



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
ESPECIALIZACIÓN EN ESTOMATOLOGÍA DEL NIÑO Y DEL
ADOLESCENTE

EFECTO DEL XILITOL Y CLORHEXIDINA SOBRE LA
ADHESIÓN DE *Candida albicans* AL
POLIMETILMETACRILATO USADO EN APARATOS DE
ORTOPEDIA

T E S I S

Que para obtener el grado de especialista en:

ESTOMATOLOGÍA DEL NIÑO Y DEL ADOLESCENTE

Presenta:

C. D. CORNEJO REYES CRISTINA

Director de tesis: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

Asesor de tesis: Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO

México, D. F. Noviembre del 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



ÍNDICE

I.	INTRODUCCION.....	6
II.	MARCO TEÓRICO.....	7
II.1.	Polimetilmetacrilato (PMMA).....	7
II.2.	Formación de biopelícula.....	7
II.3.	<i>Candida albicans</i>	9
II.3.1	Taxonomía.....	9
II.3.2.	Morfología.....	10
II.3.3.	Componentes estructurales.....	12
II.3.4.	Mecanismos de adherencia.....	14
II.3.5.	Mecanismos y factores de adherencia.....	16
II.4.	Sistemas de polimerización.....	19
II.5.	Adherencia de <i>Candida albicans</i> al (PMMA) usados en los aparatos de ortopedia.....	21
II.6.	Saliva.....	21
II.7.	Estomatitis protésica.....	22
II.8.	Antisépticos y desinfectantes.....	23
II.8.1.	Definición y generalidades.....	23
II.9.	Clorhexidina.....	27
II.10.	Xilitol.....	32
II.11.	Estudios de los efectos del xilitol y la clorhexidina en la adherencia de <i>Candida albicans</i> en los aparatos de ortopedia.....	33
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
IV.	HIPOTESIS.....	44
V.	OBJETIVO.....	45
VI.	MATERIALES Y METODOS.....	46
VI:1	Tipo de estudio.....	46
VI.2.	Población de estudio.....	46
VI.3.	Criterios de inclusión.....	46
VI.4.	Criterios de exclusión.....	46
VI.5.	Variables.....	46
VI.7.	Operacionalización de las variables.....	47
VI.8.	Técnicas.....	48
VI.9.	Análisis estadístico.....	51
VII.	RESULTADOS.....	52
VIII.	DISCUSIÓN.....	73
IX.	CONCLUSIONES.....	76
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
XI.	ANEXOS.....	84



RESUMEN

Antecedentes: Los aparatos de ortopedia u ortodoncia son elaborados 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, la cual aunado a factores tanto locales como sistémicos, contribuye a la retención de microorganismos.

El cuidado de la boca, en cualquier circunstancia, es muy importante. Una buena higiene y cuidado de nuestros dientes y encías nos permitirá disfrutar de una salud oral adecuada. Esta afirmación es más relevante cuando somos portadores de aparatología de ortopedia u ortodoncia. Los aparatos de por sí son retentivos, la cual cosa significa que se podrá acumular mayor cantidad de alimentos por más tiempo creando una mayor predisposición a las caries, a las enfermedades de las encías y mucosa oral debido también a otros cofactores, como un pH ácido, ingesta aumentada de carbohidratos, diversas enfermedades sistémicas y tratamientos farmacológicos

En el presente estudio se analizó las características de la adherencia de *Candida albicans* en muestras de resina acrílica (Polimetilmetacrilato) de autocurado usada para la elaboración de los aparatos de ortopedia u ortodoncia, con un pre tratamiento de 2 horas con diferentes agentes desinfectantes que son Xilitol al 1%, Xilitol al 5% y Clorhexidina al 0.12% se inocularon a dos tiempos de 24hrs y 48 hrs. La adherencia del microorganismo se evaluó por medio de microscopia de barrido.

De los datos obtenidos se compararon: la superficie del polimetilmetacrilato, las características de la adherencia de *Candida albicans* y la cantidad de levaduras adheridas en los tres tipos de soluciones desinfectantes.

Objetivo: Analizar mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), la adherencia de *Candida albicans* in vitro, sobre muestras de resina acrílica de polimetilmetacrilato usadas para bases de dentaduras, las cuales fueron procesadas con tres diferentes técnicas.

Metodología: Se elaboraron 24 muestras de resina acrílica con pre tratamiento con tres soluciones desinfectantes, y un grupo control en las cuales se inoculó *Candida albicans* in vitro durante 24 y 48 h; dichas muestras se observaron mediante MEB de donde se obtuvieron fotografías a un aumento de 750x, 1,500x y 5,000x, las cuales se utilizaron como panorámica, conteo de blastoconidios y detalle, respectivamente. **Resultados y discusión:** La resina pre tratada con xilitol al 1% presenta poros de 1 a 2 micras de diámetro, a 24 h de inoculación se observan blastoconidios y formación de pseudomicelio mientras a 48 h hay



numerosas células en gemación y en el grupo control se presentan hifas. En los tratados con clorhexidina al 0.12% hay poros y mayores irregularidades que muestran un deterioro mayor al ser tratado con esta solución, a 24 h los blastoconidios tienen forma irregular con colapso en su superficie en tanto a 48 h existen un gran número células pseudomicelios, gemación y las células siguen presentando irregularidades. En el pre tratado con xilitol al 5% hay poros de 1 a 5 micras, a 24 h hay pseudomicelios y células en gemación, tanto que a 48 h la formación de pseudomicelios es mayor en el grupo control existiendo hifas.

Conclusiones: La resina acrílica que se pre trato con xilitol al 1% presenta la superficie con menos defectos y el efecto de él xilitol se mantiene aun con la inoculación de 48hrs hay diferencia significativa en el número de células adheridas de 24 a 48 h de inoculación.

Palabras clave: Adherencia, polimetilmetacrilato, Estomatitis protésica, Microscopia electrónica de barrido.



Background: The orthopedics and orthodontics devices are generally made of acrylic. Universal material which formed a solid surface that is found in contact with mucosa oral of the carrier patient. This surface presents defects that join factors as local as systematic. It contributes to retention of microorganism.

The care of the mouth in every circumstance is very important, a good hygiene and a good care of our teeth and gums let us enjoy a suitable oral health. This affirmation is more relevant when we are carriers of science of devices of orthopedics and orthodontics. The devices are retentives and it means that it could accumulate mayor quantity of food for too much time creating a mayor disposition to cavities, to sicknesses of the gums and mucosa mouth due to different factors such as PH, increasing intake of carbohydrates, several systematic sickness and pharmacological treatments.

The current research analyzes the characteristics of the attachment candida albicans in samples of resin acrylic (polimetilmetacrilato) the self-healing is used to elaborate the orthopedics and orthodontics devices pretreatment of 2 hours with different disinfectants that are Xilitilo from 1%, Xilitilo to 5% and clorhexidina to 0.12%. It inoculates with two times of 24 hours. The attachment is evaluated by throwing out microscope.



I. INTRODUCCIÓN

El cuidado de la boca, en cualquier circunstancia, es muy importante. Una buena higiene y cuidado de nuestros dientes y encías nos permitirá disfrutar de una salud oral adecuada. Esta afirmación es más relevante cuando se es portador de aparatología de ortodoncia. Los aparatos de ortodoncia tienen superficies que pueden servir como reservorios de restos de alimentos y microorganismos, este hecho puede favorecer la formación de caries, enfermedad periodontal y el desarrollo de lesiones en la mucosa oral.

En la mayoría de los casos, la edad ideal para el uso de los aparatos correctores y otros tratamientos de ortodoncia es entre los 5 y 14 años de edad. Edad en la cuál es frecuente que los hábitos de higiene bucal adecuado, aunado a la retención de biopelícula microbiana que presentan este tipo de aparatología, pueden presentarse diferentes patologías.

De todos los materiales empleados en aparatología de ortopedia y ortodoncia así como superficie de prótesis removible, es el polimetilmetacrilato (PMMA), el que ha demostrado tener las mejores propiedades como son: No experimentar cambios de color después de su procesado, tanto en medioexterno como en medio intrabucal. Poseer buena estabilidad dimensional. Tener una resistencia mecánica y a la abrasión adecuada para su uso. Ser impermeable a los fluidos orales, de forma que sea higiénica, sin gusto ni olor desagradable. Ser atóxica y no irritante para los tejidos bucales, es decir, biocompatible. No presentar corrosión, ablandamiento ni solubilidad ante los fluidos bucales u otras sustancias que se puedan encontrar ocasionalmente en la boca. Tener poco peso específico y conductividad térmica relativamente alta. Ser fáciles de reparar en caso de fractura. Tener un procesado y manipulación no complicada en cuanto a técnicas y equipos, pero también su superficie es susceptible de ser colonizada por multitud de microorganismos que pueden dar origen a patologías en mucosa que soporta el aparato de ortopedia. Los defectos pueden ser producidos por errores en el procesado y una incorrecta manipulación al momento de su elaboración, como puede ser una presión inadecuada, falta de homogeneidad en el momento de la



polimerización dando lugar a la aparición de poros, y como consecuencia una disminución de la resistencia por acumulo de tensiones y dificultad en la limpieza. En este sentido, la búsqueda de agentes limpiadores para la eliminación de la biopelícula de la superficie de los aparatos ortodonticos y de ortopedia se han probado diferentes colutorios con la finalidad de observar su efectividad. Estos colutorios se han dividido dependiendo sus componentes químicos y sus mecanismos de acción en: peróxidos alcalinos, hipocloritos alcalinos, ácidos, desinfectantes y enzimas. La efectividad de estos agentes depende de su concentración, tiempo de exposición y el pH. Dentro del factor tiempo interviene la concentración de microorganismos y por lo tanto la concentración del desinfectante, así como el tipo de material de la prótesis.

Al respecto, la clorhexidina es el agente antimicrobiano bucal más usado, efectivo y documentado en eliminar o disminuir *Streptococos mutans*. La eficacia antimicrobiana de la clorhexidina permite controlar el desarrollo de otras bacterias orales como son los lactobacilos y en mayor medida contra el desarrollo de levaduras como *Candida albicans*.

Por otro lado, el xilitol es un pentitol (QUE ES EL PENTITOL) que se presenta en la naturaleza en pequeñas cantidades, en los hongos, líquenes, algunas frutas y verduras. Asimismo se forma en el cuerpo humano como un intermediario normal en el metabolismo de la glucosa en cantidades que varían desde los 5 a los 15 gramos diarios. Es un producto que no favorece el desarrollo de caries ya que no es metabolizado por los microorganismos que las generan. Por lo que es de interés estudiar la efectividad de estos agentes antimicrobianos sobre la adherencia de *Candida albicans* al polimetilmetacrilato usado en aparatos de ortopedia.



II. MARCO TEÓRICO.

II.1. POLIMETIL METACRILATO (PMMA).

El inicio de los polímeros acrílicos en odontología fue después de la segunda guerra mundial.¹ Desde su introducción, la resina acrílica a base de polimetil metacrilato (PMMA) demostró ser un material para bases de prótesis dental, aparatos de ortopedia bucal y prótesis ortodóntica muy satisfactoria ya que su principal ventaja es ser biocompatible con la mucosa oral, así como poseer una fácil manipulación, baja toxicidad, una buena estabilidad dimensional, baja susceptibilidad a fracturas y recientemente con la modificación de redes inter cruzadas (cross-linking) se ha mejorado la resistencia al agua.^{1, 2, 3,4,5.}

El colocar un aparato de ortodoncia 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 superficies acrílicas como en la mucosa bucal adyacente.^{3, 6, 7, 8}

Dicha biopelícula es una acumulación heterogénea de varios microorganismos tanto aerobios como anaerobios que dependen de la adhesión a una superficie, rodeados de una matriz intercelular compuesta de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleídos y lípidos que proveen una estabilidad mecánica a la biopelícula mediante su adhesión a la superficie formando una red polimérica tridimensional cohesiva que interconecta y transitoriamente inmoviliza a las células de la biopelícula^{9, 10, 11.}

II.2. Formación de biopelícula: La película de condicionamiento se forma en la superficie de biomateriales y de la capa inferior del tejido blando inmediatamente después de la implantación, porque los dispositivos biomédicos son rodeados generalmente por los fluidos corporales tales como orina, sangre y líquido sinovial. La adherencia de la levadura es seguida de cerca por la formación y proliferación de biopelícula.



Para colonizar una superficie, la levadura en forma de blastoconidio debe primero adherirse a las células del anfitrión o a la superficie del biomaterial que se encuentra cubiertas de una película de condicionamiento de glicoproteínas.

Los mecanismos de formación de las biopelículas son los siguientes:

1) Formación de una película orgánica: La superficie del aparato de ortodoncia presenta a las pocas horas de su inserción en la boca una película orgánica constituida por proteínas presentes en la saliva. Estas proteínas (glicoproteínas, amilasa, IgAs, IgG, IgM, lipasa, peroxidasa, lactoferrina, lisozima y calcio) actuarían como mediadores en la fijación de la biopelícula bucal a la superficie de los aparatos de ortodoncia.¹²

2) Formación de biopelícula bucal en la superficie protésica: El mecanismo de fijación de los microorganismos a la superficie en una primera fase es inespecífico, reversible y se explica por medio de energía de superficie entre los microorganismos y la base de la prótesis u aparatos de ortodoncia. En estas interacciones intervienen fenómenos electrostáticos y de hidrofobicidad; en una segunda fase, el proceso de la adhesión esta mediado por interacciones entre adhesinas y receptores específicos de los microorganismos.

3) Penetración y anclaje mecánico en los defectos de la superficie protésica: Este último punto es particularmente importante en el caso de las prótesis elaboradas con resinas acrílicas, en las que los defectos de la superficie pueden favorecer la formación de biopelícula bucal y evitar su remoción.¹³

La formación de la biopelícula se correlaciona con la hidrofobicidad de la célula. La adherencia de las células es seguida de cerca por la formación y proliferación de biopelículas. Y dentro de las consecuencias del crecimiento de biopelículas son, la resistencia hacia los agentes microbianos y la protección contra las defensas del anfitrión.¹⁴

Con frecuencia los pacientes portadores de aparatos ortodonticos con base de PMMA presentan ulceras e infecciones originadas por factores locales: mal ajuste del aparato ortodontico, falta de higiene, y sistémicos: estados de malnutrición,



diabetes mellitus, infección por VIH, antibiótico terapia prolongada, quimio y radioterapia que contribuyen a la proliferación de *Candida albicans* y su adherencia a la superficie de la base de PMMA.¹⁴

Los aparatos de ortodoncia con base de PMMA generalmente son elaborados con una técnica de autopolimerizado ya que los aditamentos mecánicos (ganchos, alambres, tornillos y brackets) dificultan el enmuflado de la misma. La superficie interna de dichos aparatos presenta defectos microscópicos (grietas, porosidades e irregularidades) que son producidos por diversos factores.¹⁴

- 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 de polvo-liquido, esto ocurre en algunas regiones de la resina que contienen más polvo 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 asumen formas irregulares.
- Inclusión de aire durante el mezclado del material.
- Resecado del material ya polimerizado.
- Exceso en la velocidad de polimerizado.

Estas irregularidades pueden actuar como depósito de *C. albicans*, que es responsable del inicio, progresión y el mantenimiento de la infección llamada estomatitis protésica.

II.3 .*Candida albicans*

Es una levadura, saprófito y patógeno oportunista la cual habita en la mucosa gastrointestinal, oral, vaginal y piel del humano.¹⁴ *Candida albicans* es la levadura



de mayor importancia médica, debido a que la mayor parte de las micosis que se presenta en el humano son ocasionadas por este microorganismo. *Candida albicans* presenta características estructurales, de adhesión y factores de patogenicidad las cuales se relacionan con su capacidad de producir lesiones.^{14,26}

II.3.1. TAXONOMÍA

Los microorganismos involucrados como agentes etiológicos de la Candidiasis, se encuentran actualmente clasificados taxonómicamente de la siguiente forma:

Reino: Hongo

División: *Deuteromycota*

Clase: *Blastomycetes*

Familia: *Cryptococcaceae*

Género: *Candida*

Especies: *albicans* (como la más frecuente y virulenta) y otras especies⁶. *Candida albicans* es una levadura oportunista y un organismo comensal inofensivo dentro de la microflora endógena de muchas personas sanas, sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, este hongo es una causa importante de infecciones que van desde las micosis superficiales, invasiva, profunda y candidiasis sistémica, *C. albicans* es considerado el más común hongo patógeno humano, y, en general, las especies de *Candida* son la cuarta causa principal de infecciones del torrente sanguíneo en los Estados Unidos.^{27, 29,30}

II.3.2. MORFOLOGÍA

C. albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado



formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí.^{3,15,16}



Fig. 1 Blastoconidios de *C. albicans* en gemación, formación de clamiconidio, y con formación de tubo germinativo. Tomado de: Serdanaturaleza

Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales tienen reproducción asexual por un proceso de división celular llamado gemación.

Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora. Cuando el brote o yema crece y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un septo entre las dos células¹⁶.

La forma filamentosa del hongo **hifa**, es una estructura microscópica tubular, que contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes, miden de 5 a 15 micrometros de largo en su estado maduro. Esta crece continuamente por extensión apical inicialmente como tubo germinativo, pseudo hifa y posteriormente como hifa verdadera. “in vitro” se han observado los factores que regulan la transición de blastoconidio a hifa, como lo son las temperaturas que van entre 37°C a 40°C, pH entre 6.5 a 7.0 y la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno, así como factores de Transcripción Cph1 y Efg1p.^{14, 16,17}

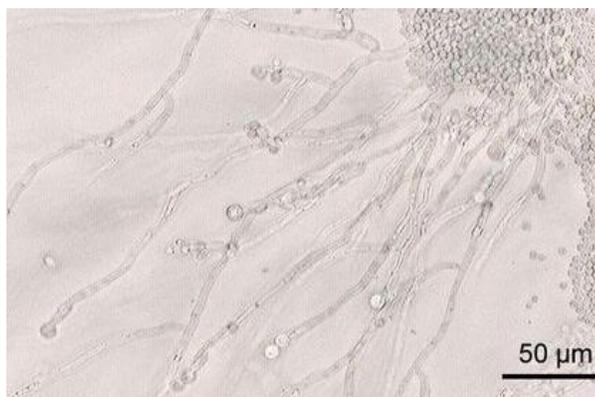




Fig. 2 Grupos de hifas de *Candida albicans*. Tomado de: De Wikimedia Commons año 2005

Un tubo germinal se define como una extensión filamentosa de una célula levaduriforme que mide alrededor de la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula^{18,19}.



Fig.3 Tubo germinativo de *Candida albicans* 100x. Tomado de: ASM Microbelibrary ©Stanford

Clamidoconidio: Son cuerpos celulares grandes de pared gruesa que protege contra condiciones desfavorables, esta pared contiene 2 capas: una interna de polisacáridos y la externa con proteínas. Se llegan a presentar cuando se cultivan en medios especiales como el Agar Harina de Maíz; el clamidoconidio tiene un diámetro de 7 a 17 micras en un estado maduro y se origina en el extremo del pseudomicelio. Es una importante característica morfológica en la identificación de *Candida albicans*.^{14,16}





Fig 4. Clamidoconidias terminales de *C. albicans* en agar harina de maiz, luego de 48 h de incubación, 400X

II.3.3. Componentes estructurales

Pared celular: La pared celular es una estructura esencial para todos los aspectos de la biología y 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. Se han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): Manoproteínas, β -Glucán-Quitina, β -Glucán, Manoproteínas y una capa de fibrillas (Figura 5)

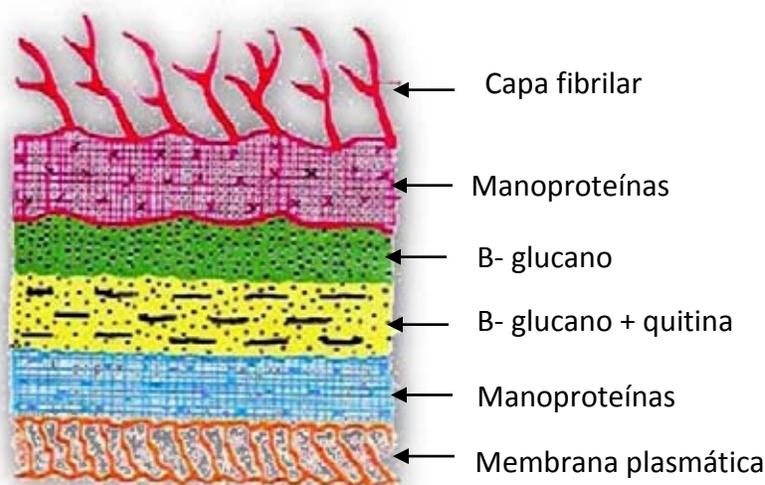


Fig 5: Diagrama esquemático de la pared celular de *C. albicans* Tomado de Calderone y Braun 1991.⁶¹

Los dos primeros están asociados con la rigidez estructural, y la mananoproteína está implicada a la adherencia a los tejidos del hospedero, y son diferentes en su expresión, secreción y localización dentro de la estructura de la pared.¹⁴

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es



variable²⁰. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono²¹.

