



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LA ADHERENCIA IN VITRO  
DE *Candida albicans* EN RESINA ACRÍLICA UTILIZADA PARA  
BASES DE DENTADURAS PROCESADAS CON TRES  
DIFERENTES TÉCNICAS.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O D E N T I S T A**

**P R E S E N T A :**

**ENRIQUE ROMO ARÉVALO**

**DIRECTOR: Mtro. Víctor Moreno Maldonado**  
**ASESORES: M.C. Silvia Antuna Bizarro**  
**Q.B.P. Bertha Muñoz Hernández**  
**Dra. Teresa Fortoul Van Der Goes**

MÉXICO D. F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres **Enrique y Patricia**, por su apoyo incondicional y ser un gran ejemplo en mi vida.

A mi **Familia**, pues siempre he tenido su ayuda y muestras de cariño.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por haberme dado la oportunidad de ingresar a sus aulas

A la **Facultad de Odontología UNAM**, por formarme como profesionista y al **Mtro. Víctor Moreno Maldonado** que ha compartido su amistad y conocimientos conmigo.

Al **Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina UNAM** y a la **Dra. Teresa Fortoul Van Der Goes** que me abrieron las puertas para poder realizar la observación con el Microscopio Electrónico de Barrido.

A la **Dra. Silvia Antuna**, pues me ha compartido su amistad, profesionalismo, conocimientos y que me ha demostrado que todo en esta vida se tiene que hacer bien.

Al **Departamento de Investigación en Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias** y a la **Dra. Maria Eugenia Manjarrez** que me abrieron las puertas para realizar ahí el desarrollo microbiológico de este estudio.

A la **Q.B.P. Bertha Muñoz**, por su amistad y conocimientos, los cuales contribuyeron para este estudio.

Agradezco al **Sr. Francisco Pasos Nájera** por la realización fotográfica del estudio de Microscopia Electrónica.

A mis **Amigos** del laboratorio de prostodoncia y del INER, por su amistad, por hacer divertido el tiempo en el laboratorio y porque de todos aprendí mucho y tengo grandes recuerdos.

# INDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	2
<b>Marco Teórico</b>	5
<i>Candida albicans</i>	
Taxonomía	5
Morfología	6
Factores de Patogenicidad.	9
Componentes estructurales.	9
Mecanismos de Adherencia.	12
Mecanismos de invasión a tejidos.	16
Estomatitis Protésica	17
Polimetilmetacrilato.	19
Técnicas de Procesado	
Termo-polimerizado con inyección SR IVOCAP	21
Auto y termo-polimerizado con inyección PALAXPRESS	23
Polimerizado mediante microondas ACRON MC	24
Instrumento utilizado para el estudio de la Adherencia:	
Microscopio electrónico de Reflexión o Scaning.	25
<b>Planteamiento del Problema</b>	27
<b>Justificación</b>	27
<b>Hipótesis</b>	28
<b>Objetivos</b>	28
<b>Material y métodos</b>	29
<b>Resultados</b>	32
<b>Discusión</b>	50
<b>Conclusiones</b>	53
<b>Referencias</b>	54

## **RESUMEN**

Las prótesis dentales parciales o totales están fabricadas generalmente de resina acrílica, material universal, el cual forma una superficie sólida que se encuentra en contacto con la mucosa bucal del paciente portador. Esta superficie presenta defectos, lo cual aunado a factores tanto locales como sistémicos, contribuye a la retención de microorganismos.

En el presente estudio se analizó las características de la adherencia de *Candida albicans* en muestras de resina acrílica usadas para bases de dentaduras, procesadas con tres diferentes técnicas (Termo-polimerizado con inyección Ivocap, Auto y termo-polimerizado con inyección Palaxpress y Polimerizado por microondas Acron). La adherencia del microorganismo se evaluó por medio de microscopia electrónica de barrido.

De los datos obtenidos se compararon: la superficie de la resina acrílica, las características de la adherencia de *Candida albicans* y la cantidad de levaduras adheridas en las tres técnicas de procesado.

## INTRODUCCIÓN

La cavidad bucal se ve afectada por numerosos cambios durante la vida, los microorganismos que en ella habitan como la microbiota habitual, se modifican constantemente dependiendo de múltiples factores que se presentan durante el crecimiento y madurez del individuo<sup>1</sup>. Conforme los dientes se pierden los sitios disponibles para la colonización microbiana, van cambiando, los microorganismos requieren nuevas superficies a las que adherirse para después reproducirse, y son los aparatos protésicos, que sustituyen a los dientes perdidos, los que proporcionan un medio protegido en el cual las bacterias y hongos pueden multiplicarse y cubrir tanto la mucosa bucal como la superficie acrílica de la prótesis.<sup>2-10</sup> La placa microbiana que se forma en la superficie de dichas prótesis esta compuesta esencialmente por levaduras y bacterias. De acuerdo con estudios realizados por Frank & Steven, estos forman una película densa de un grosor de 2 a 6  $\mu\text{m}$ .<sup>8,11,12</sup>

Siempre se ha reconocido que las dentaduras totales proporcionan grandes ventajas estéticas y funcionales al paciente, aunque también ofrecen desventajas importantes, como servir a modo del principal reservorio de los microorganismos<sup>1,7,9</sup>. El colocar una prótesis en la cavidad bucal produce una alteración en las condiciones ambientales, ya que impide el efecto mecánico de limpieza realizado por la lengua y el flujo libre de la saliva que permite la eliminación de los microorganismos, favoreciendo la formación y el depósito de estos, los que se acumulan en forma de biopelículas, tanto en las prótesis como en la mucosa bucal adyacente.<sup>1,11,13,14</sup> Con frecuencia los pacientes portadores de dentaduras presentan úlceras o irritaciones debajo del aparato protésico, originadas tanto por mal ajuste de la prótesis, como por la fragilidad que presenta una mucosa envejecida que hace mas vulnerables a los

tejidos ante las irritaciones mecánicas, como consecuencia de la deshidratación de la mucosa y del adelgazamiento continuo del epitelio a medida que avanza la edad.<sup>13, 15.</sup>

Las prótesis dentales parciales o totales están fabricadas generalmente de resina acrílica (polimetilmetacrilato o PMMA), material universal, el cual forma una superficie sólida que se encuentra en constante contacto con la mucosa bucal del paciente portador.<sup>3, 4.</sup> Esta superficie presenta defectos, lo cual, aunado tanto a factores locales (falta de higiene, trauma local y pérdida de la integridad tisular) y sistémicos (estados de malnutrición, Diabetes mellitus, infección por VIH, alteraciones sanguíneas, antibiótico-terapia prolongada, quimioterapia, radioterapia y xerostomia) contribuyen a la proliferación de *Candida albicans*, y su adherencia en la superficie del aparato protésico. Este microorganismo patógeno oportunista es causante de procesos infecciosos importantes en la cavidad bucal.<sup>1, 4, 10, 12, 14, 16 – 18.</sup> Dentro de estos procesos patológicos se encuentra la estomatitis protésica, esta es una condición patológica eritematosa de la mucosa bucal en pacientes portadores de prótesis, presentándose con mayor frecuencia en mujeres, localizándose preferentemente en la superficie del paladar que se encuentra en contacto con una prótesis dental total.<sup>1, 7, 8, 19, 25 – 28.</sup> Aunque la etiología de la estomatitis protésica es multifactorial, se asume que *Candida albicans* tiene un papel de suma importancia en el inicio, mantenimiento y agravamiento de la enfermedad.<sup>2, 13, 19, 25, 29, 30.</sup>

La técnica de procesamiento utilizada en la elaboración de las dentaduras, así como las características de la superficie del material son importantes y se asocian a la adherencia de microorganismos con la subsiguiente colonización, invasión al material y desarrollo de procesos infecciosos en la mucosa.

El manejo terapéutico de la estomatitis protésica resulta muy complicado debido a su etiología multifactorial, por lo que es de interés estudiar el efecto que pudiera tener la técnica de procesado y las características de la adherencia de *Candida albicans* sobre la resina acrílica.

# MARCO TEÓRICO

## TAXONOMIA

*Candida albicans* se encuentran actualmente clasificada taxonómicamente de la siguiente forma: <sup>38</sup>

**Clase:** *Deuteromycota*

**Subclase:** *Blastomycetes*

**Orden:** *Cryptococcaceae*

**Familia:** *Criptocaceae*

**Género:** *Candida*

**Especie:** *albicans* (como la más frecuente y virulenta)<sup>20-46</sup>

El Género *Candida* comprende más de 150 especies de blastoconidios (levaduras) que no forman esporas, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual por lo que se encuentran dentro de la división *Deuteromycota*.<sup>20</sup>

Es un hongo microscópico, saprofito, patógeno oportunista el cual habita en la mucosa bucal, gastrointestinal, vaginal y piel del humano. La especie *Candida albicans* es la de mas importancia medica, debido a que la mayoría de las micosis que se presentan en el hombre son ocasionadas por este microorganismo.

*Candida albicans* presenta características morfológicas, estructurales, de adhesión y de factores de patogenicidad los cuales están relacionados con su capacidad para producir lesiones.

## MORFOLOGÍA

*Candida albicans* tiene tres formas biológicas y morfológicas. <sup>20, 38, 46, 52.</sup>

1. **Blastoconidio:** es una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras de diámetro en su estado maduro, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie del blastoconidio. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células.

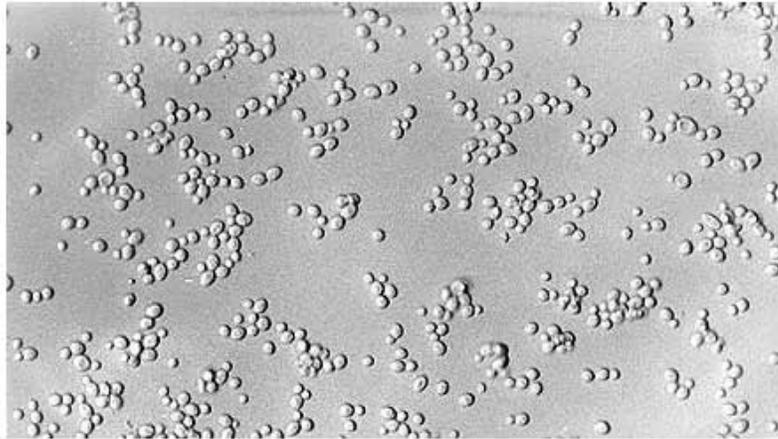


Fig. 1 Blastoconidio de *C. albicans* en caldo de soya tripticasina. 40X



Fig. 2 Blastoconidio en gemación de *C. albicans*, con un septo 100X

2. **Hifas:** es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de levaduras o de hifas existentes, miden de 5 a 15 micrómetros de largo en su estado maduro. Esta crece continuamente por extensión apical inicialmente como tubo germinativo, pseudo-hifa y posteriormente hifa verdadera. Se ha demostrado “in vitro” que varios factores regulan la transición de blastoconidio a hifa, como son temperaturas entre 37° C a 40° C, pH entre 6.5 a 7.0 y la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno, así como dos factores de Trascrición Cph1 y Efg1p.<sup>38, 41, 44, 46, 52</sup>



Fig. 3 Tubo germinativo de *Candida albicans* 100X

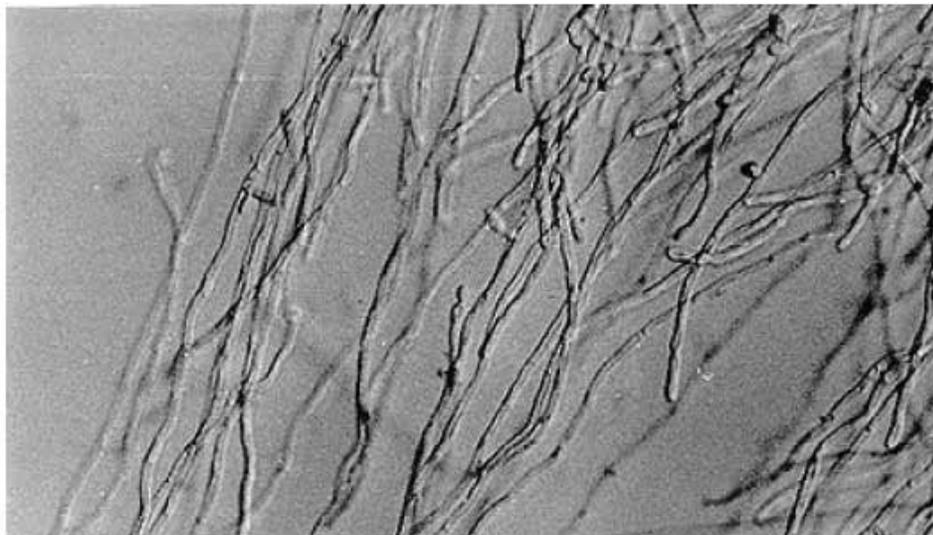


Fig. 4 Grupos de hifas de *Candida albicans* 40X

- 3 **Clamidoconidio:** Son cuerpos celulares grandes de pared gruesa, la cual los protege contra condiciones desfavorables, dicha pared tiene dos capas: la interna de polisacárido y la externa de proteínas. Se presentan cuando se cultivan en medios especiales como el Agar Harina de Maíz; el clamidoconidio tiene un diámetro de 7 a 17 micras en su estado maduro y casi siempre se origina en el extremo del pseudomicelio. Es una importante característica morfológica en la identificación de *C. albicans*.<sup>38, 41, 44, 46, 52</sup>



Fig. 5 Formación de clamidoconidio de *Candida albicans*, en agar harina de maíz 400X.

