

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía  
Bucofacial)



**ESTUDIO IN VITRO DE LA ADHERENCIA DE  
CANDIDA ALBICANS A LAS RESINAS ACRÍLICAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Carlos Serrano Granger

Bajo la dirección de las Doctoras:

Rocío Cerero Lapiedra  
Icía González Benítez

**Madrid, 2002**

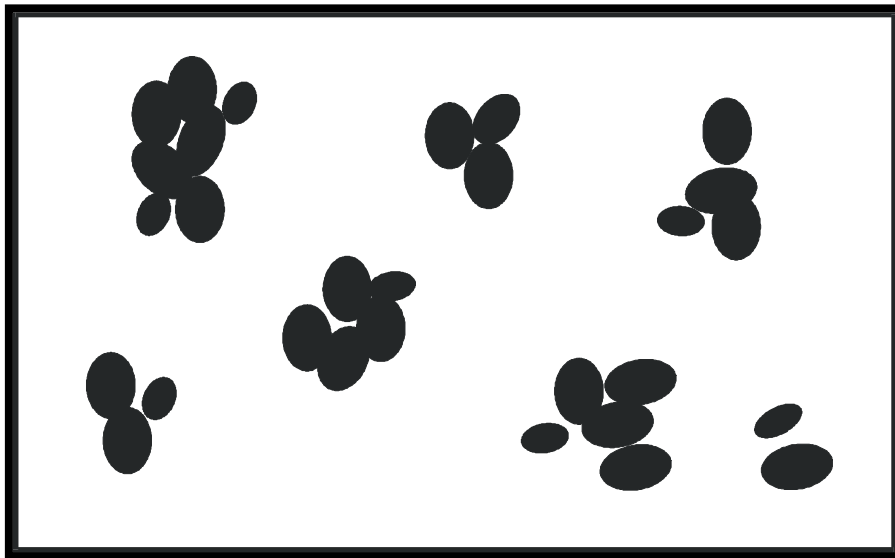
**ISBN: 84-669-2142-7**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA  
BUCOFACIAL**



**ESTUDIO IN VITRO DE LA  
ADHERENCIA DE *CANDIDA ALBICANS*  
A LAS RESINAS ACRÍLICAS**

**TESIS DOCTORAL  
Carlos Serrano Granger**

**2002**

**ESTUDIO IN VITRO DE LA  
ADHERENCIA DE *CANDIDA ALBICANS*  
A LAS RESINAS ACRÍLICAS**

Trabajo de investigación para  
optar al grado de Doctor en Odontología  
por la Universidad Complutense de Madrid que presenta:

Carlos Serrano Granger

Directores:

**Profa. Dra. Dña. Rocío Cerero Lapiedra**

Profesora Asociada

**Dra. Dña. Iciar González Benítez**

Técnico de Grado Superior

Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial

Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2002

A mi hija, Sara.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido posible, en buena parte, gracias a la colaboración multidisciplinaria de un gran número de personas a las que quiero mostrar mi agradecimiento.

A la Dra. Rocío Cerero, directora de esta tesis, por su estímulo, consejos, ayuda y paciencia, en todas las fases y apartados de la realización de este trabajo.

A la Dra. Iciar González, codirectora de esta tesis, por sus consejos y ayuda en la parte experimental con los cultivos, manejo, y recuento de *Candida*.

A Dña. M<sup>a</sup> Rosa Simón y Dña. Ana O'Connor del Laboratorio de Investigación por su ayuda en la preparación y conservación de los cultivos y en las tinciones de *Candida*.

Al Departamento de Prótesis de esta Facultad por sus medios materiales para la realización de este proyecto.

Al Dr. Pedro Galera de Técnicas Instrumentales de la Facultad de Farmacia por su apoyo con medios materiales, enseñanzas y consejos con el manejo del goniómetro de contacto.

A la Dra. M<sup>a</sup> Angeles Mosso del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia por su ayuda en perfeccionar la técnica de tinción de *Candida albicans*.

A la Dra. M<sup>a</sup> José Félix y a la técnico de laboratorio Dña. Yolanda Sanz de la Fundación Jiménez Díaz por su ayuda y disposición de medios materiales en el trabajo con isótopos radiactivos.

A D. Ricardo García del Centro de Proceso de Datos (Área de apoyo a la investigación) de la UCM. Por su aportación con respecto a métodos estadísticos.

A la Dra. M<sup>a</sup> Teresa González del Departamento de Matemática Aplicada de la Facultad de Ciencias Biológicas, por sus útiles aclaraciones en la interpretación de los resultados estadísticos.

A Prótesis S.A. y a D. Lorenzo del Río por su ayuda en la confección de las muestras de las resinas.

A mis compañeros de Departamento por su apoyo en estos años.

A mi amigo Gonzalo por sus buenos consejos.

A mi familia, especialmente a mi esposa Susana por su ayuda, paciencia y apoyo inestimable para la realización de la tesis a lo largo de estos años.

# ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>1. BASES DE PRÓTESIS.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. MATERIALES POLIMÉRICOS PARA BASES DE PRÓTESIS.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. POLIMETACRILATO DE METILO (PMMA):.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES:	
1.2.1.A. Estabilidad dimensional.....	11
1.2.1.B. Porosidad y superficie.....	12
1.2.1.C. Propiedades mecánicas.....	13
1.2.1.D. Propiedades térmicas.....	14
1.2.1.E. Estética.....	14
1.2.1.F. Densidad.....	14
1.2.2. SISTEMAS DE POLIMERIZACIÓN:	
1.2.2.A. Polimetilmetacrilato termocurado.....	15
1.2.2.B. Polimetilmetacrilato autopolimerizable.....	15
1.2.2.C. Polimerización en microondas.....	16
1.2.2.D. Moldeado por inyección.....	16
<b>1.3. OTROS POLÍMEROS:</b>	
1.3.1. POLIVINILOS.....	17
1.3.2. POLIAMIDAS.....	18
1.3.3. POLICARBONATOS.....	18
1.3.4. POLIESTIRENO.....	18
<b>2. GÉNERO CANDIDA: CANDIDA ALBICANS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. FACTORES RELACIONADOS CON LA ADHESIÓN DE LAS LEVADURAS A ESTRUCTURAS ORALES.....</b>	<b>20</b>
2.2.1. FACTORES RELACIONADOS CON LAS LEVADURAS:	
2.2.1.A. Características y estructura de la pared celular.....	21
2.2.1.B. Fenotipo.....	22

2.2.1.C. Fase de germinación.....	23
2.2.1.D. Hidrofobicidad.....	23
2.2.2. FACTORES RELACIONADOS CON LAS CÉLULAS DEL HUÉSPED:	
2.2.2.A. Origen, tamaño y viabilidad celular.....	24
2.2.2.B. Fibronectina.....	24
2.2.2.C. Fibrina.....	25
2.2.2.D. Hormonas sexuales.....	25
2.2.3. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN A LA ADHESIÓN DE LAS LEVADURAS:	
2.2.3.A. Cationes.....	26
2.2.3.B. Acidez y alcalinidad.....	26
2.2.3.C. Azúcares.....	26
2.2.3.D. Saliva.....	27
2.2.3.E. Anticuerpos humorales y suero.....	28
2.2.3.F. Drogas antibacterianas.....	28
2.2.3.G. Bacterias.....	29
2.2.3.H. Lecitina.....	29
<b>3. ESTOMATITIS PROTÉTICA.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. CLASIFICACIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. EPIDEMIOLOGÍA.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4. ETIOPATOGENIA:</b>	
3.4.1. TRAUMA PROTÉSICO.....	33
3.4.2. FALTA DE LIMPIEZA DE LA PRÓTESIS.....	34
3.4.3. IRRITACIÓN Y REACCIÓN ALÉRGICA A LOS MATERIALES DE LA BASE DE LA DENTADURA.....	34
3.4.4. INFECCIÓN POR <i>CANDIDA</i> .....	35
3.4.5. HÁBITOS DIETÉTICOS.....	36
3.4.6. FACTORES SISTÉMICOS.....	37
3.4.7. MISCELÁNEA.....	37



<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>43</b>
<b>1. MATERIAL:</b>	
<b>1.1. EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTAL.....</b>	<b>43</b>
<b>1.2. MEDIOS DE CULTIVO, TRANSPORTE, DILUCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>1.3. CEPA <i>CANDIDA ALBICANS</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>1.4. MUESTRAS DE POLIMETILMETACRILATO (PMMA).....</b>	<b>44</b>
<b>1.5. LÍQUIDOS EMPLEADOS PARA EL CALCULO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL DE LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA.....</b>	<b>45</b>
<b>1.6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>45</b>
<b>2. MÉTODO:</b>	
<b>2.1. DETERMINACIÓN DE LA ADHESIÓN DE <i>C. ALBICANS</i> A LAS DISTINTAS MUESTRAS DE POLIMETILMETACRILATO (PMMA)POR MEDIO DE MICROSCOPIO ÓPTICO.....</b>	<b>46</b>
2.1.1. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	46
2.1.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA.....	47
2.1.3. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS DE POLIMETILMETACRILATO (PMMA) CON LA SUSPENSIÓN DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	48
2.1.4. TINCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA.....	49
2.1.5. RECUESTO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ADHERIDA A LA SUPERFICIE DE LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA..	49
<b>2.2. DETERMINACIÓN DE LA ADHESIÓN DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> A LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA POR MEDIO DE MARCAJE CON METIONINA [<sup>35</sup>S].....</b>	<b>50</b>
2.2.1. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> MARCADA CON METIONINA [ <sup>35</sup> S].....	50
2.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA.....	50

2.2.3. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA CON LA SUSPENSIÓN DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> MARCADA CON METIONINA.....	51
2.2.4. RECUENTO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ADHERIDA A LAS MUESTRAS DE PMMA EN CÁMARA DE CENTELLEO.....	51
<b>2.3. DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL DE LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA.....</b>	<b>52</b>
2.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA.....	54
2.3.2. DETERMINACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO ENTRE LOS DIVERSOS LÍQUIDOS EMPLEADOS Y LAS MUESTRAS DE PMMA.....	55
<b>2.4. TRATAMIENTO DE LOS DATOS.....</b>	<b>56</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
<b>1. CONSIDERACIONES PREVIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA:</b>	
2.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL RECUENTO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ADHERIDA A PMMA POR MEDIO DE MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.....	59
2.2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL RECUENTO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ADHERIDA A PMMA POR MEDIO DE CÁMARA DE CENTELLEO.....	72
2.3. VALORES DE LOS ÁNGULOS DE CONTACTO DE LOS DIFERENTES LÍQUIDOS EMPLEADOS PARA EL CÁLCULO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL DE LOS DISTINTOS TIPOS DE PMMA.....	74
<b>3. ESTADÍSTICA ANALÍTICA:</b>	
3.1. ESTADÍSTICA ANALÍTICA DEL RECUENTO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ADHERIDA A PMMA POR MEDIO DE MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.....	77

---

3.2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA DEL RECUENTO DE <i>CANDIDA</i> <i>ALBICANS</i> ADHERIDA A PMMA POR MEDIO DE CÁMARA DE CENTELLEO.....	80
3.3. ESTADÍSTICA ANALÍTICA DE LA COMPARACIÓN DE AMBOS MÉTODOS DE RECUENTO DE ADHESIÓN DE <i>CANDIDA</i> <i>ALBICANS</i> A LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA.....	82
3.4. ESTADÍSTICA ANALÍTICA DE LA ADHESIÓN DE <i>CANDIDA</i> <i>ALBICANS</i> Y LA TENSIÓN SUPERFICIAL DE LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA.....	84
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
<b>1. DISCUSIÓN DE MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>87</b>
<b>2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>92</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>102</b>
<b>VII. ICONOGRAFÍA.....</b>	<b>104</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>111</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1. BASES DE PRÓTESIS.

El aparato estomatognático es un conjunto de estructuras anatómicas que conforman una unidad morfológica responsable de relaciones y funciones como la masticación, la fonación y la deglución. La pérdida de dientes produce alteraciones tanto en la vida social o de relación como en las funciones del aparato estomatognático.

La ausencia de dientes, dependiendo de la localización y del número, se puede solucionar mediante prótesis fija (sujeta a dientes o implantes de tal forma que el paciente no se la puede quitar) o mediante prótesis removible (el paciente se puede quitar la prótesis y volver a insertar en boca). La prótesis removible puede estar retenida por dientes remanentes o por implantes pero esta soportada en mayor o menor grado por la mucosa del reborde alveolar residual (Llena, 1988).

La parte de la prótesis que sostiene los dientes artificiales y que, a su vez, está destinada a adosarse y mantenerse en los tejidos blandos de la boca se denomina base de la prótesis o dentadura. Cuanto mayor sea la adaptación de la base a los tejidos blandos, tanto mejor será la retención de la prótesis y más útil y cómoda resultará para el paciente (Skinner et al, 1970). Las bases de las prótesis tienen como función dar soporte y retención a dientes artificiales en la relación oclusal correcta de cada paciente individual (Smith et al, 1996).

A lo largo de la historia, en la fabricación de las bases para dentaduras se han empleado varios materiales, entre ellos madera, hueso, marfil, cerámica, metales, aleaciones metálicas y numerosos polímeros (polimetilmetacrilato, poliestireno, poliamida, resina epóxica, policarbonato y vulcanita). La selección de los distintos materiales específicos se ha basado en la disponibilidad, costo, propiedades físicas, cualidades estéticas y características de manipulación.