La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos Manáno (polímero de manosa), Glucáno (polímero de glucosa) y Quitina (polímero de N-acetil glucosamina). Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos, en la literatura existen bastantes datos acerca de la composición química de dicha pared. El polisacárido manán representa aproximadamente entre 15,2% y 22,9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán β -1-3 y el D-Glucán β -1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular²². Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas^{22,23,24,25,26} en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y Quitina entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular^{22,27}.

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 Glucáno y de Quitina de *C. albicans* varía de acuerdo con la forma de crecimiento^{22,28}.

Estudios ultraestructurales de la pared celular de *C. albicans* han demostrado una compleja microarquitectura. La pared tiene un espesor variable y está compuesta por varias capas, las cuales se han puesto de manifiesto por diferencias en la densidad electrónica.

El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación²².

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, colágena y filamentos de actina), componentes



del suero (fibrinógeno y fibrina) y los que se encuentran en las células epiteliales y endoteliales. La expresión de estas manoproteínas de la pared tiene un papel importante en la morfogénesis, además de ser importantes inmunogenos, capaces de disparar y modular la respuesta inmune durante la candidiasis. ^{37, 46}

Las Manoproteínas de *C. albicans* están constituidas por residuos de manosa unidos entre sí por enlaces α -1,6 los cuales unen a la porción de proteína a través de dos residuos de N-acetil glucosamina (unidos entre sí por enlaces β -1,4) con un residuo de Asparagina y residuos de manosa que se unen a la proteína a través de residuos de los aminoácidos de Serina y Treonina.²²

En el citoplasma se encuentra un núcleo que contiene 7 cromosomas los cuales están delimitados por una membrana nuclear, posee además un nucléolo rico en ARN y organelos citoplasmáticos, como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi. ⁵⁷

La membrana citoplasmática es una estructura de 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^{39,40}. Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción^{41,42}.

II.3.4. 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 *C. albicans* a los biomateriales es mediada por factores no específicos (la hidrofobicidad superficial y fuerzas electroestáticas) 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 mediar por las proteínas de la superficie de la célula tales como por los



codificados por los genes de la familia ALS (agglutinin-like sequence) que codifican para glucoproteínas localizadas en la superficie celular, las cuales participan en la adhesión de *C. albicans* a las superficies del hospedero que producen la proteína de adhesión EAP1.^{14,30}

Candida albicans presenta una serie de factores de virulencia que facilitan la colonización y la infección del hospedador. Entre ellos cabe mencionar el dimorfismo o capacidad del hongo para desarrollar un crecimiento levaduriforme y filamentoso, el cual favorece la evasión de los mecanismos defensivos del hospedador.

También existen otros tipos de factores de virulencia, tales como:

- 1) Adhesinas: que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres
- 2) Proteinasa y fosfolipasas: Las cuales corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador.
- 3) Tigmotropismo: que permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos.
- 4) Producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras.

II.3.5. MECANISMOS Y FACTORES DE ADHESION



Posiblemente, uno de los eventos críticos en la patogénesis de las infecciones producidas por *Candida* es la capacidad de estos hongos oportunistas, especialmente *C. albicans* de cambiar del estado hidrofílico de su superficie celular al estado hidrofóbico ^{37,38,39,40}.

Se considera que, dicho cambio está relacionado con la patogenicidad y por lo tanto, se ha pensado que las células hidrofóbicas son más virulentas y se adhieren con más facilidad a las células epiteliales y a las superficies plásticas inertes que las células hidrofílicas.

ADHESINAS: una adhesina se define como una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* a las células del huésped.

La adhesina principal de *C. albicans* es una manoproteína que conforma una capa de fibrillas (dicha capa está constituida aproximadamente por 85% de carbohidratos, principalmente manosa), y cuya síntesis se incrementa en medios que contienen altas concentraciones de galactosa o sacarosa a 37° C.

Se describen proteínas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágena tipo I y IV. Existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida*, como Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p.

Als1 comparte una secuencia con la glicoproteína de adhesión a las superficies celulares llamada α - aglutinina, indispensable para el reconocimiento célula-célula.

Int1 tiene un papel importante en la adherencia y filamentación de *C. albicans*

La agregación de microorganismos mediada por glicoproteínas puede aumentar su capacidad de adherirse a los tejidos bucales. Una de estas glicoproteínas proveniente de la pared celular de *C. albicans*, permite la unión de esta especie a la colágena Tipo I.

C. albicans posee dos receptores con alta y baja afinidad para fibronectina. Estos receptores pueden funcionar como adhesinas que permiten la unión de la



fibronectina del plasma sanguíneo, así como de los péptidos derivados de la fibronectina.³⁴

Está claramente demostrado que de las enzimas extracelulares sintetizadas por *C. albicans*, las proteinasas ácidas son las más conocidas que cumplen funciones como adhesinas. Estas enzimas han sido identificadas en diversos tejidos infectados por el hongo y constituyen como tal, un importante factor de virulencia del mismo.

Así mismo, ha sido comprobado que células de *C. albicans* adheridas al acrílico de los aparatos de ortodoncia, crecen en mayor grado en medios suplementados con altas concentraciones de glucosa, galactosa, sacarosa o maltosa que en medios con bajas concentraciones de glucosa.

Esta observación tiene gran relevancia, si se toma en consideración el hecho de que las dietas ricas en carbohidratos predisponen a los individuos a infecciones por *Candida* en cavidad bucal. También se ha podido comprobar que *C. albicans* posee una mayor virulencia cuando crece en medios que contienen galactosa que cuando crece en medios que contienen glucosa.^{14, 23}

En otros trabajos, se ha demostrado que después que ocurre la adherencia de *C. albicans* a los tejidos, este microorganismo sintetiza nuevas proteínas de superficie, las cuales van acompañadas por la fosforilación de la tirosina de algunas de estas.^{24, 25}

Las proteinasas ácidas han sido localizadas en la capa más externa de la pared celular de *C. albicans* a través del microscopio inmunoeléctrico, se activan en zonas donde hay valores bajos de pH y son inhibidas por la Pepstatina A.³⁵

Estas enzimas tienen la capacidad de dañar la membrana celular de las células del huésped, al degradar los lípidos que la constituyen. La producción o no de estas enzimas pueden ser un importante determinante en la capacidad de los microorganismos, para producir infecciones invasoras.³⁶

Por otro lado los mananos y las manoproteínas despliegan la más potente actividad inmunomoduladora, capaz de regular virtualmente todos los mecanismos



que posee el sistema inmune (células NK, fagocitos, la inmunidad medida por células y los mecanismos humorales).¹⁴

La Coagregación: *C. albicans* como comensal de la cavidad bucal puede adherirse a proteínas de la saliva y a bacterias de la cavidad bucal para evitar su eliminación de esta zona.²⁹

En la coagregación existen interacciones en donde intervienen múltiples mecanismos, se ha observado aglutinación microscópica y macroscópica de *C. albicans* con cepas de *Streptococcus S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus amylovorus* y *Bacteroides gingivalis*.¹⁴

Se han realizado estudios "*in vitro*", donde se ha demostrado que la adherencia de *C. albicans* a la superficie de la resina acrílica, puede llevarse a cabo mediante interacciones célula-célula con *Streptococcus mutans* en presencia de glucosa y sacarosa, observándose una coagregación entre ambas especies a través del microscopio electrónico de barrido en presencia de sacarosa. No se observó coagregación entre ambos microorganismos en presencia de glucosa.³¹

C. albicans también puede unirse a *S. gordonii* y esta interacción parece ser una propiedad general para la levadura, 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 oligosacárido de la pared de *S. gordonii*, el cual inhibe la adherencia este oligosacárido que contiene ramosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina.^{14, 22,28}

II.4 SISTEMAS DE POLIMERIZACIÓN.



El polimetilmetacrilato presenta ligeras variaciones según el proceso empleado en su polimerización: termocurado, autocurado, polimerización al microondas y moldeado por inyección.

II.4.1 Polimetilmetacrilato termocurado.

Generalmente se presenta en forma de dos componentes, polvo y líquido:

El polvo, compuesto de microesferas de polímero polimetilmetacrilato transparentes o pigmentadas y con el 0,5% de peso de iniciador, generalmente peróxido dibenzoico. Las propiedades mecánicas se pueden mejorar empleando copolímeros y metilmetacrilato con cloruro de vinilo y acetato de vinilo.

El líquido, compuesto de monómero metilmetacrilato volátil transparente. Su punto de ebullición es de 100,3 °C, contiene el 0,01% de hidroquinona como estabilizador. Algunos materiales contienen hasta el 6% de agente entrecruzador, como el etilenglicoldimetacrilato (EGDMA). Algunos pueden contener 4-META, elemento que forma una unión química entre el acrílico y las aleaciones de los metales no preciosos para prótesis, disminuyendo así las tensiones entre los dos componentes y reduciendo el agrietamiento del acrílico.⁶⁸

II.4.2. Polimetilmetacrilato autopolimerizable.

Se presenta comercialmente en forma de dos productos uno en forma de polvo y otro líquido:

El polvo, formado por microesferas transparentes o pigmentadas de polímero de polimetilmetacrilato (generalmente más finas que las usadas en el acrílico termocurado) y el 0,5% de peso de peróxido dibenzoico como iniciador. Varios materiales incorporan 4-META como agente de promoción de la adhesión a los componentes metálicos de los aparatos dentales, especialmente de aquellos confeccionados en acero inoxidable, cromo-cobalto, cromo-níquel o aleación de plata.



Los polímeros para bases de ortodoncia contienen generalmente el 5-20% de polietil o butilmetacrilato o en otros casos poliestireno o poli (2-etil-hexil-metacrilato).

Estos polímeros se añaden para mejorar las propiedades antidesplome de estos materiales durante su manipulación.

El líquido, compuesto de monómero de metilmetacrilato volátil transparente que contiene el 0,01% de hidroquinona como estabilizador y hasta el 2% de un activador químico como las aminas terciarias dimetil-p-toluidina o dihidroxi-p-toluidina. También pueden usarse como activadores los derivados del ácido sulfúrico.⁶⁸

II.4.3. Polimerización en microondas.

El material es polvo de polimetilmetacrilato con peróxido dibenzoico como iniciador; y monómero de metilmetacrilato estabilizado con cantidades reducidas de amina terciaria como activador.

Para la confección de las prótesis se emplean muflas (moldes) de elementos poliméricos reforzados con fibra y una escayola dental modificada. El procesado es más rápido y la base de la prótesis resultante contiene menos monómero residual y porosidades que la base tradicional termocurada. Por contra sólo se puede emplear para la confección de las prótesis que no tengan elementos metálicos.⁶⁸

II.4.4. Moldeado por inyección.

La resina se presenta en forma de cartuchos de copolímero de metacrilato termoplástico rosa o transparente. Los cartuchos son calentados para convertir el copolímero en una masa plástica que se inyecta en el molde o mufla por medio de dióxido de carbono a una presión de diez atmósferas, y la presión se mantiene hasta que el copolímero se ha enfriado.

Estos materiales presentan una alta resistencia y oposición a la fractura por su homogeneidad y su elevada densidad. Como no se emplea monómero para el procesado no puede quedar monómero residual con lo que evitamos posibles irritaciones de la mucosa donde se asientan la aparatología. Los copolímeros muestran una absorción de agua mínima y buena estabilidad dimensional a largo plazo.⁶⁸



II.5. Adherencia de *Candida albicans* al acrílico de los aparatos de ortodoncia y ortopedia.

La adherencia de las especies de *Candida* a las superficies plásticas es mediada por fuerzas de atracción de London-van der Waals (fuerzas hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas). Asimismo, la habilidad de las especies de *Candida* para adherirse a las superficies de acrílico de las prótesis, puede conferirle a estos microorganismos un acceso directo al hospedero humano.⁵²

Una investigación realizada por Edgerton et al, determinó que la saliva producida por las glándulas salivales sub-mandibulares, sub-maxilares y sub-linguales humanas, formaba una película adquirida sobre la superficie de la prótesis dentales, favoreciendo la adherencia de *C. albicans* a la superficie de acrílico (polimetilmetacrilato) de las mismas. Estos investigadores identificaron en la saliva, dos glicoproteínas del tipo mucinas (una de alto peso molecular, denominada MG1 y la otra de bajo peso molecular, denominada MG2), y sugirieron que las mucinas servían de receptores a ciertas adhesinas del hongo.³³

También se ha comprobado que el Polímero Extracelular es sintetizado por levaduras de *C. albicans* aumenta la habilidad de estas de adherirse al acrílico de las prótesis dentales, incrementándose aún más esta actividad en la cavidad bucal en presencia de carbohidratos.^{36,37}

II. 6.SALIVA.

La importancia de la saliva en la adhesión de las levaduras no está clara. La Ig A secretora tiende a inhibir la unión de *Candida albicans* a las células del epitelio bucal. Resina acrílica tratada durante 30 minutos con una mezcla de saliva recogida sin estimulación, tiende a reducir la adherencia de todas las cepas probadas de *Candida albicans* (McCourtie et al, 1986). Estos hallazgos están de acuerdo con la observación realizada en monos en los que la colonización de prótesis por *Candida* aumenta cuando decrece el flujo de saliva.⁶⁹

En las prótesis dentales la unión de *C. albicans* está mediada por componentes específicos de la saliva o del suero que forman la película adquirida e intervienen, por tanto, en el inicio de la adhesión, este efecto de la saliva y suero también se



produce para otras especies de *Candida*.⁷⁰ Esta película adquirida también puede hacer variar la efectividad de los antifúngicos.⁷¹

Por otro lado, levaduras preincubadas durante tres horas en una mezcla de saliva completa mostraron posteriormente mayor adhesión a células epiteliales humanas y deriñón de embrión humano que aquellas que fueron preincubadas en suero fosfato (solución amortiguadora). Así mismo una película de mezcla de saliva sobre células epiteliales humanas aumenta de forma significativa la adhesión de *Candida albicans*.⁴¹

II.7. Estomatitis protésica

La estomatitis protésica es una de las presentaciones clínicas de mayor prevalencia entre las infecciones causadas por *Candida albicans*, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, y en pacientes con una serie de factores predisponentes como el uso de aparatología ortodóntica, prótesis dentales, xerostomía y terapias frecuentes con antibióticos.¹⁵

La estomatitis protésica es una enfermedad muy frecuente entre los portadores de prótesis removible realizadas con resina acrílica y la prevalencia se cifra entre un 11% y un 67%.

Es mucho más frecuente en la mucosa palatina que en la mandibular, y empieza como un punteado rojo diseminado, que progresivamente se torna más eritematoso y congestivo para terminar con inflamación incluso con erosiones en la mucosa; la sintomatología suele ser escasa, en ocasiones, los pacientes solo describen halitosis, gusto desagradable y sequedad en boca; sólo al ulcerarse pueden provocar dolor y sobre todo ardor.^{1, 14,30}

Para el tratamiento de estomatitis protésica existen diversos medicamentos y sobre todo se utilizan anti fúngicos como lo son el fluconazol, nistatina y anfotericina B; así como diversos antisépticos como lo pueden ser la Clorhexidina e hipoclorito de sodio, solo por mencionar algunos.



II.8. ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES

Dentro de las medidas para controlar la colonización de esta levadura y que puede ser adoptadas por los portadores de aparatos de ortodoncia se encuentran: rutinas de limpieza tanto de la mucosa bucal como del aparato de ortodoncia y el uso de colutorios para la remoción de la biopelícula de la base de PMMA.^{15, 16,28}

Una rutina de limpieza puede ser instituida para prevenir y eliminar la acumulación de microorganismos y de quitar mucina, restos de comida, de cálculo y las manchas.

La limpieza de la prótesis o aparato de ortodoncia puede lograrse mecánicamente por cepillado, químicamente mediante el uso de agentes químicos o por la asociación de ambos métodos.

También es importante señalar que los agentes de limpieza empleados deben tener la capacidad para disolver depósitos orgánicos, no deben ser tóxicos o irritar la mucosa, debe ser estable para el almacenamiento, preferentemente bactericida y fungicida y debe ser inofensivo para el aparato de ortodoncia.¹⁵

II.8.1. Definición y generalidades de los antisépticos.

Los **antisépticos** son soluciones de acción inespecífica y de uso estrictamente externo, capaces de destruir o inhibir el desarrollo de microorganismos que habitan o se encuentran transitoriamente presentes en la piel o mucosas. Para lograrlo deben reunir suficiente actividad antimicrobiana en el sitio de acción y una buena tolerancia local y general.

Los **desinfectantes** son agentes antimicrobianos que se emplean estrictamente sobre objetos inanimados o medios inertes ya que son tóxicos celulares protoplasmáticos (con capacidad para destruir materia viva).



Los antisépticos y desinfectantes se diferencian de los quimioterápicos en:

- La toxicidad sobre los tejidos del huésped (mucho mayor en el caso de los antisépticos y desinfectantes).
- La **especificidad** de acción: mientras los quimioterápicos son de acción específica, los desinfectantes y antisépticos son de acción inespecífica, al producir alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática (efecto más frecuente), en las proteínas estructurales y en las enzimas (incluyendo aquellas que intervienen en la respiración celular).

- **Sustantividad**

Se denomina sustentividad a la propiedad de un antiséptico de permanecer activo en el sitio de aplicación. Se puede medir de dos maneras:

- Tiempo necesario para que la actividad del antiséptico disminuya hasta un porcentaje dado (por ejemplo: tiempo en que la actividad del antiséptico disminuye a la mitad).
- Porcentaje de la actividad antiséptica (respecto de la inicial) que se conserva luego de un tiempo dado (por ejemplo: 24 horas).

Los productos de limpieza para prótesis o aparatos de ortodoncia se clasifican como productos de limpieza abrasivos o químicos.

Entre los agentes químicos, hipocloritos alcalinos, peróxidos y ácidos diluidos puede ser descrito el uso de clorhexidina para la desinfección de prótesis y para el tratamiento de la candidiasis. Los agentes de hipoclorito para disolver el material orgánico, el cálculo y mucina, desinfectar los aparatos de ortodoncia y son buenos para la eliminación de pigmentaciones.

Por otro lado, estos agentes son corrosivos para los metales y pueden ser perjudiciales para los aparatos de ortodoncia cuando éstos están inmersos en por un largo periodo de tiempo.¹⁵

En estudios recientes han comparado la efectividad de varios colutorios para la remoción de la biopelícula de los aparatos de ortodoncia, y son divididos



dependiendo sus componentes químicos y sus mecanismos de acción en: peróxidos alcalinos, hipocloritos alcalinos, ácidos, desinfectantes y enzimas.

La efectividad de estos agentes depende de su concentración, tiempo de exposición y el pH. Dentro del factor tiempo interviene la concentración de microorganismos y por lo tanto la concentración del desinfectante, así como el tipo de material de la prótesis.³¹

Hipoclorito Alcalino: El producto clorado más utilizado en desinfección es el hipoclorito de sodio. El principio activo es el ácido hipocloroso no dissociado; el cuál es bactericida para bacterias Gram(+) y Gram(-), fungistático (especialmente para *Cándida albicans*) y viricida (incluyendo al virus de la HBV y HIV-1).

Se le clasifica como un desinfectante de nivel intermedio. La mínima disociación se obtiene entre pH 6 y 8. Se cree que su acción se basa en la desnaturalización proteica.

Actúa directamente sobre la matriz orgánica de la biopelícula y además causa la destrucción de la estructura del polímero del acrílico. El hipoclorito no disuelve el cálculo dental, pero sí inhibe la formación de éste sobre las prótesis.

Aunque es un desinfectante eficaz presenta diversos inconvenientes como son: la corrosión del metal y aumenta la flexibilidad de los retenedores, lo que restringe su empleo a aparatos sin componentes metálicos. Por otra parte, estas soluciones blanquean las resinas acrílicas y su efectividad disminuye cuando aumentan las concentraciones de material inorgánico así como el efecto de la luz y la temperatura. Su efecto es rápido, requiriéndose solamente unos pocos minutos de exposición^{31,32}

Ácidos: Entre los ácidos diluidos encontramos el ácido clorhídrico al 3-5% con o sin ácido fosfórico y el ácido acético al 5% (vinagre blanco casero).