# FACTORES DE PATOGENICIDAD

## COMPONENTES ESTRUCTURALES

**Pared celular:** es una estructura multilaminada fundamental, ya que es responsable de la forma y protección frente a los cambios osmóticos. En ella se encuentran moléculas que intervienen de forma decisiva en la patogenia de infecciones, antígenos y moléculas que participan en la adhesión del hongo a células de hospedador y a prótesis.<sup>57</sup>

La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos Manano (polímero de manosa), Quitina (polímero de N-acetil glucosamina) y Glucano (polímero de glucosa). Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. El polisacárido manano representa aproximadamente el 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El Glucano y el  $\beta$ -Glucano el 40% del peso seco de la pared celular, Quitina entre 0.6% y 9% del peso de la pared celular. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas<sup>22, 23,24,25,26</sup> en cantidades que oscilan alrededor del 6% y lípidos entre 1% y 7%<sup>22,27</sup>. Las proporciones de los componentes que constituyen la pared celular de las hifas y de los tubos germinales es relativamente similar, aunque la cantidad de Glucano y de Quitina de *C. albicans* varía de acuerdo con la forma de crecimiento<sup>22,28</sup>

Estudios ultraestructurales de la pared celular de *C. albicans* han demostrado una compleja microarquitectura. La pared tiene un espesor variable 125-300 nm y está compuesta por varias capas. El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con diversos factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio y el medio de cultivo empleado para el crecimiento de la

célula. Se han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): a) Manoproteínas, b)  $\beta$ -Glucano + Quitina, c)  $\beta$ -Glucano, d) Manoproteínas y e) una capa de fibrillas<sup>22, 28, 57</sup>.

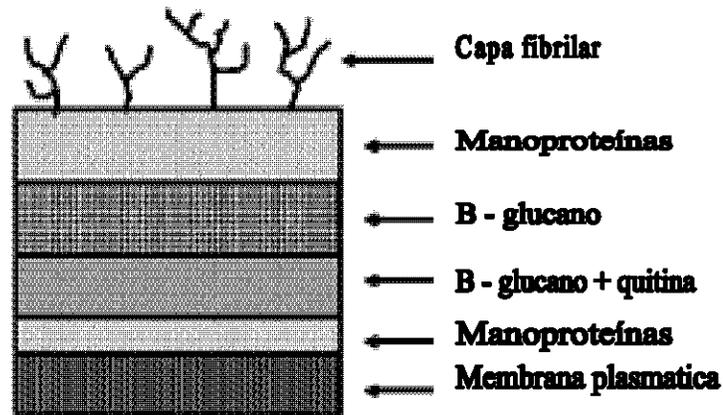


Fig. 6 Diagrama esquemático de la pared celular de *C. albicans*

Los polisacáridos del tipo Manano están localizados a lo largo de la pared celular y éstos, predominan en las zonas de alta densidad electrónica<sup>33,34</sup>. Las capas internas de la pared celular están compuestas principalmente por Quitina y Glucano<sup>22</sup>. Estos componentes le dan rigidez a la célula y son esenciales para la división celular<sup>35,36</sup>. Están presentes tres tipos de Glucano: 1) Glucano  $\beta$ -1,6 altamente ramificado, 2) Glucano  $\beta$ -1,3 altamente ramificado y 3) Glucano  $\beta$ -1,6- $\beta$ -1,3 mezclado con Quitina. Las proporciones de ciertos tipos de Glucano difieren entre los blastoconidios y los tubos germinativos de *C. albicans*. Durante las primeras etapas de la formación del tubo germinativo, se sintetiza casi exclusivamente Glucano  $\beta$ -1. La Quitina se encuentra en las células en forma de blastoconidio, hifas, pseudo-hifas y en los tubos germinativos, aunque la proporción es mayor en las hifas<sup>28</sup>. La capa externa de fibrillas de la pared celular de *C. albicans*, tanto en blastoconidios como en hifas está compuesta de Manano, Esta capa ha sido descrita en ocasiones como un revestimiento mucoso o capsular<sup>37</sup>.

**Las manoproteínas:** de la pared celular de *C. albicans* reconocen receptores específicos en el hospedero localizados en los componentes de la matriz extracelular (laminina, entactina, colágeno y filamentos de actina), componentes del suero (fibrinógeno y fibrina) y aquéllos que están ubicados en las células epiteliales y endoteliales. La expresión de estas manoproteínas de la pared celular juega un papel importante en la morfogénesis, además de ser potentes inmunógenos, capaces de disparar y modular la respuesta inmune durante la candidosis<sup>37, 46.</sup> Las Manoproteínas de *C. albicans* están constituidas por residuos de Manosa unidos entre sí por enlaces  $\alpha$ -1,6 los cuales se unen a la porción de Proteína a través de dos residuos de N-Acetil Glucosamina (unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -1,4) con un residuo de Asparagina y residuos de Manosa que se unen a la Proteína a través de residuos de los aminoácidos Serina y Treonina<sup>22</sup>

**En el citoplasma** se encuentra un núcleo que contiene 7 cromosomas el cual es delimitado por una membrana nuclear, un nucleolo rico en ARN y organelos citoplasmáticos como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80 S<sup>57</sup>

**La membrana citoplasmática** es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antimicóticos actúan a nivel de la misma, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Esta presenta una doble capa compuesta por lípidos y posee invaginaciones, que se observan como surcos de 200 a 300 nanómetros de longitud, por 35 a 40 nanómetros de espesor<sup>39,40</sup>. Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción<sup>41,42</sup>.

## MECANISMOS DE ADHERENCIA

**Adherencia:** es un requisito para la colonización y un paso fundamental para el establecimiento de la infección. La fase inicial de la adhesión de *Candida albicans* a los biomateriales es mediada por factores no específicos (la hidrofobicidad superficial y fuerzas electrostáticas) y por adhesinas específicas en la superficie del microorganismo que reconocen ligandos en las películas de condicionamiento, tales como proteínas del suero (fibrinógeno y fibronectina). Estudios recientes sugieren que los acontecimientos específicos de la adherencia se puedan también mediar por las proteínas de la superficie de la célula tales como los codificados por los miembros de la familia de ALS que producen los genes de adhesión - EAP1.<sup>41</sup>

La pared celular es una estructura esencial para todos los aspectos de la biología y la patogenicidad de *C. albicans*. Aunque inicialmente fue considerada como una estructura celular prácticamente inerte, actualmente se ha demostrado que es un organelo dinámico. Los principales componentes de la pared celular son: glucano, quitina y mananoproteínas. Los dos primeros están asociados con la rigidez estructural, y las mananoproteínas están implicadas en la adherencia a los tejidos del hospedero, y son diferentes en su expresión, secreción y localización dentro de la estructura de la pared.<sup>37,40</sup>

Las interacciones físicas de *Candida albicans* con el hospedero son a nivel de la superficie celular, y los constituyentes proteicos de la pared celular de esta levadura, involucrados en esta unión, se han designado como adhesinas. El componente es reconocido en el hospedero por el microorganismo y se conoce como ligando o receptor. *Candida albicans* se adhiere a células epiteliales, células endoteliales, factores solubles, componentes de la matriz extra celular y Materiales inertes como prótesis implantadas en el cuerpo del hospedero. Los ligandos o receptores de estos sitios en el hospedero son diversos, y representan toda clase de moléculas, incluyendo carbohidratos, proteínas y lípidos. El gran repertorio de adhesinas desplegado por esta

levadura refleja la variedad de sitios en el hospedero que pueden ser invadidos. La interacción de estas adhesinas con el hospedero tiene implicaciones directas para la patogénesis, ya que pueden modular (activar o inhibir) la respuesta inmune. Los mananos y las manoproteínas despliegan la más potente actividad inmunomoduladora, capaz de regular virtualmente todas las armas que posee el sistema inmune (células asesinas naturales, fagocitos, la inmunidad mediada por células y los mecanismos humorales) <sup>6, 9, 24</sup>.

**Coagregación:** Como comensal de la cavidad bucal, *C. albicans* puede adherirse a proteínas de la saliva y a bacterias de la cavidad bucal para evitar su eliminación de esta zona. En estas interacciones intervienen múltiples mecanismos. Se ha observado aglutinación microscópica y macroscópica de aislados de *C. albicans* con cepas de *Streptococcus sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus amylovorus* y *Bacteroides gingivalis*. En general, la asociación con especies bacterianas distintas a los estreptococos fue sensible al tratamiento térmico de las bacterias y a la inhibición por un carbohidrato, por lo tanto, para estas especies, se sugiere la presencia de una interacción tipo lectina con los carbohidratos presentes en la superficie de *Candida*.

*C. albicans* también puede unirse a *S. gordonii* y esta interacción parece ser una propiedad general para el hongo, ya que numerosas cepas poseen la habilidad de unirse a esta bacteria. La adhesina de unión que se ha propuesto para esta bacteria es un oligosacárido complejo. Esto se demostró por experimentos realizados utilizando anticuerpos contra el polisacárido de la pared de *S. gordonii* el cual inhibe la adherencia. Este polisacárido contiene ramnosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina y la unión no fue inhibida por los azúcares encontrados en el polisacárido o por fucosa y manosa. Por otra parte, es notorio que el polisacárido bacteriano contiene algunos de los azúcares que son reconocidos por la adhesina tipo lectina de *Candida albicans*. <sup>37, 38, 41, 42</sup>

**Formación de biopelícula:** Para colonizar, los blastoconidios deben primero adherirse a las células del anfitrión o a la superficies del biomaterial que se encuentran cubiertas con una película de condicionamiento de glicoproteínas. La película de condicionamiento se forma en la superficie de biomateriales y de la capa inferior del tejido fino inmediatamente después de la implantación porque los dispositivos biomédicos son rodeados generalmente por los fluidos corporales tales como orina, sangre, saliva y líquido sinovial, la formación de la biopelícula se correlaciona con la hidrofobicidad de la superficie de la célula. La adherencia de las células es seguido de cerca por la formación y proliferación de biopelículas. Dos consecuencias del crecimiento de biopelículas son la resistencia marcada a los agentes antimicrobianos y la protección contra las defensas del anfitrión.<sup>42</sup>

MECANISMO	ADHESINA (EN CANDIDA)	RECEPTOR O LIGANDO	SUPERFICIE
Hidrofobicidad	Proteínas de Superficie	Superficies hidrófobas	Materiales dentales
Proteína - proteína	Proteínas de superficie similares a integrinas	Complemento, polipéptidos con la secuencia Arg-Gly-Asp: fibronectina C3d, proteínas de la matriz extracelular: fibrinógeno, colágeno, laminina, entactina	Células epiteliales, matriz extracelular endotelios, sangre.
Tipo lectina	Proteínas de superficie  Manoproteínas fibrilares	Residuos de fucosa o N-acetilglucosamina en las glicoproteínas humanas. Polisacáridos de los estreptococos bucales  Receptores glucoesfingolípidos	Células epiteliales  Células epiteliales colonizadas (biopelícula) Células epiteliales

Tabla. 1 Mecanismos de adhesión de *Candida albicans*

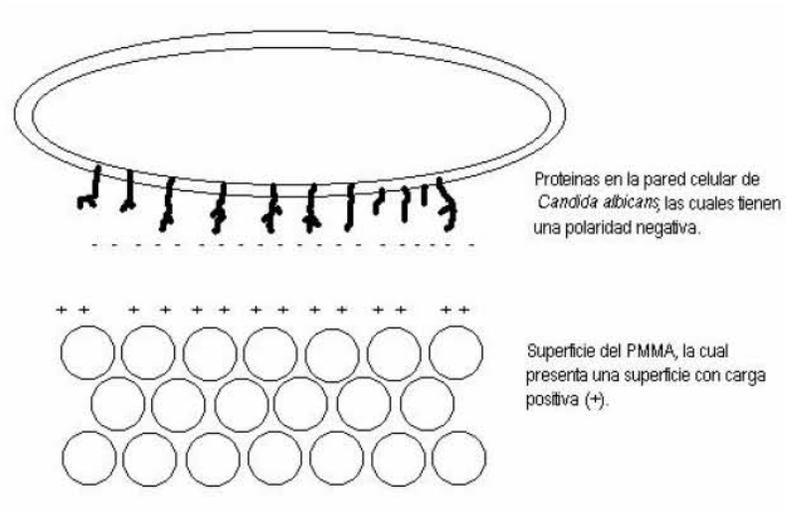


Fig. 7 Mecanismo de adherencia de *Candida albicans* al PMMA mediante hidrofobicidad.