Las primeras prótesis se formaron al tallar bases de dentaduras a partir de materiales naturales, como la madera, el hueso y el marfil. La introducción y la

elaboración de los vaciados y los procedimientos de forjado establecieron a los metales y aleaciones metálicas como materiales viables para bases de dentaduras. Posteriormente se utilizó la porcelana para la fabricación de estas bases.

## **1.1. MATERIALES POLIMÉRICOS PARA BASES DE PRÓTESIS.**

Durante la primera mitad del siglo XIX, se introdujo el caucho vulcanizado (vulcanita), como material de base para las dentaduras, y esto marcó la introducción de los polímeros en la prostodoncia total. A medida que pasó el tiempo, y debido a los problemas de estabilidad dimensional y de color, otros polímeros desplazaron al caucho vulcanizado, se emplearon polimetilmetacrilato, poliestireno, polivinilacrílico, poliamidas, etc. De todos los materiales empleados, el que mostró mejores propiedades globalmente fue el polimetilmetacrilato, y como resultado, este último ha dominado el terreno de las bases de las dentaduras en los últimos tiempos (Rodney, 1996).

El término *polímero* se deriva del griego, y significa muchas partes (poli=mucho, mero=parte). Se utiliza para describir moléculas largas en forma de cadenas, formadas por muchos monómeros repetidos; si las moléculas del monómero que se van a polimerizar son todas idénticas, el polímero resultante recibe el nombre de homopolímero, si las moléculas de monómero son de dos clases diferentes el polímero resultante se denomina copolímero y si son de tres clases terpolímero (Vega del Barrio, 1996; Graig, 1998).

Los polímeros que se emplean en Odontología como bases de prótesis pueden ser rígidos o bien blandos y resilentes, pero en cualquier caso deben cumplir una serie de requisitos (Skinner et al, 1970):

- 1- Ser lo suficientemente translúcidos como para reemplazar estéticamente los tejidos bucales.
- 2- No experimentar cambios de color después de su procesado, tanto en medio externo como en medio intrabucal.
- 3- Poseer buena estabilidad dimensional.

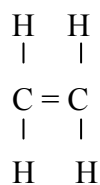
- 4- Tener una resistencia mecánica y a la abrasión adecuada para su uso.
- 5- Ser impermeable a los fluidos orales, de forma que sea higiénica, sin gusto ni olor desagradables.
- 6- Poseer una superficie que se pueda limpiar con facilidad.
- 7- Ser atóxica y no irritante para los tejidos bucales, es decir, biocompatible.
- 8- No presentar corrosión, ablandamiento ni solubilidad ante los fluidos bucales u otras sustancias que se puedan encontrar ocasionalmente en la boca.
- 9- Tener poco peso específico y conductividad térmica relativamente alta.
- 10- Ser fáciles de reparar en caso de fractura.
- 11- Tener un procesado y manipulación no complicada en cuanto a técnicas y equipos.

Considerando estos requisitos, el material que más se emplea en la actualidad como base de prótesis es el polimetacrilato de metilo.

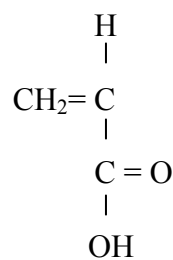
## 1.2. POLIMETACRILATO DE METILO (PMMA).

Estos polímeros son derivados del etileno, la obtención de este polímero la podríamos resumir de la siguiente forma:

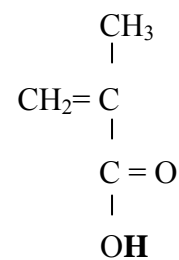
etileno → ácido acrílico → ácido metacrílico → metacrilato de metilo.



Etileno



Acido acrílico



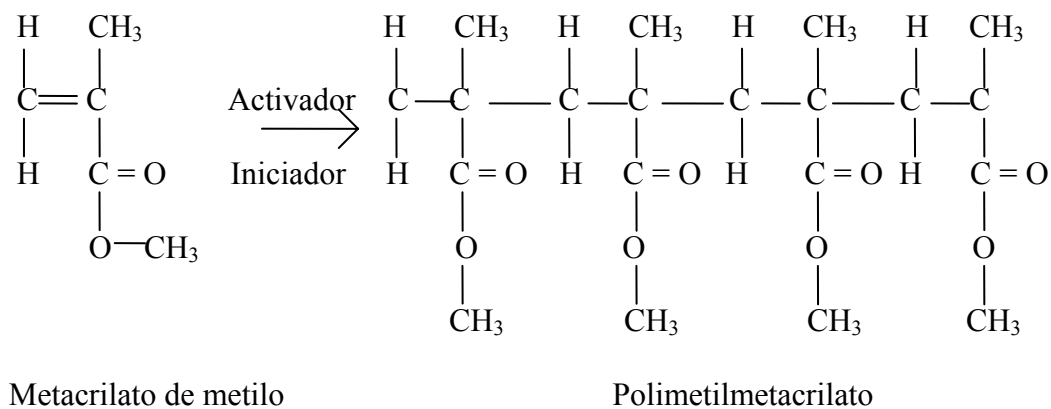
Acido metacrílico

Los polímeros obtenidos a partir del ácido acrílico o metacrílico (poliácidos) son duros y transparentes, pero su polaridad permite la sorción de agua que tiende a separar las cadenas ocasionando un ablandamiento general y una pérdida de resistencia por lo que no se utilizan en la boca. Sí se usan, por el contrario los ésteres de los poliácidos, así mediante la sustitución del H (en **negrita**), del radical OH del ácido metacrílico, por un radical metil obtenemos el metacrilato de metilo.

A partir del metacrilato de metilo por una reacción de polimerización se obtiene el polimetilmetacrilato de metilo que es material básico que constituye la base de la prótesis. Se entiende por polimerización la formación de cadenas largas o macromoléculas, de elevado peso molecular, a partir de la unión de moléculas pequeñas (metacrilato de metilo) que constituyen los monómeros (Graig, 1998).

Los mecanismos de polimerización se pueden encuadrar en dos grandes grupos, polimerización por adición y polimerización por condensación. Se habla de polimerización por adición cuando los monómeros se unen entre sí, sin producir ningún producto intermedio, mediante el mecanismo de condensación, sin embargo, la unión de los monómeros se realiza mediante una reacción química en la que se desprende algún producto secundario en forma de molécula pequeña como agua, algún alcohol, etc (Graig, 1998).

La polimerización del metacrilato de metilo es por adición, basada en la producción de radicales libres a partir de la apertura de dobles enlaces.





Las cadenas de polímero se forman de manera simultánea, estas cadenas a menudo se entrelazan, sin embargo, se puede producir un deslizamiento de una cadena sobre otra. A nivel clínico, este fenómeno produce una deformación de la estructura polimérica que afecta al ajuste de la base de la dentadura de manera adversa. Por medio de la adición de glicoldimetacrilato se producen interconexiones entre las cadenas de polímeros, resultando una estructura similar a una red de pesca, esto produce una resistencia al deslizamiento y en consecuencia una resistencia importante a la deformación (Caycik et al, 1992).

En la actualidad, los materiales para base de dentaduras de polimetilmetacrilato se suministran en forma de dos componentes, el monómero líquido (metacrilato de metilo) se mezcla con el polímero que se presenta en forma de polvo (formado de pequeños fragmentos de cadenas de polimetacrilato de metilo). El monómero disuelve parcialmente al polímero dando una masa plástica. Esta masa plástica se ataca dentro de un molde, donde el monómero polimeriza, debido a esta presentación, se puede observar una estructura de tipo esférico, donde hay una matriz uniforme en la que resaltan las partículas esféricas del polímero (imágenes 1 y 2) (Rodney; 1996).

## **1.2.1. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES.**

### **1.2.1.A. Estabilidad dimensional.**

El metacrilato de metilo al polimerizar experimenta una contracción lineal de un 6% a un 7%. En la práctica, debido a que el molde rígido evita la deformación del acrílico se produce una contracción de sólo un 0.2% a un 0.5%, la cual es despreciable para el correcto ajuste de la prótesis en la boca.

Una vez colocada la prótesis en la boca, debe mantenerse dimensionalmente estable, en lo cual intervienen dos propiedades, la absorción de agua y la solubilidad.

El mecanismo de absorción consiste en la difusión de moléculas de agua, se realiza lentamente y durante un cierto tiempo de manera que a los 17 días queda

totalmente saturada. Esta absorción de agua produce un cambio volumétrico positivo de aproximadamente un 0.23%. Cuanto mayor sea el peso molecular del polímero menor será el aumento de peso. La absorción de agua produce un cambio en las propiedades mecánicas, aumentando su flexibilidad. Cuando el material se deja secar el proceso se invierte, produciéndose una deshidratación y una disminución de volumen.

Aunque los polímeros acrílicos son solubles en muchos solventes, son prácticamente insolubles en los líquidos que entran en contacto con la cavidad oral (Vega del Barrio; 1996).

### **1.2.1.B. Porosidad y superficie.**

Diferentes errores en el procesado y manipulación de la masa del polímero de las bases de prótesis (vaporización del monómero por exceso de temperatura, falta de homogeneidad en el momento de la polimerización, presión inadecuada...), dan lugar a la aparición de poros. Las consecuencias son disminución de la resistencia por acúmulo de tensiones y dificultad en la limpieza, en caso de que los poros se localicen en la superficie.

La superficie de la prótesis es susceptible de ser colonizada por multitud de microorganismos que pueden dar origen a patología de la mucosa que soporta la prótesis. Los mecanismos de fijación de la placa bacteriana a la superficie son los siguientes:

- a- Formación de una película orgánica.
- b- Fijación directa de los organismos a la superficie.
- c- Penetración o anclaje mecánico en los defectos de la superficie.

a- La superficie de la prótesis presenta a las pocas horas de su inserción en boca una película orgánica adquirida constituida por proteínas presentes en la saliva. Estas proteínas actuarían como mediadores en la fijación de la placa bacteriana a la superficie de la prótesis.

b- El mecanismo de fijación de los microorganismos a la superficie en una primera fase es inespecífico y reversible y se explica por medio de energía de superficie entre los microorganismos y la superficie de la prótesis, interviniendo fenómenos electrostáticos y de hidrofobicidad; en una segunda fase, el proceso de la adhesión esta mediado por interacciones entre adhesinas y receptores específicos (Minagi et al, 1985; Quirynen et al, 1995; Waters et al, 1997).

c- Este último punto es particularmente importante en el caso de las prótesis confeccionadas con resinas acrílicas, en las que los defectos de la superficie pueden favorecer la formación inicial de placa y, además, evitar su remoción (Verran et al, 1997). Estudios realizados para determinar las características de esta superficie, empleando distintos materiales de impresión, de confección de modelos, agentes separadores y resinas termopolimerizables y autopolimerizables, dan como resultado que la profundidad de las indentaciones varía de 1 a 12  $\mu\text{m}$  (imagen 3), pero, siendo la anchura varias veces superior a la profundidad y las paredes con una inclinación expulsiva, ofrecen pequeña resistencia a la remoción de microorganismos (Davenport, 1972).

La rugosidad de la superficie esta relacionada con la del material contra el cual se procesa la resina, es decir el material que sirve de molde o patrón para confeccionar la prótesis (Morrow et al, 1971).

La escasa difusión de los colorantes en el acrílico indica que la porosidad existente no esta abierta a la superficie (Davenport, 1972). La penetración bacteriana no es un hecho corriente y se produce cuando el material no ha sido procesado correctamente, lo que puede ocurrir por numerosas causas, como por la vaporización del monómero cuando la temperatura del material sobrepasa el punto de ebullición, o por la falta de homogeneidad en la masa plástica en el momento de la polimerización.

### **1.2.1.C. Propiedades mecánicas.**

Mecánicamente, el polimetacrilato de metilo es un material frágil y relativamente rígido. Como valores medios tiene una resistencia a la tracción de 55 Mpa y a la compresión de 76 Mpa. Tiene una escasa o deficiente resistencia al impacto, lo

que facilita su fractura si se deja caer sobre una superficie dura. La resistencia a la abrasión es moderada (Vega del Barrio, 1996).

#### **1.2.1.D. Propiedades térmicas.**

Los polímeros acrílicos no se ablandan por debajo de los 75<sup>0</sup> C, lo cual hace prácticamente imposible que la temperatura de los fluidos orales pueda afectarlos.

Estos materiales poseen una baja conductividad térmica, lo cual es un inconveniente en el sentido de que la mucosa subyacente queda aislada de los cambios térmicos que la ingesta produce en la boca.

Aunque el coeficiente de expansión térmica es elevado, es difícil que los cambios transitorios de la temperatura bucal durante la ingesta de líquidos o sólidos puedan afectar a la estabilidad dimensional, debido a la baja conductividad térmica y al gran volumen de la estructura (Reisbick, 1985; Vega del Barrio, 1996).

#### **1.2.1.E. Estética.**

Las propiedades estéticas de los polímeros acrílicos para bases de prótesis son muy buenas. El polimetacrilato de metilo es transparente, lo cual facilita la obtención de un color compatible con las estructuras orales mediante la incorporación de pigmentos rosados, siendo estable esta coloración (Skinner et al, 1970; Vega del Barrio, 1996).

#### **1.2.1.F. Densidad.**

Es importante que los acrílicos para bases de prótesis sean poco densos, para que estas no pesen demasiado las prótesis. La densidad de los polímeros acrílicos se sitúa en 1.18 gr/cm<sup>3</sup> (Vega del Barrio, 1996).