Deben ser utilizados con precaución debido a su capacidad de producir corrosión de los metales.

Estas soluciones presentan una eficacia proporcional al grado de disociación del ácido. Son muy efectivos para eliminar pigmentaciones difíciles que resisten a los limpiadores tipo peróxido.



Peróxidos Alcalinos: Son los limpiadores más comúnmente usados para limpieza de las prótesis, incluyen polvos o tabletas. La liberación de oxígeno por parte del peróxido de hidrógeno causa la formación de burbujas o una acción efervescente que tiene un efecto de limpieza mecánica sobre la prótesis. Esta acción mecánica se produce sólo durante un período de 10 a 15 minutos. Cuando se disuelve en agua, se convierten en soluciones alcalinas de peróxido de hidrógeno.

La degradación de peróxido libera burbujas de oxígeno que mecánicamente deja las dentaduras limpias al entrar en contacto con los desechos.

Tales peróxidos son recomendados para la eliminación de mucina presente en la saliva y de alimentos sigue siendo y también puede prevenir la formación de manchas y calculo. Se pueden utilizar como agentes antimicrobianos también. Sin embargo, presentan el efecto adverso de blanqueo de materiales plásticos.^{15,32}

El peróxido de hidrógeno actúa dependiendo de su concentración: al 6% se comporta como esporicida y al 3% es bactericida pero sólo ligeramente esporicida. Otro factor que influye en su actividad es su baja estabilidad, ya que se descompone en presencia de metales, sales metálicas, calor y agitación; es relativamente estable en presencia de exceso de ácidos.^{17, 23}



II.9. CLORHEXIDINA

La clorhexidina es un antiséptico antimicrobiano activo contra bacterias Gram(+) y Gram(-), bacterias aerobias, y anaerobias facultativas. Se lo utiliza como alternativa en pacientes en quienes el yodo está contraindicado y es de aplicación tópica como desinfectante.

El uso en el área a desinfectar debe ser lavado durante por lo menos 2 o 3 minutos y posteriormente secado con una toalla estéril. Luego debe repetirse el proceso por otros 2 o 3 minutos. Se utiliza en mucosa oral como enjuagues con una duración de 30 segundos, después del lavado dental.

II.9.1 Propiedades físicas:

Dentro de sus propiedades físicas de la clorhexidina se sabe que es una sustancia antiséptica de acción bactericida, fungicida y que pertenece al grupo de las biguanidas y se utiliza ampliamente en odontología en concentraciones de 0,2%, 0,12% y 0,10 % en presentaciones para el uso como colutorio o enjuague bucal. (PerioGard, Colgate Palmolive, New York), gluconato de clorhexidina al 0.12%.

La clorhexidina al ser un clorofenil bisbiguanidina catiónico que se une a las superficies negativamente cargadas (como lo es la superficie del PMMA). La clorhexidina suele ser más efectiva que la nistatina o la anfotericina B para matar células de *C. albicans* adheridas.

Y existen algunos estudios realizados por McCourtie y Spiechoweck que demostraron que el pretratamiento del acrílico con clorhexidina reduce la adhesión de *C. albicans*⁴¹.

Una prolongada exposición o uso excesivo del antiséptico, ocasiona pigmentación de tejidos duros y tejidos blandos.³²

La exposición de *Candida albicans* a la clorhexidina resulta en una pérdida de la integridad estructural de la célula, disminuyendo la habilidad de adherirse y la fragmentación de la pared celular.



Un notable descubrimiento de la clorhexidina es que esta se adhiere a las glicoproteínas de la película salival, desprendiéndose lentamente con el paso del tiempo. ^{18, 21}

Otra de las características notables de la clorhexidina es que se adhiere a glicoproteínas salivales en la resina acrílica y se libera lentamente con el tiempo. El tratamiento de una superficie con clorhexidina es eficaz en la reducción tanto en la adherencia y el crecimiento *C. albicans* cuando se aplica directamente a la superficie de acrílico.

Dando como resultado la reducción en el crecimiento y la adhesión apoya el papel de la clorhexidina como agente terapéutico potencial en la prevención y tratamiento de la estomatitis dental.

La clorhexidina se desarrolló durante la década de 1940 como resultado de una investigación que la intención de buscar un agente antiviral, que observó un efecto antibacteriano notable.

Caracterizado como una base fuerte, se preparan comúnmente como la sal de digluconato que le confiere una mayor estabilidad y solubilidad en agua. ¹⁵

Pero dentro de sus desventajas es el poder presentar sabor desagradable, alteraciones en el paladar, sensación de quemazón en la lengua, alteración del sabor de los alimentos y pigmentaciones en la superficie dental. Por lo que se ha buscado una mejor opción que tenga las mismas propiedades de control en contra de la película bacteriana, pero sin sus desventajas; uno de los desinfectantes que se ha estudiado, y que presenta las mismas aplicaciones clínicas pero sin sus efectos adversos es el xilitol. ^{18, 24}



II.10. XILITOL

D-Xilitol: Es un poliol de cinco carbonos (alcohol-azúcar de cinco carbonos) que tiene la capacidad de formar complejos con ciertos cationes, incluidos Cu, Ca, Fe. Este desplaza a las moléculas de agua de los iones metálicos y la hidratación de capas de proteínas. En la naturaleza el xilitol se encuentra en varias frutas y vegetales, como son: maíz, cascarillas, avena, lechuga, coliflor y hongos.

El contenido de xilitol en frutas y vegetales es bajo, para la producción en escala industrial se utiliza la hemicelulosa como materia para separar D-xilosa en estado puro, con su subsecuente reducción a D-xilitol.^{30,31, 32}

Se usa como un efectivo y seguro agente preventivo de caries. El xilitol es utilizado en goma de mascar y pasta de dientes. El *Streptococcus mutans* es el microorganismos más asociado con la caries dental por su unión a la película adquirida del esmalte y sus interacciones directas con los componentes de la saliva. Se conoce que esta bacteria se aglutina en la saliva utilizando glicoproteínas en un pH óptimo entre 5 y 7.5, *S. mutans* posee la habilidad de producir grandes cantidades de polisacáridos intercelulares a partir de la sacarosa, la cual puede ser convertida a ácido láctico.

Sin embargo *S. mutans* no puede metabolizar al xilitol. La saliva con xilitol es más alcalina que la que contiene otros azúcares.

Cuando el pH en la boca es mayor de 7, el calcio y el fosfato presentes en la saliva comienzan a precipitarse dentro del esmalte donde se empaquetan, además el xilitol incrementa el potencial amortiguador de la saliva, por lo tanto este es capaz de reducir la habilidad de *S. mutans* de adherirse a las superficies haciendo más fácil la remoción de la biopelícula e inhibiendo la coagregación con otros microorganismos entre ellos *Candida albicans*.^{19,32}



2.9.1. Propiedades físicas

- Baja viscosidad
- Alta solubilidad
- Baja actividad en agua, lo que da una alta estabilidad microbiológica
- Alta estabilidad térmica y química

Dentro de sus características químicas es el presentar una sensación de frescura al disolverse con la saliva, también ha sido utilizada como uno de los principales sustitutos de azúcar pero con una gran ventaja al presentar una acción anticariogénica, al no poder ser metabolizada por las bacterias.²⁶

En un estudio realizado en la Universidad de Turku en Finlandia indicó que el consumo de xilitol reduce la biota bacteriana que habita en la cavidad oral, previene la formación de biofilm, promueve la producción de una saliva alcalina y al mismo tiempo disminuye la incidencia de *Candidiasis* oral.⁴²

McCourtie y Douglas^{17 22} realizaron un estudio en donde los resultados de este estudio nos indican que *Candida spp.* Incubada en 500 mM xilitol exhibió una inhibición significativa de la adherencia.²⁵ La ingesta dietética de xilitol nos da una reducción de *Candida* en mucosa oral²⁶, e inhibición de la colonización e invasión de la vía gastrointestinal²⁷.

Además, fue descrito la producción de células gigantes por *C. albicans* que se cultivaron en xilitol²⁸, lo cual se explica por la incapacidad de las células de levadura a catabolizar o excretar los productos de xilitol que se acumulan en el citoplasma e inducir un aumento fuerza osmótica y la inflamación celular.

Tales condiciones podrían ser responsables de la adherencia reducida a través de una pobre producción de una capa adicional fibrilar-floculado en la superficie celular de la levadura^{18,19}.

Por lo tanto el xilitol es considerado un azúcar de cinco carbonos, lo que significa que es un antimicrobiano, impidiendo el crecimiento de bacterias. El azúcar es formador de ácido, y el xilitol es alcalino.



Todas las otras formas de azúcar, incluyendo el sorbitol, otro edulcorante alternativo popular, son los azúcares de seis carbonos, de los que se alimentan las bacterias y hongos.

La glucosa, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza.

Es la fuente primaria de síntesis de energía de las células, mediante su oxidación catabólica, y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y el glucógeno.

El xilitol invierte todos estos efectos destructivos de azúcar en la salud oral.

El xilitol no fermenta y por lo tanto no se puede convertir en ácidos por las bacterias orales, por lo que ayuda a restaurar un equilibrio alcalino adecuado para boca. Este ambiente alcalino es inhóspito para todas las bacterias destructivas, especialmente en sus peores variedad, *Streptococcus mutans*. También inhibe la formación de placa.

Es importante señalar que de acuerdo a la literatura y los estudios antes mencionados en la actualidad la mayoría de los aparatos de ortodoncia preventiva y correctiva están elaborados a base de PMMA autopolimerizable.

Las bases de estos aparatos presentan desventajas como son favorecer un ambiente protegido para los microorganismos y defectos en su superficie que pueden servir como reservorios, dentro de estos microorganismos uno que tomo gran relevancia es *Candida albicans*. La interacción de *C. albicans* con otros microorganismos favorece la formación de biopelículas lesionando la mucosa bucal.

Una de las estrategias para evitar la formación de la biopelícula es el uso de colutorios con agentes activos con propiedades antibacterianas y antimicóticas como son la clorhexidina y el xilitol.²¹





II.11. CUADRO DE REVISIÓN SISTEMATIZADA

Efectos de xilitol y clorhexidina en la adherencia de *Candida albicans* en la resina acrílica (PMMA) usada en los aparatos de ortopedia.

Autor, año	País	Población de estudio	Objetivo	Hallazgos
Azmi (2003) ²⁷	Saudi	2 grupos, grupo 1 sujetos se examinaron antes de insertar el aparato de ortodoncia fija y 2-3 meses más tarde. Grupo 2, los sujetos se tomaron muestras después de 4-36 meses de usar el aparato de ortodoncia.	El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tratamiento con aparatos ortodóncicos fijos en el transporte por vía oral y la infección por <i>Candida</i> en individuos sanos.	Los resultados del grupo 1 mostró que el uso de aparatos fijos de ortodoncia durante un período de 2-3 meses resultó en un incremento significativo en la prevalencia de la candidiasis oral asintomática transporte del 12% al 36% ($p < 0,05$). En el grupo 2, el transporte por <i>Candida</i> oral fue hasta el 68,7%
U.Hägg (2004) ²⁸	China	El grupo estaba compuesto por 27 sujetos, 13 hombres, 14 mujeres (edad media $15,5 \pm 2,3$ años).	Evaluar la prevalencia de <i>Candida</i> y Enterobacteriaceae en un grupo de adolescentes en terapia con aparatos fijos de ortodoncia (FOA).	En conjunto, estos datos implican que la inserción de un FOA es probable que promueva el transporte por vía oral de las especies de <i>Candida</i> y coliformes.
Gö kec (2002) ¹²	Alemania	Probetas cilíndricas de PMMA se llevaron en la boca y luego resorbe con una solución de cloruro de sodio 0,5-M. La solución se analizó para determinar la proteína total, Amilasa, proteasas totales, inhibidores de la proteasa, la inmunoglobulina A secretora, inmunoglobulina G, peroxidasa, tiocianato, lisozima, y el contenido de calcio.	Investigar la composición cuantitativa y la variación individual de la película salival, formada en el material base de la prótesis (PMMA).	los componentes antimicrobianos pueden influir en la colonización microbiana de las bases de las dentaduras y que inhibidores de la proteasa podría ser significativa para la propagación de la levadura <i>Candida albicans</i>



Montagner, et al (2009)	Brasil	Sesenta muestras fueron fabricados con una resina de curado por calor (vipi Wave ®; vipi, Pirassununga, SP, Brasil) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.	Evaluar la acción antifúngica de diferentes agentes en resinas acrílicas de microondas sin pulir muestras contaminadas con <i>Candida albicans</i> .	Los agentes ensayados que contienen hipoclorito sódico o peróxido de hidrógeno 10 V en su composición mostró una excelente acción antifúngica. El agente efervescente utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante no era eficaz en la eliminación de las colonias de <i>C. albicans</i> . Por otra parte, 2% de solución de clorhexidina no fue efectivo hasta la inmersión de 10 minutos.
Rui Ma, et al.(2010) ⁹	China	Dextranos marcadas fluorescentemente con masa molecular diferente (3 kD, 10 kD, 40 kD, 70 kD, 2 000 kD) fueron utilizados como una serie de sondas de difusión. <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>naeslundii Actinomyces</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> se utilizaron como inóculo para la biopelícula formación.	Desarrollar un modelo matemático para describir cuantitativamente el transporte pasivo de macromoléculas dentro de los biofilms dentales.	Se utiliza para predecir la concentración efectiva y el tiempo de penetración de - medicamentos- biopelícula que pueden difundirse a través de biopelícula oral.
Hoehamer FC, et al.(2010) ²⁹		Se utilizó una combinación de 2-D PAGE y MALDI-TOF espectrometría de masas para dilucidar las respuestas de adaptación específicas y no específicas de ketoconazol, anfotericina B y caspofungina en <i>C. albicans</i> .	Identificar los cambios en la <i>C. albicans</i> , la abundancia de proteínas utilizando la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida y la matriz de desorción por láser asistida ionización de tiempo de exposición de la espectroscopia de masas.	Resultados revelan antifúngicos específicos y no específicos inducidos por cambios en la abundancia de proteínas en <i>C. albicans</i> .
Abu-Elteen,(2005) ³⁰	Jordania	Se investigó in vitro. La adhesión de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i> fue promovido significativamente por incubación en medio mínimo que contenía una alta concentración (500 mM) de	Evaluar la adhesión de cuatro especies de <i>Candida</i> a las células epiteliales bucales (CEB) después del tratamiento con la mayor parte de la comúnmente se consumen	Los carbohidratos de la dieta, podrían representar un factor de riesgo para la candidiasis oral. La limitación de su consumo mediante la sustitución de xilitol podría ser de valor en el control de la colonización por <i>Candida</i>



		fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, sorbitol o sacarosa.	carbohidratos de la dieta se investigó in vitro.	bucal y la infección. xilitol demostró una reducción significativa en la adherencia (p/0.001, relativa la adhesión).
Un Sengün, et al(2004) ³¹	Turquía	Doce voluntarios participaron en este estudio. Antes de la medición del pH de la placa, los sujetos se les pidió que se abstengan de cepillarse los dientes durante 48 horas y de comer y beber durante dos horas.	El propósito de este estudio fue evaluar la influencia de una pastilla xilitol en el perfil de pH de la placa dental de pacientes ortodóncicos fijos.	Como resultado, el uso de una pastilla xilitol después de un desafío sacarosa puede ser una práctica conveniente para los pacientes usuarios de ortodoncia fija para la prevención de futuras caries dentales
Kauko K, (1975) ³²	Finlandia	Tres cepas de <i>Candida albicans</i>	Evaluar el efecto del xilitol y el efecto del xilitol con glucosa sobre las tres cepas de <i>Candida albicans</i> para medir el crecimiento e inhibición del mismo en presencia de ambos componentes	El cultivo de <i>Candida albicans</i> con presencia de xilitol represento un decrecimiento en el crecimiento de las cepas.
Ucar BA.(2006) ¹⁷	Venezuela	10 cuadros de resina acrílica (25 x 25 x 3 mm) fueron sumergidos en un medio contaminado con <i>C. albicans</i> . Luego de lavados, 2 muestras por cada grupo se introdujeron en soluciones desinfectantes.	Evaluar cuatro agentes químicos en la eliminación de <i>Cándida albicans</i> sobre prótesis dentales.	No se observó crecimiento fúngico sobre los especímenes desinfectados con hipoclorito de sodio y clorhexidina al 2% a partir de los cinco minutos de inmersión.
CannonRD(1995) ⁴	Nueva Zelanda	Revisión bibliográfica sobre los mecanismos de <i>C. albicans</i> para colonizar superficies bucales.	Revisión bibliográfica	<i>Candida</i> presenta mecanismo de adherencia asociados a receptores de complemento, proteínas de matrix extracelular y residuos específicos de azúcar.
Nikawa H(1997) ³	Japón	Tres cepas de <i>Candida albicans</i> , 2 cepas de <i>Candida glabrata</i> y 2 cepas de <i>Candida tropicalis</i>	Determinar el efecto del azúcar saliva y suero en la formación de biopelículas de <i>Candida</i> en superficies de acrílico.	El crecimiento de las cepas se ve aumentado en los cultivos con glucosa.



Gibbons RJ(1989) ⁵	E.U	Revisión bibliográfica de artículos relacionados a la adhesión bacteriana en superficies orales	Presentar un modelo de adhesión bacteriana en tejidos orales	Las bacterias expresan proteínas ricas en prolina que promueve la adhesión a superficies como la hidroxipatita
Ohman SC(1995) ⁶	Suecia	100 personas de 79 años de edad de la región de Goterborg	Determinar la prevalencia de <i>S. Aureus</i> , especies de enterobacterias y especies de <i>Candida</i> con su relación en lesiones bucales en un grupo de personas de 79 años.	<i>S. aureus</i> estuvo presente en 5 personas las especies de enterobacteria solo en una y <i>Candida albicans</i> se encontró en 9 paciente portadores de dentadura y en el 74% de pacientes con estomatitis
Nikawa H(2000) ⁸	Japón	7 acondicionadores de tejido blandos de marca comercial	Determinar la interacción entre materiales para dentadura con películas de saliva y suero en la adhesión de <i>Candida albicans</i>	La colonización se vio disminuida en materiales tratados con flúor
Bowen WH(2011) ¹⁰	E.U.	GST C, GST D, y GST B derivadas de <i>S. mutans</i>	Determinar el papel de glucosiltransferasas (GST) derivadas de <i>S.mutans</i> en la formación de matriz extracelular en biopelículas	GST C es absorbida por el esmalte, GST B está relacionada con la adhesión bacteria, GST D es la forma soluble
Flemming HC(2010) ¹¹	Alemania	Bibliografía referente a la producción de ESP derivada de microorganismos	Revisión bibliográfica sobre la formación de biopelículas y la producción de sustancias poliméricas extracelulares (ESP)	Las ESP son principalmente polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos
Addy et al. 1982	UK	148 adolescentes de 12- a 16- años con uso de aparatos removibles y fijos de ortodoncia.	Muestra representativa	Si se encontró biofilm
Arendorf and Addy 1985	UK	33 Adolescentes de 8- a 17- años con aparatología de ortodoncia removible con 9 meses de uso.	Muestra Representativa	Se encontro biofilm
Ha'gg et al. 2004	Hong Kong	50 casos consecutivos en 27 sujetos Con edad entre 15.5 ± 2.4 años Con aparatología fija con una duración de 3 meses usando	estudio cohorte	Si se encontro biofilm



		colutorios		
Brusca et al. 2007 ⁶⁴		Aparatología fija 303 brackets de diversos materiales como son: 24 metal, 24 cerámicos y tipo 24 morelli hechos de composite. Y un grupo control de 24 Se realizó con 48 horas de incubación	Definir la capacidad de crecimiento y adherencia de los microorganismos a los diferentes materiales	Se encontró que en los brackets la adherencia de <i>estreptococo mutans</i> no fue modificada en los tres tipos de brackets mientras que en los brackets de composite existe un número mayor de células de <i>Candida albicans</i> adheridas
Arslan et al. 2008	Turquia	72 sujetos ; 42 sujetos tenían <i>Candida</i> y fueron observados. Con una edad entre 19.8 años con aparatología fija por 12 meses.	En la muestra tomada con isopo	No se encontró placa
Lee et al. 2008	Hong Kong	112 pacientes Se observaron 97pacientes con una edad promedio de 17.7 años Con uso de aparatología fija de 12 meses sin uso de enjuague Oral	Studio cohorte	No se encontro placa
Pithon MM et al. 2012 ⁶⁵	Brasil	84 pacientes, 2 grupos de 42 cada uno usando 2 tipos de aparatología 42 con has y 42 con hyrax,	Experimental, se tomó muestra de saliva, al inicio del tratamiento y a los 30 días de uso.	Hubo diferencia significativa ente los 2 grupos de $p < 0.05$ en donde has promueve el incremento de <i>estreptococo mutans</i> y <i>candia albicans</i>
Muggiano F. et al. 2014 ⁶⁶	Italia	Rol y efectos de la colonización de <i>Candida albicans</i> a los aparatos de ortodoncia	Revisión bibliográfica	Con los pocos estudios al respecto se llega a la conclusión de no todos los pacientes con ortodoncia presentaran una infección por <i>candida albicans</i> pero existe una tendencia a que los portadores de aparatos de ortodoncia tengan una mayor prevalencia a desarrollar <i>candida albicans</i> .



