodos de tiempo de 24 y 48 horas. Estas características son: el número de blastoconidios adheridos, su morfología, la formación deseudomicelio, reproducción y colonización sobre el PMMA, así como la superficie de dicho material mediante el uso del microscopio electrónico de barrido. De acuerdo con investigaciones previas realizadas por Waltimo, Ramaje²¹ y Gordon,²⁷ coincidimos en la capacidad de adherencia y colonización de *Candida albicans* al PMMA en ausencia de proteínas específicas de la saliva y de coagregación con otros microorganismos.

Las biopelículas se definen como comunidades microbianas estructuradas que se encuentran unidas a una superficie mediante una matriz de material exopolimérico.²⁷ Según ciclos biológicos propuestos por diversos autores^{27,28} *Candida albicans* forma una biopelícula bien establecida que incluye blastoconidios,seudohifas e hifas verdaderas de estado maduro. Nuestros resultados demuestran que la biopelícula formada en estos periodos de tiempo consta únicamente de blastoconidios y de acuerdo con el mismo autor²⁷ el dimorfismo por sí solo no es un requisito previo absoluto para la formación de la biopelícula.

En estudios previos de adherencia de *Candida albicans* al PMMA realizados por Chandra et al,²⁸ se observó que este microorganismo a partir de las 11 h de inoculación, empieza a aglutinarse en las áreas irregulares de la resina acrílica, lo cual crea reservorios protegidos para el hongo. Nosotros coincidimos con estos resultados, pues se observó principalmente en las muestras procesadas con la técnica de auto y termo-polimerizado y polimerizado mediante microondas que *Candida albicans* se aglutina y reproduce en los

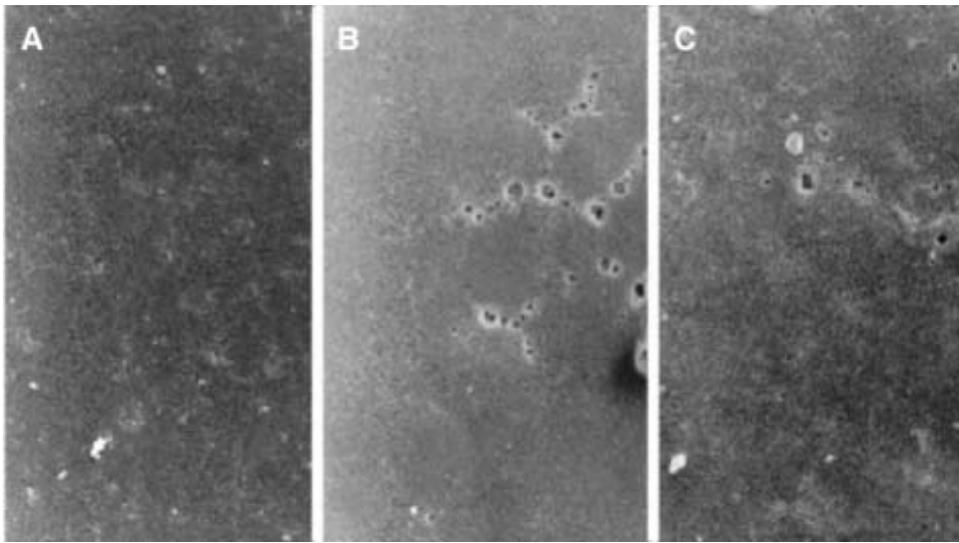


Figura 1. Diferencias de la superficie de la resina acrílica a base de polimetilmetacrilato procesada con tres diferentes técnicas, MEB 600x. **A)** Termo-polimerizado con inyección, **B)** Auto y termo-polimerizado con inyección, **C)** Polimerizado mediante microondas.

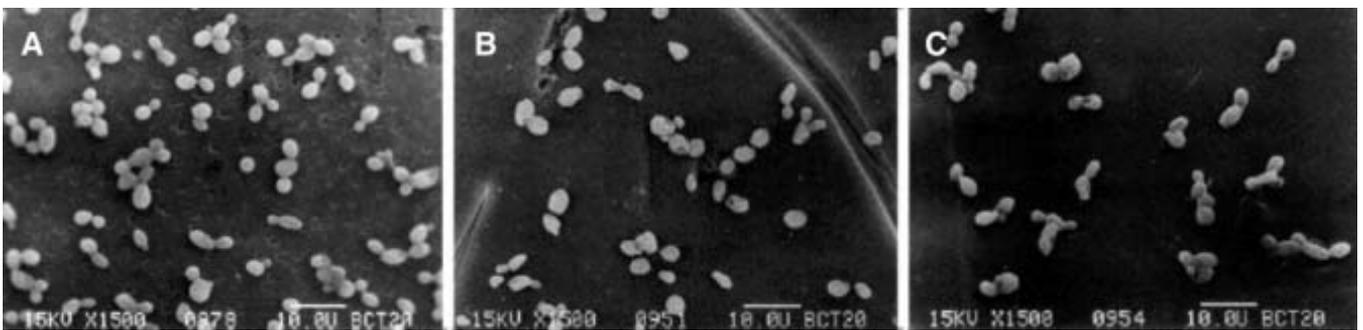


Figura 2. Diferencias en la adherencia de *Candida albicans* en muestras de resina acrílica a 24 horas de inoculación, MEB 1,500x. **A)** Termo-polimerizado con inyección, **B)** Auto y termo-polimerizado con inyección, **C)** Polimerizado mediante microondas