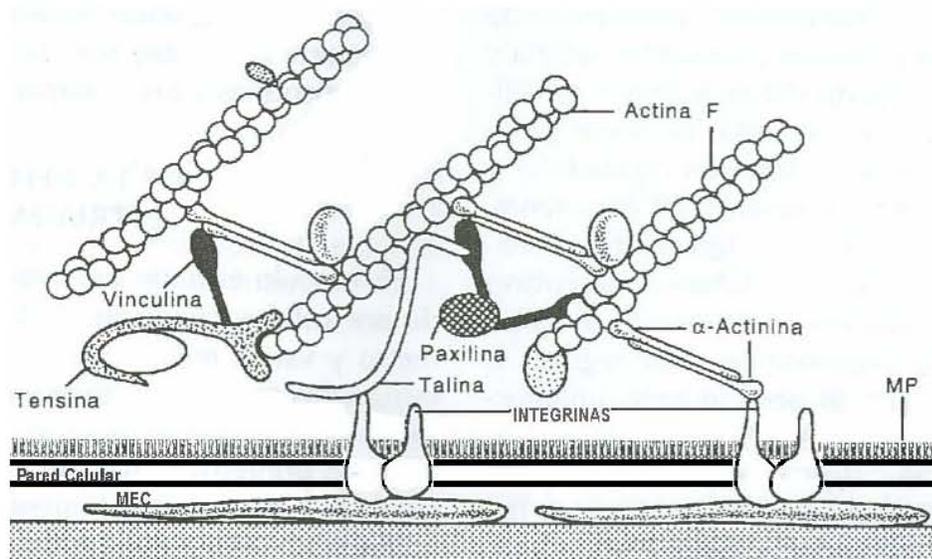


Fig. 8 Mecanismo de adherencia de *Candida albicans* a la matriz extracelular mediante Integrinas.

## MECANISMOS DE INVASIÓN A TEJIDOS

Para cambiar su comportamiento saprofita a patógeno, *Candida albicans* tiene que desarrollar algunas características fenotípicas que le permitan penetrar al organismo del hospedero. La propensión de la célula fúngica a cambiar su comportamiento es muy grande y depende de su entorno. Se ha demostrado que el cambio fenotípico en las cepas de *C. albicans* está asociado con las infecciones sistémicas. Para ser considerado como un patógeno, *Candida* tiene que exhibir dos propiedades fundamentales: la adherencia a los receptores en el hospedero y la producción de enzimas líticas. Está bien establecido que estos dos procesos están asociados con variaciones morfológicas. Operando una transición dimórfica del estado levaduriforme (blastoconidio) al estado filamentoso (hifa), *C. albicans* incrementa sus propiedades adhesivas y la secreción de enzimas. <sup>20, 37, 46</sup>

**Dimorfismo:** La capacidad para desarrollar dos tipos de crecimiento, el filamento y el levaduriforme, esto favorece la adaptación al hospedero y facilita la evasión de sus mecanismos de defensa al producirse un cambio antigénico o de composición bioquímica entre los componentes de los dos tipos de desarrollo. Cuando *Candida albicans* se encuentra como colonizador en las mucosas se desarrolla fundamentalmente como levaduras, mientras que cuando invade los tejidos se observa en forma de levadura y filamentosa, esta última facilita la adhesión a células del hospedero, a la penetración tisular y dificultan la fagocitosis al ser más difíciles de fagocitar que las levaduras y permitir el escape del interior de la célula fagocítica al romper su membrana citoplasmática. <sup>23, 57</sup>

**Tigmotropismo:** *Candida albicans* puede orientar su crecimiento cuando se encuentra en su fase micelial guiándose por la topografía del tejido, este crecimiento guiado por contacto es utilizado por el hongo para encontrar discontinuidades entre las células y penetrar entre ellas. <sup>57</sup>

**Enzimas:** las proteasas y fosfolipasas producidas por *Candida albicans* facilitan su multiplicación favoreciendo la diseminación por los tejidos del hospedero ya que estas son capaces de cortar la acción de la IgA sérica y la IgA secretora. <sup>57</sup>

### **Estomatitis protésica:**

Es un proceso inflamatorio de la mucosa bucal. Sus principales formas clínicas son la atrófica (con presencia de lesiones eritematosas) y la hiperplásica. Se observa con mayor frecuencia en mujeres, principalmente con localización maxilar, en la superficie del paladar que se encuentra en contacto con la prótesis dental. La mucosa del paladar que esta en contacto con la dentadura se inflama de manera difusa, en placas o extendiéndose afectando toda el área que esta cubierta con la prótesis. Se observa una zona roja con petequias y en casos crónicos ocurre hiperplasia papilar en la bóveda palatina así como edema y eritema.

Esta lesión tiene una etiología multifactorial y ha sido asociada principalmente con la presencia de *Candida albicans*, así como con otros microorganismos bucales<sup>1</sup>. El desarrollo de la estomatitis protésica se ve influido, por la presencia de prótesis, de *Candida* y otros microorganismos, por diversos factores locales y sistémicos, como un pH salival ácido, el alto consumo de carbohidratos, tratamiento prolongado con antibióticos, terapia hormonal, así como por enfermedades sistémicas, como *diabetes mellitus* o hipertensión arterial, xerostomía, neoplasias, deficiencias nutricionales e infección por VIH, que tienen repercusión directa en las condiciones ambientales de la cavidad bucal

El hecho de portar una prótesis ya es un factor predisponente para la patología. Se crea un ambiente cerrado, más anaerobio, entre la prótesis colocada en la boca y la mucosa, con lo cual se favorece el crecimiento de *Candida*, pudiendo pasar las mismas de ser un hongo comensal en la mucosa a ser un parásito que infecte la

mucosa. Si además la superficie de la resina es rugosa y tiene una elevada porosidad, se favorece la acumulación de microorganismos y la aparición de la enfermedad

En ocasiones los cambios epiteliales producidos por irritación por parte de *Candida albicans* durante esta patología pueden degenerar en atipias celulares y transformaciones malignas. Con relación a esto, se ha comprobado la capacidad de la *C. albicans* para producir nitrosaminas (N-nitrosobenzylmethylamine carcinogénicas). En lesiones con fenómenos de premalignización se aislaron cepas con un mayor poder de nitrosaminación. Las células epiteliales tratadas con nitrosaminas, producidas por *Candida*, alcanzan la fase de carcinoma en períodos cortos.

## **Polimetilmetacrilato.**

La introducción de los polímeros acrílicos en odontología fue después de la segunda Guerra Mundial, los polímeros sintéticos eran originalmente desechos de laboratorio, residuos que quedan después de ciertas reacciones orgánicas derivadas del petróleo y gas natural.

Desde su introducción, la resina acrílica ha demostrado ser un material para bases de dentaduras muy satisfactorio, cuya mayor ventaja reside en ser compatible con la mucosa bucal. En la actualidad, probablemente más del 95% de las prótesis totales dentales se elaboran con resina acrílica de polimetilmetacrilato.

Este material está formado por dos componentes: un polvo que está compuesto por microesferas transparentes o pigmentadas de metilmetacrilato prepolimerizado más peróxido benzoico como iniciador y un líquido que corresponde a metilmetacrilato más una pequeña cantidad de hidroquinona como estabilizador, que previene una polimerización indeseable durante el almacenamiento.<sup>61</sup>

Estos dos componentes al unirse y activarse mediante calor inician una polimerización por adición la cual cursa por cuatro etapas:<sup>61</sup>

- **Inducción:** Para que el proceso inicie deben estar presentes radicales libres, estos se obtienen por el peróxido de benzoilo que durante la aplicación de calor de 50 a 100°C, hace que sus moléculas se fragmenten en dos radicales libres, los cuales inician la polimerización del monómero de metilmetacrilato. Este periodo es altamente influenciado por la pureza del monómero y a mayor temperatura es menor el periodo de inducción.

- **Propagación:** las reacciones en cadena deberán continuar, con la evolución del calor, hasta que todo el monómero se transforme en polímetro, aunque la polimerización nunca se completa al 100%.
- **Terminación:** las reacciones en cadena terminan por acoplamiento directo o por intercambio de átomos de hidrógeno de una cadena en crecimiento, los radicales libres interactúan y forman un enlace covalente.
- **Transferencia de la cadena:** En el estado activo de la transferencia de cadena un radical activo se transfiere a una molécula inactiva creando un nudo de crecimiento.

La superficie del polimetilmetacrilato puede presentar poros, los cuales, son producidos durante su elaboración y dependen de diversos factores como:

- Vaporización del monómero no reaccionado, la cual se da cuando la temperatura de la resina alcanza o sobrepasa su punto de ebullición (100.8°C).
- Proporción inadecuada polvo – líquido, si esto ocurre, algunas regiones de la resina contienen más monómero que otras. Durante la polimerización, estas regiones se contraen más que otras y tienden a producir vacíos.
- La presión inadecuada o insuficiente de la resina en el molde puede ocasionar porosidades, las cuales no son esféricas, sino que asume formas irregulares.
- Inclusión de aire durante el mezclado del material.

## Técnicas de Procesado

**Termo-Polimerizado con Inyección:** SR IVOCAP High Impact. Ivoclar® <sup>58</sup>

Composición:

Polvo: Polimetilmetacrilato

Líquido: Metilmetacrilato.

Indicaciones:

- Prótesis total.
- Prótesis parcial.
- Rebases.
- Trabajos ortodónticos
- Férulas.

Técnica de Procesado.

Preparación de la cápsula:

El contenido de la cápsula es de 20 gr. polímero y 30 ml de monómero.

1. Verter el monómero dentro de la cápsula.
2. Colocar la cápsula en el Cap-Vibrator y mezclar durante 5 min.
3. Transcurrido el tiempo de mezcla eliminar el aire de la cápsula.

Fijación de la Mufla:

1. Se introduce la mufla en la brida.
2. Se coloca la brida con la mufla en una prensa hidráulica y se carga con 3 toneladas u 80 bar de presión.

#### Colocación de la cápsula e Inyección.

1. Introducir la cápsula hasta el tope en la mufla.
2. Introducir el pistón del inyector en la cápsula hasta que los agarres encajen correctamente en la mufla y bajar la brida de seguridad hasta que encaje.
3. Conectar el inyector de presión con la llave de aire comprimido cerrada a la instalación de aire (6 bar).
4. Abrir lentamente la llave de paso del aire comprimido, el pistón desciende e inyecta el material SR-Ivocap en el modelo.

#### Polimerización:

1. Se coloca la unidad SR-Ivocap en una bañera de polimerización con agua. La superficie del agua debe cubrirse con bolas flotantes de plástico para evitar una pérdida innecesaria de calor del baño de agua (aislamiento).
2. El tiempo de polimerización una vez que ha empezado a hervir el agua es de 35 min.
3. La unidad SR-Ivocap se extrae del agua hirviendo una vez transcurridos los 35 min. y se enfría directamente en agua 30 min. (durante el enfriamiento la presión de la brida debe ser constante).