Saloom et al. 2013 ⁶⁷	Irak	64 muestras de cuatro diferentes tipos de aparatos fijos de ortodoncia, divididos en cuatro grupos de 16 cada uno. El grupo 1 es de brackets de safiro y alambre recubierto, grupo 2 brackets de safiro con alambre de acero inoxidable, grupo 3 brackets de acero inoxidable con alambre recubierto, y grupo 4 brackets y alambre de acero inoxidable y se estudiaron dos microorganismos que fueron <i>streptococo mutans</i> y <i>candida albicans</i>	Experimental (in vitro)	Los resultados mostraron que los brackets con mayor estética en este caso los de safiro con arco cubierto muestran menos adherencia de los microorganismos que los que tienen menos estética como lo son los brackets y arcos de alambre de acero inoxidable. Lo cual mostro diferencia significativa de ($p < 0.001$).
----------------------------------	------	---	-------------------------	---



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La superficie de la resina acrílica PMMA presenta diferentes características de porosidad en su superficie, lo cual contribuye significativamente en la adherencia y retención de microorganismos como lo es el caso de *Candida albicans*, La microbiota que se adhiere a la superficie de los aparatos de ortodoncia así como las prótesis dentales y en la mucosa bucal que soporta estos aparatos, está compuesta por una gran diversidad de microorganismos, principalmente bacterias y levaduras, los cuales al encontrar las condiciones adecuadas, se desarrollan formando una biopelícula causante de procesos infecciosos como la estomatitis protésica.

A través de estudios realizados, se ha observado que uno de los microorganismos patógenos más frecuentes en el desarrollo de esta infección es *Candida albicans* y recientemente se han encontrado especies bacterianas relacionadas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococo mutans*, por lo que se menciona que existe alguna relación entre estos microorganismos en la formación de la biopelícula en los aparatos de ortopedia.

La estomatitis protésica es una infección que comprometa la integridad de la mucosa bucal y la salud del paciente y es considerada un problema de salud pública. Por lo tanto el evitar la formación de la biopelícula o su eliminación cuando está ya está establecida es de suma importancia.

La relevancia de este estudio se basa en determinar las propiedades antimicrobianas y antimicóticas de la clorhexidina y el xilitol en la disminución de la biopelícula en los aparatos de ortopedia elaborados con polimetilmetacrilato de autopolimerizado.



Con base a lo anterior y tomando en cuenta que en México son escasos los estudios reportados la importancia de este estudio, por lo que se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será la efectividad del xilitol al 1% y al 5% en comparación con la clorhexidina al 0.12% en la adhesión de *Candida albicans* al polimetilmetacrilato usado en aparatos de ortopedia?



IV. HIPÓTESIS:

Acorde a varios reportes que indican que la clorhexidina tiene un efecto inhibitorio en la adherencia de *Candida albicans* en polimetilmetacrilato suponemos que el tratamiento con xilitol en concentraciones al 1% y 5% tendrá un efecto inhibitorio en la adhesión de *Candida albicans* al polimetilmetacrilato similar a la clorhexidina al 0.12%.



V. OBJETIVOS:

Objetivo general:

Determinar la efectividad del xilitol en comparación con la clorhexidina en la adherencia de *Candida albicans* al polimetilmetacrilato usado en aparatos de ortopedia.

Objetivos específicos:

Evaluar la adhesión de *Candida albicans* al PMMA tratado con clorhexidina al 0.12% y xilitol al 1% y 5%.

Realizar identificación de la cepa de *Candida albicans*

Cultivos

Imágenes de SEM (Microscopio electrónico de barrido)



VI. MATERIAL Y METODOS:

VI.1. Tipo de estudio:

Experimental

VI.2 Universo de estudio:

Especímenes de resina acrílica a base de PMMA autopolimerizable

Cepa de *Candida albicans*

VI.3. Criterios de Inclusión

Especímenes de PMMA más usados para elaborar aparatos de ortodoncia

Especímenes de PMMA elaborados con fecha de caducidad vigentes siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante

Cepa de *Candida albicans* viable.

VI.4. Criterios de exclusión:

Cepa de *Candida albicans* contaminado con otro microorganismo

Especímenes de PMMA elaboradas con otra técnica

Muestras de PMMA con fecha de caducidad vencida.

Muestras que se contaminen durante el procedimiento

VI.5. Variables independientes:

Xilitol al 1%

Xilitol al 5%

Clorhexidina al 0.12%

VI.6 Variable dependiente:

Adherencia de *Candida albicans*



VI.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN	NIVEL DE MEDICIÓN	CATEGORIA
XILITOL	El xilitol es un alcohol de azúcar, de 5 Carbonos, obtenido por la reducción del azúcar <i>xilosa</i> .	Cuantitativa continua	5% y al 1% xylitol/g xylose
CLORHEXIDINA	Sustancia antiséptica de acción bactericida y fungicida. Pertenece al grupo de las biguanidas y se utiliza ampliamente en odontología en concentraciones de 0,2%, 0,12% y 0,10 % en presentaciones para el uso como colutorio o enjuague bucal.	Cuantitativa continua	0.12%
ADHERENCIA DE <i>Candida albicans</i>	<p>Adherencia: Resistencia tangencial que se produce en la superficie de contacto de dos cuerpos cuando se intenta que uno deslice sobre otro. En este caso de <i>Candida albicans</i>: <i>Candida albicans</i> es un hongo diploide asexual (forma de levadura.²³, saprófito de la familia de los Sacaromicetos)</p> <p>Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación.</p>	Cuantitativa discreta	Cantidad de levaduras adheridas por campo.



VI.8. TÉCNICAS:

Preparación de especímenes:

Fueron elaboradas láminas de resina acrílica a base de PMMA con la técnica de autopolimerizado de 7mm de diámetro x 4mm siguiendo las instrucciones de manufactura proporcionadas por el fabricante.

Los especímenes se mantuvieron durante dos días en agua bidestilada estéril para remover los residuos de monómero tóxico que pudiesen haber quedado después de la polimerización.²⁰

Microorganismo y condiciones de cultivo.

Se utilizó una cepa viable de *Candida albicans* proporcionada por el Laboratorio de microbiología de la FES Zaragoza. A esta cepa se le realizaron pruebas de: Formación de tubo germinativo, formación de claminoconidio, y cultivo en medio cromógeno selectivo (CHROMagar Candida), con el fin de comprobar que la cepa correspondiera con la especie *Candida albicans*.

Una vez que fueron realizadas las pruebas de identificación *Candida albicans* se cultivó en placas de agar dextrosa Sabouraud e incubó en 37° C durante 24 a 48 horas. De este cultivo fresco se tomó una asada microbiológica y se incorporó en 100ml de caldo de soya tripticasa estéril y se mantuvo en una incubadora a 37° durante una noche con agitación.

Transcurrido el tiempo de incubación el cultivo se centrifugó durante 10 min a 1000rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y el botón celular se lavó con solución salina estéril (para eliminar los restos de caldo de soya tripticasa).

Al botón celular se le agregó 2 ml de caldo de soya tripticasa estéril para resuspender la levadura.

De este concentrado se fue agregando 100 ml de caldo de soya tripticasa estéril hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.8 a 520nm (1×10^7 levaduras/ml).²⁰



La preparación de la suspensión se realizó en caldo de soya tripticasa por tener los requerimientos para crecimiento de levaduras y para la obtención de la suspensión del microorganismo se empleó un espectrofotómetro de luz visible.²⁰

Las muestras fueron incubadas previamente tratadas con las siguientes soluciones: Clorhexidina al 0.12% por un periodo de 2 horas. Xilitol al 5% y 1% por un periodo de 2 horas. Así como un control con H₂O destilada estéril con el mismo intervalo de tiempo.³²

ENSAYO DE ADHERENCIA.

Las muestras de PMMA se colocaron en placas de cultivo celular de 24 pozos en cada pozo se agregó 1.5 ml de la suspensión de *Candida albicans* para cubrir totalmente el espécimen.

Una vez añadida la suspensión de *Candida albicans* a cada muestra se incubo con agitación durante 24 y 48 horas. Tras la inoculación y bajo condiciones asépticas, fueron retiradas las muestras con pinzas estériles y se lavaron vigorosamente con solución amortiguador de calcodilato de sodio al 0.1 M a un pH de 7.2 para eliminar las levaduras no adheridas. El ensayo se realizó por triplicado.

Cuantificación de las levaduras adheridas.

El análisis mediante el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5310LV que realizó en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Las levaduras adheridas a las muestras se fijaron de la siguiente manera.



PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Se realizó con la técnica convencional que consiste en lo siguiente:

Selección de las muestras

Lavado de las muestras con solución amortiguadora

Fijación con Glutaraldehído al 2.5% en calcodilato sodio 0.1 M pH 7.2 por 2 horas.

Lavar con el mismo amortiguador en tres ocasiones

Postfijación con tetraóxido de osmio al 1% en el mismo buffer por dos horas

Lavado con el mismo buffer 3 veces

Deshidratación con etanol al 30, 50, 60, 70, 80, 90, y 95% 10 minutos cada uno

Deshidratación con etanol al 100% dos cambios de 15 minutos cada uno

Desecación por punto crítico con CO₂

Montaje en aluminio con adhesivo conductor.

Recubrimiento con carbón por evaporación.

Recubrimiento con oro por ionización.

Almacenamiento en desecador al vacío.

Análisis en MEB.

Posteriormente fueron montadas en porta muestras de aluminio o latón, donde se ionizaron con una capa de oro-paladio durante 3 minutos, a 1500mili volts, 10mm amperes y fueron observadas con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5310LV. Se utilizaron tres fotografías con aumentos de 1500x de cada muestra, y se contaron las levaduras adheridas que hay en cada fotografía. También se tomaron fotografías del mismo campo a 750x que sirvieron como panorámica y a 5000x que se utilizaron para observar detalle.



VI.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Todos los experimentos se realizaron por triplicado utilizando los valores de la mediana y análisis exploratorio de datos, así mismo para la comparación de los mismos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, considerando un valor de $p \leq 0.05$ se consideró significativo. Para tal efecto se utilizó el programa estadístico SPSS V.15



VII. RESULTADOS.

Se tomaron fotografías de las diferentes muestras para observar 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.

Auto-polimerizado sin tratamiento

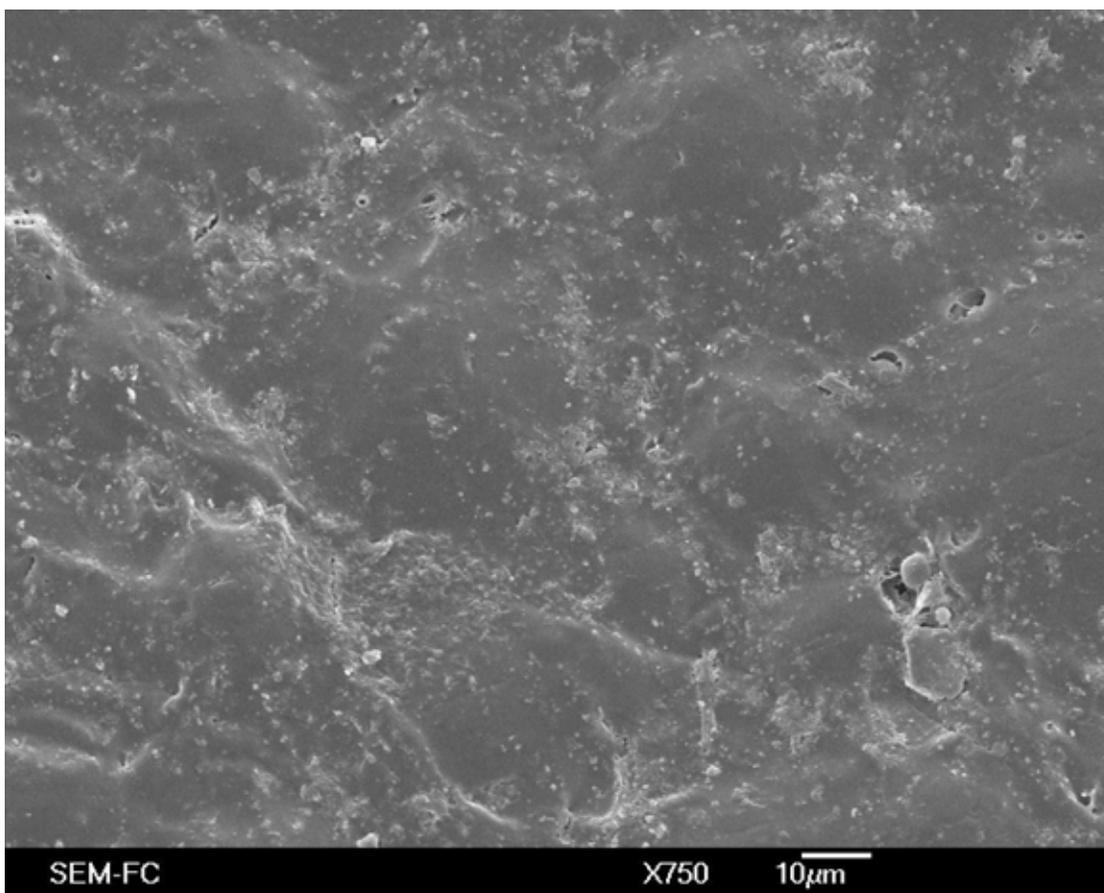


Fig.6 Superficie del PMMA procesado Auto-polimerizado Nic-Tone MEB 750x.

Características: Se observa la resina acrílica (PMMA) con la técnica de procesamiento de Auto-polimerizado presenta una superficie uniforme en su mayor parte con presencia de poros de tamaño variable de 1 a 3 micras de diámetro, y grietas. Fig. 6



Soluciones desinfectantes y tiempos de incubación.

Xilitol al 5%: Cultivo 24 hrs.

Las características de los blastoconidios: Estos presentan un tamaño de 2 a 3.5 micras de diámetro mostrando una forma madura y bien delimitada, con células en gemación.

Dentro de las 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, con poros y grietas de poca profundidad, así como áreas lisas así como imperfecciones (grietas y concavidades).

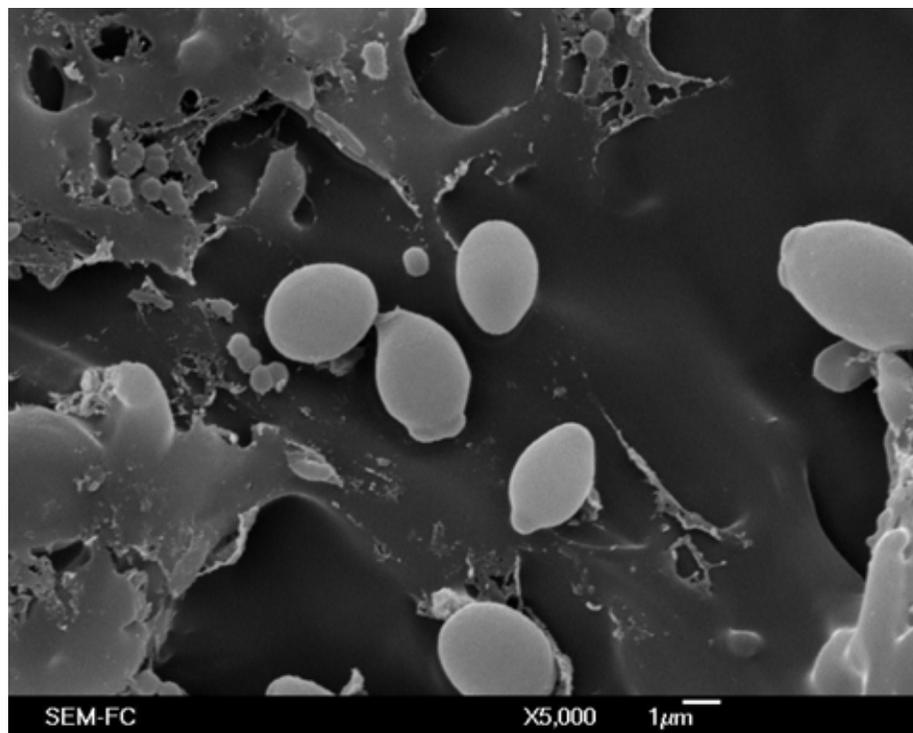


Fig. 7 PMMA con tratamiento de Xilitol al 5%, cultivo con *Candida albicans* 24 hrs. 5000x MEB

En la fig.7 Se observa en detalle los blastoconidios de *C. albicans*, las cuales se encuentran bien delimitadas, y la porosidad del material PMMA.

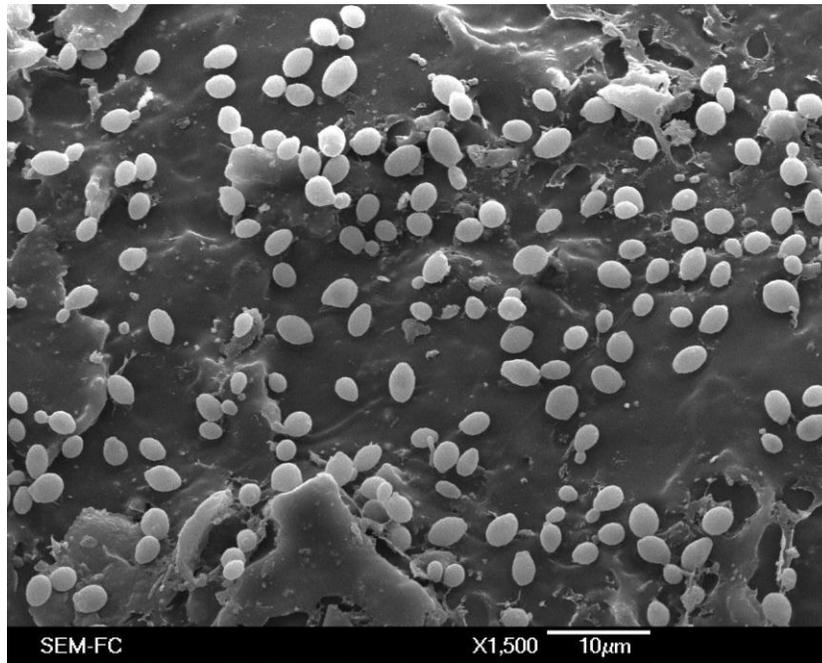


Fig. 8. PMMA con tratamiento de Xilitol al 5%, cultivo con *Candida albicans* 24 hrs. 1 500x MEB

En la figura 8. Se observa los blastoconidios en forma individual y el pseudomicelio. La superficie del PMMA presenta varias imperfecciones.

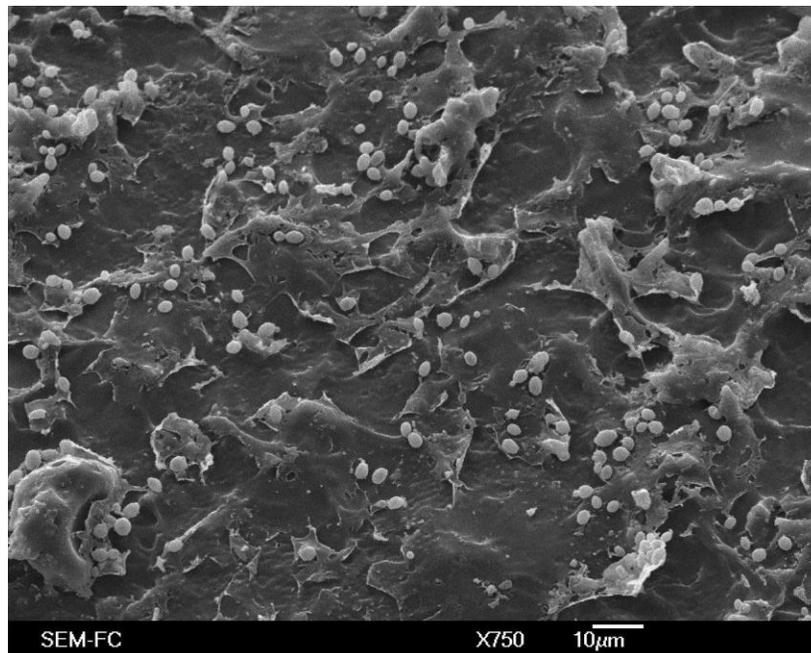


Fig. 9. PMMA con tratamiento de Xilitol al 5%, cultivo con *Candida albicans* 24 hrs. 750x MEB. Imagen panorámica.



