

ADHERENCIA DE LA CANDIDA ALBICANS A LAS PROTESIS DE ACRILICO UTILIZADAS EN NUESTRO MEDIO.*

Valencia B. Sol Beatriz **

PALABRAS CLAVES: *Candidiasis, Adherencia*

INTRODUCCION:

La candidiasis es una lesión común en pacientes portadores de prótesis dentales, habiéndose demostrado que el material de las prótesis tiene tendencia a infectarse con levaduras del género *Candida* (Gruber y col. 1966). A su vez, las condiciones del medio en el que se encuentra el acrílico y las características del huésped, influyen en dicha adhesión (McCourtie, J. y Douglas, L.J., 1984) (Staford G.D. y Russell, C., 1971).

El género *Candida* incluye un amplio grupo de levaduras que causan la candidiasis, entidad que incluye muchas formas clínicas. El agente etiológico más importante es la *Candida albicans*, esta levadura hace parte de la flora normal de la cavidad oral, tracto gastro-intestinal y tracto genital femenino, se le observa también en piel periorificial (Kennedy, M.J., 1988). En los sitios mencionados anteriormente el microorganismo se encuentra en un número limitado y es sólo demostrable por medio de cultivos.

Hay ciertos factores predisponentes que producen un incremento en la concentración de la levadura en las mucosas lo que da lugar a la producción de enfermedad local o sistémica, esta última por diseminación a través de la vía hematogena (Thomas y col. 1979 y Kennedy, M.J., 1988).

Para que un microorganismo produzca enfermedad debe ser capaz de invadir los tejidos, siendo el primer paso la adherencia. El término adherencia debe usarse para describir aquel proceso por el cual la levadura se adhiere de manera estable e irreversible a las superficies (Kennedy, M.J., 1988).

En varios estudios realizados en la última década está bien demostrada la habilidad de la *C.albicans* para adherirse a las células de las mucosas del huésped, factor importante en la patogénesis de muchas infecciones bacterianas y micóticas, entre ellas la candidiasis (Thomas y col. 1979 y Kennedy, M.J., 1988). La inoculación de los adhesivos usados en prótesis dentales con *C.albicans* da lugar al crecimiento de la levadura con la formación de hifas, situación que expresa la patogenicidad y que no existe en condiciones normales en la mucosa oral (Lucatorto y Molnar 1966). También se ha observado adhesión de la *C.albicans* en muchas superficies acrílicas y utilizadas en prótesis orales, esofágicas y en catéteres (Kennedy, M.J., 1988; Samaranayake, L.P. y MacFarlane, T.W. 1980, a). La adherencia de la *C.albicans* a las superficies acrílicas de las prótesis juega papel importante en la estomatitis por prótesis dental, mecanismo que se ve favorecido por concentraciones altas de azúcar (McCourtie, J. y Douglas, L.P., 1984, a; Staford, G.D. y Russell, C., 1971; Samaranayake, L.P. y MacFarlane, T.W., 1980). Dado que en Colombia no existen informes previos sobre la adherencia de la *C.albicans* a los acrílicos empleados para prótesis se propuso estudiar comparativamente dos tipos de acrílicos, ambos termocurables para determinar la adherencia de la levadura a tales materiales.

MATERIALES Y METODOS:

Selección de cepas de levadura para el trabajo

Se tomaron muestras de 18 pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de candidiasis, como sigue: 8 pacientes con candidiasis oral y los 10 restantes con candidiasis en piel, uñas y flujo vaginal. Con el fin de aislar *Cándida*, se realizó un raspado en el área afectada, cultivando el material así obtenido en Agar-Sabouraud y Mycosel. Para la clasificación de las levaduras se realizaron pruebas fisiológicas como la

* Investigación para optar el título de Odontóloga en el Instituto de Ciencias de la Salud, CES. Realizada en la Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB.