## **1.2.2. SISTEMAS DE POLIMERIZACIÓN.**

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

### **1.2.2.A. 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 (Reisbick, 1985; Smith et al, 1996).

### **1.2.2.B. 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 (Smith et al, 1996).

#### **1.2.2.C. 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 (Smith et al, 1996).

#### **1.2.2.D. 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 asienta la prótesis. Los copolímeros muestran una absorción de agua mínima y buena estabilidad dimensional a largo plazo (Smith et al, 1996).

### **1.3. OTROS POLÍMEROS.**

Existen gran cantidad de polímeros alternativos pero no ofrecen las ventajas de los acrílicos, por lo cual, unos están en desuso aunque otros pueden emplearse en ciertos casos como alternativa en pacientes alérgicos.

#### **1.3.1. Polivinilos.**

Este grupo de polímeros derivan del etileno. Dos de los derivados de especial interés son el cloruro de vinilo y el acetato de vinilo, de la polimerización de estas moléculas obtenemos el policloruro vinílico y el poliacetato vinílico.

El policloruro vinílico es una resina dura, transparente, insípida e inodora. La exposición a los rayos ultravioleta la oscurece y, a menos que se plastifique, se decolora cuando se la calienta a temperaturas próximas a su punto de ablandamiento.

El poliacetato vinílico es estable a la luz y al calor pero presenta un punto de ablandamiento bastante bajo (35-40 °C). Cuando ambas resinas se copolimerizan en proporciones variables se obtienen resinas muy útiles.

Uno de los copolímeros que se empleó como base tenía una proporción de 80% de acetato y un 20% de cloruro vinílico, sin embargo, el peso molecular promedio fue tan elevado que resultaba difícil ablandar todo el material, esto inducía tensiones y deformaciones que reducían el límite de resistencia, por lo que después de cierto tiempo se producían fracturas (Skinner et al, 1970; Vega del Barrio, 1996).

### **1.3.2. Poliamidas.**

Las poliamidas (nylon) se emplearon en los años 50, es un polímero cristalino con moléculas de cadena larga ordenadas en paralelo, lo que le confiere sus propiedades de insolubilidad, alta resistencia al calor y elevada solidez.

Las desventajas resumidas son su tendencia a decolorarse o mancharse, y la facilidad con que la superficie se hace rugosa y áspera con el uso, su absorción de agua, la distorsión, su facilidad para el desarrollo bacteriano, las dificultades de procesamiento y la dificultad en el acabado y pulido (Reisbick, 1985).

### **1.3.3. Policarbonatos.**

Los policarbonatos son poliésteres lineales del ácido carbónico. Si bien son duros y fuertes, sus propiedades físicas son sólo ligeramente superiores a las del polimetacrilato de metilo.

Sus desventajas, en comparación con los polímeros acrílicos, son su mayor distorsión por absorción de agua, mayor flexibilidad, deficiente adhesión a los dientes de plástico, mayor temperatura para su procesamiento lo cual implica un equipo más elaborado y una mayor dificultad en el pulido (Reisbick, 1985).

### **1.3.4. Poliestireno.**

La molécula base es el estireno o vinilbenceno, que es el resultado de la reacción de un radical bencénico con un grupo vinílico.

El poliestireno es una resina transparente de tipo termoplástico. Estable a la luz y a muchos reactivos químicos, pero soluble en ciertos solventes orgánicos. Se ha empleado como base de dentaduras en grado limitado por su tipo de procesamiento. El producto se presenta comercialmente en forma de barras prepolimerizadas que se calientan hasta los 210 ° C a fin de ablandarla e inyectarla en un molde con equipo especial (Skinner et al, 1970; Reisbick, 1985).



## 2. GÉNERO CANDIDA: *CANDIDA ALBICANS*.

### 2.1. INTRODUCCIÓN.

Los hongos son seres unicelulares o pluricelulares con estructura eucariótica y, por tanto, con núcleo similar al de los animales y las plantas. Poseen nutrición heterótrofa de carbono de tipo absorptivo.

El reino *Fungi* posee varias divisiones establecidas según sus características y reproducción sexual: *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota*, *Deuteromycota* (Pumarola et al, 1985; McCullough et al, 1996; Bermejo, 1998).

Los hongos pueden presentar dos tipos de organización celular: filamentosa o levaduriforme. En los hongos filamentosos la estructura básica es una hifa (estructura pluricelular alargada de paredes paralelas) cuyo conjunto da lugar a un micelio o talo. En los hongos levaduriformes, la estructura básica es unicelular (levadura), aunque puede formar un pseudomicelio y a veces incluso, desarrollar una hifa verdadera.

El género *Candida* está encuadrado dentro de los hongos imperfectos (*deuteromycota*) de la clase Blastomycetes y dentro de la familia *Criptococcaceae*.

*Candida* puede observarse como células redondeadas u ovaladas de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , grampositivas y con un metabolismo principalmente aerobio. Es capaz de producir gemaciones y puede formar pseudomicelio o verdadero micelio o ambos y tiene una reproducción asexual por blastoconidios (Liébana, 1995).

En la adhesión de *Candida* a distintas superficies juegan un papel primordial su membrana y sobre todo su pared. La membrana está constituida por una doble capa de diversos fosfolípidos entre los que destacan la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, contiene también esteroides (sobre todo ergosterol y zimosterol), esta membrana protege al citoplasma, regula la entrada y salida de solutos y facilita la síntesis de la pared celular. La pared celular proporciona rigidez y fuerza, y protege a la membrana celular

de un shock osmótico, está compuesta en un 80 al 90% de hidratos de carbono y aproximadamente un 10% de proteínas y glucoproteínas (incluyen enzimas involucradas en el crecimiento de la pared y proteínas estructurales); los polisacáridos de la pared celular pueden tener una estructura fibrilar y disponerse en múltiples capas o formar una matriz polisacárida amorfa (Zinsser et al, 1986). En la fase levaduriforme de *Candida albicans* se pueden distinguir tres capas en su pared, una capa externa constituida en un 80% por manoproteínas, una capa media de  $\beta$  (1,6) glucanos, y una capa interna con  $\beta$  (1,3) glucanos, manosa y quitina (García-Rodríguez et al, 1996). La pared celular tiene importancia médica por constituir un potente antígeno.

Se han descrito más de 100 especies distintas del género *Candida*, todas ellas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Estas levaduras pueden encontrarse formando parte de la microbiota normal de la cavidad oral (lengua, paladar, mucosa oral), el tubo digestivo (estómago, intestino), la vagina, y en el ambiente (Bermejo, 1998).

*Candida. albicans* posee algunos factores de patogenicidad que le permiten desarrollar patología con más frecuencia de lo que ocurre con otras especies de *Candida*. Necesita encontrarse en fase levaduriforme para iniciar la lesión, aunque las variaciones nutricionales y ambientales modulan, con el tiempo, su conversión en fase micelial, en la que, además de conservar intacta su virulencia previa, ésta constituye un buen mecanismo de escape a la actividad fagocitaria de los macrófagos (Liébana, 1995).

## **2.2. FACTORES RELACIONADOS CON LA ADHESIÓN DE CANDIDA A ESTRUCTURAS ORALES.**

Existe un gran número de factores involucrados en la adhesión de *Candida* a distintas superficies orales como mucosa o esmalte dentario, y distintos polímeros de uso odontológico. El papel que desempeñan estos agentes por su número y diverso grado de participación es complejo y en muchos casos no está bien determinado.

## 2.2.1. FACTORES RELACIONADOS CON LAS LEVADURAS.

### 2.2.1.A. CARACTERÍSTICAS Y ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR.

La producción de **adhesina** (estructura de la superficie celular que promueve la adhesión) está directamente relacionada con las condiciones de cultivo de la levadura. Estas moléculas actúan como receptores para el fibrinógeno, fibronectina, colágeno, N-acetilglucosamina, y péptidos C3d e iCeb. Está comprobado que usando diferentes medios y temperaturas de cultivo se modifica la capacidad de adhesión de *Candida albicans* a las células del epitelio bucal. El cultivo en distintos medios produce diferencias tanto en la topografía de la superficie como en la ultraestructura de la pared, aunque ninguna de estas diferencias se ha correlacionado con cambios en la adhesividad.

La adhesina de *Candida* se puede estructurar formando una capa flocular o una capa fibrilar. La capa flocular interviene en la adhesión de *Candida* a las células de la mucosa oral, distintas cepas de la levadura, cuando crecen en un medio con un alto contenido de galactosa o sucrosa, pueden sintetizar una capa superficial fibrilar, mostrando un incremento en la adhesión a las células del epitelio bucal y en la virulencia. Estas fibras se sintetizan, en presencia de alta concentración de azúcar, durante la fase exponencial del crecimiento de las levaduras (McCourtie et al, 1984).

Formando parte de la pared de las levaduras se encuentra también, el **material polimérico extracelular**. Está compuesto de carbohidratos (65-82%), proteínas (7%), fósforo (0.5%) y glucosamina (1.5%), y juega un papel destacado en la capacidad de adhesión de la levadura. Su producción depende del tipo de carbohidrato que intervenga en el desarrollo de *Candida* (McCourtie et al; 1981) y ha sido demostrado que su presencia aumenta la adhesión de *Candida* a la superficie acrílica.

Existe la posibilidad que la adhesión de *Candida* este mediada por una sustancia alcali-soluble contenida en la pared de la levadura que es la **manosa**. Las levaduras

tratadas con álcali y ácido para extraer la manosa tienen una adherencia significativamente menor a las células del epitelio bucal en comparación con las no tratadas. La manosa está unida por enlaces covalentes a proteínas, estas manoproteínas se sitúan en el interior de la pared. Y también están en la parte más externa, donde dependiendo de las condiciones de crecimiento de la levadura se pueden expresar en diferente medida lo que se traduce en distintos grados de adhesión (San Millan et al 1996; Calderone, 1998).

La **quitina** es otra sustancia similar a la adhesina, presente en la pared celular y con posible participación en la adhesión. El extracto soluble de quitina inhibe la adhesión de *Candida* a células del epitelio vaginal, y este contiene dos fracciones de las que solamente una tiene actividad inhibitoria de la adhesión. Los análisis químicos muestran que más del 70% está formado por proteínas, la mayoría de las cuales se encuentran en la fracción no activa. Existen dudas acerca del papel de la quitina en la adhesión debido a que se encuentra localizada principalmente en la capa interna de la pared de la célula (Olsen, 1990).

Existen además **proteinasas y fosfolipasas extracelulares** que están relacionadas de una forma directa con la capacidad de adherencia e invasión de la mucosa por parte de *Candida albicans*.

Los **lípidos** de la superficie celular de las levaduras parecen estar involucrados en la adherencia. Diversos lípidos aislados de diferentes formas de *Candida albicans* como ceramida monohexósido y ceramida dihexósido, así como el estearil glucósido aislado de formas miceliales, producen una inhibición de la adherencia de las levaduras a las células del epitelio bucal (Olsen, 1990).

### **2.2.1.B. FENOTIPO.**

Una misma cepa de *Candida albicans*, dependiendo de las condiciones ambientales y en ocasiones de forma espontánea, puede presentar distintos fenotipos. Esto da origen a diferentes grados de hidrofobicidad que determinan variaciones en la

adherencia. Estas diferencias en la adhesión dependiendo del fenotipo se producen tanto en relación con las células del epitelio bucal (Kennedy et al, 1988) como con materiales acrílicos (Vasilas et al, 1992; Blanco et al, 1999).

#### **2.2.1.C. FASE DE GERMINACIÓN.**

La presencia de tubos germinativos constituye el inicio del crecimiento micelial de *Candida albicans* y se acompaña de una adherencia y virulencia aumentada (Poirier et al, 1997).

La formación de hifas de *Candida*, en condiciones ambientales favorables (temperatura de 37°C y Ph 7), produce una capa superficial adicional en comparación con la fase de blastospora que es la responsable del aumento de adherencia tanto a distintos polímeros como a las células de la mucosa. Esta capa adicional está formada de fibrillas, compuestas de manoproteínas de distinto peso molecular, que son retenidas sobre la superficie plástica (Tronchin et al, 1988; Cannon, 1995 B; San Millan et al, 1996; Calderone, 1998).

#### **2.2.1.D. HIDROFOBICIDAD.**

Los estudios realizados sobre este tema aportan resultados discordantes. Los péptidos de manosa presentes en la pared celular forman uniones hidrofóbicas con moléculas de poliestireno (Tojo et al, 1987); para otros autores, la hidrofobicidad sería un factor de menor importancia en la adhesión de *Candida* a las células epiteliales pero contribuiría a la coadhesión de las levaduras (Kennedy et al, 1988).

Los diferentes grados de hidrofobicidad de la superficie celular de distintas cepas de *Candida* estarían relacionados con la mayor o menor capacidad de las levaduras de adherirse a los materiales de base de las prótesis y a los plásticos, sin embargo, también influye la energía libre superficial (tensión superficial) del material de la dentadura en la adhesión de *Candida* (Klotz et al, 1985; Minagi et al, 1985; Calderone, 1998; Cannon et al, 1999).

## **2.2.2. FACTORES RELACIONADOS CON LAS CÉLULAS DEL HUÉSPED.**

### **2.2.2.A. ORIGEN, TAMAÑO Y VIABILIDAD CELULAR.**

La adherencia in vitro de *Candida albicans* a células de la mucosa está influida por el lugar de origen mayor adherencia a células de la mucosa yugal que a células del epitelio de vagina, baja adherencia a células del epitelio del tracto urinario y varía además de unos individuos a otros no encontrándose diferencias entre los sexos.

Existe una gran variación en el número de *Candida. albicans* adheridas a células aisladas del epitelio bucal, puede haber células que no tengan ninguna levadura adherida mientras que otras presentan levaduras en gran número.