Pre- tratamiento con Xilitol al 5%: cultivo a 48hrs.

Podemos observar las siguientes características del Blastoconidio que presenta un diámetro de 2 a 3 micras con forma madura, uniforme y con células en gemación, dentro de las características de la adherencia: presentan cadenas de células (seudomicelio) y así como blastoconidios aislados con gemación.

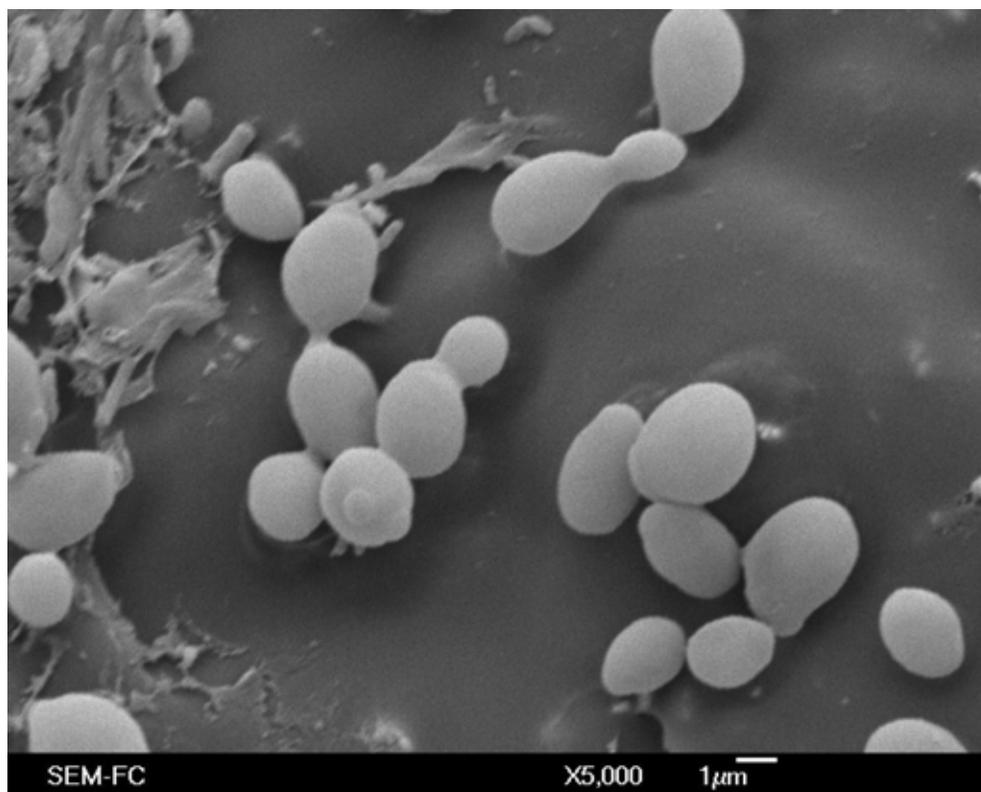


Fig. 10 Pre- tratamiento con xilitol al 5%, cultivo con *Candida albicans* 48hrs 5000X MEB.



Se observa en detalle múltiples células en gemación, así como la imperfección de la superficie del PMMA. Los blastoconidios se encuentran maduros.

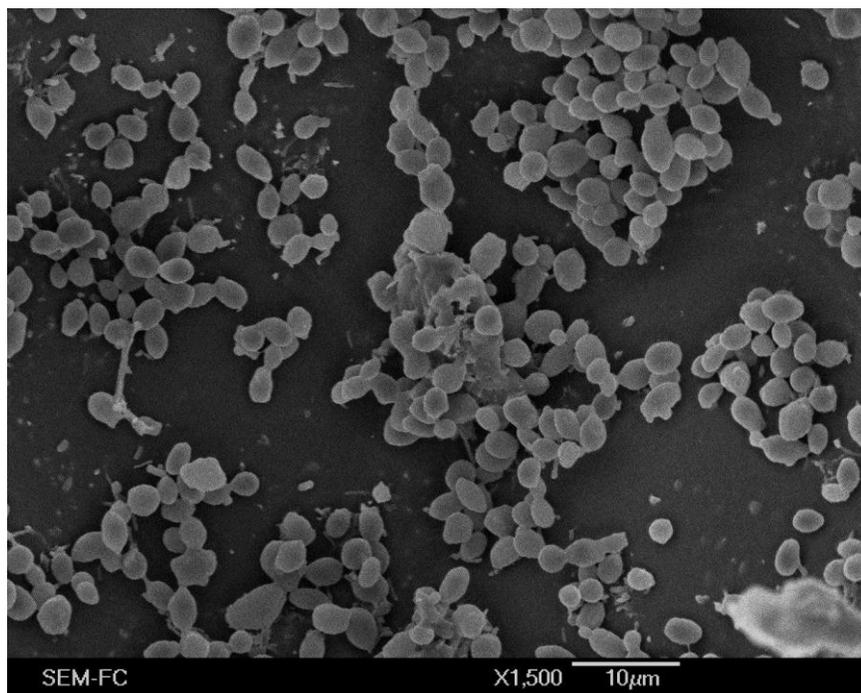


Fig 11. Pre- tratamiento con xilitol al 5%, cultivo de *Candida albicans* 48 hrs. 1500X MEB

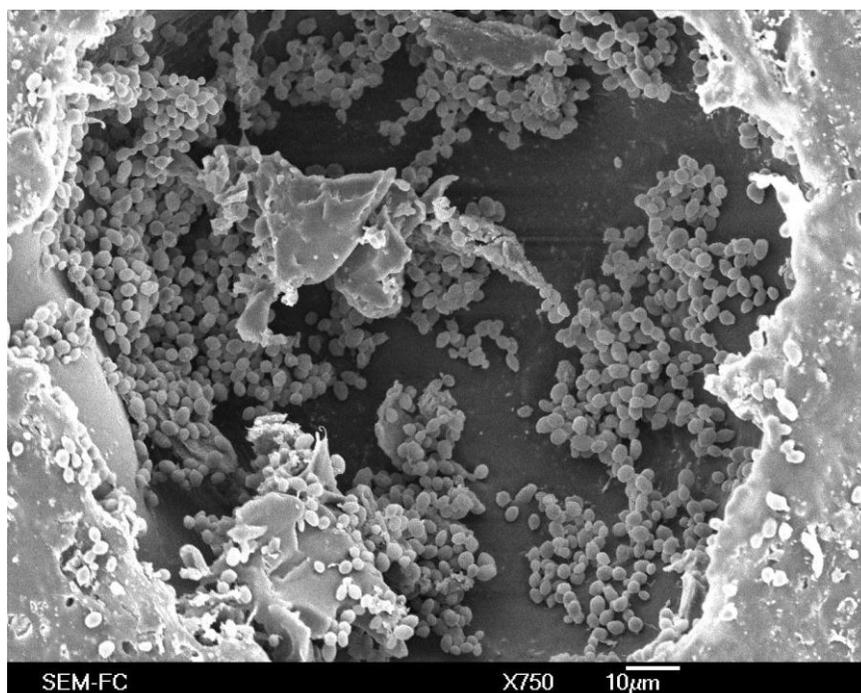


Fig 12. Pre- tratamiento con Xilitol al 5% con cultivo de *Candida albicans* de 48 hrs, imagen panorámica 750X MEB.



Pre- tratamiento con xilitol al 1%: cultivo a 24 hrs.

Como se puede observar las características de los blastoconidios presentan un diámetro entre 2 a 3 micras con forma uniforme y numerosas células en gemación.

Dentro de las características de adhesión se presentan cadenas celulares (seudomicelio) y también blastoconidios aislados, siendo uniforme su distribución sobre el PMMA.

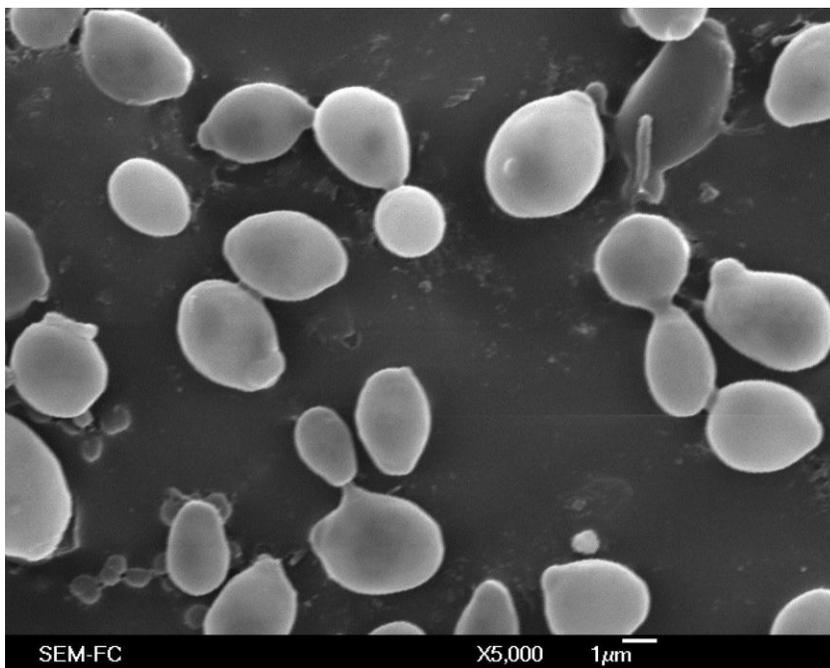


Fig. 13 Pre- tratamiento con Xilitol al 1% con cultivo de *Candida albicans* de 24 hrs. 5000X MEB

Se observa en detalle las células en gemación, así como la presencia de pocos defectos de la superficie.

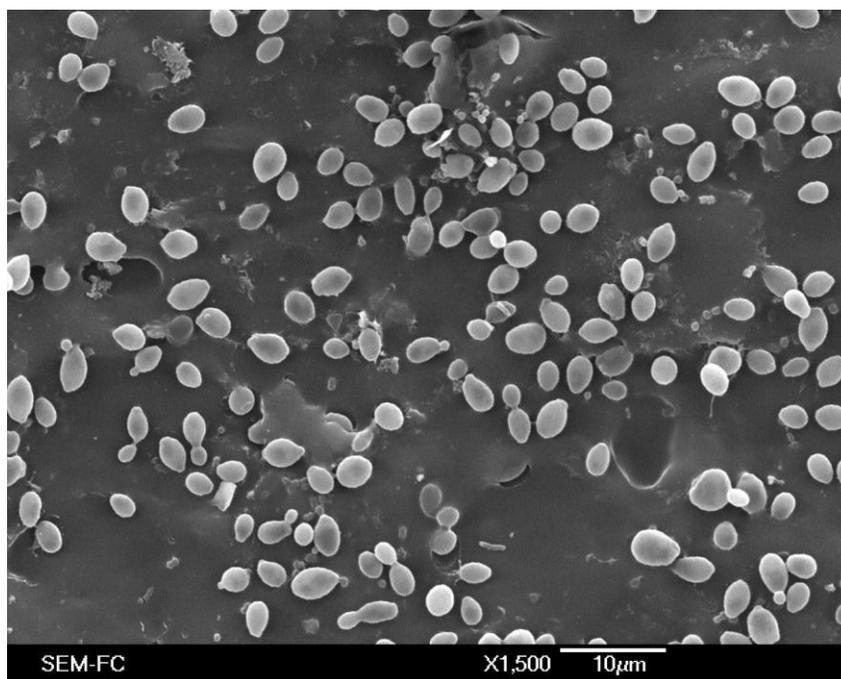


Fig.14 Pre- tratamiento con xilitol al 1%, cultivo de *Candida albicans* 24 hrs. 1500X MEB

En la Fig. 14 se observa los blastoconidios en forma individual y el seudomicelio. Existen uniformidades en superficie combinados con pocos poros.

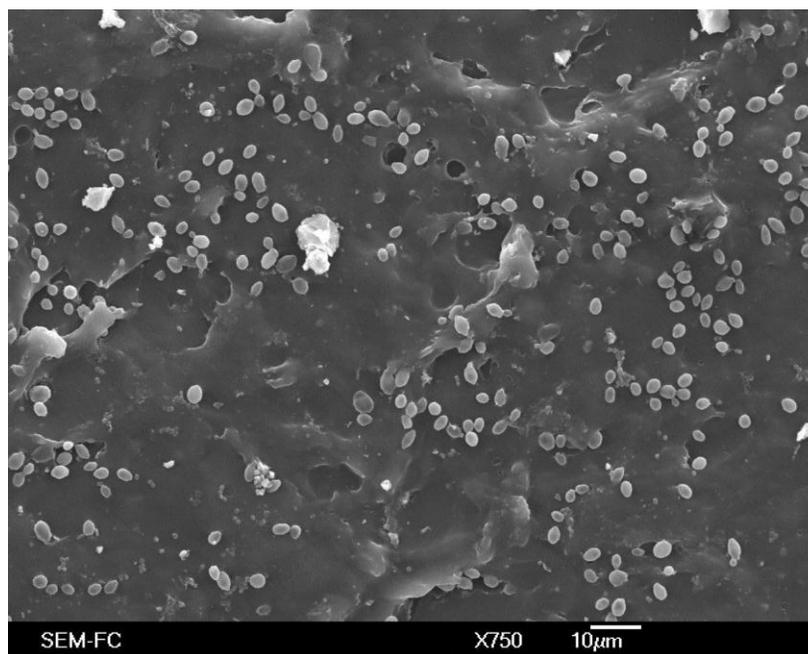


Fig. 15. Pre- tratamiento con Xilitol al 1%, cultivo de *Candida albicans* 24 hrs 750X. MEB.



Pre- tratamiento con Xilitol 1%: cultivo 48 hrs.

Se aprecia una mayor cantidad de blastoconidios, con un diámetro entre 2.5 a 4 micras, con morfología variable, presentando células maduras y de formas irregulares, con blastoconidios en gemación y bien delimitados. Las características de la adherencia, es uniforme sobre la muestra, las células se encuentran en grupos. Las características de la superficie de PMMA. Presenta poros, áreas lisas y áreas con grietas e irregularidades.

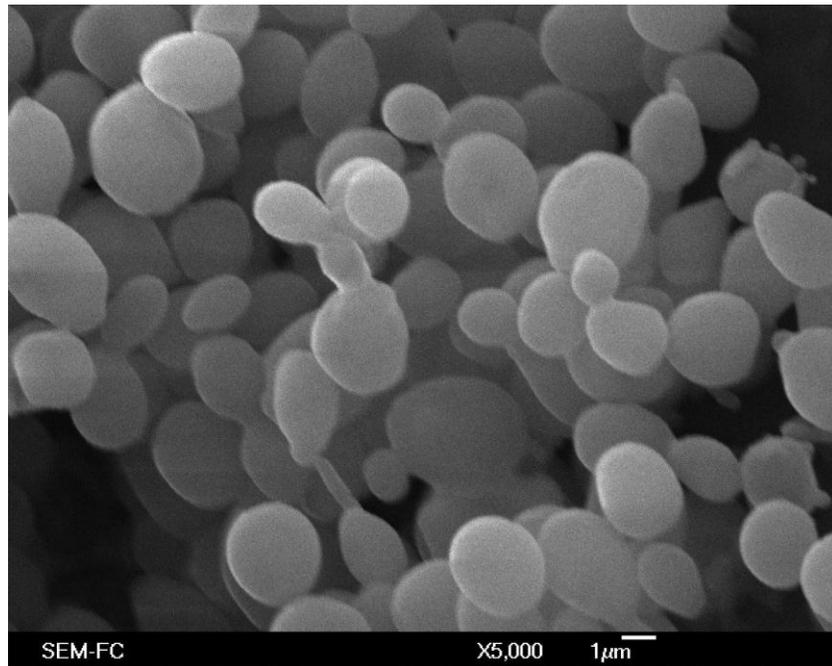


Fig. 16. Pre-tratamiento Xilitol 1%, cultivo *Candida albicans* 48 hrs. 5000X MEB.

En la Fig. 16 se observa a mayor detalle la superficie del blastoconidio con presencia de gemación, con diversas morfologías y tamaño variable.

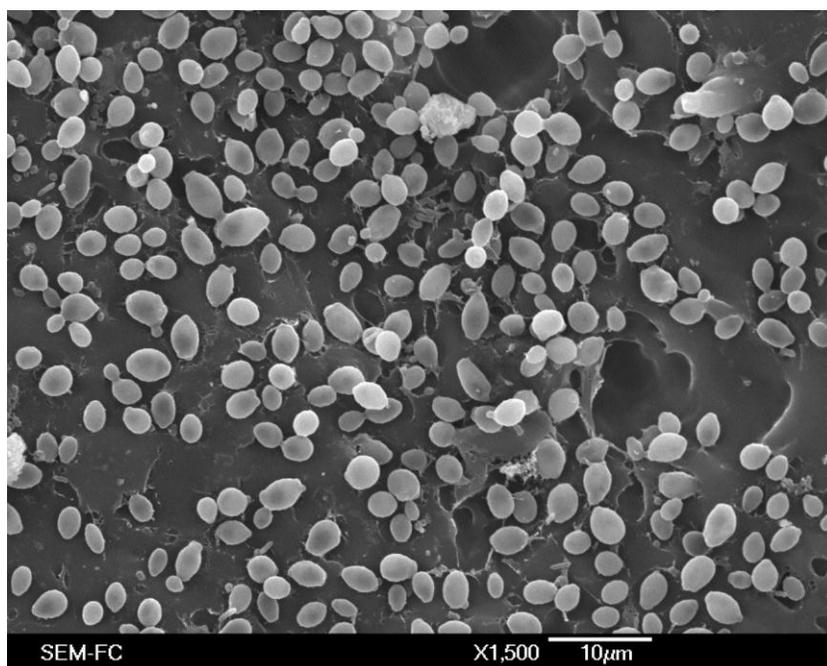


Fig. 17 Pre- tratamiento Xilitol al 1%, cultivo de *Candida albicans* 48hrs 1500X MEB

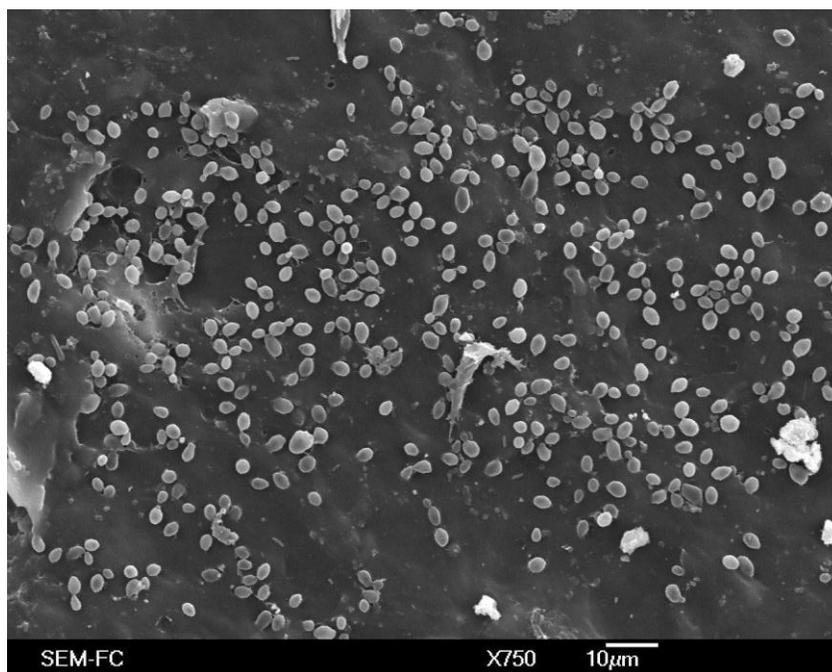


Fig. 18 Pre- tratamiento xilitol 1%, cultivo *Candida albicans* 48 hrs 750X ME

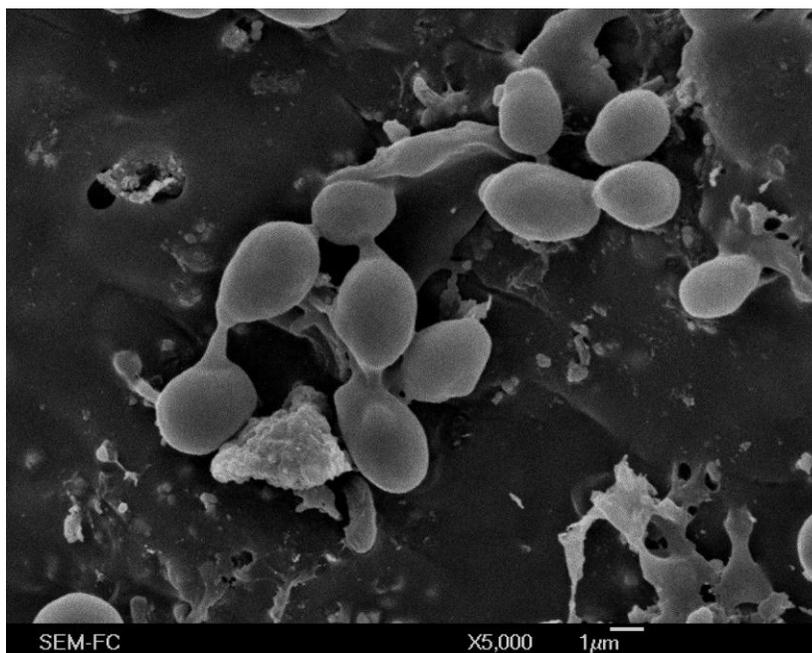
Se observan grietas en la superficie y adherencia de células tanto en las zonas lisas, como en los defectos.