**Auto y Termo-polimerizado con inyección: PALAXPRESS. Heraeus Kulzer®** <sup>59</sup>

Composición:

Polvo: Metilmetacrilato – copolimero.

Líquido: Metilmetacrilato, dimetacrilato.

Indicaciones:

- Prótesis total.
- Prótesis parcial.
- Rebases.

Técnica de Procesado.

Dosificación y mezcla:

1. Colocar el Palaxpress en una proporción de mezcla (2 : 1) de 30g de polvo : 15 ml de líquido en el recipiente dosificador.
2. Mezclar los componentes con una espátula metálica, a una temperatura ambiente de 23° C se llega la fase plástica a los 7 minutos y el punto de inyección se alcanza cuando la pasta muestra una superficie opaca.
3. La polimerización final se realiza en la estufa de cocción Palajet® a una temperatura en el agua a 55° C, una presión de 2bar y un tiempo de 25 minutos.

**Polimerizado mediante microondas: ACRON MC GC Lab®<sup>60</sup>**

Composición:

Polvo: Polimetilmetacrilato

Líquido: Metilmetacrilato.

Indicaciones:

- Prótesis total.
- Prótesis parcial.
- Rebases.

Técnica de Procesado.

1. La porción normal de polvo/líquido es de 7 ml de líquido por 30 cc de polvo.
2. Situar la cantidad de líquido en el frasco de mezcla Gc Acron y colocar el polvo sobre el líquido golpeando ligeramente el frasco hasta integrar los componentes.
3. Cerrar el frasco y dejar reposar 15 a 20 min. a 23° C.
4. Retirar toda la masa de una sola intención del frasco utilizando una hoja de polietileno y colocarlo dentro del modelo en la mufla.
5. Cerrar la mufla repitiendo 2 a 3 veces hasta que no se observen residuos de resina y apretar utilizando los tornillos y la llave proporcionada.
6. Someter a irradiación de microondas durante 3 minutos a una potencia de 500 vatios.
7. Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 30 min.
8. Sumergir la mufla 20 min. en agua fría.

## **INSTRUMENTO UTILIZADO PARA EL ESTUDIO DE BIOPELICULAS**

### **Microscopio Electrónico de Reflexión o Scanning.**

La introducción de la microscopia electrónica en la investigación constituye un desarrollo significativo para los estudios microbianos en general, debido a que el tamaño de muchos microorganismos se acerca al máximo poder de resolución del microscopio óptico. Es un instrumento diseñado para estudiar, en alta resolución la superficie de los sólidos y características morfológicas y topográficas de la muestra.<sup>55</sup>

Se basa en la teoría de que un campo electromagnético actúa sobre un haz de electrones de manera análoga a la acción de una lente de cristal sobre un haz de fotones, no se pueden observar especímenes vivos debido al alto vacío requerido en ciertos microscopios, los especímenes deben estar preparados y secos para poder ser observados. Los electrones emitidos de un cátodo de tungsteno son acelerados a través de un sistema de lentes magnéticas que disminuyen el diámetro del haz y una bobina de barrido desvía dicho haz sobre la muestra siguiendo un patrón de rastreo (barrido). Cuando este haz interactúa con la muestra se producen electrones secundarios, los cuales son colectados por un detector y posteriormente transformados y amplificados para producir una imagen visible en una pantalla de rayos catódicos (fotones).<sup>55</sup>

El microscopio cuenta con las siguientes partes: óptica electrónica, cámara del espécimen, circuitos de alimentación de la óptica electrónica, generación del alto voltaje y de producción de barrido, detectores secundarios emitidos por la muestra, electrones retrodispersos y otros tipos de detectores y dispositivos para la observación y registro de imágenes. Tiene una resolución de 10 a 20 nm, la ampliación máxima del MEB es de 50000 diámetros. Al rastrear la superficie, el haz de electrones es absorbido por la superficie y genera una emisión secundaria de electrones captada por

el sistema integrador y el decodificador de imagen para proyectarla en un monitor o bien en el sistema de registro de una placa fotográfica.<sup>55</sup>

Las ventajas que ofrece este instrumento es su gran profundidad de campo, una imagen tridimensional, la posibilidad de visualizar muestras de muy pequeño tamaño, una gran gama de aumentos, resolución, facilidad de variar el aumento sin modificar la distancia focal y la posibilidad de obtener del espécimen diversos tipos de información, como por ejemplo los análisis cuantitativos y cualitativos químicos (microanálisis).<sup>55</sup>

Las muestras pueden ser orgánicas e inorgánicas y deben prepararse antes de ser observadas, estos especímenes deben desecarse e ionizarse con una capa conductora de carbón (60–100 nm) y con una película de metal (oro, plata, platino, paladio), de grosor semejante.<sup>55</sup>

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La microflora de la superficie de las prótesis dentales totales y parciales, así como de la mucosa bucal que soporta estos aparatos protésicos, esta compuesta por una gran diversidad de microorganismos, incluyendo bacterias y hongos principalmente, los cuales, al encontrar las condiciones ambientales adecuadas, se desarrollan formando una biopelícula la cual esta compuesta por microorganismos patógenos, causantes de procesos infecciosos como la estomatitis protésica. En estudios previos, se ha observado que uno de los microorganismos patógenos mas importantes en el desarrollo de estas infecciones es *C. albicans*.

La superficie de la resina acrílica presenta defectos o diferentes características de porosidad en su superficie, dependiendo del tipo de técnica de procesado de la misma, lo cual contribuye significativamente en la adherencia y retención de microorganismos como *Candida albicans*, en la superficie del aparato protésico.

## **JUSTIFICACIÓN**

La técnica de procesado que es utilizada para la elaboración de las dentaduras favorece la adherencia los microorganismos a la superficie acrílica, con la subsecuente colonización y desarrollo de procesos infecciosos de la mucosa bucal.

Conocer en este tipo de resina acrílica que técnica de procesado es la que puede presentar las mejores características en su superficie y la menor adherencia de *Candida albicans* nos permitirá ofrecer al paciente la alternativa mas adecuada para

su tratamiento protésico, ya que estos materiales son empleados para la elaboración de prótesis en el Laboratorio No- 4 de la Facultad de Odontología UNAM, así como en diversos laboratorios dentales a nivel privado.

## **HIPÓTESIS**

La adherencia in Vitro de *Candida albicans* y las características de la superficie de la resina acrílica son diferentes según la técnica de procesado empleado para su elaboración, así como diferentes tiempos de inoculación.

## **OBJETIVOS**

- Evaluar las características de la adherencia de *Candida albicans* in vitro a 24 y 48 hrs. de inoculación sobre resina acrílica de PMMA procesada con:
  - Termo-polimerizado con inyección SR-IVOCAP® (Ivoclar).
  - Auto y termo-polimerizado con inyección PALAPRESS® (Kulzer).
  - Polimerizado mediante microondas ACRON MC® (GC).
  
- Determinar que técnica de procesado disminuye la adhesividad de los hongos.
- Observar las características que presenta la superficie del PMMA en cada técnica de procesado.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Preparación de especímenes**

Fueron elaboradas laminas de resina acrílica de 7mm x 7mm x 4mm, de las tres técnicas de procesado, de acuerdo con las instrucciones de manufactura proporcionadas por el fabricante. Esto se realizó en el Laboratorio No- 4 de la Facultad de Odontología UNAM

Los especímenes se mantienen durante dos días en agua destilada estéril para remover los residuos de monómero tóxicos y posteriormente para su desinfección son sumergidos en alcohol al 70% durante cinco minutos y lavados con agua estéril nuevamente para eliminar el alcohol.<sup>32</sup>

### **Microorganismo y condiciones de cultivo**

La metodología microbiológica de este estudio se realizó en el Laboratorio de Micología Médica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Se utilizó una cepa viable de *Cándida albicans*, proporcionada por el Instituto Pasteur de Francia, la cual se conservó en placas de cultivo agar dextrosa Sabouraud.

A esta cepa se le hicieron pruebas de; formación de tubo germinativo, clamidoconidio y cultivo en CHROMagar Candida, esto con el fin de comprobar que la cepa era *Candida albicans*.

*Candida albicans* fue cultivada en placas de agar dextrosa sabouraud e incubadas a 37° C durante 24 a 48 horas, de este cultivo fresco se tomo una asada microbiológica y se incorporo en 100ml de caldo de soya tripticasa estéril el cual se mantuvo en una incubadora elíptica toda una noche a 37° C con agitación.

Este cultivo fue centrifugado 10 minutos a 1000Rpm, posteriormente se retiro 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 agrego 2ml de caldo de soya tripticasa estéril para resuspender los blastoconidios. Este concentrado se va agregando a 100ml de caldo de soya tripticasa estéril hasta que se obtuvo una suspensión del microorganismo a 0.8 OD520 ( $1 \times 10^7$  blastoconidios/ml)<sup>33</sup>.

La preparación de la suspensión de hizo en caldo de soya tripticasa por tener los requerimientos de crecimiento para los hongos.<sup>33</sup>

### **Ensayo de adherencia.**

Las muestras de PMMA se colocaron en placas de cultivo celular de 24 pozos, en las cuales se agrego 1.5 ml de la suspensión a cada pocillo para cubrir completamente el espécimen.

Una vez añadida la suspensión de *Candida albicans* a cada muestra se incubaron con agitación durante los siguientes tiempos: 24 y 48 hrs. a 37° C.

Tras la inoculación bajo condiciones asépticas, son retiradas las muestras con pinzas estériles y se lavan vigorosamente con PBS a un pH de 7.2 aprox. para eliminar las células no adheridas.

La prueba se realizo por triplicado

### **Cuantificación de la Adherencia**

El análisis mediante el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM35CF se realizo en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina UNAM.

1. Análisis con microscopia electrónica de Barrido MEB (Adam B, 2002)<sup>33</sup>.

Las biopelículas formadas en las replicas se fijaron con etanol absoluto durante 5 min. Se secan a temperatura ambiente y con silica gel, posteriormente son montadas en balines de latón donde se ionizan con una capa de oro – paladio durante 3 min. a 1500 KV y a 10 $\mu$ A y fueron observadas con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM35CF.

1. Se utilizaron 3 fotografías con un aumento de 1500x de cada técnica de procesado y del mismo tiempo de inoculación, se contaron las levaduras que hay en cada fotografía. También se tomaran fotografías del mismo campo a 600x que servirá como panorámica y a 6000x que se utilizara para observar detalles. Así como fotografías a 1500x de las muestras de PMMA sin cultivo para observar la superficie del material.

## RESULTADOS

La formación de la biopelícula, el desarrollo de *Candida albicans* y su adhesión a la superficie del PMMA en dos periodos de tiempo, 24 y 48 horas, así como las características de la superficie de la resina fueron observadas, utilizando el microscopio electrónico de barrido.