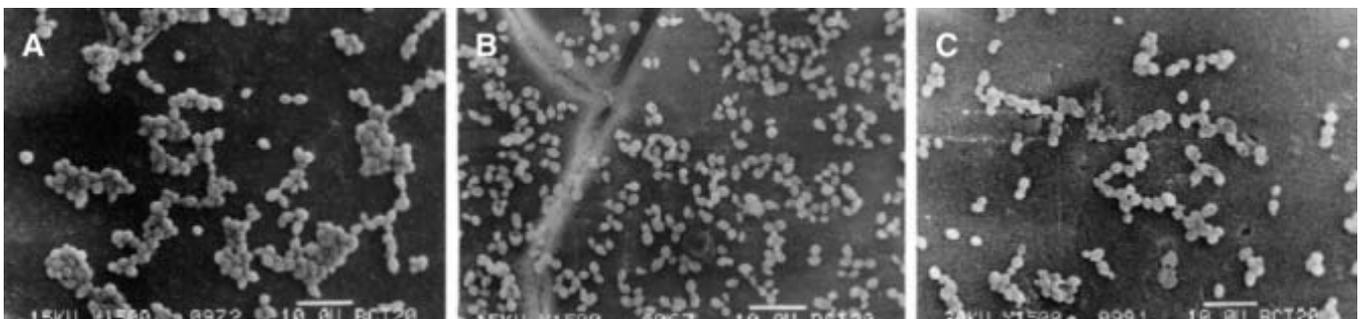


Figura 3. Diferencias en la adherencia de *Candida albicans* en muestras de resina acrílica a 48 horas de inoculación, MEB 1,500x. **A)** Termo-polimerizado con inyección, **B)** Auto y termo-polimerizado con inyección, **C)** Polimerizado mediante microondas.

defectos de estas superficies a las 24 y 48 h de inoculación.

No hubo diferencia estadísticamente significativa en la adherencia entre los tres sistemas de procesado

en el estudio, el único sistema que muestra una diferencia significativa es Acron entre 24 y 48 h (t Student $p < 0.05$ PM 24 h vs PM 48 h), el cual demuestra un aumento en el número de blastoconidios adheridos de

Cuadro I. Promedio de blastoconidios adheridos al PMMA en las tres técnicas de procesado.

Procesado	Promedio
TPI 24 h	106.3
TPI 48 h	265.6
ATPI 24 h	197.3
ATPI 48 h	208.6
PM 24 h	71
PM 48 h	213.6

24 a 48 h. Para haber logrado un resultado con diferencias estadísticamente significativas, en este caso, se tendría que aumentar el número de muestra y tiempos de inoculación para valorar estadísticamente, ya que los estudios previos^{14,22,27} estaban diseñados para valorar la adherencia del microorganismos sobre un solo tipo de muestra a diferentes tiempos, y en este trabajo se observó la adherencia en tres diferentes muestras a dos tiempos.

En concordancia con otros autores,^{13,14,22,25,27} es de señalar la importancia del estudio de las biopelículas formadas por *Candida albicans* mediante el uso del MEB. Ya que actualmente es un método sumamente confiable, práctico y valioso que permite observar la superficie del espécimen, así como la arquitectura de las comunidades microbianas que en ella se establecen.

CONCLUSIONES

La superficie del PMMA y la forma en que *Candida albicans* se adhiere a este material es diferente según la técnica de procesado empleada en su elaboración.

De acuerdo con los resultados de este estudio de las tres técnicas utilizadas, el termo-polimerizado con inyección presenta la superficie más uniforme y con menos defectos. El número de blastoconidios adheridos de 24 a 48 h de inoculación no es estadísticamente significativo y no se observa un aumento en el crecimiento ni reproducción del microorganismo.

En la técnica de auto y termo-polimerizado, se presenta una superficie irregular con amplias grietas y defectos. Se observó que *Candida albicans* aloja en estos defectos, sin embargo el número de blastoconidios adheridos no es estadísticamente significativo de 24 a 48 h.

En el polimerizado mediante microondas, hay un aumento estadístico en el número de blastoconidios adheridos entre 24 y 48 h de inoculación, lo que indica un crecimiento exponencial entre estos periodos de tiempo.