Pre- tratamiento con clorhexidina al 0.12%: cultivo a 24 hrs.

Se puede observar que con esta técnica presenta una superficie con diversas áreas con defectos e irregularidades, como poros y grietas distribuidas en el material las cuales presentan tamaños variables que van desde 1 a 6 micras de diámetro.

Mientras que los blastoconidios se encuentran formando pseudomicelios de 3 a 6 células y con un diámetro de 2 a 4 micras, con superficie uniforme y en gemación.



Fif.19 Pre-tratamiento de Clorhexidina al 0.12%, cultivo de *Candida albicans* 24 hrs a 5000x MEB

La adherencia de los blastoconidios de *Candida albicans*, formando pseudomicelio y gemación.

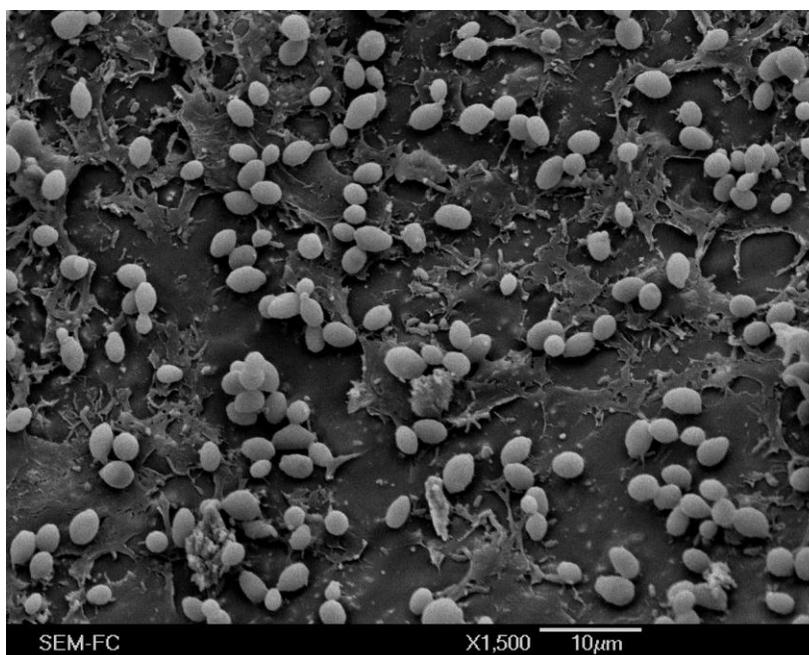


Fig. 20 Pre- tratamiento de Clorhexidina al 0.12%, cultivo de *Candida albicans* 24 hrs 1500X MEB

Se observa la adherencia de los blastoconidios y pseudomicelios en gemación así como una superficie con diversos defectos.

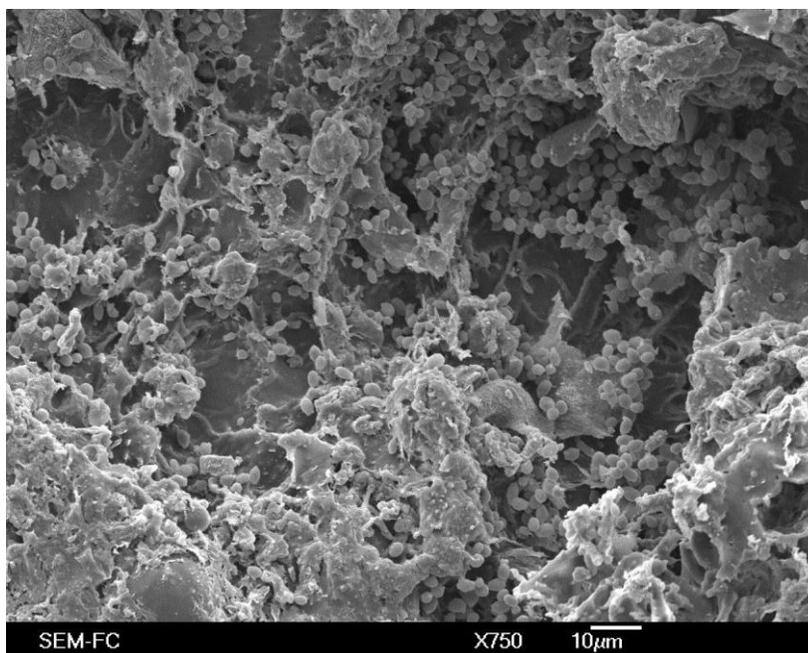


Fig. 21 Pre-tratamiento de Clorhexidina al 0.12%, cultivo de *Candida albicans* 24 hrs 750X. MEB

Panorámica para valorar la superficie del material que presenta múltiples irregularidades que las células las utilizan como reservorios.



Pre- tratamiento con clorhexidina al 0.12%: cultivo a las 48 hrs.

La superficie muestra de igual manera múltiples defectos e irregularidades de diferentes diámetros y poca profundidad.

Características de la adherencia. Los blastoconidios se encuentran adheridos a la superficie de PMMA en forma de pseudomicelio y como células aisladas con un diámetro de 2.5 micras en promedio.

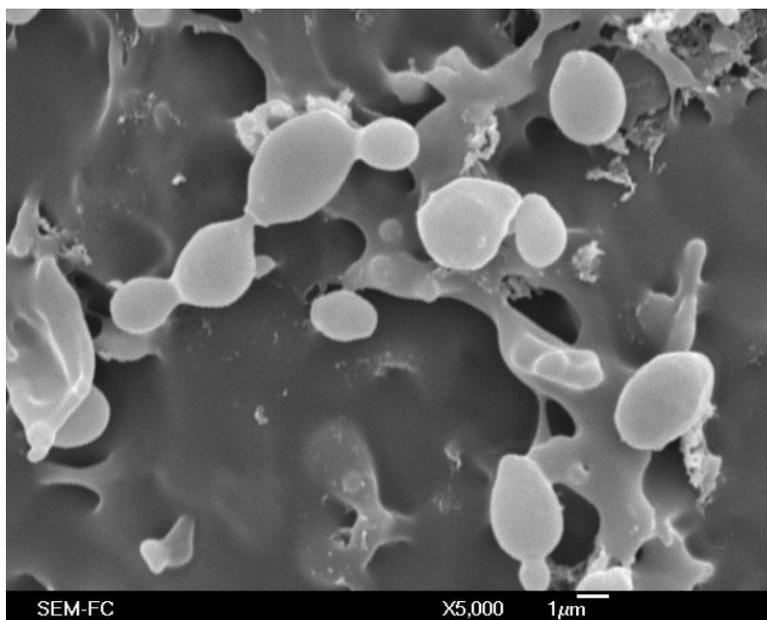


Fig. 22 Pre- tratamiento de Clorhexidina al 0.12%, cultivo de *Candida albicans* 48Hrs 5000X MEB.

Blastoconidios maduros, uniformes, formando pseudomicelios y presentando gemación

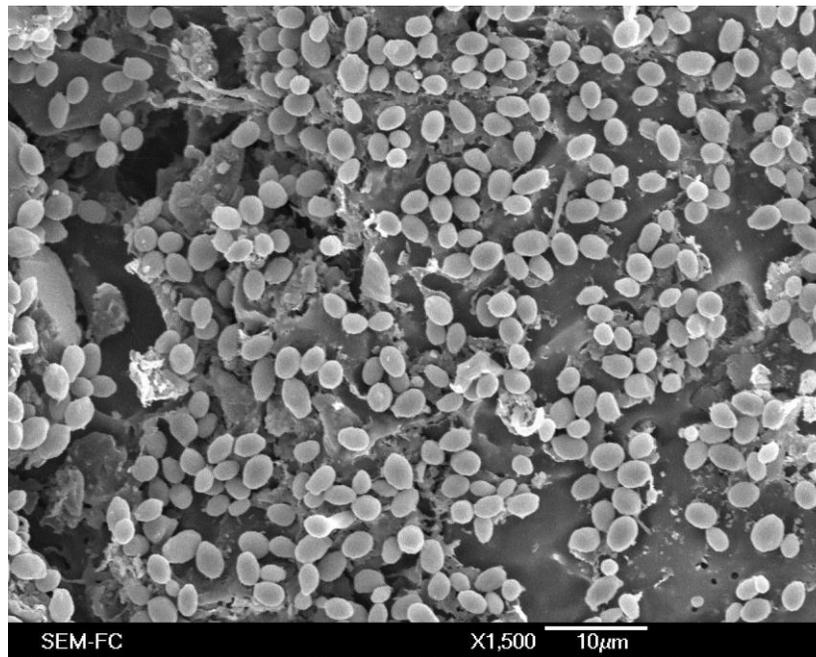


Fig. 23 Pre- tratamiento de Clorhexidina al 0.12%, cultivo de *Candida albicans* 48hrs 1500X. MEB

La superficie del material presenta múltiples defectos así como una mayor cantidad de blastoconidios adheridos en la mayor parte en los defectos de la superficie. Estos presentan gemación.

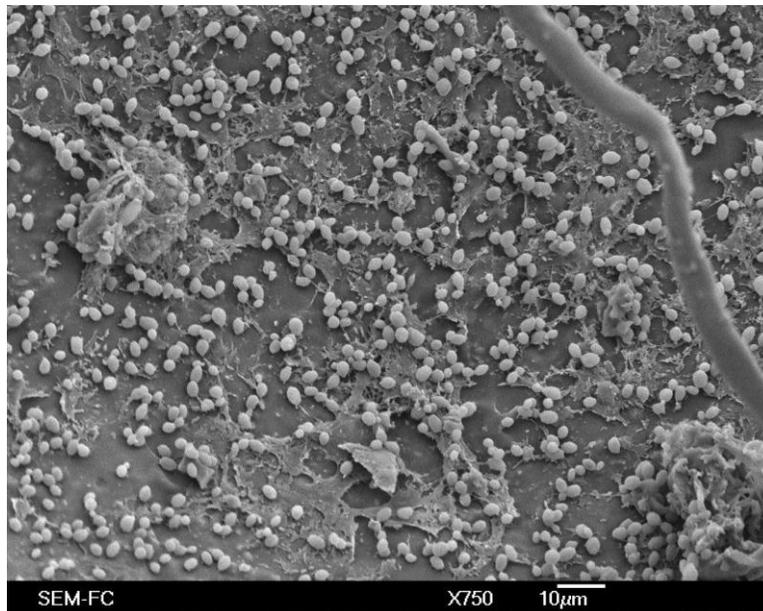


Fig. 24 Pre-tratamiento Clorhexidina 0.12%, cultivo de *Candida albicans* 48 hrs 750X MEB.

Se observan múltiples defectos en la superficie y adherencia de los blastoconidios, tanto en las áreas lisas y en mayor cantidad en las zonas con defectos, con lo que determinamos que la clorhexidina daña la superficie de la resina acrílica PMMA, permitiendo una mayor disposición a la adherencia de los blastoconidios en los reservorios propicios.



Pre- tratamiento H₂O grupo control: cultivo 24 hrs

Las características que presentan los blastoconidios son los siguientes su tamaño varia de entre 3 a 4 micras de diámetro, se observan con morfología variable, encontrando células maduras y presentando gemación.

La adherencia de los blastoconidios es uniforme sobre la muestra, encontrando células en grupos pequeños y con pseudomicelios de 5 a 6 células.

Dentro de las características que presenta la superficie se pueden observar defectos como lo que son grietas y poros de tamaño variable y de poca profundidad.

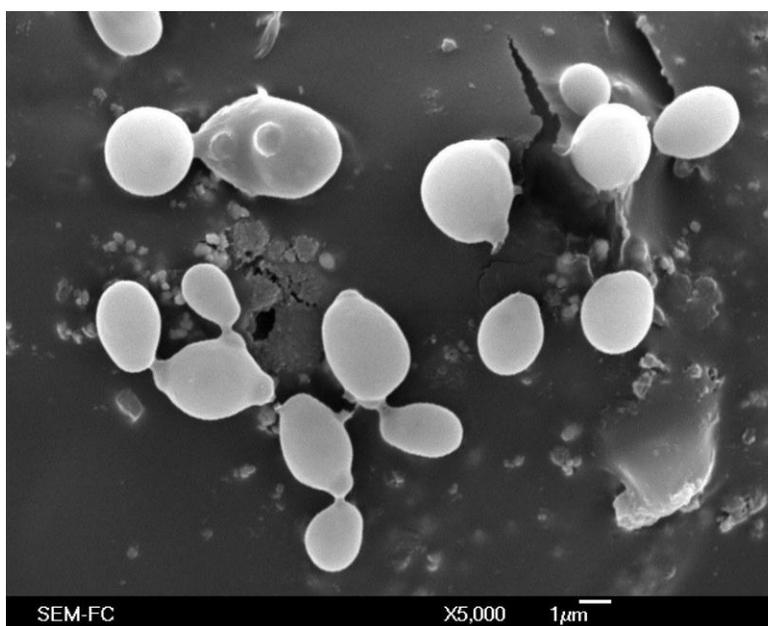


Fig. 25 Grupo control H₂O, cultivo *Candida albicans* 24Hrs 5000X. MEB

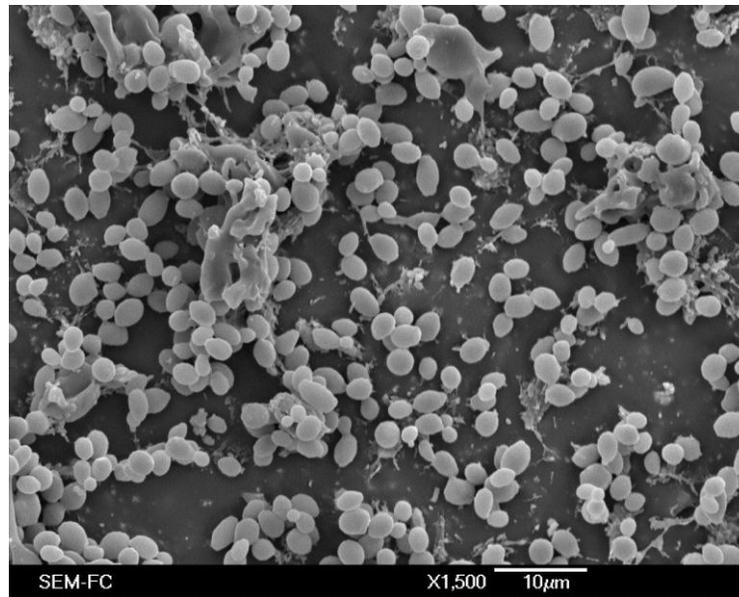


Fig. 26 Grupo control H₂O, cultivo *Candida albicans* 24hrs 1500X. MEB

Se observa la adherencia de parte de *Candida albicans* tanto en la superficie lisa como en los defectos de la superficie de la muestra, existe formación de pseudomicelios y blastoconidios aislados.

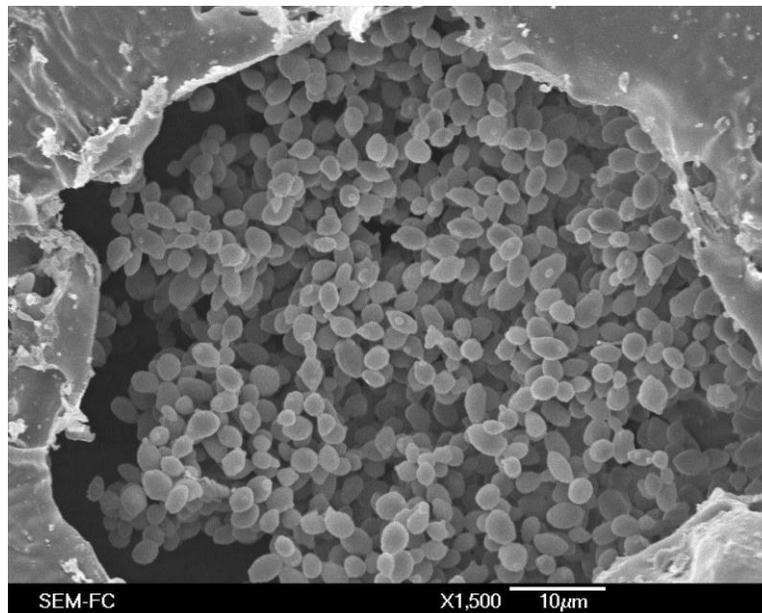


Fig.27 Grupo control H₂O, cultivo *Candida albicans* 24 hrs 750X. MEB

Se observa vista panorámica del PMMA y que dentro de un defecto de la superficie en donde los blastoconidios usan como reservorio, teniendo como característica una gran cantidad de células, maduras y en gemación.



Grupo control H₂O: Cultivo a 24 hrs.

Características de los blastoconidios de 3 micras de promedio presentan formación de hifas así como gemación, abarcando toda la superficie del campo.

Características de la adherencia: los blastoconidios se encuentran adheridos a la superficie del PMMA en forma de pseudomicelio y con presencia de hifas

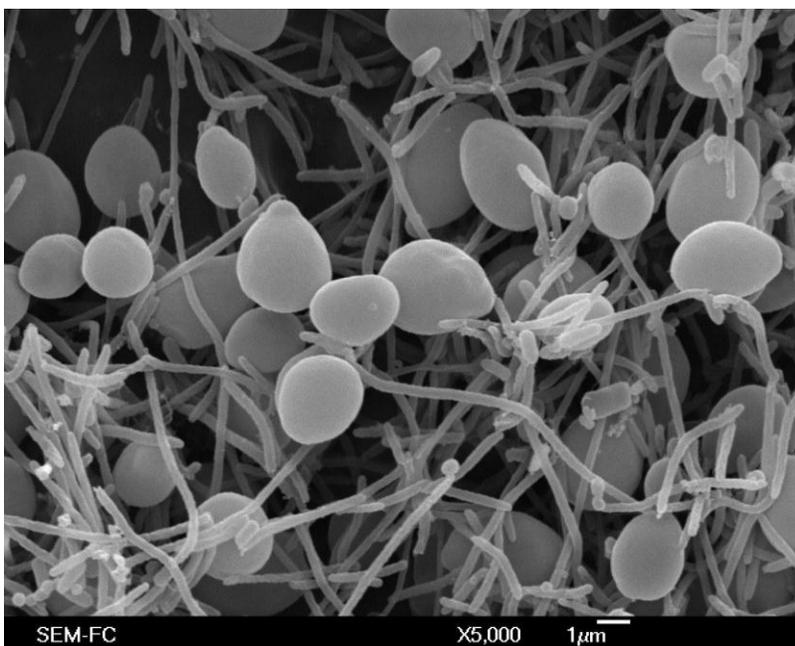


Fig. 28 Grupo control H₂O, cultivo *Candida albicans* 48 hrs 5000X. MEB.