### Termo-polimerizado con inyección Ivocap.

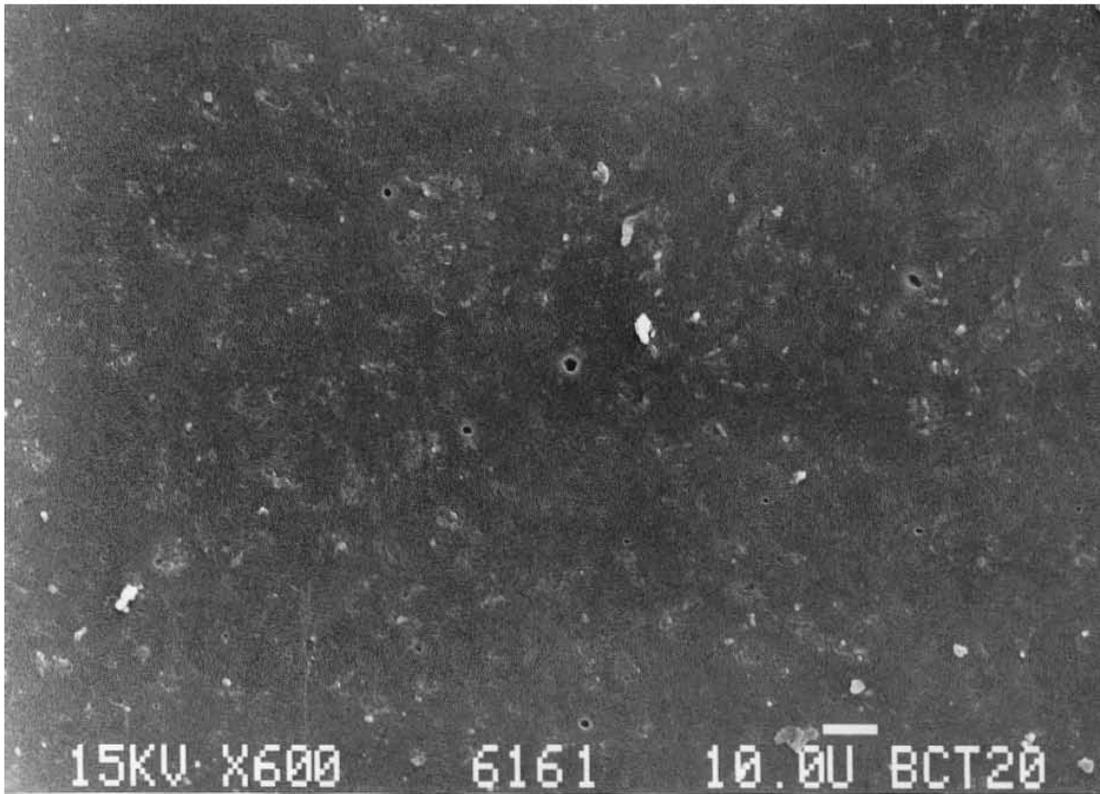


Fig.9 Superficie del PMMA procesado Termo-polimerizado Ivocap, MEB 600x

**Características:** El PMMA procesado con esta técnica presenta una superficie uniforme en su mayor parte y con pocos poros de tamaño variable de 1 a 2 micras de diámetro.

### **Termo-polimerizado con inyección Ivocap: cultivo a 24hrs.**

Característica del blastoconidio: presentan un tamaño de 2 a 3.5 micras de diámetro, mostrando una forma madura y bien delimitada, con escasas células en gemación.

Características de la adherencia: Se presenta una adherencia uniforme sobre la muestra, en donde se encuentran blastoconidios aislados así como pequeñas cadenas celulares (seudomicelio) y agrupaciones.

Características del PMMA: Presenta una superficie en su mayor parte uniforme, con poros de diámetro variable que van de 0.5 a 1 micra de poca profundidad, así como áreas lisas y escasas imperfecciones (grietas y concavidades).



Fig. 10 Termo-polimerizado Ivocap, cultivo con *Candida albicans* 24hrs 6000x MEB.

En la Fig. 10 se observa en detalle los blastoconidios de *C. albicans*, las cuales se encuentran bien delimitadas del material, las cadenas celulares (seudomicelio) y la porosidad del PMMA.

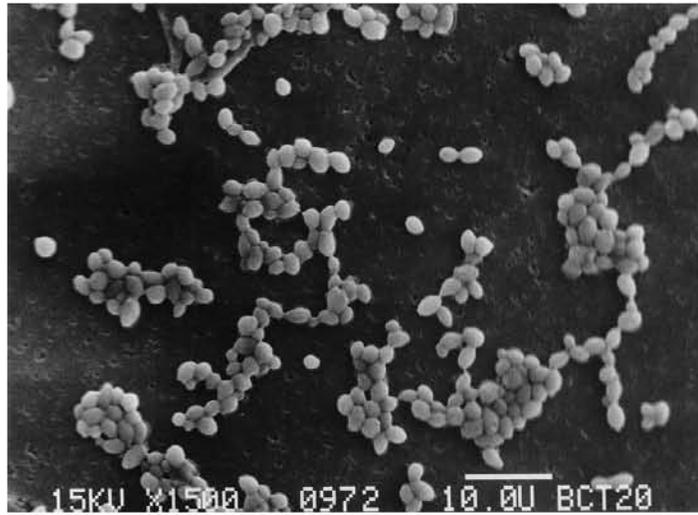


Fig.11 Termo-polimerizado Ivocap, cultivo con *Candida albicans* 24hrs 1500x MEB.

En la Fig.11 se observa los blastoconidios en forma individual y el seudomicelio. Hay uniformidad en la superficie del PMMA presentando pocas imperfecciones

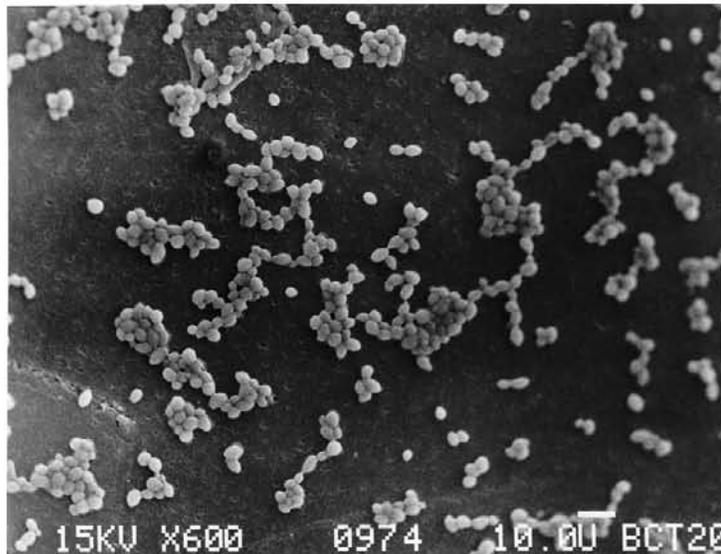


Fig.12 Termo-polimerizado Ivocap, cultivo *Candida albicans* 24hrs 600x MEB. Imagen panorámica.

## Termo-polimerizado con inyección Ivocap: cultivo a 48hrs

Característica del Blastoconidio: presenta un diámetro entre 2 a 3.8 micras con forma madura, uniforme y numerosas células en gemación.

Características de la adherencia: Hay cadenas celulares (seudomicelio) y blastoconidios aislados, los cuales presentan gemación y su distribución sobre el PMMA es uniforme.

Características del PMMA: Presenta una superficie uniforme en su mayor parte, con poros de diámetro variable que van de 0.5 a 1 micra de poca profundidad, así como áreas lisas y escasas imperfecciones (grietas y concavidades).



Fig.13 Termo-polimerizado Ivocap, cultivo con *Candida albicans* 48hrs 6000x MEB.

Se observa en detalle las células en gemación, así como la porosidad del PMMA. Los blastoconidios se encuentran maduros.

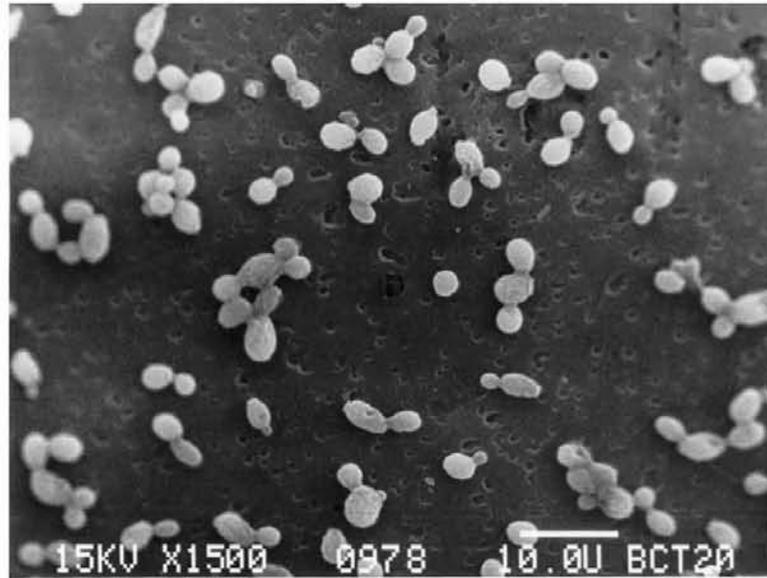


Fig.14 Termo-polimerizado Ivocap, cultivo con *Candida albicans* 48hrs 1500x MEB.

Seudomicelio que presentan múltiples células en gemación, se observa la porosidad del PMMA y superficie uniforme.

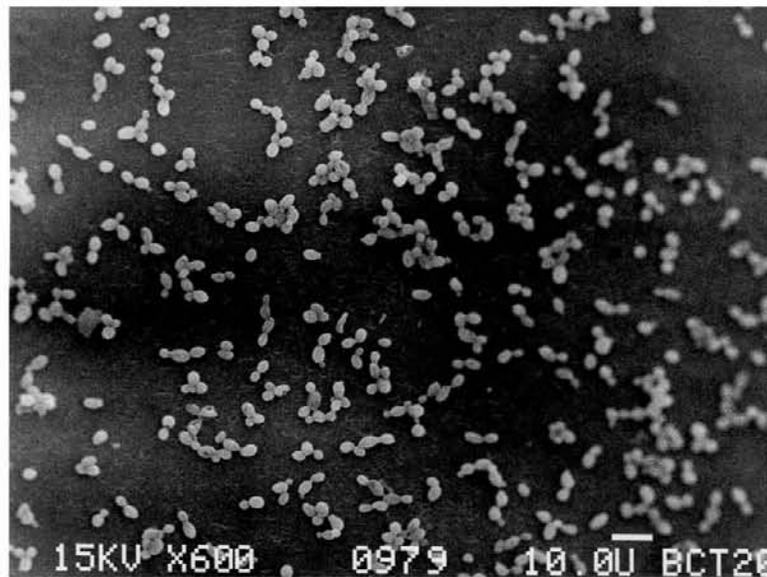


Fig.15 Termo-polimerizado Ivocap, cultivo *Candida albicans* 48hrs 600x MEB. Imagen panorámica.

## Auto y Termo-polimerizado con inyección: Palaxpress

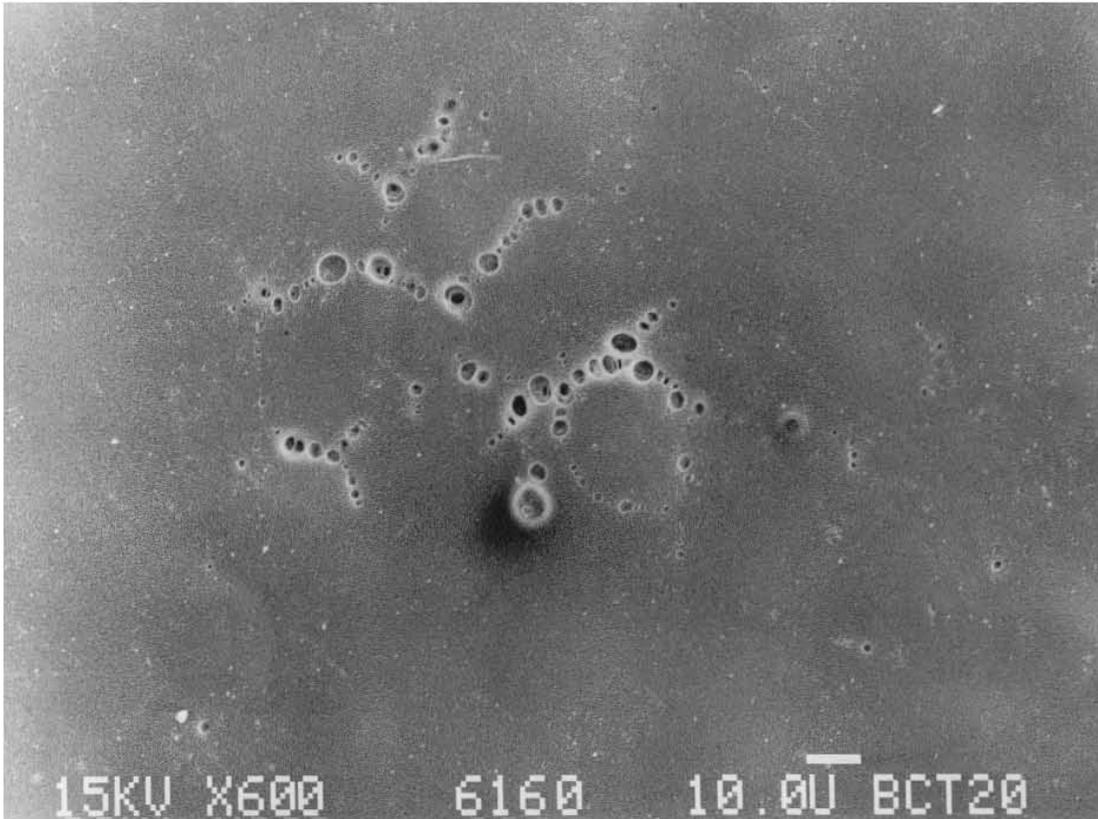


Fig.16 Superficie del PMMA procesado Auto y termo-polimerizado Palaxpress MEB 600x

**Características:** El PMMA procesado con esta técnica presenta una superficie en su mayor parte lisa y uniforme. Se observa la presencia de poros bien delimitados los cuales se encuentran agrupadas en el centro y miden de .5 a 5 micras de diámetro.