** Odontóloga CES 1988.

producción del tubo germinal (Fig. 1) prueba específica para *C.albicans* y la prueba de asimilación de azúcares (Fig. 2). Para la experimentación se empleó una cepa escogida al azar de *C.Albicans* aislada de mucosa oral; para su mantenimiento se repicó en tubos con Agar-Sabouraud cada 15 días y para cada uno de los experimentos se emplearon cultivos de 48 horas de crecimiento disponiéndose así de levaduras jóvenes en igual fase de crecimiento.



FIGURA # 1

Prueba fisiológica, ésta es específica para *C.albicans*. Obsérvese la producción del tubo germinal, vista la mezcla en un microscopio de luz.

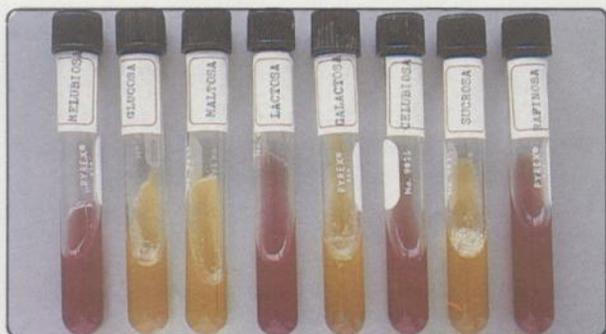


FIGURA # 2

Prueba de asimilación de azúcares, este patrón, corresponde a *Cándida albicans*. El carbohidrato asimilado se torna amarillo considerando positivo y es negativo aquel que no sufre variación de su color púrpura original.

Obtención de las placas de acrílico termocurable.

Se escogieron dos tipos de acrílicos, ambos termocurables. El acrílico "A" de fabricación nacional y el "B" de fabricación norteamericana. Se confeccionaron laminillas de 2.6 centímetros de largo, 1.1 centímetros de ancho y un espesor de 0.1 centímetro (Fig. 3); se siguió el mismo procedimiento que se utiliza para la elaboración de una prótesis total.



FIGURA # 3

Placas de acrílicos termocurables de 2.6 cms de largo, 1.1 cms de ancho y 0.1 cms de espesor.

Determinación de la esterilidad del acrílico

Para comprobar que el acrílico de las prótesis está libre de microorganismos se cultivaron estos materiales en Agar-Sabouraud y se observaron durante 96 horas. Una vez comprobado que los acrílicos estaban estériles, se consideraron aptos para proceder a la inoculación con *C.albicans*.

Determinación de la adherencia de la *Cándida albicans* al acrílico

Para comprobar la existencia de dicha adherencia fue necesario idear un método diferente al usual de tinción, dada la opacidad de la muestra y que permitiera establecer parámetros que asegurasen la reproducibilidad y confiabilidad de la investigación (Fig. 4.1 y 4.2). Para ello se sumergió en suspensiones de la cepa anteriormente descrita y a concentraciones de 1.4×10^3 cel/ml, 1.4×10^2 cel/ml y 1.4×10 cel/ml; la incubación se hizo en lapsos de tiempo variables desde 15 hasta 90 minutos (Fig 5.). Una vez transcurrió el tiempo de incubación, las placas de acrílico fueron sacadas de la suspensión y lavadas tres veces con PBS (Ph 7.2) estéril durante 5 minutos cada vez. Esto con el fin de eliminar las levaduras no adheridas a las placas.

Realización de la siembra para el recuento de colonias

Se diseñó un método que permitiera el recuento preciso e individual del número de *C.albicans* adheridas a las placas de acrílico. Este consistió en imprimir en un medio de cultivo (Agar-Saboraud) seis huellas consecutivas con cada placa de acrílico, ejerciendo cierta presión sobre el medio y conservando un orden preciso (Fig. 4).

Lectura de los cultivos

A las 48 horas de marcadas las huellas, se hizo el recuento del número de colonias que hubieran crecido en el sitio correspondiente a cada huella.