Blastoconidios maduros con presencia de hifas. Vista a detalle

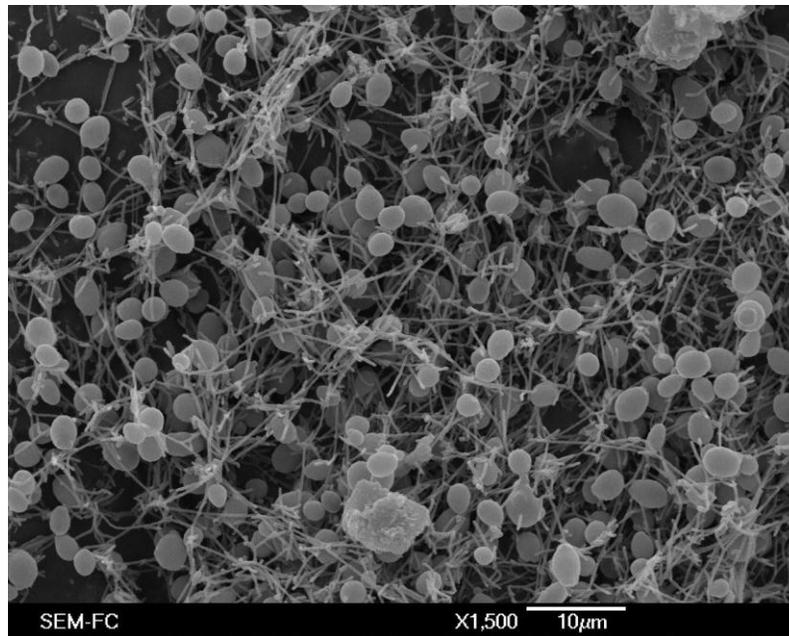


Fig. 28 Grupo control, cultivo *Candida albicans* 48Hrs 1500X MEB.

Por la presencia de la gran cantidad de células con hifas no se logra apreciar la superficie de la muestra.

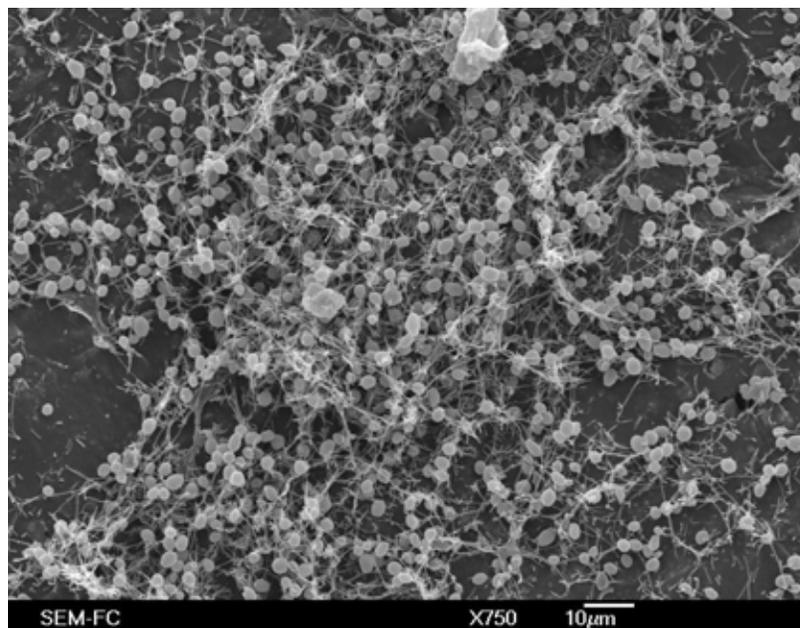


Fig. 29 Grupo control H₂O, cultivo *Candida albicans*, 48 hrs 750X. MEB Vista panorámica.

Se observa la distribución uniforme de los blastoconidios con hifas en la superficie de la muestra.

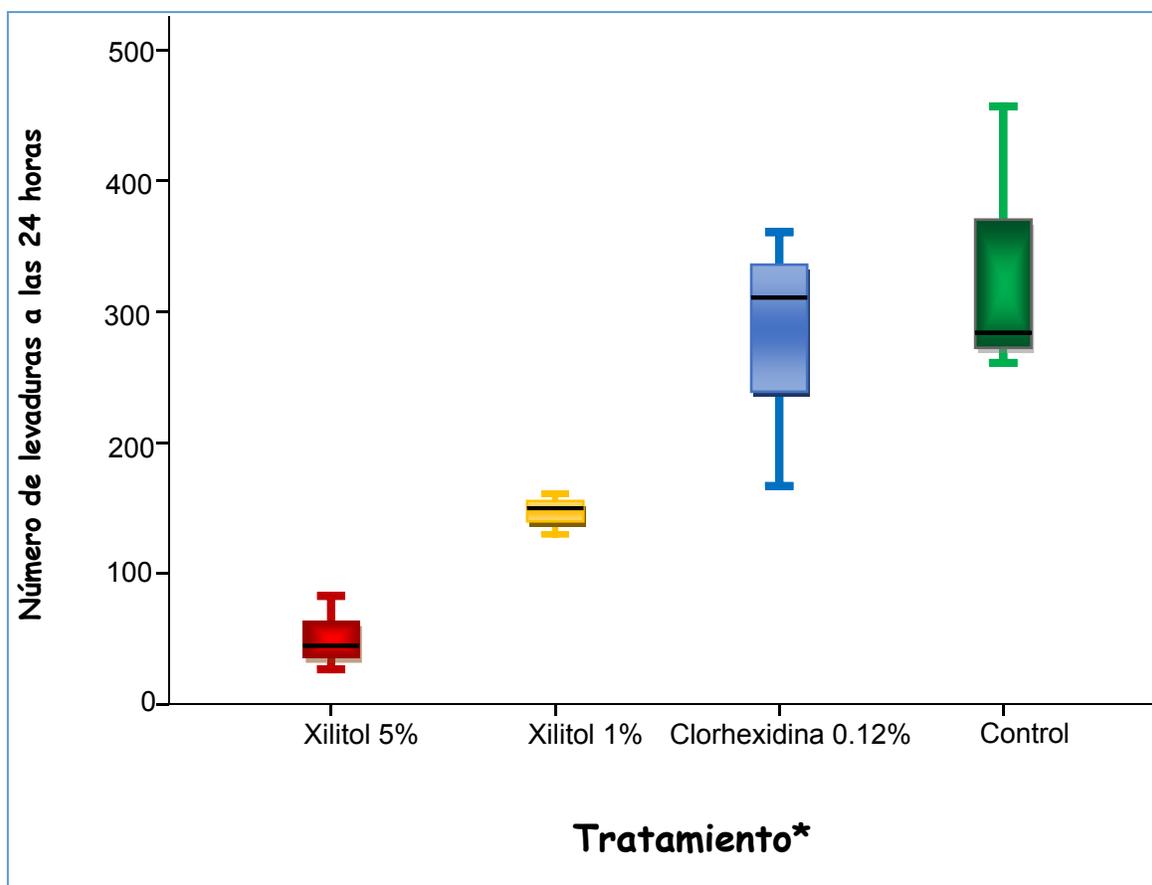


De las cuatro pruebas realizadas para cada solución, se observó que el número de blastoconidios adheridos al PMMA fue muy variable, siendo que las pruebas de adherencia, fijado de las muestras y observación del campo mediante microscopia de barrido se realizaron bajo condiciones iguales, así como se pudo observar que en la superficie de las muestras tratadas con clorhexidina al 0.12% se observaron diversas irregularidades en comparación con los otros tratamientos a base de xilitol al 1% y 5%.

La variación de la adherencia en los diferentes tratamientos entre 24hrs y 48 hrs

Se ha demostrado que los aparatos de ortodoncia al alterar el ambiente microbiológico conducen al aumento en la prevalencia de *Candida albicans* en la boca, y algunas pacientes susceptibles pueden cambiar de *Candida albicans* no transportistas a condición de portador *Candida albicans*. Es importante para nosotros saber los efectos microbiológicos a partir de la inserción de los aparatos, y puede tomar un enfoque más cauteloso con aparatología de ortodoncia y tratamientos a niños inmunocomprometidos sobre el posible aumento del riesgo de infección por *Candida albicans*.

De los conteos individuales para cada prueba se obtuvieron los promedios y se compararon las medianas para los 4 grupos de rangos (medianas) bajo la prueba de Kruskal Wallis y se determinó que la diferencia no se deba al azar señalando la significancia estadística con el valor de p menor de 0.05. Todo mediante el programa estadístico de ssps Ver. 15. se resume en las siguientes gráficas.

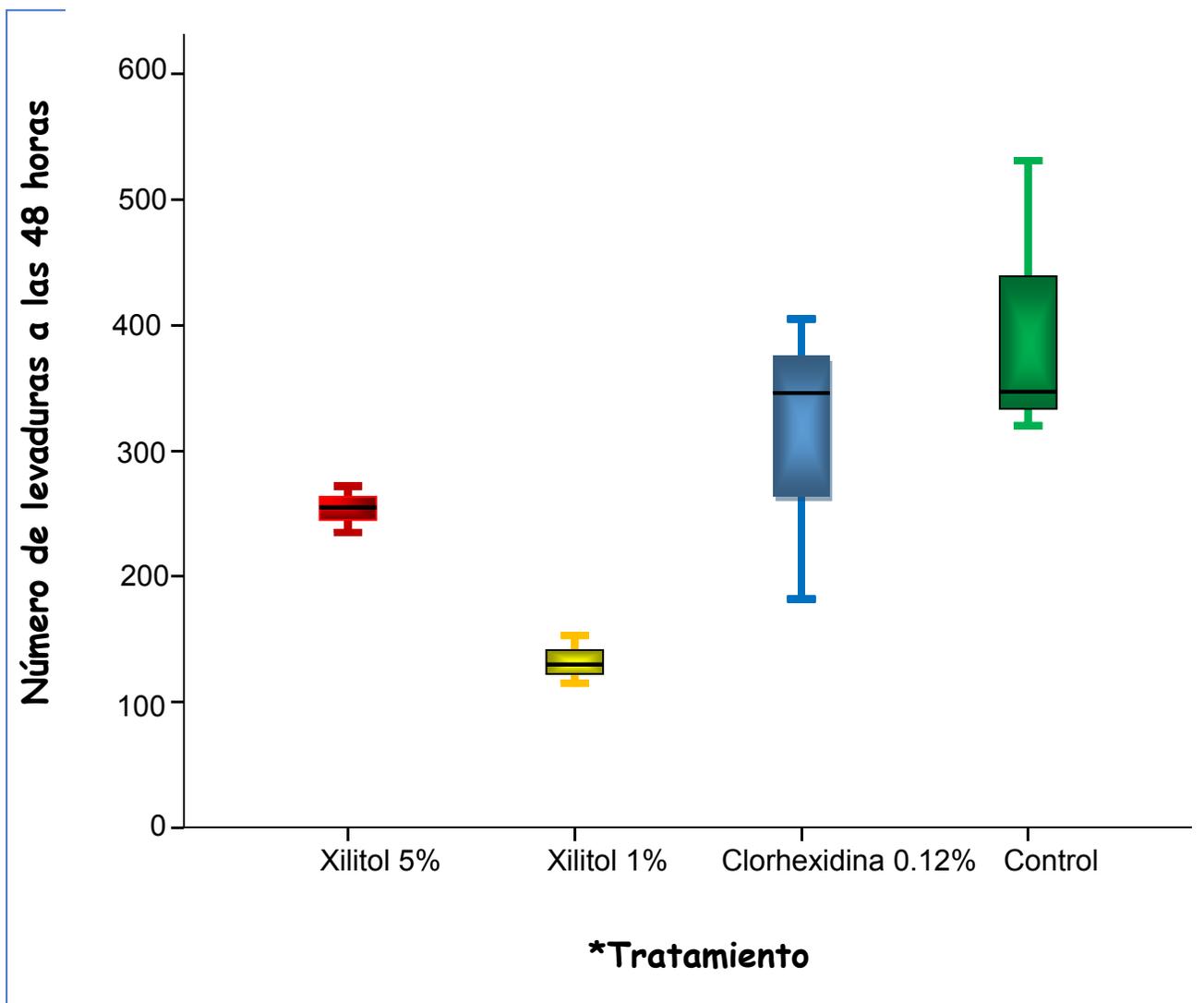


***Prueba de Kruskal Wallis en donde p es menor 0.05**

Tratamiento: Xilitol 5% versus control p menor 0.05

Xilitol 1% versus control p menor 0.05

Grafica. 1 Adherencia de *Candida albicans* al PMMA con diferentes soluciones desinfectantes con cultivo *Candida albicans* 24 hrs.



Prueba de Kruskal Wallis p menor 0.05

Tratamiento: Xilitol versus control p menor 0.05

Grafica 2. Muestra el número de blastoconidios de *Candida albicans* adheridos de al PMMA a una inoculación de 48 hrs. Con las diferentes soluciones desinfectantes en donde nos muestra que xilitol al 1% tiene un mejor efecto y estabilidad de inhibición de adherencia de blastoconidios de *Candida albicans* en comparación con el grupo control a la superficie de la resina acrílica (PMMA).



VIII. DISCUSION:

La superficie de la resina acrílica PMMA presenta diferentes características de porosidad en su superficie, lo cual contribuye significativamente en la adherencia y retención de microorganismos como lo es el caso de *Candida albicans*, en la superficie de la resina acrílica para lo cual el sentido de este estudio fue probar diferentes soluciones desinfectantes como lo son el xilitol en dos concentraciones 5% y 1% así como la solución reconocida clorhexidina en su dosis comercial de 0.12% dentro de sus desventajas el uso continuo provoca la decoloración de resina acrílica y, por tanto, no debe ser indicado para uso diario.

Varios estudios han reportado que la clorhexidina al 0.12% utilizada para el control químico de la película bacteriana, dentro de sus desventajas esta presentar sabor desagradable, alteraciones en el paladar, sensación de quemazón en la lengua, alteración del sabor de los alimentos y pigmentaciones en la superficie dental. Por lo que se ha buscado una mejor opción que tenga las mismas propiedades de control en contra de la película bacteriana, pero sin sus desventajas; uno de los desinfectantes que se ha estudiado, y que presenta las mismas aplicaciones clínicas pero sin sus efectos adversos es el xilitol.

En este sentido al saber que la fase temprana de la colonización comienza por los factores fisicoquímicos de las propiedades de la superficie de la resina acrílica y los mecanismos activo y pasivo de la adhesión microbiana desde el punto de vista de la colonización de *Candida albicans* al PMMA.

En este análisis fue posible revelar las características de la adherencia de *Candida albicans* a la superficie de PMMA con dos diferentes soluciones desinfectantes y en dos periodos de tiempo de 24 y 48 horas. Estas características son: el número de blastoconidios adheridos, su morfología, la formación deseudomicilio, reproducción y colonización sobre PMMA.

Una de las estrategias para evitar la formación de la biopelícula es el uso de colutorios con agentes activos con propiedades antibacterianas y antimicóticas como son la clorhexidina y el xilitol.²¹



Los datos obtenidos del conteo de los blastoconidios adheridos al PMMA mediante el tratamiento de soluciones de clorhexidina y xilitol y a los dos tiempos de inoculación, lo cual nos permitió hacer el estudio comparativo con Kruskal Wallis. Al realizar una gráfica de los promedios de blastoconidios adheridos en los dos tratamientos y a los dos tiempos de 24hrs y 48hrs, en la cual se observa que el xilitol comparado con el grupo control tiene valor significativo en donde p es menor 0.05.

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

Los resultados de la investigación microbiológica demostraron que la clorhexidina y xilitol en un sistema de administración inhibió la colonización de *Candida albicans* al limitar su adherencia de estos sistemas poliméricos pre medicados con las diferentes concentraciones de los desinfectantes ya mencionados.

Estudios similares *in vitro* que emplean diferentes sistemas poliméricos para una liberación sostenida de fármacos antifúngicos intraorales debe fomentarse. Los estudios clínicos son esenciales con el fin de probar la eficacia de la sugerida, antes de la aplicación de la nueva forma de dosificación de las soluciones antisépticas para el tratamiento de los aparatos de ortopedia y ortodoncia asociados a Candidiasis oral.

El uso de clorhexidina parece ser benéfico para los pacientes con aparatos de ortopedia con base acrílica dental, pero su uso continuo provoca la decoloración de resina acrílica y, por tanto, no debe ser indicado para uso diario.¹⁵

Un reciente estudio de dos años realizado por Turku et al. Indico que el consumo de xilitol reduce la incidencia de *Candida* oral.⁴² El xilitol reduce significativamente la adherencia de *Candida spp*.



McCourtie y Douglas ¹⁷ mostraron que la adherencia de la levadura para superficies acrílicas in vitro se incrementó después del crecimiento de la levadura en un medio que contenía altos niveles de diferentes azúcares, particularmente galactosa.

La glucosa también puede promover la producción de ácido y pH más bajo, con el consiguiente una activación de proteinasas ácidas y fosfolipasas, de los factores extracelulares, factores que se encuentran implicados en la adhesión de la levadura ^{22,23}.



IX. CONCLUSIONES:

Acorde a varios reportes que indican que la clorhexidina tiene un efecto inhibitorio en la adherencia de *Candida albicans* en polimetilmetacrilato suponemos que el xilitol en concentraciones de 1% y 5% tendrá un efecto inhibitorio en la adhesión de *Candida albicans* al polimetilmetacrilato similar a la clorhexidina al 0.12%.

El efecto inhibitorio del xilitol al 5% sobre el grupo control H₂O demuestra tener valor estadístico significativo donde p es menor 0.05 en el periodo de 24 hrs.

El xilitol al 1% versus el grupo control donde el valor estadístico fue significativo en donde p es menor 0.05 en el periodo de 24 hrs.

Y en el periodo de 48 hrs el xilitol al 1% versus el grupo control también presento valor estadísticamente significativo en donde p es menor 0.05.

Resumiendo que el efecto inhibitorio del xilitol en su concentración de 1% versus el grupo control demostró ser notable en su periodo de inoculación de 24 hrs.

Nuestros resultados mostraron que el xilitol al 1% tiene un efecto inhibitorio similar al de la clorhexidina sin afectar la superficie del PMMA debido a que la clorhexidina daña la superficie de la resina acrílica aumentando así sus defectos en los cuales *Candida albicans* los encuentra como reservorios para su colonización.

Dentro de las limitaciones de la actual investigación es haber efectuado mediante el empleo de un solo sistema de resina para el suministro intraoral de los desinfectantes, y mediante la evaluación de la eficacia de los mismos sobre la crecimiento de sólo una especie *Candida*, *Candida albicans*, dando lugar de un rango amplio de patógenos. Tras conclusiones, sin embargo, se puede alcanzar que:

- Clorhexidina y xilitol usados como desinfectantes antifúngicos puede ser con éxito incorporados a las medidas previas de higiene de los aparatos de ortopedia hechos con polimetilmetacrilato.