Las células de tamaño intermedio (36-70  $\mu\text{m}$ ) tienen una afinidad por las levaduras mayor que las células de otros tamaños. La viabilidad de las células de la mucosa bucal no influye en el grado de adhesión de las levaduras.

### **2.2.2.B. FIBRONECTINA.**

Algunos estudios experimentales han demostrado la unión de *Candida* por medio de fibronectina pero sin embargo, no se han caracterizado receptores para la fibronectina en las células epiteliales. La fibronectina, junto con la fibrina y el fibrinógeno está presente en el suero (Olsen, 1990).

**2.2.2.C. FIBRINA.**

En estudios experimentales la mayor o menor virulencia de distintas cepas de *Candida albicans* está relacionada con su grado de unión a la fibrina. Parece que el factor de unión al fibrinógeno en *Candida* es una glicoproteína, probablemente una manoproteína presente en la superficie de la pared de la levadura (Nikawa et al, 1990; McCullough et al, 1996).

**2.2.2.D. HORMONAS SEXUALES.**

Existe una correlación entre el grado de adherencia in vitro de *Candida albicans* a células epiteliales y el estado hormonal de los individuos (Olsen, 1990). El estradiol y la progesterona afectan al grado de adherencia de las levaduras a las células del epitelio vaginal. La progesterona parece tener el efecto más marcado produciendo un incremento significativo de la adherencia a estas células sobre todo a las situadas en estratos intermedios en contraposición a las más superficiales. Estas células de estratos intermedios que aparecen incrementadas durante los períodos con alto nivel de progesterona, se encuentran en pacientes predispuestos a candidosis vaginal.

### **2.2.3. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN A LA ADHESIÓN DE LAS LEVADURAS.**

#### **2.2.3.A. CATIONES.**

Los cationes bivalentes tales como el  $\text{Ca}^{++}$  y el  $\text{Mg}^{++}$  incrementan la adhesión de *Candida albicans* tanto a las células del epitelio de la cavidad oral como al acrílico (Samaranayake et al, 1980 A, B). Altas concentraciones de estos cationes promueven la coadhesión y agregación de estas levaduras, ello indica que las fuerzas iónicas y electrostáticas jugarían un papel importante en los mecanismos de adhesión de la *candida*.

#### **2.2.3.B. ACIDEZ Y ALCALINIDAD.**

El papel del Ph en la adhesión de *Candida albicans* no está claro, si bien en algunos trabajos (Samaranayake et al, 1982) la máxima adhesión a células epiteliales ocurre con un Ph de 3 y la mínima con Ph normal, otros autores (Olsen, 1990) encuentran que la adhesión alcanza su máximo a las células del epitelio oral en un Ph comprendido entre 6,2 y 7.

#### **2.2.3.C. AZÚCARES.**

Los carbohidratos tanto de origen exógeno como endógeno afectan a las propiedades de adhesión de *Candida albicans*. En buen número de trabajos (Samaranayake et al, 1980 A, B; Douglas et al, 1981; McCourtie et al, 1981; Samaranayake et al, 1982; Nikawa et al, 1997) diversas cepas de *Candida albicans* después de una incubación con diversos azúcares tenían aumentada su adherencia tanto a las células del epitelio oral como a



resinas acrílicas, siendo la galactosa y la maltosa los azúcares que más aumentaban la adhesión.

La adhesión de *Candida albicans* a las células epiteliales puede ser inhibida por L-fucosa, N-acetyl-glucosamina, metil- $\alpha$ -D-manosido, D-manosa, o D-manosamina, posiblemente por bloqueo de los glucósidos que sirven como receptores epiteliales en la adhesión. El papel de estos receptores no está todavía claro, y existen trabajos con resultados contradictorios (Sandin, 1987).

#### **2.2.3.D. 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 (Epstein et al, 1982; Vudhichamnog et al, 1982; Challacombe, 1994; Pontón et al, 1996). 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 (Olsen et al, 1977). En las prótesis dentales la unión de *C. albicans* esta 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 (Yoon et al, 1989; Edgerton et al, 1993; Cannon et al, 1995 A; Nikawa et al, 2000 A, B), este efecto de la saliva y suero también se produce para otras especies de *Candida* (Ramage et al, 2001). Esta película adquirida también puede hacer variar la efectividad de los antifúngicos (Chandra et al, 2001).

Por otro lado, levaduras preincubadas durante tres horas en una mezcla de saliva completa mostraron posteriormente mayor adhesión a células epiteliales humanas y de riñón de embrión humano que aquellas que fueron preincubadas en suero fosfato tamponado. Así mismo una película de mezcla de saliva sobre células epiteliales humanas aumenta de forma significativa la adhesión de *Candida albicans* (Samaranayake et al, 1982).

### **2.2.3.E. ANTICUERPOS HUMORALES Y SUERO.**

Los anticuerpos humorales contra la *Candida albicans* pueden proteger frente a la endocarditis candidiásica al disminuir la adhesión, que es un paso crucial en la patogénesis de esta enfermedad (Scheld et al, 1983).

Sin embargo, el pretratamiento de acrílico con suero incrementa ligeramente la adhesión de las cepas de *Candida*, esto se debe en parte a la presencia de fibrinógeno y fibrina (McCourtie et al, 1986; Nikawa et al, 2000 A, B, C).

### **2.2.3.F. DROGAS ANTIBACTERIANAS.**

El uso de drogas antibacterianas, particularmente las de amplio espectro, promueve la infección candidiásica. La administración de una solución al 0,1% de tetraciclina durante 4 días a ratones arrojó como resultado un incremento muy significativo en la adhesión de *C. albicans* a las células epiteliales (Olsen, 1990).

El empleo de enjuagues antisépticos como la clorhexidina al 0,2% reduce significativamente la adhesión de las levaduras a las células del epitelio bucal. El uso de antibióticos como la tunicamicina, al disminuir la síntesis de manoproteínas reduce la capacidad de adhesión. Esta también puede reducirse por medio de dosis subletales de ketoconazol, que disminuyen la formación de hifas (Sobel et al, 1983). Antifúngicos como la nistatina, anfotericina B, 5-fluorocitosina, cotrimazol y ketoconazol inhiben significativamente la adherencia de *Candida albicans* a las células del epitelio bucal (Macura, 1987).

El pretratamiento de la resina acrílica de las prótesis dentales con clorhexidina 0,12% y la exposición de *Candida* a concentraciones subletales de clorhexidina producen una reducción de la adhesión de las levaduras a la superficie de la prótesis (Tejerina et al, 1989; Olsen, 1990). El pretratamiento de la resina acrílica con nistatina y anfotericina B, a concentraciones subterapéuticas, reduce la adhesión de un buen

número de especies de *Candida* (*albicans*, *glabrata*, *guilliermondii*, *krusei* y *parapsilosis*) a la superficie acrílica (Egusa et al, 2000).

### **2.2.3.G. BACTERIAS.**

La flora bacteriana saprofita puede interferir en la adhesión de las levaduras (Epstein et al, 1984; Nair et al, 1994). Este efecto varía de forma considerable dependiendo de la bacteria que comparta nicho ecológico con *Candida albicans* (Millsap et al, 2000). La exposición previa de células epiteliales humanas a *Streptococcus salivarius* y *S. mitis* redujo la adhesión de *Candida* a esas células, mientras que la exposición previa a *Streptococcus mutans* no tuvo un efecto significativo (Samaranayake et al, 1982). Según estudios in vitro, la adhesión de *Candida albicans* a las superficies acrílicas se reduce de forma significativa por el *S. salivarius* (Samaranayake et al, 1980 A, B).

### **2.2.3.H. LECITINA.**

En el material polimérico extracelular de todas las cepas de *Candida* se encuentran, en diferentes cantidades, proteínas similares a la lecitina con afinidad por la L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina y D-manosa. Los glicósidos que contienen L-fucosa o N-acetil-D-glucosamina pueden funcionar como receptores de las células epiteliales para *Candida albicans* (Cannon et al, 1999). La adición y posterior incubación de células de epitelio bucal con concavalina A, que une la lecitina a los radicales  $\alpha$ -manosil, reduce la adhesión de *C. albicans* respecto a los valores de control (Olsen, 1990).

### 3. ESTOMATITIS PROTÉSICA.

La estomatitis protésica se define como un proceso inflamatorio de la mucosa oral relacionado con una prótesis removible y cuyos parámetros fundamentales son el eritema y la inflamación de la mucosa. Ya desde el año 1936 se relacionó la estomatitis protésica con la infección por *Candida* (Zamacona et al, 1990), y esta asociación se ha confirmado posteriormente en numerosos trabajos (Budtz-Jørgensen et al, 1970; Olsen et al, 1974; Ceballos et al, 1990; Fotos et al, 1992).

La estomatitis protésica o candidiasis subplaca estaría encuadrada dentro de las formas crónicas (candidiasis crónica atrófica) de la candidiasis oral (Bermejo, 1998). Otros autores la sitúan dentro de las lesiones asociadas a *Candida* junto con la queilitis angular y la glositis rómbica media (Holmstrup et al, 1990; Axell et al, 1997).

#### 3.1. CLASIFICACIÓN.

Desde el punto de vista clínico-patológico la clasificación más clásica es la de Newton (1962) y Ostlund (1958), según la cual podemos distinguir tres tipos de estomatitis protésica:

- Tipo I, con focos hiperémicos.

Aparece una inflamación de carácter focal de pequeña intensidad con un punteado rojizo, estaría producido por la oclusión de los conductos excretores de las glándulas salivales menores (Bascones et al, 1999). La inflamación tiene un carácter local y está limitada a un área de la mucosa palatina en relación con la prótesis. Es el cuadro más banal y está estrechamente relacionado con el trauma protético (Zamacona et al, 1990).

- Tipo II, con hiperemia difusa.

Muestra una inflamación difusa con un enrojecimiento general en toda el área cubierta por la prótesis. Este tipo ha sido asociado a diferentes factores etiopatogénicos, siendo los más importantes el trauma protético y la infección por *Candida albicans*.

- Tipo III, con inflamación granular.

Se caracteriza por presentar una intensa inflamación con hiperemia de la mucosa y un aspecto nodular en el área cubierta por la prótesis. La granulación es más frecuente en la parte anterior y central del paladar. En este caso el factor etiopatogénico que aparece involucrado es la *Candida albicans*, aunque siempre en relación con el trauma protético acompañante (Zamacona et al, 1990).

Para Bergendal (1982), sólo existirían dos formas, una difusa atrófica y otra hiperplásica, que corresponderían respectivamente con los tipos II y III de la clasificación de Newton-Ostlund.

## **3.2. EPIDEMIOLOGÍA.**

La estomatitis protésica es una enfermedad muy frecuente entre los portadores de prótesis removible y, dependiendo del autor, la prevalencia se cifra entre un 11 % y un 67 % (Budtz-Jørgensen, 1974; Arendorf et al, 1987; Zamacona et al, 1990; Bascones et al, 1996).

La mayor parte de los trabajos realizados indican que la estomatitis protésica es más frecuente entre las mujeres, no obstante, algunos autores han descrito una igualdad entre el hombre y la mujer (Davenport, 1970; Arendorf et al, 1987; Zamacona et al, 1990; Lynch et al, 1994; Bermejo, 1998).

La media de edad en la que aparece la estomatitis protésica coincide con la media de edad de los portadores de prótesis, situándose en los 49 años. Esto sugiere que en los adultos susceptibles portadores de prótesis, la estomatitis protésica ocurre tempranamente. Otros trabajos señalan que la enfermedad disminuye según aumenta la edad (Ettinger, 1975; Nater et al, 1978; Arendorf et al, 1987; Zamacona et al, 1990).

### **3.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.**

Es mucho más frecuente en la mucosa palatina que en la mandibular, y empieza en forma de un punteado rojo diseminado, que progresivamente se torna más eritematoso y congestivo, para terminar con inflamación e incluso erosiones en la mucosa; la sintomatología suele ser escasa, en ocasiones los pacientes describen únicamente halitosis, gusto desagradable y sequedad de boca; y sólo al ulcerarse puede ocasionar dolor y sobre todo ardor (Davenport, 1970; Arendorf et al, 1987; Tejerina et al, 1989; Zamacona et al, 1990; Bascones et al, 1996; García-Pola et al, 1997; López et al, 1997; Abu Elteen et al, 1998; Chimenos et al, 2000).

La estomatitis protésica debido a la pérdida de dimensión vertical se asocia con gran frecuencia (33-82,6 %) a la queilitis angular (Bergendal et al, 1983; Tejerina et al, 1989; Warnakulasuriya et al, 1991; Lynch et al, 1994). También se asocian de forma ocasional la glositis crónica atrófica candidiásica, y candidiasis aguda pseudomembranosa (Arendorf et al, 1987; Zamacona et al, 1990).

### **3.4. ETIOPATOGENIA.**

La mayoría de los trabajos realizados coinciden en señalar el origen multifactorial de la estomatitis protésica, entre los factores más significativos encontramos:

Trauma protésico.

Falta de limpieza de la prótesis.

Irritación y reacción alérgica a los materiales de la base de la dentadura.

Infección por *Candida*.

Hábitos dietéticos.

Factores sistémicos.

Miscelánea.

### 3.4.1. TRAUMA PROTÉSICO.

El factor predisponente directo de la estomatitis protésica es la presencia de una prótesis removible, parcial o total, en la cavidad oral. La enfermedad se produce con mayor frecuencia en pacientes cuya prótesis está desajustada y carece de oclusión correcta (Blanco et al, 1999).

El trauma puede provocar una inflamación simple que normalmente no está colonizada por *Candida*, esta lesión correspondería al tipo I de la clasificación de Newton y Ostlund.