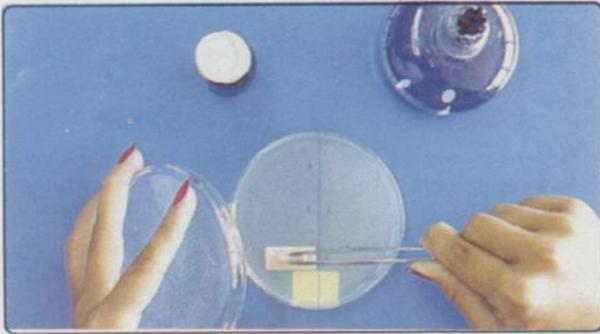


FIGURA # 4.1

Método que se diseñó para poder hacer una evaluación de la adherencia de la *C.albicans* al acrílico, consiste en imprimir sobre el Agar-Sabouraud seis huellas con cada placa de acrílico.

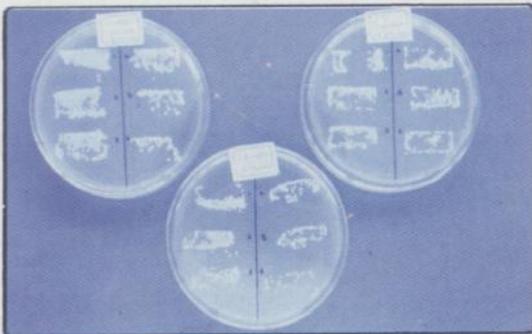


FIGURA # 4.2

48 horas después de realizadas las huellas sobre el medio de cultivo para proceder al recuento de colonias adheridas por huella.

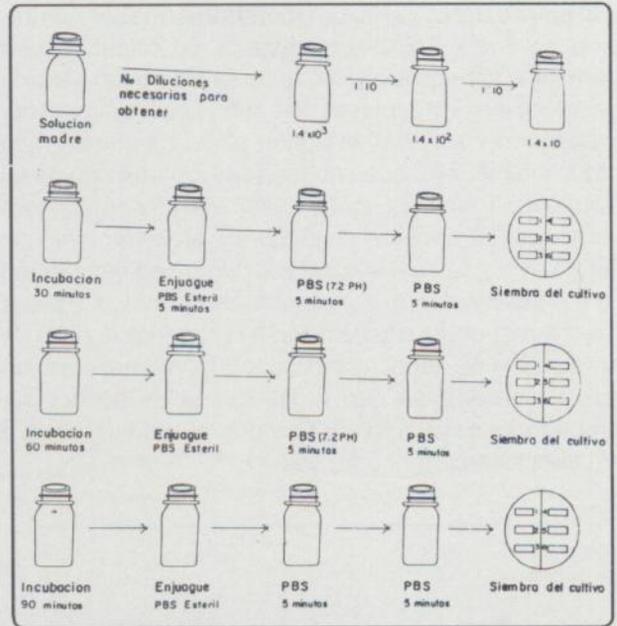


FIGURA # 5

Con cada solución (1.4×10^3 cel/ml, 1.4×10^2 cel/ml y 1.4×10^1 cel/ml) se realizó con los tres tiempos de incubación siguiendo el mismo procedimiento. Después del tiempo de incubación se realizan los tres enjuagues con PBS estéril durante 5 minutos cada uno. Posteriormente se realizó la siembra de los cultivos.

ESTUDIOS DEL EFECTO DE LOS LIQUIDOS INHIBIDORES SOBRE LA ADHERENCIA DE LA CANDIDA ALBICANS EN LAS PROTESIS DE ACRILICO

Se utilizó la misma cepa de *C.albicans* con cultivos de 48 horas de realizado su repique.

Líquidos inhibidores utilizados

Se emplearon las siguientes sustancias:

- 1) Hipoclorito de Sodio, conocido comercialmente como Clor-dental antiséptico (Laboratorio Centroquímico Medellín).
- 2) Cloruro de Benzalconio, con nombre comercial de Neobac (Neobac Colombiana Ltda.).
- 3) Agua Bicarbonatada.