## **Auto y Termo-polimerizado con inyección Palaxpress: cultivo 24hrs**

Características del blastoconidio: tiene un diámetro entre 2.5 a 4 micras, presentan morfología variable, pues se encuentran células maduras y de forma irregular presentando colapso e irregularidades en la superficie. Hay pocos blastoconidios en gemación, estas células se encuentran bien delimitadas del material.

Características de la adherencia: Es uniforme sobre la muestra, la mayor parte de las células se encuentran aisladas y pocos pseudomicelios de 5 a 6 células.

Características del PMMA: La superficie del material presenta pocos poros, áreas lisas rodeadas por grietas, de un promedio de 100 micras de longitud y 5 micras de ancho.

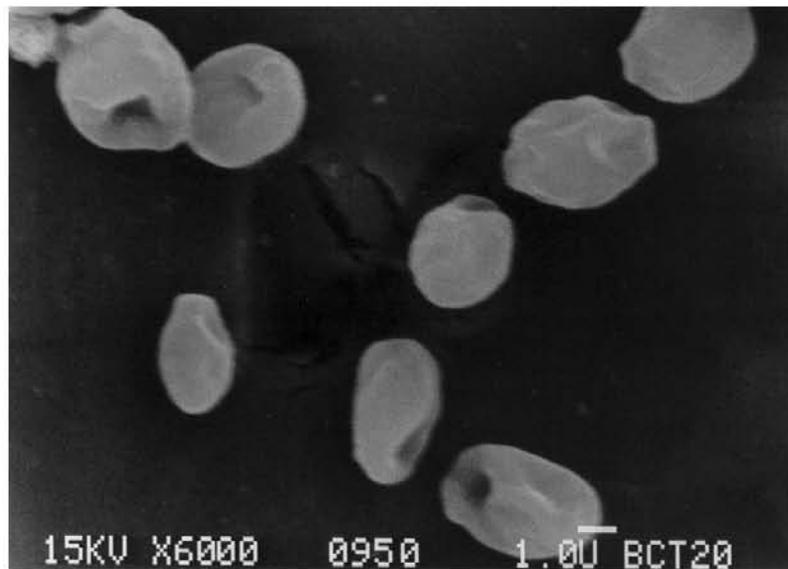


Fig.17 Auto y termo-polimerizado Palaxpress, cultivo *Candida albicans* 24hrs 6000x MEB.

En la Fig. 17 se observa en la superficie del blastoconidio irregularidades, así como colapso y un tamaño variable. No hay porosidades en el PMMA, sin alteraciones en el material en donde se encuentra adherido el blastoconidio.

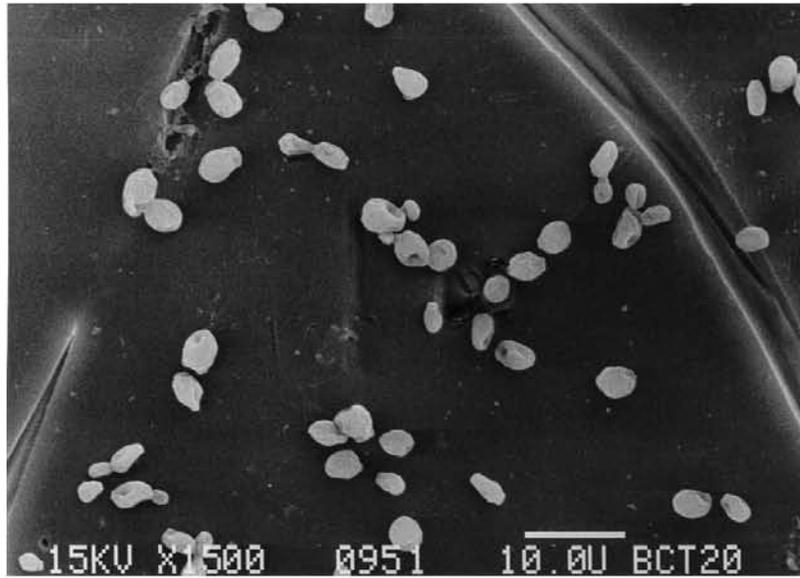


Fig.18 Auto y termo-polimerizado Palaxpress, cultivo *Candida albicans* 24hrs 1500x MEB.



Fig.19 Auto y termo-polimerizado Palaxpress, cultivo *Candida albicans* 24hrs 600x MEB

Se observan grietas en la superficie y la adherencia del blastoconidio, tanto en las áreas lisas, como en los defectos.

## Auto y Termo-polimerizado con inyección Palaxpress: cultivo 48hrs

Características del blastoconidio: el tamaño varía de 2 a 3.7 micras de diámetro, se observan células maduras y uniformes, aunque, siguen presentando colapsos en su superficie y células en gemación.

Características de la adherencia: Se presenta en su mayoría como blastoconidios aislados y en pequeños pseudomicelios de 4 a 10 células. Su distribución en el PMMA es uniforme, se encuentran adheridas tanto en áreas lisas y defectos.

Características del PMMA: Presenta en su superficie grietas continuas, de un promedio de 100micras de largo, 5micras de ancho en promedio, así como poros aislados de hasta 1 micra de diámetro.

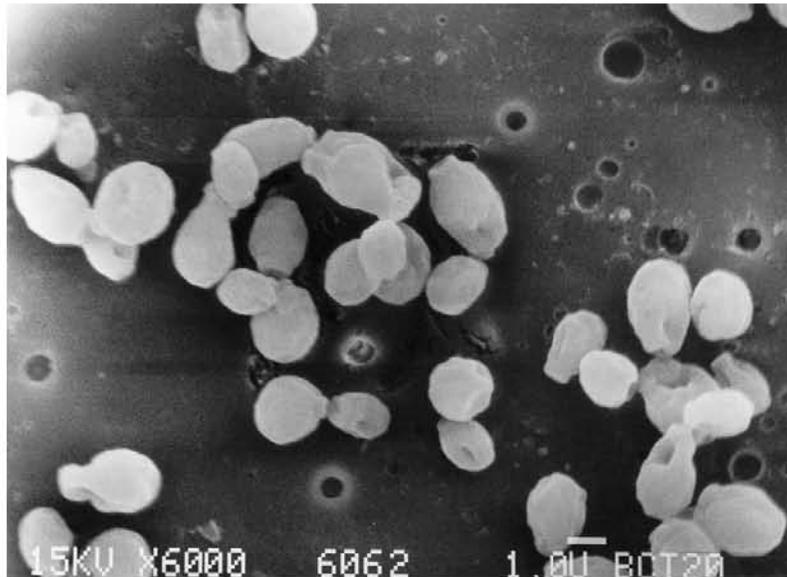


Fig.20 Auto y termo-polimerizado Palaxpress, cultivo *Candida albicans* 48hrs 6000x MEB

Se observan blastoconidios maduros, en gemación y con colapso en su superficie. Los poros del material están bien definidos.

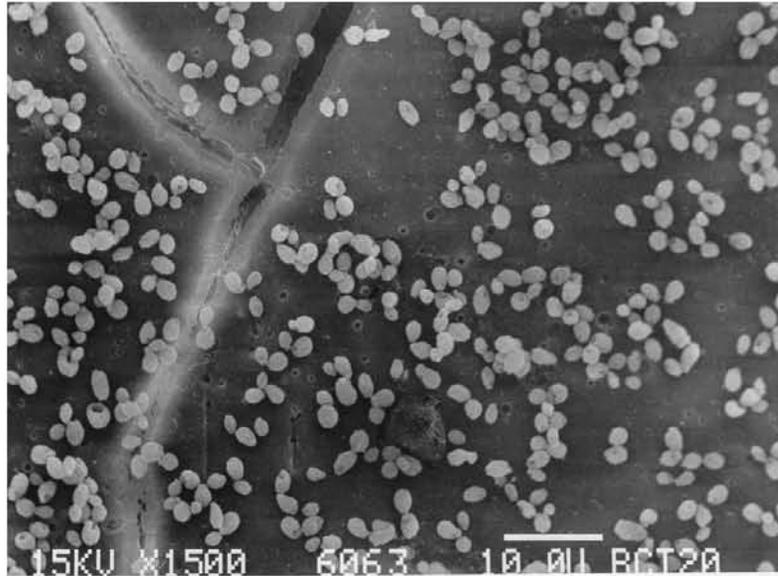


Fig.21 Auto y termo-polimerizado Palaxpress, cultivo *Candida albicans* 48hrs 1500x MEB

Se observa la adherencia por parte de *Candida albicans* tanto en la superficie lisa, como en las grietas. Hay formación de pequeños pseudomicelios y blastoconidios aislados.

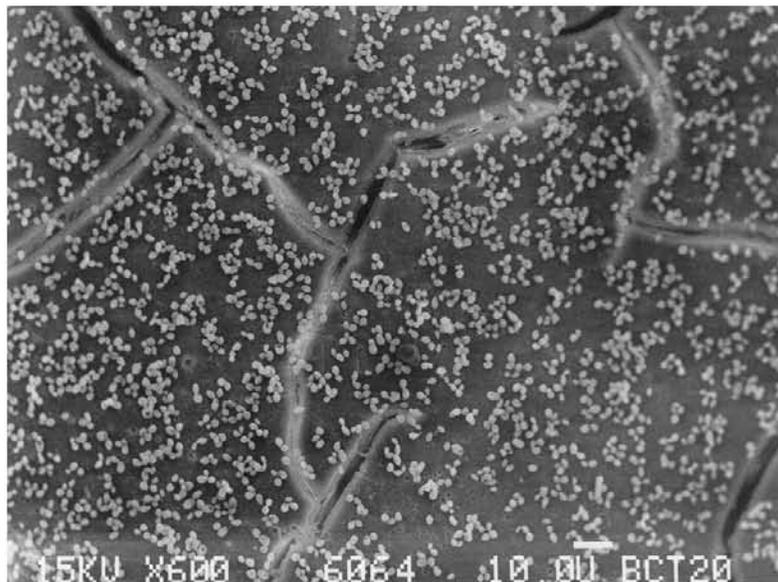


Fig.22 Auto y termo-polimerizado Palaxpress, cultivo *Candida albicans* 48hrs 600x MEB

Se observan grietas continuas en la superficie del PMMA. Vista panorámica.

## Polimerizado mediante microondas: Acron

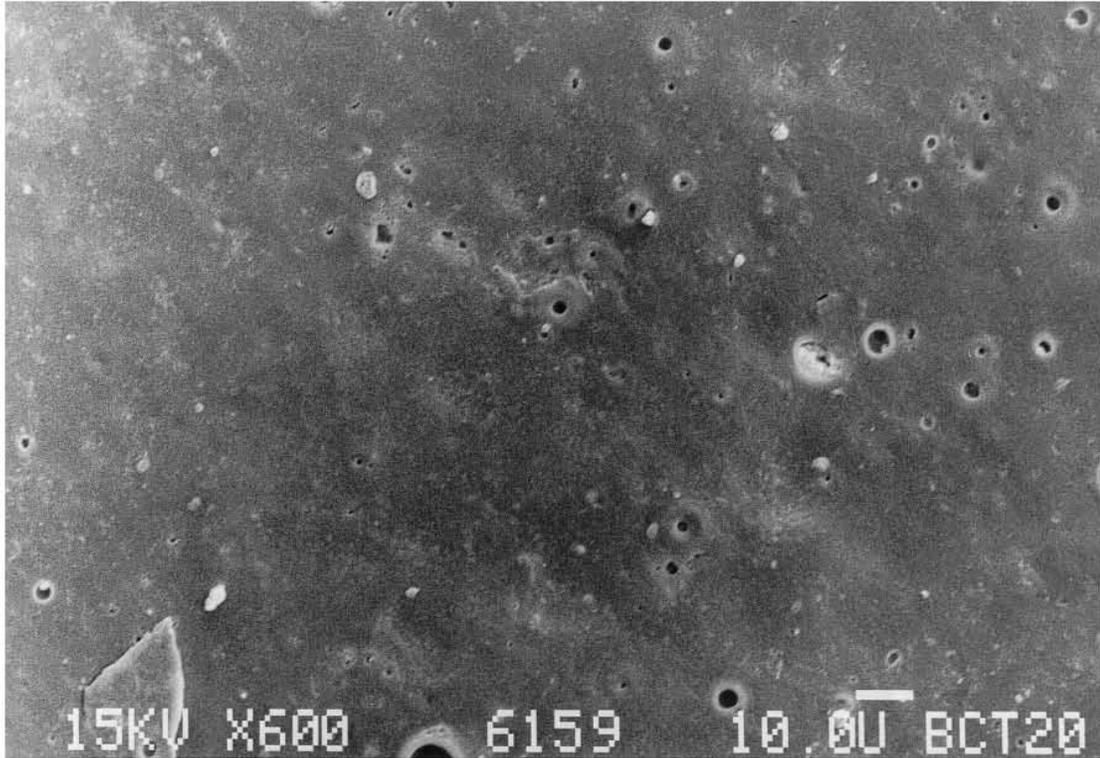


Fig.23 Superficie del PMMA Procesado con Polimerizado mediante microondas Acron MEB 600x

**Características:** El PMMA procesado con esta técnica presenta una superficie con áreas uniformes en su mayor parte, hay porosidades distribuidas en el material, las cuales tienen un tamaño entre 1 a 5 micras de diámetro.