Cuando una prótesis está desajustada, produce una alteración en el tejido que la soporta con disminución de la queratinización y de las fibras de colágeno de la submucosa (Aguirre et al, 1990), lo que se traduce en una disminución de las defensas hísticas locales, que aprovecha *Candida* para instalarse como patógeno sobreañadido a la lesión ya existente. Por ello, la estomatitis protésica es menos frecuente en pacientes con buenos rebordes alveolares donde el grado y frecuencia de trauma protético es menor que en los que poseen bajos y estrechos rebordes. La existencia de hábitos parafuncionales como el bruxismo, estaría involucrada al producir un incremento del trauma debido al apretamiento y el desplazamiento de la prótesis sobre la mucosa (Budtz-Jørgensen et al, 1970; Arendorf et al, 1987; Tejerina et al, 1989; Ceballos et al, 1990; Zamacona et al, 1990).

La estomatitis protésica está asociada al uso continuo de la prótesis debido a un aumento del trauma de la mucosa, junto a un mayor tiempo de exposición a la placa dental y la posible alteración de su composición ya que el hecho de llevar la prótesis durante el día y la noche de forma continua está asociado a un incremento en la cantidad de *Candida* en la superficie palatina de las prótesis comparada con aquellas que se usan intermitentemente (Bergendal, 1982; Tarbert, 1982; Arendorf et al, 1987; Bascones et al, 1999).

Sin embargo, existen estudios que no encuentran diferencias significativas en la frecuencia de llevar la prótesis por la noche entre los portadores de prótesis con y sin candidiasis (Budtz-Jørgensen, 1974; Wilkieson et al, 1991).

### **3.4.2. FALTA DE LIMPIEZA DE LA PRÓTESIS.**

El insuficiente cuidado de la prótesis parece ser un factor predisponente para la candidiasis en portadores de prótesis. La placa bacteriana de la prótesis está compuesta por una capa de bacterias que se encuentra cubierta por una película variable de glicoproteínas salivales. El acúmulo de la placa en la superficie de la base de la prótesis se encuentra en contacto con el epitelio oral, solo separada por una película salival y constituye un foco de infección donde especies microbianas actúan iniciando, agravando o manteniendo la enfermedad (Radford et al, 1993).

La estomatitis protésica en los pacientes con grandes depósitos de placa la película es continua, se encuentra en unión directa con el acrílico y contiene *candidas* dispersas entre las bacterias, restos celulares con células epiteliales del estrato intermedio y parabasal y leucocitos polimorfonucleares (Aguirre et al, 1996). En los pacientes sin depósitos macroscópicos hay una película heterogénea y un gran número de blastosporas de *candida* (Frank et al, 1985).

No hay relación entre los niveles de placa y el número de *candidas*, pero sí entre los niveles de placa y el eritema de la mucosa y entre el número de *candidas* y dicho eritema; esto podría interpretarse como que placa y *Candida* operan como dos factores independientes causando ambas el eritema mucoso (Budtz-Jørgensen, 1974; Tarbert, 1982).

La correcta remoción de la placa dental combinada con el hecho de que los pacientes lleven sus prótesis únicamente durante el día, constituye un factor importante para el tratamiento con éxito de la estomatitis protésica (Arendorf et al, 1987).

### **3.4.3. IRRITACIÓN Y REACCIÓN ALÉRGICA A LOS MATERIALES DE LA BASE DE LA DENTADURA.**

La aparición de una verdadera alergia a los materiales poliméricos constituyentes de las bases protésicas es muy infrecuente (Delvin et al, 1984). La alergia de contacto al polímero de las prótesis es un fenómeno de hipersensibilidad de tipo IV. Los sensibilizantes químicos que intervienen en el desarrollo de la estomatitis alérgica son



conocidos como haptenos (sustancias de bajo peso molecular capaces de inducir hipersensibilidad retardada sólo cuando se combinan con proteínas transportadoras).

El polímero puro de polimetilmetacrilato es un material inerte. Sin embargo, existen otras sustancias en la composición de las bases de prótesis que sí pueden actuar como haptenos. Las más importantes son: formaldehído, producto que se libera durante el inicio de la polimerización de las resinas; peroxibenzoico, tiene la misión de iniciar la polimerización del monómero; y metilmetacrilato residual, el monómero que no ha polimerizado podría actuar como sensibilizante (López et al, 1997).

Algunas aleaciones que se emplean en prótesis contienen níquel que está reconocido como un metal que produce frecuentemente alergias. Las toxinas de las bacterias y las *candidas* de la placa también pueden actuar como alérgenos o haptenos (Zamacona et al, 1990).

#### **3.4.4. INFECCIÓN POR *CANDIDA*.**

Desde 1936 se ha relacionado a la estomatitis protésica con *Candida*, ya que para Cahn este agente patógeno era el principal responsable del proceso (Zamacona et al, 1990). A partir de ese momento se han realizado innumerables estudios en los que se ha demostrado esta relación según la cual, en los pacientes con estomatitis protésica existe un aumento significativo de *candidas* en relación con las personas con dentición natural e incluso con portadores de prótesis sin la enfermedad (Budtz-Jørgensen et al, 1983 A, B; Arendorf et al, 1987; Zamacona et al, 1990). El grado de implicación real de *Candida albicans* en la estomatitis protésica no se conoce, pudiendo ser un factor sobreañadido a un proceso multifactorial (Bagán et al, 1995).

De las diferentes especies de *Candida* encontradas en pacientes con estomatitis protésica son la *C. albicans*, aislada aproximadamente en un 35 % de los casos (Bagán et al, 1995), y la *C. tropicalis* las más patógenas. No obstante, los hongos no son los únicos implicados, ya que existe un complejo grupo de gérmenes orales comensales y oportunistas capaces de provocar una disminución de la resistencia bucal frente a *Candida*, así, se ha demostrado un considerable aumento del porcentaje de

*estreptococos mutans* tras la colocación de una prótesis removible (Olsen, 1974; Arendorf et al, 1987; Ceballos et al, 1990; Zamacona et al, 1990).

A pesar de que existen divergencias referidas a la relación entre la estomatitis protésica y la cantidad de *Candida* (número de levaduras por mm<sup>2</sup>), la mayoría de los autores creen en la existencia de una relación directa entre el número de hongos y su patogenia en la enfermedad (Davenport, 1970; Kulak et al, 1997; Romero et al, 1997; Fernández et al, 1998). Se han descubierto hasta 18 cepas de *Candida albicans* en la estomatitis protésica, siendo el serotipo A el principalmente involucrado (Edgerton et al, 1992; Cannon et al, 1995 B; Quindós et al, 1996).

La mayoría los trabajos consultados permiten afirmar que *Candida* es un factor etiológico de primer orden en la estomatitis protésica sobre todo de los tipos II y III, pero no en el tipo I, aunque algunos estudios discutan su importancia (Koopmans et al, 1988; Zamacona et al, 1990).

#### **3.4.5. HÁBITOS DIETÉTICOS.**

Se ha relacionado una dieta con alto contenido de carbohidratos con un empeoramiento de la estomatitis protésica, al producir tanto un aumento del crecimiento de *Candida* como de su capacidad de adhesión a las células de la mucosa y a la base de la prótesis (Samaranayake et al, 1980 A, B; Samaranayake, 1986; Poirier et al, 1997; Blanco et al, 1999).

Las deficiencias nutritivas pueden aumentar la susceptibilidad a estomatitis protésica, y así los déficits tanto vitamínicos como de hierro se han señalado como factores predisponentes para la enfermedad (Budtz-Jørgensen, 1974; Samaranayake, 1986; Sakki et al, 1997).

### **3.4.6. FACTORES SISTÉMICOS.**

Algunas enfermedades se relacionan muy frecuentemente con estomatitis protésica. Podemos incluir estados de inmunodeficiencia, diabetes mellitus, anemia, hipoparatiroidismo, xerostomía, intoxicación por mercurio, penfigoide ampolloso, alcoholismo y tabaquismo (Ceballos et al, 1991; Ueta et al, 1993; Abu Elteen et al, 1998; Vitkov et al, 1999; Chismenos et al, 2000).

Tenemos que tener presente la acción de una amplia diversidad de fármacos y terapias: antibióticos, corticoesteroides, inmunosupresores, psicofármacos, radioterapia (Bergendal, 1982; Epstein et al, 1984; Lucas, 1993; Poirier et al, 1997).

### **3.4.7. MISCELÁNEA.**

Tenemos que considerar también factores psicológicos que están presentes con una gran frecuencia en los pacientes con estomatitis protésica, así como el uso de diversos materiales y sistemas que emplean los pacientes para sujeción y ajuste de la prótesis (Arendorf et al, 1987).

También el grupo sanguíneo O parece constituir un factor predisponente para la estomatitis protésica, ciertas glicoproteínas presentes en el grupo sanguíneo intervendrían en la adherencia de *Candida albicans* (Nikawa et al, 1991).

# **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Cualquier material que se introduce en la boca con fines terapéuticos es colonizado transcurridas unas horas por la flora presente en la cavidad oral. Para que esta colonización se lleve a cabo es necesaria una adherencia de los microorganismos a los materiales odontológicos (Allison et al, 1973; Edgerton et al, 1992; Cannon et al, 1995 B).

Las bacterias y hongos que colonizan los materiales odontológicos, generalmente lo hacen de forma saprofita sin producir patología alguna, aunque en ocasiones pueden actuar como un factor coadyuvante, desencadenante o perpetuador de algún tipo de patología, como ocurre en el caso de la estomatitis protésica (Budtz-Jørgensen et al, 1983 B; Lewis et al, 1988; Cannon et al, 1995 B; Radford, 1999).

La estomatitis protésica es una enfermedad con una amplia prevalencia (11-67 %) en la que, si bien, *Candida albicans* no constituye un factor determinante, se ha demostrado su implicación de una forma importante en la mayoría de los casos en los que esta presenta esta patología (Bergendal et al, 1983; Arendorf et al, 1987; Tejerina et al, 1989; Aguirre et al, 1990; Ceballos et al, 1990; Zamacona et al, 1990; Kulak et al, 1997; Romero et al, 1997).

La adhesión de *Candida albicans* al PMMA de las bases de las prótesis depende en un primer momento de la rugosidad de la superficie de la prótesis, de la energía de superficie de los microorganismos y del material de la base de la prótesis, transcurridas unas horas intervendría también en la adhesión la película proteica adquirida dependiente de forma primordial de la saliva (Samaranayake et al, 1980 B; Klotz et al, 1985; Minagi et al, 1985; Edgerton et al, 1993; Nikawa et al, 1993; Quirynen et al, 1995; Verran et al, 1997; Waltimo et al, 1999; Nikawa et al, 2000 A, B).

Existen numerosos estudios referentes a la adhesión de *Candida albicans* a las resinas acrílicas, pero son escasos los trabajos que relacionan la adhesión de *Candida albicans* con la energía de superficie del PMMA (Minagi et al, 1985; Quirynen et al, 1995; Waters et al, 1997).

Cada autor o grupo de trabajo ha utilizado el método para valorar la adhesión de *Candida albicans* al PMMA que ha creído más conveniente, basándose, generalmente,

---

en la facilidad o la disponibilidad de la técnica, suponiendo la validez del método empleado.

El método más empleado es el recuento de microorganismos por campo, realizando después la media y su equivalencia en lev/mm<sup>2</sup> (Samaranayake et al, 1980 B; McCourtie et al, 1981; Minagi et al, 1985; Verran et al, 1997; Waters et al, 1997; Maza et al, 2001). El empleo de sustancias marcadas con algún isótopo radiactivo como la metionina [<sup>35</sup>S] o uridina [<sup>3</sup>H] que son incorporadas por los microorganismos en su metabolismo es otro sistema también utilizado con cierta frecuencia, el recuento se efectúa por medio de una cámara de centelleo (Vasilas et al, 1992; Edgerton et al, 1993; Webb et al, 1995). Procedimientos menos comunes son el recuento por medio de microscopio electrónico (Okita et al, 1991; Nikawa et al, 1993; Waltimo et al, 1999), la determinación de la variación de pH dependiendo de la mayor o menor cantidad de microorganismos (Nikawa et al, 1995), la capacidad de crecimiento de colonias (Burns et al, 1987; Spiechowicz et al, 1990), o la cantidad de proteínas presentes (Nikawa et al, 1990; Nikawa et al, 1992).

No se han comparado los métodos entre sí y los resultados obtenidos sobre los valores de adhesión han sido considerados válidos en todos los casos

Actualmente no existen estudios recientes en nuestro medio sobre la adhesión de *Candida albicans* a las resinas acrílicas de uso cotidiano.

Tampoco hay trabajos sobre la posible repercusión de las diferencias de composición de los diferentes tipos de PMMA en la energía de superficie.

**Por todo ello los objetivos que nos planteamos en el presente trabajo de investigación son los siguientes:**

1. Determinar la mayor o menor adhesión de *Candida albicans* a distintos tipos de PMMA de uso frecuente en la actualidad.
2. Comparar los resultados obtenidos de adhesión de *Candida albicans* a distintos tipos de PMMA utilizando dos métodos diferentes, uno es el recuento de *Candida*

---

*albicans* por campo por medio de un microscopio óptico de fluorescencia, el segundo método es el recuento por medio de cámara de centelleo de *Candida albicans* marcada con metionina [<sup>35</sup>S].