Se sumergieron las placas en estas sustancias durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron

con agua estéril y luego se incubaron a una concentración de 1.4×10^2 cel/ml durante 60 minutos para permitir la adherencia. Para esto se diseñó un método en el que se inocularan los dos tipos de acrílico, procesando simultáneamente placas tratadas con algún inhibidor y placas no tratadas, obteniendo de tal forma que todos los acrílicos estuvieran sometidos a las mismas variables (Fig. 6). El procedimiento se siguió según la numeración y el tiempo de incubación se contabilizó desde el momento de introducir la placa que correspondía a la posición A1 (placa de acrílico de producción nacional tratada con algún líquido inhibidor) y se continúa con la B2 (placa de acrílico de producción extranjera tratada con algún inhibidor) y así sucesivamente hasta B20.

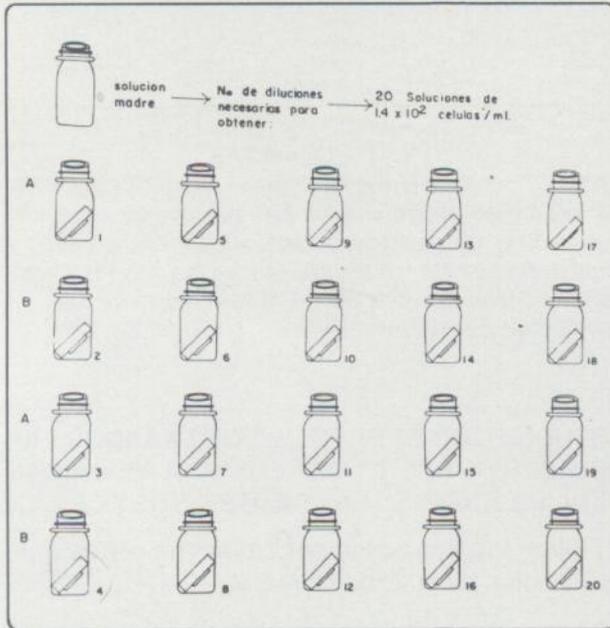


FIGURA # 6

Esquema del diseño de experimentación para la incubación de las placas de acrílico (A y B) en una solución de 1.4×10^2 cel/ml. Las dos primeras hileras corresponden a las placas de acrílico tratadas con algún líquido inhibidor. Las dos restantes corresponden a las placas de acrílico no tratadas, o sea grupos controles. Esta secuencia se realizó de forma rigurosa siguiendo la numeración para involucrar todas las variables estudiadas; siempre comenzando por la A1, siguiendo por la B2 y así sucesivamente hasta la B20 para la incubación de cada una de las placas de acrílico.