## Polimerizado mediante microondas Acron: cultivo a 24hrs.

Características del blastoconidio: tienen un diámetro entre 2.4 a 4 micras, una superficie uniforme, madura y presentan células en gemación.

Características de la adherencia: Los blastoconidios se encuentran formando pseudomicelio de 3 a 6 células.

Características del PMMA: Tiene una superficie en su mayor parte homogénea con pequeños defectos y escasos poros de menos de una micra de diámetro.

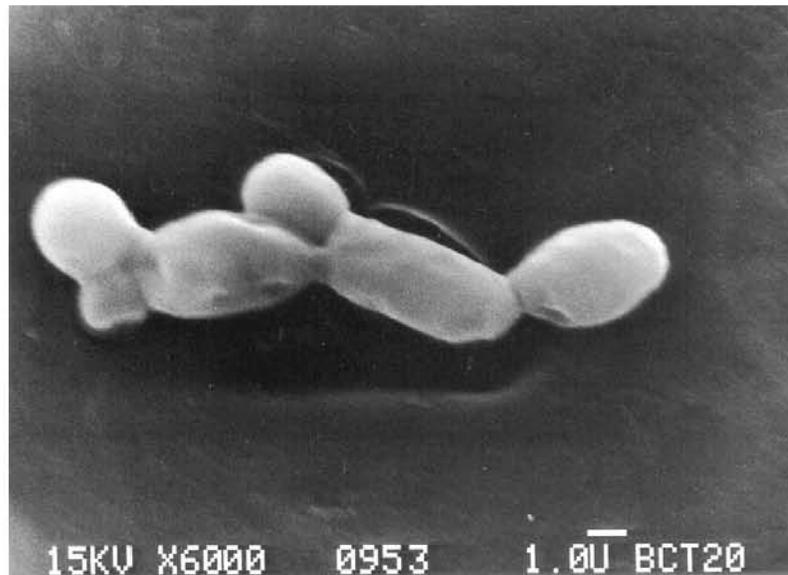


Fig.24 Polimerizado mediante microondas Acron, cultivo *Candida albicans* 24hrs 6000x MEB.

Adherencia de blastoconidios de *Candida albicans*, formando pseudomicelio y gemación. Se observa que la superficie del PMMA es uniforme.



Fig.25 Polimerizado mediante microondas Acron, cultivo *Candida albicans* 24hrs 1500x MEB.

Se observa la adherencia de blastoconidios y pseudomicelios en gemación.



Fig.26 Polimerizado mediante microondas, cultivo *Candida albicans* Acron 24hrs 600x MEB

Panorámica para valorar la superficie del material que es uniforme y presenta pocos defectos.

### **Polimerizado mediante microondas Acron: cultivo a 48hrs**

Características del blastoconidio: Se observan blastoconidios de 2.4 micras de diámetro en promedio.

Características de la adherencia: Los blastoconidios se encuentran adheridos a la superficie del PMMA en forma deseudomicelio y como células aisladas

Características del PMMA: Tiene una superficie homogénea con ligeras irregularidades y pocos poros.

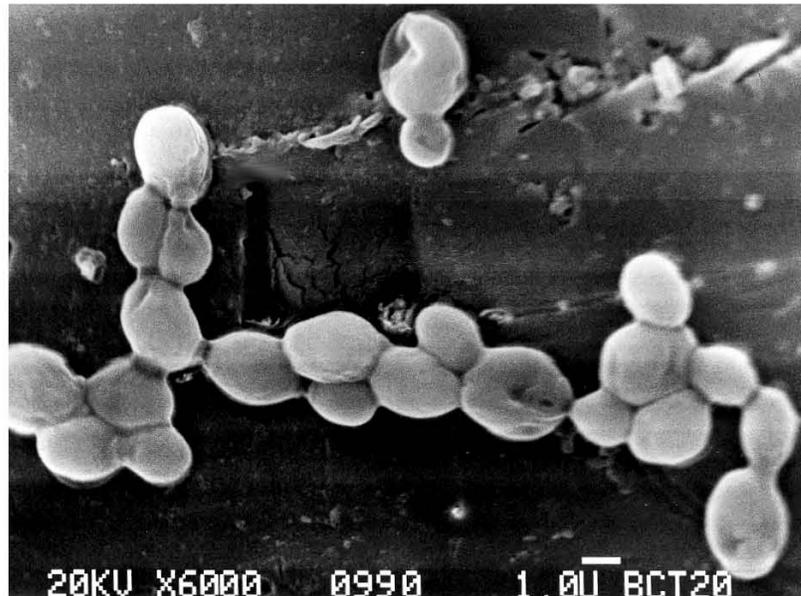


Fig.27 Polimerizado mediante microondas Acron, cultivo *Candida albicans* 48hrs 6000x MEB

Blastoconidios maduros, uniformes, formandoseudomicelios y presentandogemación.

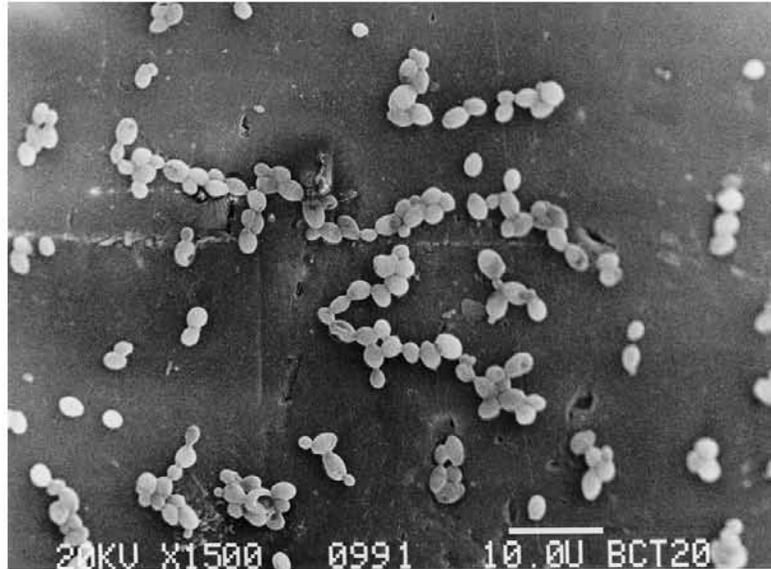


Fig.28 Polimerizado mediante microondas Acron, cultivo *Candida albicans* 48hrs 1500x MEB  
La superficie del material en su mayoría es uniforme, con pequeños defectos. Los blastoconidios forman pseudomicelio.

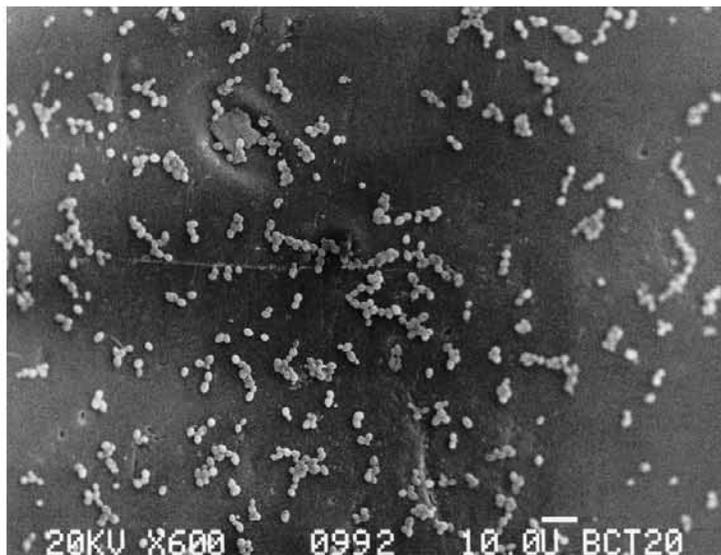


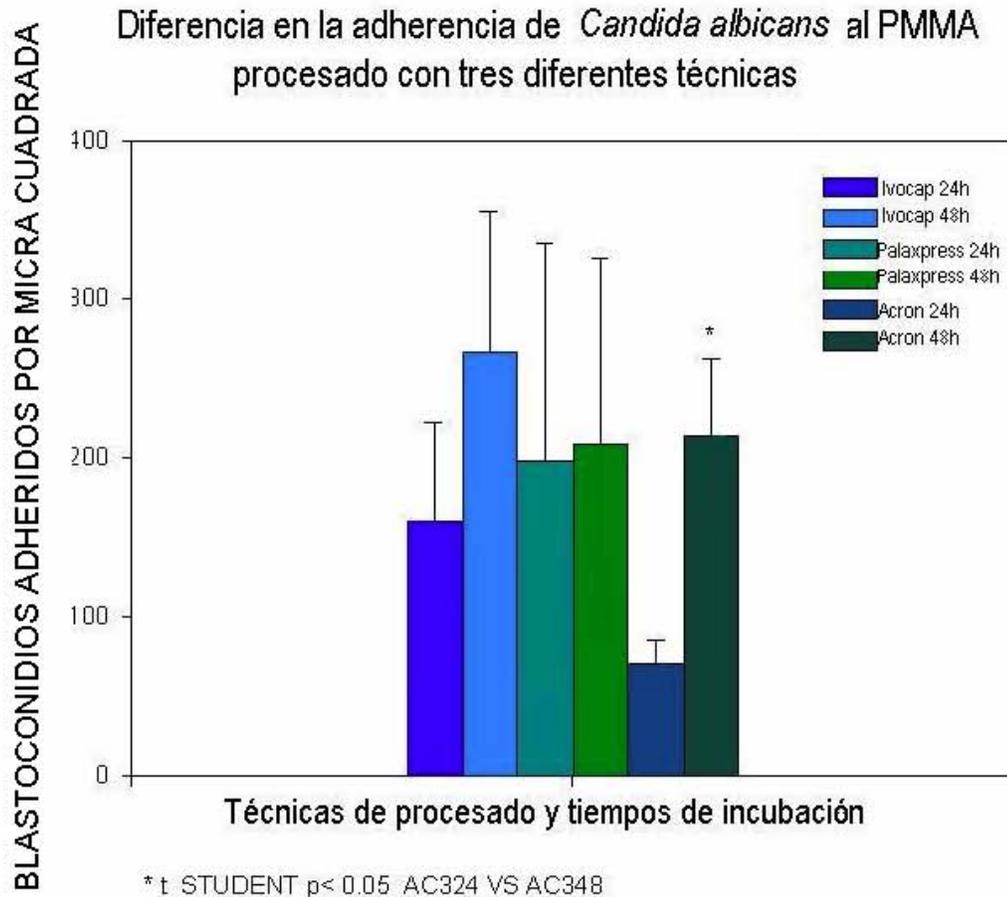
Fig.29 Polimerizado mediante microondas Acron, cultivo *Candida albicans* 48hrs 600x MEB  
Se observa la distribución uniforme de los blastoconidios en la superficie de la muestra.