3. Determinar si las diferencias en la composición de los distintos tipos de PMMA se traducen en variaciones en la energía de superficie.
4. Comprobar la relación de la mayor o menor adhesión de *Candida albicans* a los distintos tipos de PMMA con la energía de superficie.
5. Determinar si podemos obtener información práctica sobre la mejor resina acrílica a emplear en el caso de pacientes con tendencia a desarrollar una estomatitis protésica.

# **III. MATERIAL Y MÉTODO**



# **III. MATERIAL Y MÉTODO.**

## **1. MATERIAL.**

### **1.1. EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTAL.**

- Microscopio de fluorescencia (Laborlux-D, Leitz) (imagen 4).
- Mezclador de vortex “Mixo-Tub 30”.
- Centrífuga, “Selecta-P”.
- Estufa, “Selecta-P”, Mod.207.
- Espectrofotómetro, “Spectronic 20”, Bausch & Lomb.
- Goniómetro de análisis de ángulos de contacto, “RAMÉ-HART, INC. MODEL 100-00, MOUNTAIN LAKES, NJ07046 U.S.A.” (imagen 5).
- Contador centelleo  $\beta$  BECKMAN LS6000TA (imagen 6).

### **1.2. MEDIOS DE CULTIVO, TRANSPORTE, DILUCIÓN E IDENTIFICACIÓN.**

- Caldo Sabouraud-Dextrosa, Difco Laboratories (Detroit, U.S.A.).
- Solución salina fosfato tamponada (P.B.S.), compuesta por las siguientes sales: NaCl, KCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Agua destilada estéril.
- Naranja de acridina (0,003 %) en ácido acético (2,5 %).
- Líquido para contador de centelleo High Flash-Point Universal LSC-COCKTAIL Ultima Gold Packard.

### **1.3. CEPA *CANDIDA ALBICANS*.**

La cepa empleada de *Candida albicans* empleada es la 1002 de la Colección Nacional de Cultivos Tipo (Valencia) que corresponde a la 18.804 de la ATCC.

### **1.4. MUESTRAS DE POLIMETILMETACRILATO (PMMA).**

Muestras de resina de 15 x 10 x 1 mm, procesadas según el fabricante.

- 1- Vacalon, Vacalon System, Indiana, U.S.A.
- 2- Inkotherm 85, Hedent, Oberursel, Alemania.
- 3- Veracril, New Stetic, Medellín, Colombia.
- 4- Pro-Base Cold, Ivoclar, Liechtenstein.
- 5- Inkotherm Press, Hedent, Oberurse, Alemania.
- 6- Inkotherm 85 T, Hedent, Oberurse, Alemania.
- 7- Ruthinium, Dental Manufacturing, Rovigno, Italia.
- 8- Vertex, Supra, Benelux.
- 9- SR Ivocap, Ivoclar, Liechtenstein.
- 10- Idoacryl, Odilux, Villarejo de Salvanes (Madrid), España.
- 11- Lucitone, De Trey (Dentsply), Dreieich, Alemania.

El yeso empleado para enmuflar es de Herbör Española S.A., (Madrid), España.

## **1.5. LÍQUIDOS EMPLEADOS PARA EL CÁLCULO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL DE LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA.**

Utilizando diferentes líquidos, de tensión superficial conocida, podemos obtener las curvas de tensión superficial de las diferentes resinas empleadas, para ello hemos trabajado con los siguientes líquidos:

LÍQUIDO	TENSIÓN SUPERFICIAL (mJ/m <sup>2</sup> )
1-. Agua.....	72,70
2-. Glicerol.....	63,13
3-. Formamida.....	59,08
4-. Dietilenglicol.....	45,16
5-. Dimetilsulfóxido.....	42,68

## **1.6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Para la obtención de datos y antecedentes sobre el tema a tratar, se realizó una revisión bibliográfica en libros de texto, tesinas de licenciatura, y artículos publicados en diferentes revistas.

Las fuentes de búsqueda bibliográfica han sido:

- Index to Dental Literature.
- Base de datos Med-Line en soporte CD.
- Internet, National Library of Medicine (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov>).

Las referencias bibliográficas están citadas en el texto según autor y año.

## **2. MÉTODO.**

La parte experimental se ha desarrollado en tres áreas:

- 2.1. Determinación de la adhesión de *Candida albicans* a las distintas muestras de polimetilmetacrilato por medio de microscopio óptico.
- 2.2. Determinación de la adhesión de *Candida albicans* a las distintas muestras de polimetilmetacrilato por marcaje con metionina [<sup>35</sup>S].
- 2.3. Determinación de la tensión superficial de las distintas muestras de polimetilmetacrilato empleadas.

### **2.1. DETERMINACIÓN DE LA ADHESIÓN DE CANDIDA ALBICANS A LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA POR MEDIO DE MICROSCOPIO ÓPTICO.**

#### **2.1.1. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE CANDIDA ALBICANS.**

La cepa de *Candida albicans* se presenta liofilizada en una ampolla de cristal al vacío. Para rehidratarla, una vez abierto el envase, se añaden 0,5 ml de caldo Sabouraud dextrosa y se mantiene en incubación durante 24 horas a 37 °C.

El crecimiento de la cepa estandarizada de *Candida albicans* se realiza mediante cultivo durante 24 horas a 37 °C en el caldo de Sabouraud-dextrosa (Minagi et al, 1985; Nikawa et al, 1992; Verran et al, 1997; Waters et al, 1997; Waltimo et al, 1999). Al finalizar el período de crecimiento se comprueba que *Candida* está en fase levaduriforme (blastospora) mediante una tinción con naranja de acridina y posterior visualización en el microscopio de fluorescencia.

La separación de las levaduras del caldo de cultivo se realiza mediante centrifugación a 1200 r.p.m. durante 10 minutos, lavando con 10 cc de solución salina fosfatotamponada (PBS). Este procedimiento se repite dos veces. Tanto el tiempo como las revoluciones de la centrifugación no se encuentran estandarizadas en forma alguna, por ello se han elegido los valores más comúnmente empleados (Nikawa et al, 1992; Waters et al, 1997; Valtimo et al, 1999).

Mediante dilución con PBS se obtiene una suspensión de levaduras con una densidad óptica 1 a una longitud de onda de 540 nm, que corresponde a una concentración de  $1,29 \pm 0,6 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>. Al no existir un protocolo admitido que se emplee de forma rutinaria por los distintos investigadores, los métodos empleados para determinar la concentración de la suspensión son diversos, si bien todos los autores emplean concentraciones muy similares.

### **2.1.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA.**

Las muestras de polimetilmetacrilato se preparan a partir de un modelo maestro de latón del cual se obtienen preformas de cera de las dimensiones deseadas (15 x 10 x 1 mm) que luego vamos a transformar en los diferentes polímeros acrílicos (imagen 7).

Cada polímero acrílico se ha procesado según las especificaciones del fabricante, para los que requieren enmuflado en su polimerización, éste se ha realizado empleando el mismo tipo de yeso (Hebör Española, S.A.):

- Vacalon, poliacrílico termocurado a alta temperatura con electrovacío (imagen 8).
- Inkothem 85, poliacrílico autocurado.
- Veracril, termocurado (imagen 9).
- Inkothem press, termocurado por inyección.
- Inkothem 85 T, autocurado.
- Ruthinium, termocurado.
- Vertex, termocurado.

- SR Ivocap, termocurado por inyección.
- Idoacryl, termocurado.
- Lucitone, termocurado.

De cada tipo se han preparado 25 muestras. Éstas son examinadas mediante una lupa (50 x) y las que presentan defectos o poros superficiales son descartadas. Se han utilizado para los dos diferentes procedimientos de forma aleatoria, a las muestras elegidas para ser utilizadas en el estudio de la adhesión de *Candida* de forma óptica con el microscopio de fluorescencia, se les realiza una pequeña marca en una de las caras, con el propósito de saber la cara sobre la que realizamos la tinción (cara no marcada), las utilizadas para *Candida* marcada con metionina [<sup>35</sup>S] no llevan ninguna marca ya que el procedimiento se realiza por toda la superficie de la resina.

### **2.1.3. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA CON LA SUSPENSIÓN DE *CANDIDA ALBICANS*.**

Las muestras de polimetilmetacrilato se mantienen en agua destilada durante 17 días renovando el agua diariamente, con ello se consigue su saturación (Vega del Barrio, 1996).

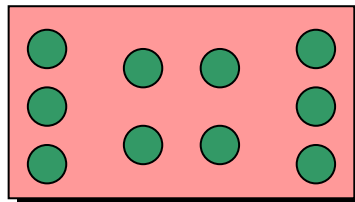
Se coloca una muestra de polímero por tubo y se añaden 2 ml de suspensión de levaduras. Posteriormente se procede a incubar las muestras durante dos horas a 37 °C. Una vez terminado el período de incubación se extraen las muestras de la estufa, se sacan de los tubos y se procede a aclararlas por dos veces con 25 ml de solución PBS estéril durante un minuto mediante agitación manual suave. Mediante este aclarado se consigue eliminar las levaduras que no se encuentran adheridas a las muestras de polímero. Este procedimiento se realiza para los once tipos de polímeros diferentes y para cada uno de los tipos se lleva a cabo cinco veces y por duplicado (Verran et al, 1997; Waters et al, 1997; Waltimo et al, 1999).

#### **2.1.4. TINCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA.**

Una vez que las muestras están secas, se realiza la tinción de las levaduras mediante naranja de acridina. Las muestras se colocan en placas de Petri añadiendo ocho gotas de la solución de naranja de acridina sobre la superficie, después de 1 minuto se aclara con 25 ml de agua destilada estéril y se dejan secar (Verran et al, 1997; Waters et al, 1997).

#### **2.1.5. RECUENTO DE *CANDIDA ALBICANS* ADHERIDA A LA SUPERFICIE DE LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA.**

Sobre cada muestra se realiza el recuento de diez campos, las áreas seleccionadas para el recuento se intenta que estén distribuidas de manera uniforme sobre la superficie de la muestra, tal y como indica el esquema. El área de cada campo observado con un aumento de 40 x 10, es de 0,152 mm<sup>2</sup>.



Los círculos verdes muestran las diferentes áreas donde se realizan los recuentos de los campos.

## **2.2. DETERMINACIÓN DE LA ADHESIÓN DE *CANDIDA ALBICANS* A LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA POR MEDIO DE MARCAJE CON METIONINA [<sup>35</sup>S].**

### **2.2.1. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE *CANDIDA ALBICANS*.**

Para realizar el marcado de *Candida* se parte de 100 ml de la suspensión obtenida según el procedimiento explicado en el punto 2.1.1. que presenta una concentración de  $1,29 \times 10^7 \text{cél.ml}^{-1}$ . Añadimos 1  $\mu\text{l}$  de metionina [<sup>35</sup>S] por ml de suspensión y se deja una noche (12-14 horas) a 37 °C para que se incorpore a las levaduras. Transcurrido el tiempo se realiza un centrifugado a 1200 r.p.m. durante 10 minutos resuspendiendo el sedimento con PBS (se añade la misma cantidad que el sobrenadante quitado), este procedimiento se realiza dos veces y con ello se elimina la metionina que no se ha incorporado a las levaduras.

### **2.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA.**

Las muestras de polimetilmetacrilato utilizadas para este procedimiento se seleccionan al azar entre las disponibles preparadas según el fabricante mediante los procesos explicados en el punto 2.1.2.



### **2.2.3. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA CON LA SUSPENSIÓN DE *CANDIDA ALBICANS* MARCADA CON METIONINA [<sup>35</sup>S].**

Las muestras de polímero se colocan cada una en un tubo de 5 ml y se añaden 2 ml por tubo de la suspensión de levaduras, manteniéndose en una estufa a 37 °C durante dos horas. Una vez transcurrido el tiempo se sacan las muestras y se aclaran en 25 ml de PBS estéril mediante agitación manual suave durante un minuto, por dos veces cada muestra.

### **2.2.4. RECUENTO DE *CANDIDA ALBICANS* ADHERIDA A LAS MUESTRAS DE PMMA EN CÁMARA DE CENTELLEO.**

Las muestras de resina se depositan en tubos de plástico especiales para contador de centelleo (imagen 10), añadiéndose 2 ml por tubo de líquido para contador de centelleo. Se selecciona el programa y la máquina procede automáticamente a realizar el recuento de centelleos de toda la superficie de la resina. Para establecer la correspondencia del número de cuentas por *Candida* se emplean dos tubos “en blanco” que únicamente llevan diferentes diluciones conocidas de las levaduras marcadas.

Este procedimiento se ha llevado a cabo de cuatro a seis veces por muestra de resina dependiendo de los valores obtenidos.

## **2.3. DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL DE LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA EMPLEADAS.**

Se denomina con el nombre de tensión superficial a la fuerza que se ejerce en la superficie de los líquidos por unidad de longitud. También la podemos definir como el trabajo necesario para incrementar la superficie de un líquido en la unidad de superficie. Las causas de la tensión superficial se deben buscar en las fuerzas de cohesión (Vans der Waals, iónicas).

Por ello las unidades empleadas son  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$  y  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ , ya que:

$$\text{J}/\text{m}^2 = \text{N} \times \text{m}/\text{m}^2 = \text{N} \times \text{m}^{-1}$$

En los sólidos la tensión superficial se presenta con mayor intensidad que en los líquidos pero no puede ponerse de manifiesto debido a la indeformabilidad de los sólidos.

### **Factores que afectan a la tensión superficial.**

La tensión superficial depende de:

- a) Temperatura, al aumentar ésta, disminuye la tensión superficial.
- b) Presencia de sustancias extrañas, cuando se encuentran en la superficie se alteran las fuerzas de cohesión.
- c) Forma y espesor de la superficie del líquido.