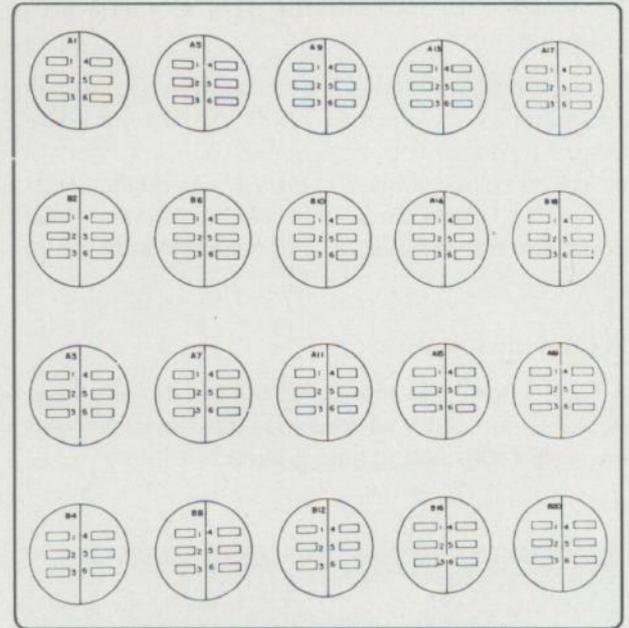


FIGURA # 7

La forma de realizar los cultivos correspondientes al diseño de experimentación respetando siempre su orden, comenzando desde la A1 y realizando con esta las seis huellas correspondientes a él continuando con la B2 y así sucesivamente hasta la B20. De esta forma están listas para realizar el conteo del número de colonias adheridas por huella en cada uno de los cultivos.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS, conservando el mismo orden. Luego se sembraron las placas en el medio de cultivo (Agar-Sabouraud), realizando con cada una de las placas 6 huellas (Fig. 7). Posteriormente (48 horas después de realizadas las huellas), se contaron las colonias por huella. En esta forma se realizaron dos series de huellas por cada inhibidor.

Para el análisis estadístico se utilizó el Test de Student con un 95% de confiabilidad siendo los hallazgos significantes cuando p es menor o igual a 0.005.

RESULTADOS:

El primer resultado importante fue comprobar que el acrílico de las prótesis estaba libre de microorganismos.

Se observó que las placas controles presentaban recuentos de colonias muy semejantes en todos los experimentos y para cada tipo de acrílico (Tabla 1 y 2). Además se observó una adherencia inferior al acrílico de fabricación norteamericana, pero no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre un acrílico y otro. Como era de esperarse, los recuentos de colonias fueron mayores en la huella 1; las huellas restantes produjeron menor número de colonias. De los tres productos utilizados como inhibidores, uno (el

agua bicarbonatada) no ejerció ningún efecto sobre el control de la adherencia, se encontró una diferencia estadísticamente significativa, con un efecto inverso al esperado (Tabla 1 y 2). En efecto, los recuentos de colonias en las placas tratadas con este producto fueron aún superiores a los de las placas controles, este hallazgo se observó en las dos primeras huellas pero no en las restantes. Además los recuentos de las placas en agua bicarbonatada fueron los más altos de todo el grupo, en todas las huellas.

TABLA # 1

PLACAS DE ACRILICO "A" TRADADAS VS. CONTROLADAS CON DIFERENTES AGENTES INHIBIDORES Y LOS RECUEENTOS DE COLONIAS

ACRILICO "A"	CLORURO DE BENZALCONIO	HIPOCLORITO DE SODIO	AGUA BICARBONATADA
PLACAS TRATADAS	32.88	2.22	72.00
VRS			
PLACAS CONTROL	32.77	32.44	33.77
P	.4956	.0000033	.0004

TABLA # 2

PLACAS DE ACRILICO "B" TRADADAS VS. CONTROLADAS CON DIFERENTES AGENTES INHIBIDORES Y LOS RECUEENTOS DE COLONIAS

ACRILICO "B"	CLORURO DE BENZALCONIO	HIPOCLORITO DE SODIO	AGUA BICARBONATADA
PLACAS TRATADAS	8.88	1.44	46.55
VRS			
PLACAS CONTROL	24.00	22.33	22.77
P	.004	.00005	.001

Con respecto a los restantes productos, se observó que el Hipoclorito de Sodio fue el agente que más redujo la adherencia a ambos acrílicos. El número de colonias adheridas a las placas fue inferior al 6.9% de aquellas adheridas a las placas control, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en ambos acrílicos con valores de p muy inferiores a 0.005 (Tablas 1 y 2).

En caso del Cloruro de Benzalconio, la diferencia entre las placas controles y las tratadas, no fue significativa en el caso del acrílico nacional, (Tabla 1). En cambio en el acrílico "B", el recuento de colonias fue menor, con un valor de $p=0.004$ (Tabla 2). Durante todos los experimentos el acrílico "B" presentó una menor adherencia que el "A", pero tal diferencia no fue significativa estadísticamente.

DISCUSION:

El primer resultado de la investigación fue comprobar la esterilidad del acrílico, de lo que no se tenía información previa; parece importante saber que las prótesis hechas con tal elemento no son portadoras de microorganismos en el momento de instalarse en la boca del paciente.