De las tres pruebas realizadas para cada técnica de procesado, se observó que el número de blastoconidios adheridos al PMMA fue muy variable, siendo que las pruebas de adherencia, fijado de las muestras y observación del campo mediante microscopia electrónica de barrido se realizaron bajo condiciones iguales.

De los conteos individuales para cada prueba se obtuvieron los promedios y el error estándar de blastoconidios adheridos mediante el programa estadístico Sigma Stat Ver. 3.1 los cuales se presentan en la tabla 2. y se resumen en la grafica 1.

Acrílico	Tiempo	Promedio	Error Estándar
Ivocap	24hrs	160.3	± 61.6
Ivocap	48hrs	265.6	±90.1
Palaxpress	24hrs	197.3	±138.4
Palaxpress	48hrs	208.6	±117.4
Acron	24hrs	71	±14.3
Acron	48hrs	213.6	±48.2

Tabla.2 Promedios de blastoconidios adheridos al PMMA



Grafica.1 Adherencia de *Candida albicans* al PMMA promedios entre grupos.

Como se puede observar en la grafica 1, los promedios de blastoconidios adheridos al PMMA nos indican que no hay una valoración estadística significativa entre los tres sistemas de procesado a 24 y 48 hrs, esto debido a la variación en la adherencia de los blastoconidios, lo cual no permite hacer una comparación estadística entre los tres grupos.

La variación de la adherencia en el sistema de procesado Ivocap y Palaxpress de 24 a 48hrs no es significativa. El sistema de procesado por microondas Acron presenta una

variación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos de 24 y 48hrs  
\*t Student  $p < 0.05$  Acron24hrs vs. Acron48hrs.

Utilizando el microscopio electrónico de barrido observamos que la adherencia de *Candida albicans* a la superficie del PMMA, el agrupamiento y la morfología de los blastoconidios, así como las características de la superficie de la muestra son diferentes en cada técnica de procesado y a los diferentes tiempos.

Se determino mediante los promedios de blastoconidios adheridos al PMMA y el total del área de las muestras, que cantidad de blastoconidios de la concentración inicial en el caldo de soya se adhirió a la muestra. El resultado se expresa en porcentaje. Del 100% de blastoconidios iniciales (  $1.5 \times 10^7$  en 1.5 ml) solo se adhirió menos del 1% en los tres sistemas de procesado.

## 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 analiza 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 de pseudomicelio, reproducción y colonización sobre el PMMA. Además de observar las características del microorganismo fue posible observar las características de la superficie del PMMA mediante el uso del microscopio electrónico de barrido.

En este estudio se demuestra 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.

Los datos obtenidos de los conteos de los blastoconidios adheridos al PMMA de las tres técnicas de procesado y a los dos tiempos de inoculación son muy variables, lo cual, no permitió hacer el estudio comparativo entre las tres técnicas de procesado con ANOVA. Se realizó una gráfica de los promedios de blastoconidios adheridos en las tres técnicas de procesado y a dos tiempos 24 y 48 hrs, en la cual se observa

que el error estándar es elevado y esto por la variación de los resultados entre las pruebas de adherencia.

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 hrs. (t Student  $p < 0.05$  Acron24hrs vs. Acron48hrs), el cual demuestra un crecimiento marcado en el número de blastoconidios adheridos de 24 a 48 hrs.

Para haber logrado un resultado con diferencias estadísticamente significativas, en este caso, se tendría que aumentar el número de pruebas y tiempos de inoculación para valorar estadísticamente.

De la concentración inicial de blastoconidios presente en el caldo de soya donde se realizó el experimento de adherencia, solo menos del 1% de estas blastoconidios se adhirieron a la superficie del PMMA, lo cual demuestra que el PMMA procesado con estas tres técnicas es una buena alternativa para fabricar bases de aparatos protésicos.

Esto nos indica que el porcentaje de blastoconidios adheridos en comparación con la concentración inicial a la que fueron expuestas las muestras es reducida. Los blastoconidios ocupan una superficie significativa sobre el PMMA, pero no se debe a la cantidad de células si no a su tamaño.

De las características valoradas que presenta la superficie del PMMA: áreas uniformes, lisas, así como poros y defectos son diferentes y varían entre los tres sistemas de procesado.

*Candida albicans* esta adherida tanto en las superficies lisas como en los defectos, lo que indica que no solo la retención mecánica por parte del material esta implicada en la adherencia, aunque es de importancia, si no que es un mecanismo con varios factores asociados como son: la hidrofobicidad por parte del material y las adhesinas en la pared celular de *Candida albicans*.

## CONCLUSIONES

La superficie del PMMA presenta características particulares según la técnica de procesado empleada en su elaboración.

Aunque en este estudio, la adherencia de *Candida albicans* al PMMA no presenta diferencias estadísticamente significativas entre las tres técnicas de procesado, las características del blastoconidio y la forma en que esta se adhiere a la superficie de la muestra tienen características particulares dependiendo de la técnica de procesado utilizada para elaborar el material. .

De las tres técnicas probadas, el que presenta las mejores características es el Termo-polimerizado con inyección IVOCAP, ya que estadísticamente no hay una diferencia significativa en el número de blastoconidios adheridas entre 24 y 48 hrs. Su superficie es homogénea, con pocos poros y defectos.

La técnica de Auto y termo-polimerizado PALAXPRESS, presenta una superficie irregular con amplias grietas que sirven de reservorio para el microorganismo.

En la técnica de polimerizado mediante microondas ACRON, la superficie es uniforme y presenta pocos defectos, sin embargo es el menos recomendable, ya que presenta un crecimiento estadístico significativo en adherencia entre 24 y 48 hrs, lo que indica que la adherencia en este sistema es exponencial entre estos periodos de tiempo.

## 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. Retención 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 BiolMed* 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. Ohman S. The prevalence of Staphylococcus aureus, Enterobacteriaceae species, and Candida species and their relation to oral mucosal lesion in a group of 79-year-olds in Göteborg. *Acta Odontol Scand* 1995; 53:49-54.
12. Budtz-Jorgensen E. Non-insulin dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol* 1996; 25:411-415.
13. Samaranayake L. Oral Candidiasis Londres Inglaterra Ed. De Wright 1990 66-103.
14. 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.
15. Nikawa H, Taizo H. Denture Plaque-past and recent concerns *J Dent* 1998; 26: 299-304
16. 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.

17. Nikawa H, Egusa H. Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacterial by dietary sugars. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 279-284.
18. Nikawa H, Tazio H. Interactions between denture lining material, protein pellicles and *Candida albicans*. *Archs Oral Biol* 1993; 38: 631-634.
19. Waltimo T, Johanna T. Adherence of *Candida albicans* to the surface of Polimethylmethacrilate-E Glass Fiber Composite Used in Dentures. *Int J Prosthodont*. 1999; 12: 83-86.
20. Scully C, Samaranayake L. *Candida* and oral Candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994; 5: 125-157.
21. Nevelainen M, Nari T. Oral mucosal lesions and oral hygiene habits in the home-living elderly. *J Oral Rehabil*. 1997; 24: 332-337.
22. Dorey J, Bruce B. Oral mucosal disorders in denture wearers. *J Prosthet Dent* 1985; 53: 210-213.
23. Lynch D. Oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 189-194.
24. 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.
25. Erkki O. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 71-74.
26. Sanchez Vargaz LO, Perez-Rios P, Romo-Garcia J. Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidiasis bucal. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 155-160.
27. Jenkinson H, Raíz C. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other *Streptococci* with *Candida albicans*. *Infec Immun* 1990; 58: 1429-1436.
28. 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.
29. Palle H, Tony A. Classification and clinical manifestations of oral yeast infection. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 57-60.
30. Samaranayake L, MacFarlane T. The in vitro proteolytic and saccharolytic activity of *Candida* species cultured in human saliva. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 229-235.
31. Nikawa H, Hamada T. Effects of salivary or serum pellicles on the *Candida albicans* grown and biofilm formation on soft lining materials in vitro. *J. Oral Rehabil* 1997; 24: 594-604.
32. 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.
33. Adam B, Baillie GS. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 2002; 51: 344-349.
34. Samaranayake LP, MacFarlane TW. An in vitro study of adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980; 25: 603-609.

35. Maza JL, Elguezabal N, Prado C. *Candida albicans* adherente to resin-composite restorative dental material: influence of whole human saliva. Oral surg Oral med Oral pathol Oral radiol Oral endod. 2002; 2002; 94: 589-92.
36. Gadea Ignacio, Cuenca-Estrella. Recomendaciones para el diagnostico micologico y estudios de sensibilidad a los antifungicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(1): 32-9
37. Panizo M, Reviánkina V. *Candida albicans* and its pathogenic effect on membranes. Rev Soc Ven Microbiol. Vol 21 n 2, 2001.
38. Pardi German, Cardozo I. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiologico de candidiasis bucal. Acta Odontol Ven. Vol. 40, n – 1. 2002.
39. Compagnoni Marco, Freitas de Souza. The effect of polymerization cycles on porosity of microwave-processed denture base resin. The Journal of Prosthetic Dentistry 2004;9: 281-5.
40. Akpan A, Morgan R. Oral Candidiasis. Postgraduate Medical Journal 2002; 78: 455-459
41. Ramage Gordon, Saville P. Biofilm of *Candida albicans*: A update. Eukaryotic Cell 2005 Vol 4, n 4. p 633-638.
42. Ramage Gordon, VandeWalle Kacy. Características de la formación de biopelículas por *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2001; 18: 163.170
43. Antje Albrecht, Angelika Felk. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions The American Society for Biochemistry and Molecular Biology 2005 <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M509297200>.
44. Garcia-Sanchez Susana, Aubert Sylvie. *Candida albicans* Biofilms: a Developmental State Associated with specific and stable gene\_expression patterns. Eukaryotic cell 2004 Vol 3; n 2, p 536-545.
45. Ayuso-Montero R, Torrent Collado J. Denture stomatitis: update. RCOE, 2004 vol 9, No 6, p. 657 – 662.
46. Panizo M, Reviánkina V. Adhesinas y receptores involucrados en el fenómeno de adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales. Rev Soc Ven Microbiol. 2001 Vol. 21; No 1.
47. Beiro Fuentes R, Vidal Garcia I. Factores predisponentes locales de Candidiasis oral. Revista de Medicina General. 2002; 40: 24-27.
48. Sitheequ M.A, Samaranayake L.P. Chronic Hiperplastic Candidosis/Candidiasis (Candidial Leukoplakia). Crit Rev Oral Biol. Med 2003, 14 (4): 253-267.
49. Green Clayton, Cheng Georgina. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene \_expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. Microbiology 2004; 150: 267-275.
50. Fang Li, Sean palecek. EAPI, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells. Eukaryotic Cell. 2003, Vol 2, n 6; p. 1266-1273.
51. Chandra Jyotsna, Kuhn Duncan. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. Journal of Bacteriology 2001 Vol. 183, No 18: p. 5385-5394.
52. Scully Crispian. Candidiasis mucosal. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994 Aug; 78(2): 189-93.

53. Moreno Maldonado V. Candidosis bucal en pacientes edentulos y parcialmente desdentados portadores de prótesis totales o parciales. 1997.
54. Sturtevant Joy, Calderone Richard. *Candida albicans* adhesins: Biochemical aspects and virulence. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 90-97.
55. Yacamán José M, Reyes José. Microscopia electrónica: Una visión del microcosmos. CONACYT – Fondo de Cultura Económica, México 1995.
56. Santander G. Rafael. Técnicas de microscopia electrónica en biología. Edit. Aguilar, España 1998.
57. Liébana Ureña J. Microbiología oral. 2da Edición. España: Editorial McGraw-Hill, 2002
58. Instrucciones de uso SR Ivocap® System. Ivoclar Vivadent® *technical*. Schaan, Liechtenstein.
59. Modo de empleo Palaxpress®. Heraeus Kulzer GMBH & co. KG. Grüner Weg 11 D-63450 Hanau. Julio 2003.
60. Instrucciones de Uso Acron™ MC. Base de resina para dentaduras curado por microondas. GC Lab Technologies INC. ALSIP, IL 60803 USA.
61. Anusavice 1999, La ciencia de los materiales dentales de Phillips. Editorial Mc Graw Hill, 10ª Edición, p.p 3-7, 219-270.