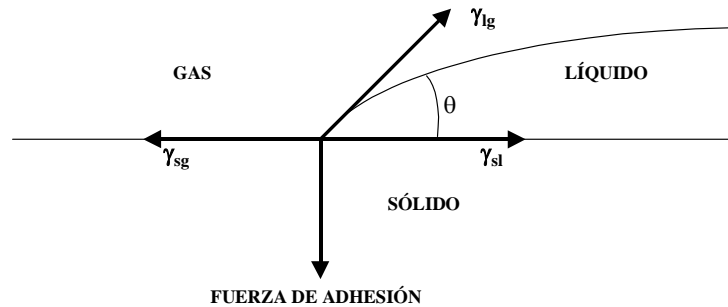
### **Superficie de contacto entre un líquido y un sólido.**

Cuando un líquido se pone en contacto con una superficie sólida el equilibrio se alcanza sólo para una inclinación particular de la superficie libre del líquido respecto a la superficie del sólido.

Las moléculas del líquido próximas a la interfase están sometidas a las siguientes fuerzas por unidad de longitud:

- Líquido – gas.
- Sólido – gas.
- Sólido – líquido.

El ángulo de contacto  $\theta$  resulta del equilibrio de estas fuerzas con la fuerza de adhesión o resultante de la atracción de las moléculas que constituyen el sólido.



Esta fuerza adhesiva se equilibra con la componente de  $\gamma_{lg}$  normal a la superficie del sólido. Por tanto resulta:

$$\gamma_{lg} \cos \theta + \gamma_{sl} = \gamma_{sg}$$

por lo tanto:

$$\cos \theta = (\gamma_{sg} - \gamma_{sl}) / \gamma_{lg}$$

Esta fórmula es conocida como ecuación de Young, según la cual cuando una gota de líquido se sitúa sobre una superficie sólida ideal, sus límites se desplazan hasta que el ángulo  $\theta$  alcanza el valor dado por la ecuación de Young.

Esta fórmula contiene dos parámetros, el ángulo de contacto y la tensión superficial del líquido, que se pueden medir directamente. Es necesario además, que la superficie sea inerte al líquido. Los diversos líquidos que se emplean tienen que ser puros para evitar interacciones.

Para el cálculo de la tensión superficial de un sólido se emplean las ecuaciones de estado de Antonow y de Berthelot, la primera relaciona  $\gamma_{sl}$  con  $\gamma_{sg}$  y  $\gamma_{lg}$  de la siguiente manera:

$$\gamma_{sl} = [\gamma_{lg} - \gamma_{sg}]$$

Y la segunda:

$$\gamma_{sl} = \gamma_{lg} + \gamma_{sg} - 2 \sqrt{\gamma_{lg} \gamma_{sg}}$$

Combinando estas ecuaciones con la de Young se obtiene la expresión:

$$\cos \theta = -1 + 2 \sqrt{\frac{\gamma_{sg}}{\gamma_{lg}}} e^{-\beta(\gamma_{lg} - \gamma_{sg})^2}$$

de acuerdo con la cual, la tensión superficial de un sólido se puede determinar a partir de ángulos de contacto cuando la tensión superficial del líquido y  $\beta$  se conocen, por lo tanto  $\gamma_{lg}$  y  $\beta$  se pueden determinar por un ajuste de mínimos cuadrados de los datos experimentales con la anterior ecuación (Kwok et al, 1997; Kwok et al, 1998).

### **2.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PMMA.**

Para la determinación del ángulo de contacto se utilizan superficies lo más ideales y limpias posible; en cada determinación se empleará una superficie nueva.

Para conseguir superficies lo más ideales posibles, las distintas muestras de resina se han sometido a un tratamiento de pulido al agua. Lo deseable sería realizar los distintos procesos de polimerización del material entre dos portas de vidrio o mica pero debido a la dificultad de realizar algunos de ellos se ha tenido que realizar el pulido después de la polimerización. Este pulido al agua se realiza de forma manual, primero con lija al agua Silicon Carbide (P1200; 3/0) con movimientos circulares durante 30 segundos, y después con lija al agua El Tren (P1600; 4/0) también con movimientos circulares durante otros 30 segundos.

### **2.3.2. DETERMINACIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO ENTRE LOS DIVERSOS LÍQUIDOS Y LAS MUESTRAS DE PMMA.**

Para este proceso se emplea un goniómetro de contacto, el cual dispone de una placa porta objetos ajustable para que esté perfectamente horizontal, sobre esta placa se sitúan las muestras sobre las que se deposita, por medio de una micropipeta, una gota del líquido (imagen 11), la imagen de la gota sobre la superficie del líquido es captada por una cámara que tiene incorporado un goniómetro que nos permite determinar la tangente del ángulo de contacto (imágenes 12 y 13).

Se realizan treinta y tres medidas de cada muestra de resina y con cada líquido.

## 2.4. TRATAMIENTO DE LOS DATOS.

Los datos relativos a la adhesión de levaduras a los distintos tipos de resinas acrílicas, tanto los obtenidos por recuento de campos mediante el microscopio de fluorescencia, como los obtenidos mediante el marcaje radiactivo y recuento en cámara de centelleo, se han archivado en hojas Excel 2000<sup>®</sup>.

También se archivaron en hojas Excel 2000<sup>®</sup> los datos obtenidos de la medición de los ángulos de contacto de los diversos líquidos con los diferentes polímeros acrílicos.

El análisis estadístico de los datos se ha realizado en el Centro de Proceso de Datos de la U.C.M. (Área de Apoyo a la Investigación) mediante el programa estadístico SAS 8.1<sup>®</sup>.

Se empleó el test paramétrico de comparaciones múltiples de Duncan en cada uno de los métodos de recuento de la adhesión de *Candida* a resinas. Debido a los rangos tan amplios en los valores obtenidos en la adhesión para una misma resina acrílica, se utilizó también el test no paramétrico de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis. El estudio de los valores de adhesión obtenidos por cada uno de los dos métodos, el óptico y el marcaje radiactivo, se realizó por medio de un Test de t de Student para determinar la igualdad de dos medias.

Los valores de energía de superficie de los diferentes tipos de polimetilmetacrilato se calcularon a partir de la ecuación de estado, empleando un ajuste de la curva por medio de mínimos cuadrados, mediante el programa MATHCAD 3.1<sup>®</sup>.

La posible relación entre la energía de superficie de las resinas acrílicas y el grado de adhesión de las levaduras, se determinó mediante el ajuste de rectas de regresión.

Todos los programas informáticos empleados están licenciados para la Universidad Complutense de Madrid.

# **IV. RESULTADOS**

# IV. RESULTADOS.

## 1. CONSIDERACIONES PREVIAS.

El análisis estadístico de los datos se realiza presentando en primer lugar una estadística descriptiva, mediante unas tablas que recogen los valores de adhesión en forma resumida, expresando la media de las observaciones y la desviación estándar. Los valores de cada tabla son expresados de forma gráfica mediante un diagrama de barras.

La estadística analítica consta de un análisis de la varianza y un test paramétrico de comparaciones múltiples a posteriori (Test de Duncan), aplicado a las diferencias de adhesión entre los distintos tipos de polimetilmetacrilato. Este test se aplica a los dos procedimientos empleados para determinar la adhesión de *Candida albicans* a PMMA. Posteriormente se emplea también un test no paramétrico de comparaciones múltiples (Test de Kruskal-Wallis) aplicado a las diferencias de adhesión entre los distintos tipos de polimetilmetacrilato. Al igual que el anterior también se aplica a los dos procedimientos usados en la determinación de la adhesión. Se utiliza un Test de t de Student para determinar la igualdad de dos medias, realizado sobre los valores obtenidos por cada uno de los dos métodos empleados para valorar la adhesión de *Candida albicans* a los distintos tipos de PMMA.



---

## **2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.**

### **2.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL RECUENTO DE *CANDIDA ALBICANS* ADHERIDA A PMMA POR MEDIO DE MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.**

A continuación se exponen las tablas resumidas con la media de los valores de adhesión de levaduras por campo para cada muestra, así como la media global para cada tipo de resina. También está reflejada la desviación estándar.

Hay que recordar que cada valor que se indica por muestra corresponde a la media de recuento de diez campos, y en cada tipo de polímero se han empleado diez muestras. Así pues la media global para cada tipo de PMMA se obtiene a partir de cien valores de recuento.

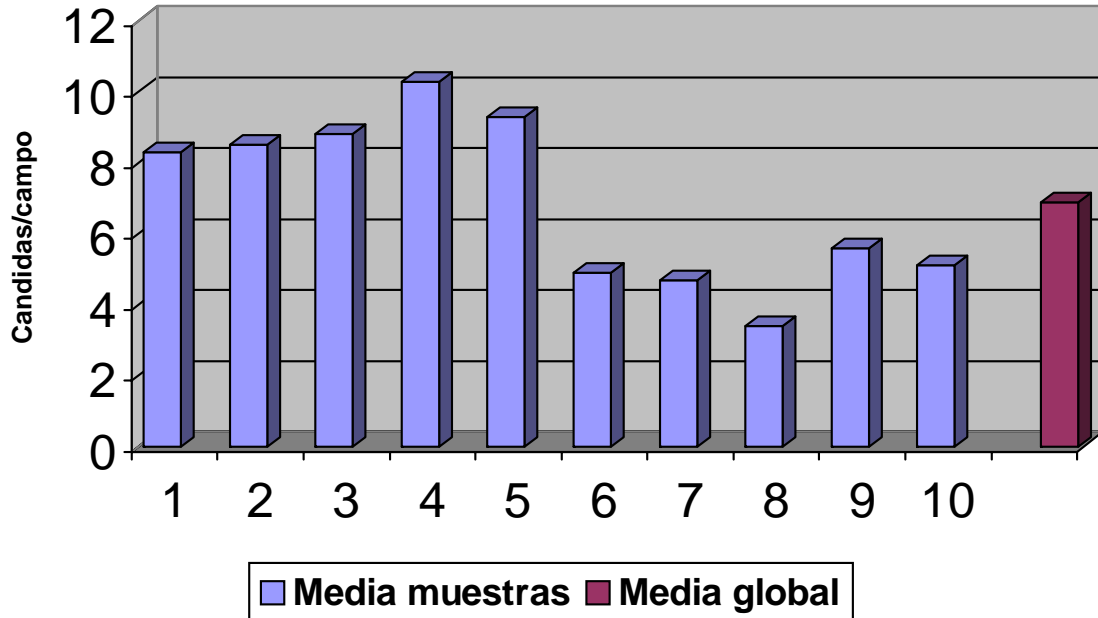
Debajo de cada tabla podemos observar la gráfica correspondiente a la media de los valores para cada muestra y la global para cada tipo de resina.

Todos estos datos referentes a los recuentos para cada tipo de resina los podemos observar de una forma conjunta en la tabla 12, en la cual también está el valor de levaduras por milímetro cuadrado, obtenido mediante una regla de tres simple, ya que conocemos la superficie del campo observado por el microscopio ( $0,152 \text{ mm}^2$ ) y la superficie total de cada muestra de resina ( $350 \text{ mm}^2$ ).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
1	1	8,3		
1	2	8,5		
1	3	8,8		
1	4	10,3		
1	5	9,3		
1	6	4,9		
1	7	4,7		
1	8	3,4		
1	9	5,6		
1	10	5,1		
			6,89	2,4

Tabla 1: resina 1; (Vacalon®).

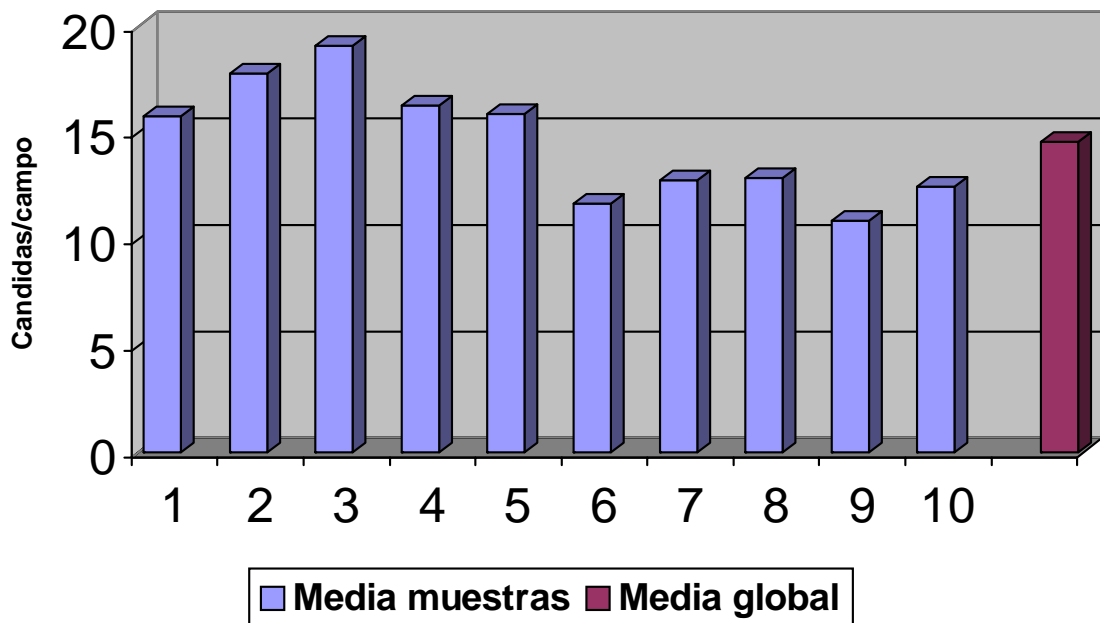
Los valores de la tabla 1 los podemos observar en forma de diagrama de barras en la gráfica 1.