Se comprobó que *C.albicans* se adhería al acrílico de las prótesis y esto está de acuerdo con Samaranayake y col. (1980), quienes consideraban las prótesis como un reservorio de infección. Es así como también Lyon notó que en varios pacientes ocurría crecimiento de *Candida* en la prótesis más que en las mucosas, dato que fue confirmado por Davenport (1970). Por último McCourtie y Douglas (1984), realizaron estudios don-

de concluyeron que existe un crecimiento similar, tanto en las prótesis de acrílico como en las células epiteliales. Los resultados confirmaron que *C.albicans* se adhiere fácilmente al acrílico ya que en las placas de este material que no fueron tratadas, el promedio de colonias adheridas fue de 30 para la huella 1.

La incorporación de fungicidas al material o la inmersión periódica de la prótesis en una solución limpiadora o fungicida no es completamente exitoso, ya que no hay inhibición del crecimiento de la levadura (Masellan y Dolan 1975). Como se observó en esta investigación, el agua bicarbonatada no mostró ningún efecto inhibitorio y el Cloruro de Benzalconio presentó una baja inhibición en el acrílico de producción extranjera y ningún efecto en el de producción nacional.

Algunos agentes tales como agua a 60°C, Cloruro de Benzalconio, Glutaldehído, Hipoclorito de Sodio y el Undecilinato de Zinc, agentes limpiadores, destruyen colonias de *C.albicans* en 15 minutos, considerándose su empleo como una medida efectiva para evitar el crecimiento de la levadura en las prótesis dentales (Masella y Dolan 1975; Devenport 1970). De las tres sustancias estudiadas en esta investigación solo el Hipoclorito de Sodio mostró ser eficaz en el control de dicha adherencia.

Por último, el método diseñado y utilizado para la realización de esta investigación resultó ser efectivo para el estudio de la adherencia de la *Candida albicans* al acrílico de las prótesis orales.

Además se observó que los controles proporcionaban recuentos muy similares y por lo tanto, el experimento es altamente reproducible y los hallazgos confiables.

BIBLIOGRAFIA

Chattaway, F.W. Bishop, R. Holmes, M.R. Odds, F.C. Barlow Aje: Enzyme activities associated with carbohydrate sybthesis and myceliae forms of *Candida Albicans*, *J. Gen microbiol* 75-97-109, 1973.

Cabib, E., Roberts, R. Bowers, B.: Syntehsis of yeast cell wal and its regulation. *Ann Rev. Biochem* 51: 763-793, 1982.

Davenport, J.C.: The oral distribution of *Candida* in denture Stomatitis. *Br. Dent* 129: 151-156, 1970.

Epstein, J.B. Truelove, E.L. and Izutzu. K.T. oral Candidiasis: pathogenesis and host defense. *Reviews of infectious Diseases* 6, 96-106, 1984.

Fisher, B.M. Lamey, P.J., Sumaranayake, L.P., Macferlane T.W., Frier, B.M., carriage of *Candida* species in the oral cavity in diabetic patients: Relationship to glicemic control *J. oral Pathology* 16: 282-284, 1987.