X. REFERENCIAS.

1. Reis KR, Bonfante G, Pegoraro LF, Conti PC, Oliveira PC, Kaizer OB. In Vitro Wear Resistance of three Types of PMMA Denture teeth. JAPPL Oral Si. Vol 16 (3), May-Jun 2008.
2. Frazee RQ, Byron RT, Osborne RT, West KP. PMMA: An Essential Material in Medicine and Dentistry. J Long Term Eff Med Implants 2005; 15 (6) 629-39.
3. Nikawa H, Samaranayake L. Effects on Dietary Sugar and Saliva and Serum on Candida Biofilm Formation on Acrylic Surfaces. Mycopat 1997; 139: 87 -91.
4. Cannon R, Holmes A. Oral Candida Clearance. Colonización or Candidiasis?. J.Dent Res. 1995;4:1152-1161.
5. Gibbons R, Turck D. Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Diseases. J Dent Res. 1989; 68:750-760.
6. Ohman S. The Prevalence of Staphylococcus Aureus, Enterobacteriaceae Species and Candida Species and Their Relation to Oral Mucosal Lesion in a Group of 79 years old In Göteborg. Acta Odontol Scand. 1995; 53: 49-54.
7. Samaranayake L. Oral Candidiosis. Londres Inglaterra. Editorial. De Wright. 1990, 66-103.
8. Nikawa H, Jin C, Hamada T, Makihiro S, Kumagai H, Murata 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.
9. Rui M, Jie L, Yun-Tao J, Zheng L, Zi-Sheng T, Dong-Xia Y, Jin Z, Zheng-Wei H. Modeling of Diffusion Transport Through Oral Biofilms With The Inverse Problem Method. *Int J Oral Sci*, 2(4): 190–197, 2010.
10. Bowen WH, Koo H. Biology Of *Streptococcus Mutans*- Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. Caries Res 2011;45:69–86



11. Flemming HC, Wingender J. The Biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623-633.
12. Göcke R, Gerath H F. Von S. Quantitative Determination of Salivary Components in the Pellicle on PMMA denture base material. *Clinical Oral Investigations*. 2002. Volume 6, Number 4, 227-235.
13. Chimenos E., López J., Blanco A., Gándara J.M. Infecciones Micóticas En Odontología. *Arch Odontología* 2000; 16: 497-507.
14. Romo AE, Moreno MV, Antuna BS, Fortoul VT, Muñoz HB. Análisis Microscópico De La Adherencia De *Candida Albicans In Vitro* Sobre Resina Acrílica Utilizada Para Bases De Dentaduras Procesada Con Tres Diferentes Técnicas. UNAM 2006.
15. Montagner H, Montagner F, Braun KO, Peres PE, Gomes BP. *In Vitro* Antifungal Action of different Substances over Microwaved-Cured Acrylic Resins. *J. Appl. Oral Sci. J Appl Oral Sci*. 2009 Sep-Oct;17(5):432-5.
16. Pardi, Germán. "Determinantes De Patogenicidad De *Candida Albicans*": (Revisión Bibliográfica). *Acta Odontol. Venez*, Jun. 2002, Vol.40, No.2, P.185-192.
17. Ucar BA, Rojas MG, Ballester LA. Acción de agentes químicos en la eliminación de *Cándida Albicans* sobre prótesis dentales. *Acta Odontol. Venez V.45 N.2 Caracas* 2007
18. Christopher R. Pusateri, Edward A. Monaco, Mira E. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and Chlorhexidine. *Arch Oral Biol*. 2009 June ; 54(6): 588–594
19. Xi C, Zi-Hua J, Sanfeng C, Wensheng Q. Microbial and Bioconversion Production of D-Xylitol and Its Detection and Application. *Int. J. Biol. Sci*. 2010, 6. 834-844.
20. Waltimo T, Tanner J. Adherence of *Candida albicans* to the surface of PMMA-Glass Fiber Composite in Dentures. *Int J Prostodonth* 1999: 12, 83-86.
21. Yévenes LI, Reyes YJ, Campos PN, Saragoni FV. Efecto Inhibitorio en placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de Clorhexidina. *Av Periodon Implantol*. 2003; 15, 1: 19-24.
22. Aguirre UJ. Candidiasis Orales. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 17-21



23. Decker, Eva María, Maier, Gabriele A, Detlef, Brex, Michel, Von O, Christiane. Efecto de Colutorios de Xilitol/Clorhexidina versus Xilitol o Clorhexidina sobre la formación Inicial de la biopelícula de Estreptococos Cariogénicos. Quintessence. Publicación Internacional De Odontología, 2009 02; XXII (2) 63-68.
24. Hairong C, Ben W, Jiyang L, Mingguo J, Shuangjun L, Zixin D. Xylitol Production From Xylose Mother Liquor: A novel strategy that combines the use of recombinant bacillus subtilis and candida maltose. Microbial Cell Factories 2011, 10:5
25. Granström TB, Izumori K, Leisola M. A Rare Sugar Xylitol. Part II: Biotechnological Production and Future Applications of Xylitol. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Feb;74(2):273-6. Epub 2007 Jan 11.
26. Silva CJ, Roberto IC. Improvement of Xylitol Production by *Candida Guilliermondii* FTI 20037 Previously Adapted to rice straw Hemicellulosic Hydrolysate. Lett Appl Microbiol. 2001 Apr; 32(4):248-52.
27. Darwazeh, A. M., & Al-Jasser, N. M. The effect of fixed orthodontic appliance therapy on oral Candida carriage. Saudi Dental Journal: 2003. 15(3), 141-144.
28. Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayak LP. The Effect of Fixed Orthodontic Appliances on the Oral Carriage of *Candida* Species and Enterobacteriaceae. European Journal of Orthodontics Volume 26, Issue 6. Pp. 623-629.
29. Hoehamer CF , Cummings ED , Hilliard GM , Rogers PD . Changes in the Proteome of *Candida Albicans* in Response to Azole, Polyene, and Echinocandin Antifungal Agents. Antimicrob Agents Chemother. 2010 May;54(5):1655-64.
30. Abu-Elteen, Khaled H. The Influence of Dietary Carbohydrates on In Vitro Adherence of Four Candida Species to Human Buccal Epithelial Cells. Microbial Ecology in Health and Disease. 2005; 17: 156_/162.
31. Un Sengün , Sari Z , Ramoglu SI , Malkoc S , Durán I. Evaluation of the Dental Plaque Ph Recovery Effect of a Xylitol Lozenge on Patients with fixed orthodontic appliances. Angle Orthodontist, Vol 74, No 2, 2004



32. Mäkinen KK, Ojanotko A, Vidgren H. Effect of Xylitol on the Growth of three Oral Strains of *Candida Albicans*. J Dent Res. 1975 Nov-Dec;54(6):1239
33. Webb, B.C.; Thomas, C.J.; Willcox, M.D.P.; Harry, D.W.S.; Knox, K.W. (1998): *Candida*-Associated Denture Stomatitis. Aetiology and Management: A Review. Part 1. Factors Influencing Distribution of *Candida* Species in the Oral Cavity. Aust Dent J. 43: 45-50.
34. Negre, E.; Vogel, T.; Levanon, A.; Guy, R.; Walsh, T.J.; Roberts, D.D. (1994): The Collagen Binding Domain Of Fibronectin Contains a High Affinity Binding Site for *Candida Albicans*. J Biol Chem. 269: 22.039-22.045.
35. Pendrak, M.L.; Klotz, S.A. (1995): Adherence of *Candida Albicans* to Host Cells. FEMS Microbiol Lett. 129: 103-114.
36. Echevarría A, Durante AG, Arechaval A, Negroni R. Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad de la fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol. 2002 Jun: 19(2):95-8
37. Antley, P.P.; Hazen, K.C. Role of Yeast Growth Temperature on *Candida Albicans* Virulence in Mice. Infect Immun. 1988: 56: 2.884-2.990.
38. Hazen, K.L. (1989): Participation of Yeast Cell Surface Hydrophobicity in Adherence of *Candida Albicans* to Human Epithelial Cells. Infect Immun. 57: 1.894-1.900.
39. Hazen, K.L.; Brawner, D.L.; Riesselman, M.H.; Jutila, M.A.; Cutler, J.E. (1991): Differential Adherence to Hydrophobic and Hydrophilic *Candida Albicans* Yeast Cells to Mouse Tissues. Infect Immun. 59: 907-912.
40. Samaranayake, Y.H.; Wu, P.C.; Samaranayake, L.P.; SO, M. (1995): Relationship between the Cell Surface Hydrophobicity and Adherence of *Candida Kruzei* and *Candida Albicans* to Epithelial and Denture Acrylic Surfaces. A P M I S. 103: 707-713.



41. Samaranayake, L.P.; Mac Farlane, T.W. (1981): The Adhesion of the Yeast *Candida Albicans* to Epithelial Cells of Human Origin *in Vitro*. Archs Oral Biol. 26: 815-820.
42. Mc Courtie, J.; Douglas, L.J. (1981): Relationship between Cell Surface Composition of *Candida Albicans* and Adherence to Acrylic after Growth on different Carbon Sources. Infect Immun. 32: 1.234-1.241.
43. Larmas, Makinen, Y Scheinin, Acta Odontol Scand A.: Turku Sugar Studies. VIII. Principal Microbiological Findings, Acta Odontol Scand 33 Suppl 70:173-216, 1975.
44. Mccourtie J, Douglas LJ. Relationship Between Cell Surface Composition, Adherence, And Virulence Of Candida Albicans . Infect Immun. 1984;/45:/6_/12.
45. Khaled H. Abu-Elteen. The Influence of Dietary Carbohydrates on In Vitro Adherence of Four Candida Species to Human Buccal Epithelial Cells. Microbial Ecology in Health and Disease. 2005; 17: 156_/162
46. Bailey, A.; Wadsworth, E.; Calderone, R.A. (1995): Adherence of *Candida Albicans* to Human Buccal Epithelial Cells: Host-Induced Protein Synthesis and Signaling Events. Infect Immun. 63: 569-572.
47. Budtz-Jorgensen, E. (1990): Etiology, Pathogenesis, Therapy and Prophylaxis of Oral Yeasts Infections. Acta Odontol Scand. 48: 61-69.
48. Budtz-Jorgensen, E.; Theilade, E.; Theilade, J. (1983): Quantitative Relationship between Yeasts and Bacteria in Denture-Induced Stomatitis. Scand J Dent Res. 91: 134-142.
49. Theilade, E.; Budtz-Jorgensen, E.; Theilade, J. (1983): Predominant Cultivable Microflora of Plaque on Removable Dentures in Patients with Healthy Oral Mucosa. Archs Oral Biol. 28: 675-680.
50. Theilade, E.; Theilade, J. (1985): Formation and Ecology of Plaque at Different Locations in the Mouth. J Dent Res. 64: 90-95.
51. Ellepola, A.N.; Samaranayake, L.P. (1998): Adhesion of Oral *Candida Albicans* Isolates to Denture Acrylic Following Limited Exposure to Antifungal Agents. Archs Oral Biol. 43: 999-1.007.



52. Klotz, S.A.; Drutz, D.J.; Zajic, J.E. (1985): Factors Governing Adherence of *Candida* Species To Plastic Surfaces. *Infect Immun.* 50: 97-101.
53. Sukontapatipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod* 2001; 23: 475–484.
54. Hirota K, Ichikawa T, Kashiwabara T, Nemoto K, Ono T, Murakami K, et al. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and the effect of electrolyzed water on the biofilm. *Bacterial Adherence & Biofilm* 1996;10:30–5.
55. Vadeboncoeur C, Trahan L, Mouton C, Mayrand D. Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. *Journal of Dental Research* 1983;62:882–4.
56. Yacamán José M, Reyes José. *Microscopía electrónica: una visión del microcosmos*. CONACYT- Fondo de Cultura Económica, Mexico. 1995.
57. Santander G. Rafael. *Técnicas de microscopía electrónica en biología*. Edit. Aguilar. España 1998.
58. Bozzola, John J. and Lonnie D. Russell. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones and Barlett publishers. USA. . 1991
59. Panizo M. M, Reviákina V. Adhesinas y receptores involucrados en el fenómeno de adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 2001 Ene; 21(1): 05-11.
60. Pardí G. Cardozo E. I. Algunas consideraciones sobre *Candida Albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta odontol. venez* [revista en la Internet]. 2002; 40(1): 9-17.
61. Calderone R, Braun P. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev.* 1991. 55(1): 1-20.
62. Nolte, W. *Microbiología Odontológica*. México. Ed. Interamericana. 4 ed. 1986. pp. 549-590.
63. Williams, D.W.; Lewis, M.A.O. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Diseases.* 2000. 6: 3-11.
64. M. I. Brusca, O. Chara, L. Sterin-Borda, and A. C. Rosa (2007) Influence of Different Orthodontic Brackets on Adherence of Microorganisms In Vitro. *The Angle Orthodontist*: March 2007, Vol. 77, No. 2, pp. 331-336.



65. Pithon MM, Santos RL, Alviano WS, Ruellas ACO, Araújo MTS. Quantitative assessment of *S. mutans* and *C. albicans* in patients with Haas and Hyrax expanders. *Dental Press J Orthod.* 2012 May-June;17(3):21.e1-6.
66. Muggiano F, Quaranta A, Previati M. *Candida albicans*: Colonization, role and effects of this opportunistic pathogen on orthodontic appliances. *WebmedCentral Orthodontics.* 2014;5(1)
67. Salomm HF, Mohammed-Salih HS, Rasheed SF. The influence of different types of fixed orthodontic appliance on the growth and adherence of microorganisms (in vitro study). *J Clin Exp Dent.* 2013; 5(1):e36-41.
- 68.. **Smith G.N., WrightS., Brown D.** Utilización clínica de los materiales dentales. 2ªEd. Barcelona: Masson S.A.; 1996. P 129-136 y 231-236.
69. **Olsen I.** Oral adhesion of yeast. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48: 45-53.
70. **Ramage G., Vande Walle K., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L.** Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3234-40.
71. **Chandra J., Mukherjee P.K., Leidich S.D., Faddoul F.F., Hoyer L.L., Douglas L.J.,et al.** Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro.*J Dent Res* 2001; 80: 903-8



XI. ANEXOS:

XI.1. MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (MEB).

Es un útil instrumento para el estudio de biopelículas. Un **microscopio electrónico de barrido** crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto. El SEM explora la superficie de la imagen punto por punto.

El Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy), utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. Es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de sólidos inorgánicos y orgánicos. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra.^{56,57}

Está diseñado para estudiar, en alta resolución la superficie de los sólidos y sus características morfológicas y topográficas de la muestra.^{56,57}

Su funcionamiento se basa en que en un campo electromagnético actúa recorriendo la muestra con un haz muy concentrado de electrones, de manera análoga a la acción de una lente de cristal sobre un haz de fotones, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión. Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor.

No es posible 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 o barrido.^{56,57}



El microscopio cuenta con las siguientes partes: óptica electrónica, cámara del espécimen, circuitos de alimentación de la óptica electrónica, generación del voltaje y 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.^{56,57}

Las ventajas que nos ofrece el uso de MEB es la gran profundidad de campo, imágenes tridimensionales, visualización de muestras de un tamaño muy pequeño, una extensa gama de aumentos, la resolución sin modificar la distancia focal, y obtener del espécimen diversos tipos de información, como análisis cuantitativos y cualitativos.

XI.1.1.Preparación de las muestras

La preparación de las muestras debe de tener un tratamiento previo que consiste en lo siguiente:

Fijación: su objetivo de este es endurecer el contenido intracelular para que soporte el estrés físico de los pasos posteriores, en este caso se utilizó un medio químico glutaraldehído y tetraóxido de osmio.⁵⁸

Los procedimientos generales a seguir cuando se utiliza tetraóxido de osmio son la fijación secuencial utilizando primero glutaraldehído al 2% (1-2 horas) en SBF 0.1M pH 7.2-7.4, seguida de una posfijación en tetraóxido de osmio al 1 ó 2% (1-2 horas) o mediante una fijación simultánea utilizando una solución mixta de glutaraldehído al 2% y tetraóxido de osmio al 2% disueltos en SBF 0.1M, pH 7.2-7.4 preparados justo antes de su empleo.

Deshidratación: La deshidratación tiene como objetivo eliminar el agua de la muestra sustituyéndola por etanol el cual puede ser posteriormente intercambiado por el CO₂ líquido durante el secado a punto crítico (SPC). Este procedimiento se realiza de forma gradual para evitar encogimiento drástico de las células para esto se preparan diluciones con agua destilada y etanol al 10%, 20%, 30%, etc. Hasta llegar al 100% y se realiza un segundo cambio para eliminar por completo remoción de agua.⁵⁸



Secado: se realiza con el secado al punto crítico (SPC) se basa a ciertas condiciones de temperatura y presión. Con esto es posible llevar todo el líquido a su fase de vapor sin que exista tensión en la superficie de la muestra, se utiliza CO₂.⁵⁸

Montaje de la muestra: se procede a montar las muestras ya que han sido secadas y se montan en porta objetos que regularmente son de metal, como lo es de aluminio, latón y cobre, y adherirse con discos adhesivos de carbón.⁵⁸

Cubrimiento con metal: Para hacer conductiva la muestra se aplica una capa muy delgada de metal con un alto número atómico realiza un procedimiento llamado “sputter coating” el equipo llamado “sputter coater” forma una nube de iones de argón y átomos de metal descargados de una laminilla, que caen suavemente sobre la superficie de la muestra cubriéndola uniformemente en toda su topografía. El metal de la laminilla preferentemente es de oro u otra aleación es el oro-paladio, estos metales son elegidos por formar partículas muy finas inadvertidas para MEB aparte de tener una mayor conductividad y así emitir una señal más fuerte para formar su imagen. El grosor de esta capa es de aproximadamente 20nm.

Observación: la muestra ya cubierta con metal se introduce al MEB para su observación.⁵⁸



XI.2. MEDIOS DE CULTIVO:

Medio de cultivo es un material alimenticio que se usa en el laboratorio para el desarrollo de los microorganismos. Una vez que ha sido preparado, un medio de cultivo puede ser inoculado y después incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano. El crecimiento de los microorganismos es el cultivo. Un cultivo axénico o puro contiene un único tipo de microorganismos.

Los medios de cultivo deben contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y deben estar exentos de cualquier microorganismo contaminante.

Los medios de cultivo deben contener como mínimo: carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas; también se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores de crecimiento de unas bacterias y no de otras.

El **agar** es el principal agente solidificante utilizado en medios bacteriológicos. Se disuelve completamente a 100°C y se solidifica al enfriarse a 40°C.

11.2.1. Clasificación: Con forme a su consistencia los medios de cultivo se clasifican en:

Líquidos: Se utilizan para el crecimiento de cultivos puros en lote. Se denominan caldos de cultivo y no tienen agar en su formulación.

Semisólidos: Contienen 0.5% de agar en su formulación. Se utilizan para estudiar la movilidad de las bacterias (presencia o ausencia de flagelo).

Sólidos: Contienen de 1.5 a 2% de agar en su formulación. Estos medios inmovilizan a las células, permitiéndoles crecer y formar masas aisladas visibles llamadas colonias. Las colonias permiten reconocer la pureza del cultivo; las placas que contengan más de un tipo de colonia no provienen de un cultivo puro. Las placas de agar también se utilizan para la determinación de células viables (recuento en placas).

De acuerdo a su composición se clasifican en:

Definidos: muy utilizados en estudios fisiológicos.

Los medios mínimos son medios definidos que únicamente le proporcionan al microorganismo los nutrientes necesarios para crecer, pero no para desarrollarse óptimamente.



Complejos: es aquél del cual no se conoce la composición exacta del medio. A menudo, los medios complejos emplean sangre, leche, extracto de levaduras, extracto de carne u otras sustancias muy nutritivas pero de las cuales se desconoce la composición química exacta. Estos medios son muy utilizados para cultivar bacterias desconocidas o bacterias de requerimientos nutricionales muy complejos.

De acuerdo a su función, los medios de cultivo se clasifican como:

Medios selectivos: Son aquéllos que poseen uno o más componentes añadidos, los cuales inhibirán o prevendrán el crecimiento de ciertos tipos de especies de bacterias y/o promoverán el crecimiento de las especies deseadas. Uno puede ajustar las condiciones físicas de un medio de cultivo tales como el pH, la temperatura, para hacerlo selectivo para los organismos de interés.

Medios diferenciales: Permiten distinguir entre diferentes tipos de bacterias con base en alguna característica observable en su patrón de crecimiento en el medio, ya sea por producción de algún pigmento o por cambios de color en el medio debido a indicadores de pH, o por halos de degradación de algún componente en el medio de cultivo.

Medios de enriquecimiento: Contienen algún componente que permite el crecimiento de cierto tipo específico de bacteria, pero no contienen sustancias inhibitoras.

Medios enriquecidos: Se emplean para cultivar microorganismos que requieren un gran número de factores de crecimiento. Generalmente contienen extractos biológicos poco usuales como sangre, suero en polvo, extracto de cerebro de res, yema de huevo.

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en Agar Sabouraud y miden de 1,5 a 2 mm de diámetro después de 5 a 7 días. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o quemado al continuar envejeciendo.⁶¹

Las colonias de *Candida* crecen “in vitro” en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2,5 y 7,5 y temperatura que oscila entre 20°C y 38°C. El crecimiento de colonias se puede detectar entre 48 y 72 horas después de la siembra, y los subcultivos pueden crecer más rápidamente⁶¹.



La habilidad de las levaduras de crecer a 37°C es una característica importante a ser considerada en su identificación a partir de muestras clínicas.

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en Agar Sabouraud y miden de 1,5 a 2 mm de diámetro después de 5 a 7 días. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o requemado al continuar envejeciendo. Para aislarlas de las muestras clínicas que siempre llevan bacterias se agregan antimicrobianos como el Cloranfenicol al medio simple.⁶²

En Agar Sabouraud o en otros medios de cultivo similares, las colonias que crecen son lisas, suaves, húmedas y de color y aspecto cremoso. Estas colonias tienen un tamaño que oscila entre 1,5 y 2 mm de diámetro, con aspecto de levadura, de consistencia blanda y rápidamente proyectan filamentos hasta la profundidad del agar. Después de 4-5 días se percibe un olor característico de levadura⁶². Otros medios de cultivo en los cuales puede crecer *C. albicans* son: Pagano-Levin, en el cual las colonias se observan de color crema, Albicans ID (Biomerieux), donde las colonias se observan de color azul y CHROMagar® *Candida* (CHROMagar), observándose las colonias de esta especie de color verde⁶³.

Las colonias de *Candida* crecen "*in vitro*" en condiciones de aerobiosis.^{62, 63.}