Diferencia en la adherencia de *Candida albicans* al PMMA procesado con tres diferentes técnicas

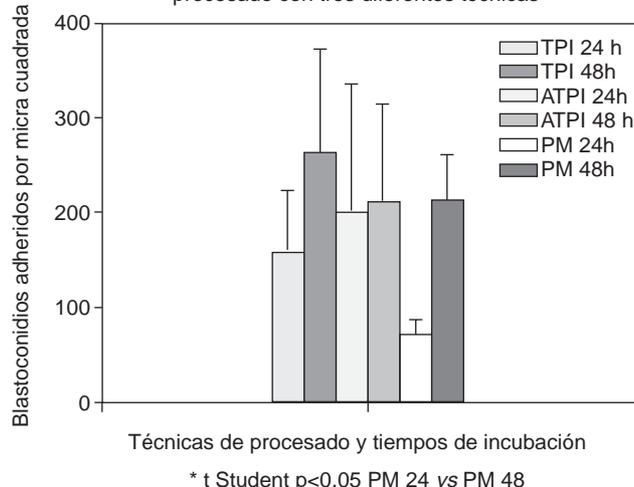


Figura 4. Promedios de blastoconidios adheridos a la superficie de la resina acrílica de polimetilmetacrilato en las tres técnicas de procesado y a dos tiempos de inoculación.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Micología Médica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER, en el cual se llevó a cabo el desarrollo microbiológico de este estudio y al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM en donde se realizó el análisis mediante el Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM35CF.

REFERENCIAS

1. Nikawa H, Samaranayake L. Effects on dietary sugars and saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycopath* 1997; 139: 87-91.
2. Verran J, Christopher M. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997; 77: 535-539.
3. Nikawa H, Taizo H. Binding of salivary or serum proteins to *Candida albicans* in vitro. *Archs Oral Biol* 1990; 35: 571-573.
4. Nikawa H, Taizo H. Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans* in vitro. Part I Effects on fungal growth. *J Oral Rehabil* 2000; 27: 41-51.
5. Edgerton M, Scannapiego F. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infect Immun* 1993; 61: 2644-2652.
6. Radford D, Challacombe S. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to Denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 99-116.
7. Cannon R, Holmes A. Oral *Candida*, Clearance. Colonization, or Candidiasis? *J Dent Res* 1995; 4: 1152-1161.
8. Vitkov L, Lugstein A. Glycaemic disorders in denture stomatitis. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 406-409.
9. Gibbons R, Turck D. Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infectious diseases. *J Dent Res* 1989; 68: 750-760.

10. Monsenego P. Presence of microorganisms on the fitting denture complete surface: study *in vivo*. *J Oral Rehabil* 2000; 27: 708-713.
11. Anusavice 1999. *La ciencia de los materiales dentales de Phillips*. Editorial McGraw-Hill, 10ª Edición. 1999: 3-7, 219-270.
12. Nikawa H, Taizo H. Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans* *in vitro*: Part II Effects on fungal growth. *J Oral Rehabil* 2000; 27: 124-130.
13. Nikawa H, Egusa H. Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacterial by dietary sugars. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 279-284.
14. Waltimo T, Johanna T. Adherence of *Candida albicans* to the surface of polymethylmethacrylate-e glass fiber composite used in dentures. *Int J Prosthodont* 1999; 12: 83-86.
15. Scully C, Samaranayake L. *Candida* and oral Candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994; 5: 125-157.
16. Nevelainen M, Nari T. Oral mucosal lesions and oral hygiene habits in the home-living elderly. *J Oral Rehabil* 1997; 24: 332-337.
17. Dorey J, Bruce B. Oral mucosal disorders in denture wearers. *J Prosthet Dent* 1985; 53: 210-213.
18. Kagermeier-Callaway A, Willershausen B. *In vitro* colonization of acrylic resin denture base materials by *Streptococcus oralis* and *Actinomyces viscosus*. *Int Dent J* 2000; 50: 79-85.
19. Liébana UJ. *Microbiología oral*. 2da Edición. España: Editorial McGraw-Hill, 2002.
20. Palle H, Tony A. Classification and clinical manifestations of oral yeast infection. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 57-60.
21. Waltimo T, Tanner J. Adherence of *Candida albicans* to the surface of polymethylmethacrylate-E glass fiber composite used in dentures. *Int J Prosthodont* 1999; 12: 83-86.
22. Adam B, Baillie GS. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 2002; 51: 344-349.
23. Nikawa H, Taizo H. Denture Plaque-past and recent concerns. *J Dent* 1998; 26: 299-304.
24. Webb B, Thomas C. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review Part 2 Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J* 1998; 43: 160-166.
25. Okita N, Orstavik D. *In vitro* and *in vivo* studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. *Dent Mater* 1991; 7: 155-160.
26. Jenkinson H, Raíz C. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other Streptococci with *Candida albicans*. *Infect Immun* 1990; 58: 1429-1436.
27. Gordon R, Stephen SP. Biofilm of *Candida albicans*. A update. *Eukaryotic Cell* 2005; 4(4): 633-638.
28. Chandra J. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology* 2001; 183(18): 5385-5394.

Dirección para correspondencia:

C.D. Enrique Romo Arévalo

Laboratorio Interdisciplinario de Prosthodontia Total.

Facultad de Odontología.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Ciudad Universitaria, México D.F. México.

Tel: 5693-8236

E-mail: dr_roaren@yahoo.com.mx