- Gruber, R.G., Lucatoro, F.M., Molnar, E. Fungus Groth on Tissue conditions of soft denture liners. *J. Am. Dent. Assoc.* 73: 641-644, 1966.
- Howlett, J.A., Squier, C.A. (a): *Candida Albicans* Ultrastructure colonization and invasion of oral epithelium. *Infect immun* 29:252-260, 1980.
- Howlett, J.A. (b): The infection of rat tongue mucosa in vitro with five species of *Candida*. *J. Med microbiol*: 309-316, 1976.
- Kennedy, M.J. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. In Mc Ginnis (ed) current topics in medical mycology volumen 2. New York, Springer Verlag pp 73-169, 1988.
- Kimura, L.H. pearsall, N.N. relationship between Germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infec immun* 28:464-468, 1980.
- Klotz, S.A. Drutz, D.J. Zajic, J.E.: Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect immun* 50: 97-101, 1985.
- Lee, J.C., King, R.D.: Characterization of *Candida albicans* adherence to human vaginal epithelial celsss in vitro. *Infect immun* 41: 12024-1030, 1983.
- Mahieu, H.F. Rosingh, H.J., Schutte, H.K. *Candida* vegetations on silicone prosthesis. *Arch. Otolarygol head Neck surg.* 112-321-325, 1986.
- Masella, R.P., Dolan, Ct. The prevention of the growth of *Candida* on silastic 390 soft liner on dentures. *J. Prosthet. Dent.* 33.250-257, 1975.
- Mc Courtie, J. and Douglas, L.J. (a), relationship between. Sell surface composition, adherence and virulance of *Candida Albicans*, *infect immun* 45.6-12, 1984.
- Mc Courtie, J. and Douglas, L.J. (b), relationship between cell surface composition of *Candida Albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect immun* 32.1234-1241. 1981.
- Miyake, Y. Fujita, Y., Minagi, S., Suginaka, H.: Surface hydrophobicity and adherence of *Candida* to Acrylic surface. *Microbios*: 46.7-14, 1986.
- Poulain, D., Tronchin, G., Dubremetz, J.F., Bigvet, J: Ultraestructure of the cell wall of *Candida Albicans* blastospores. Study of its constitutive layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides. *And Microbiol* 129.141-153, 1978.
- Robbin, S.L., *Candidiasis (Monoliasis)*. *Patología Humana*. Cap. 13.414,3. Edición Interamericana, México 1985.
- Sandin, R.L. Rogers, A.L., Fernández, M.I. and Beneke, E.S. (a), variations in affinity to *Candida Albicans* in vitro among human buccal epithelial cells. *J. Med. Microbio.* 24:151-155, 1987.
- Sandin, R.L., Rogers, A.L., Patterson, R.J. and Beneke, E.S. (b), Evidence for Mannose Mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells in vitro. *Infect Immun.* 35:79-95, 1982.
- Segal, E., Lehrer, N., Ofek, I. Adherence of *Candida Albicans* to human vaginal epithelial cells: inhibition by amino sugars. *Expl. cell. Biol.* 50, 13-17, 1982.
- Samaranayake, L.P., and Macfarlane, T.W. (a): An in vitro study of the adherence of *Cándida albicans* to acrylic surface. *Arch. Biol.* 25:603-609, 1980.
- Samaranayake, L.P., Mc Courtie, J., Macfarlane, T.W. (b): Factors affecting the in vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surface. *Arch. Oral. Biol.* 25:611-615, 1980
- Sheldon, W. *Prostodoncia total*. 33:649, 1982. Interamericana.
- Status Reports on enamel bonding of composite, preformen Laminate and laboratory fabricated resin veneers.
- Council on dental materials, instruments and equipment. *J. Am. Dental Assoc.* 109:762-764, 1984.
- Stafford, G.D. and Russell, C. Efficiency of dentadure adhesives and their influence on oral microorganismos. *J. Dent. Res.* 50:832-836-1971.
- Tobgi, R.S. Samaranayake, L.P. and MacFarlane, T.W. Adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells exposed to chorhexidine gluconate. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 25: 355:338, 1987.
- Thomas, B., Fitzpatrick, Eisen, A. Klaus Wolff, Frøedberg, I., and Austen, K.F. *Dermatology in general medicine*. 2 edicion Mc Graw Hill Company. New York 838. 1979.
- Wilborn, W.H. Montes, L.F. Scanning electron microscopy of oral lesions in chronic mucocutaneous candidiasis. *Jama* 244: 2294-2297, 1980.
- Woelfedl, J.B. Newer materials and techniques in prothetic resin materials. *Dent Clinic North America* 15: 67-79, 79, 1971.