Gráfica 1: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 1 (Vacalon®).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
2	1	15,8		
2	2	17,8		
2	3	19,1		
2	4	16,3		
2	5	15,9		
2	6	11,7		
2	7	12,8		
2	8	12,9		
2	9	10,9		
2	10	12,5		
			14,57	2,8

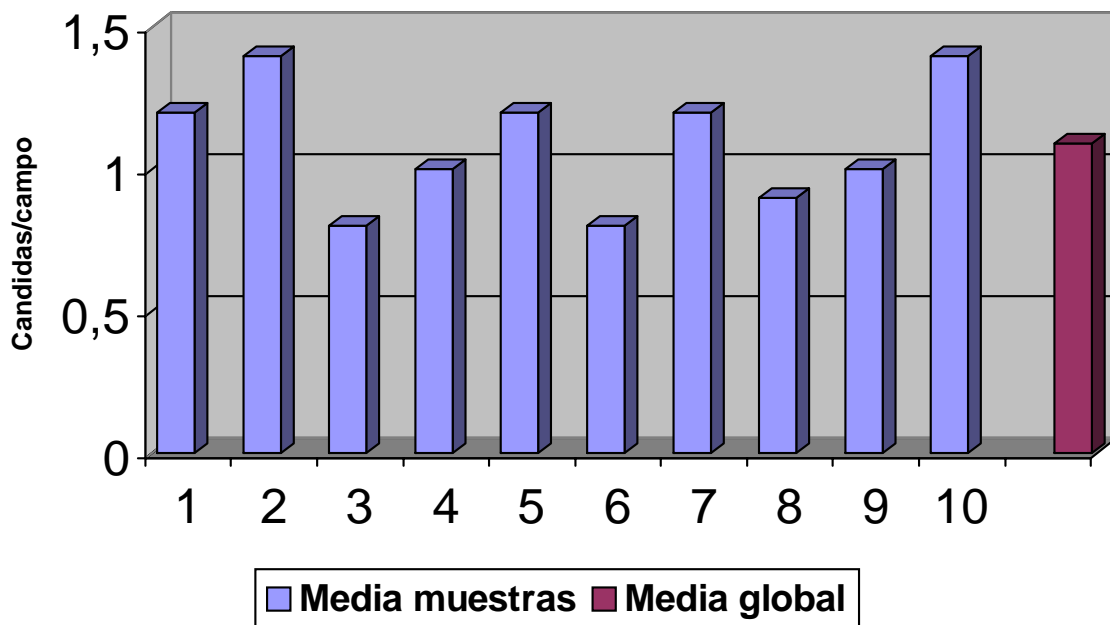
Tabla 2: resina 2; (Inkotherm 85<sup>®</sup>).



Gráfica 2: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 2 (Inkotherm 85<sup>®</sup>).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
3	1	1,2		
3	2	1,4		
3	3	0,8		
3	4	1		
3	5	1,2		
3	6	0,8		
3	7	1,2		
3	8	0,9		
3	9	1		
3	10	1,4		
			1,09	0,2

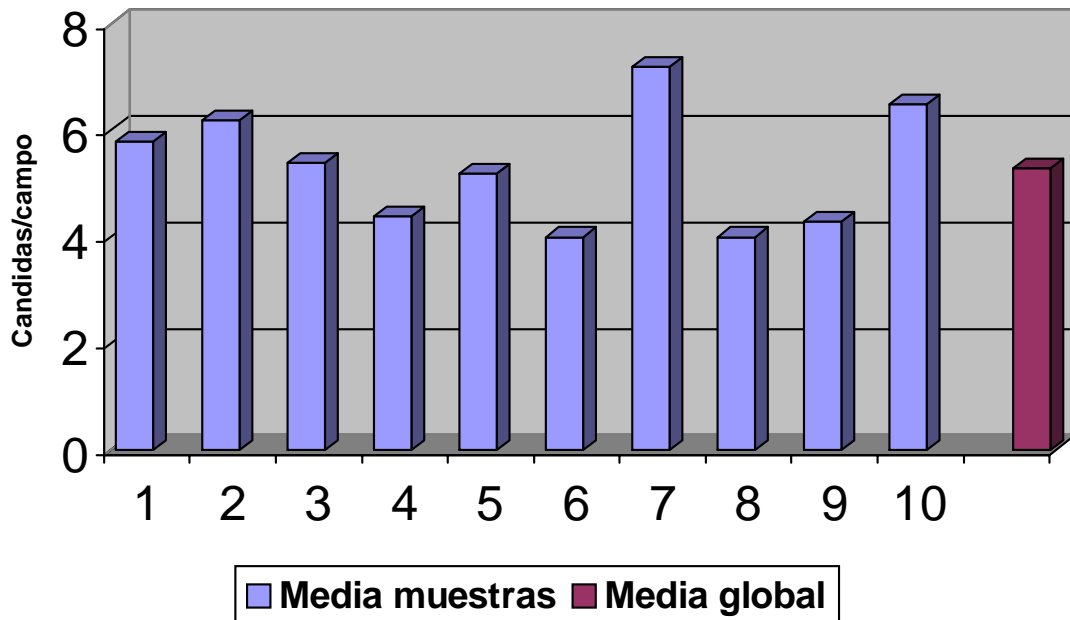
Tabla 3: resina 3; (Veracril®).



Gráfica 3: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 3 (Veracril®).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
4	1	5,8		
4	2	6,2		
4	3	5,4		
4	4	4,4		
4	5	5,2		
4	6	4		
4	7	7,2		
4	8	4		
4	9	4,3		
4	10	6,5		
			5,30	1,1

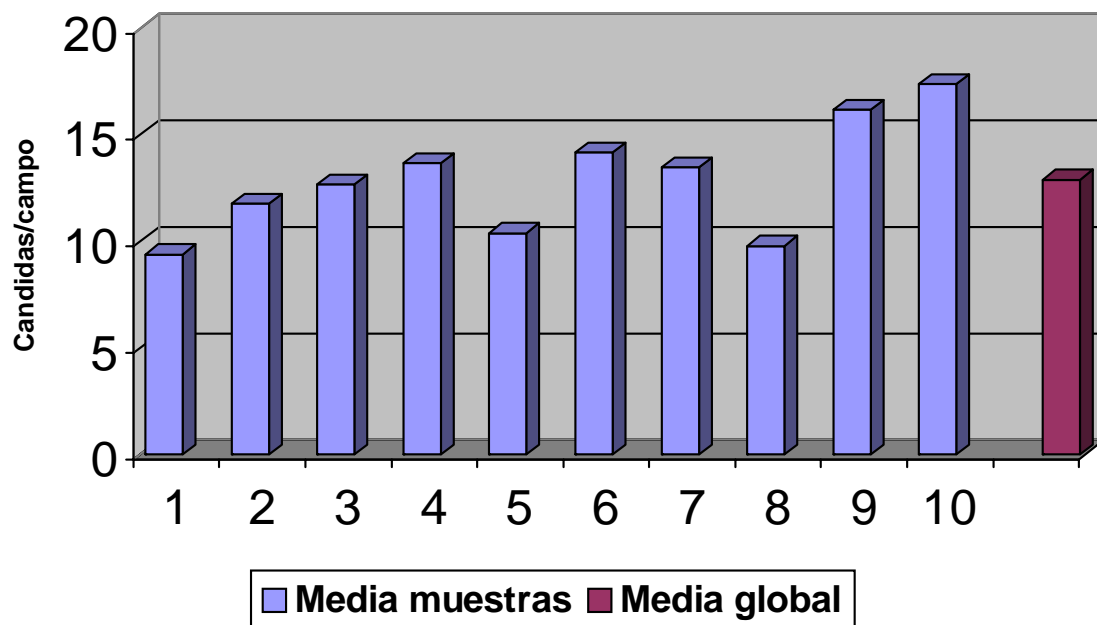
Tabla 4: resina 4; (Probase Cold<sup>®</sup>).



Gráfica 4: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 4 (Probase Cold<sup>®</sup>).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
5	1	9,4		
5	2	11,8		
5	3	12,7		
5	4	13,7		
5	5	10,4		
5	6	14,2		
5	7	13,5		
5	8	9,8		
5	9	16,2		
5	10	17,4		
			12,91	2,6

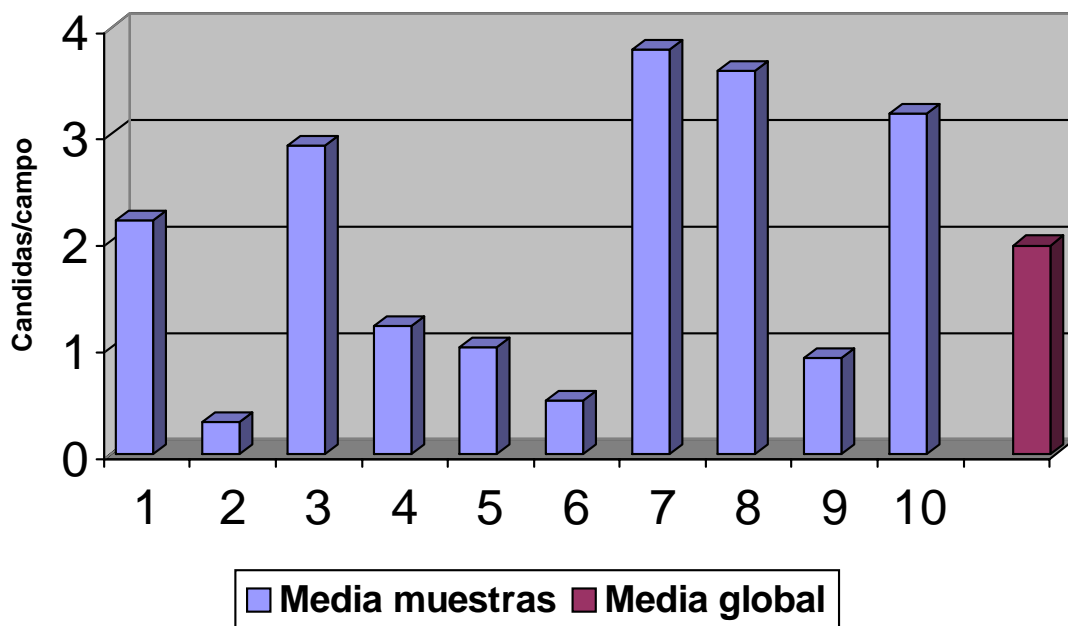
Tabla 5: resina 5; (Inkotherm Press®).



Gráfica 5: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 5 (Inkotherm Press®).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
6	1	2,2		
6	2	0,3		
6	3	2,9		
6	4	1,2		
6	5	1		
6	6	0,5		
6	7	3,8		
6	8	3,6		
6	9	0,9		
6	10	3,2		
			1,96	1,3

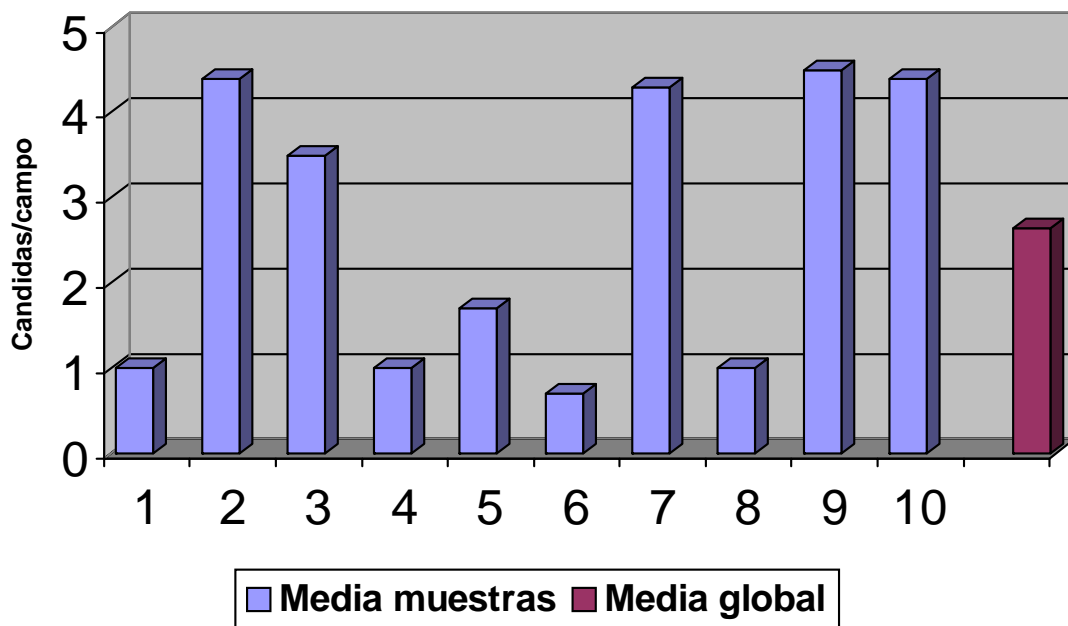
Tabla 6: resina 6; (Inkotherm 85 T<sup>®</sup>).



Gráfica 6: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 6 (Inkotherm 85 T<sup>®</sup>).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
7	1	1		
7	2	4,4		
7	3	3,5		
7	4	1		
7	5	1,7		
7	6	0,7		
7	7	4,3		
7	8	1		
7	9	4,5		
7	10	4,4		
			2,65	1,7

Tabla 7: resina 7; (Ruthinium<sup>®</sup>).

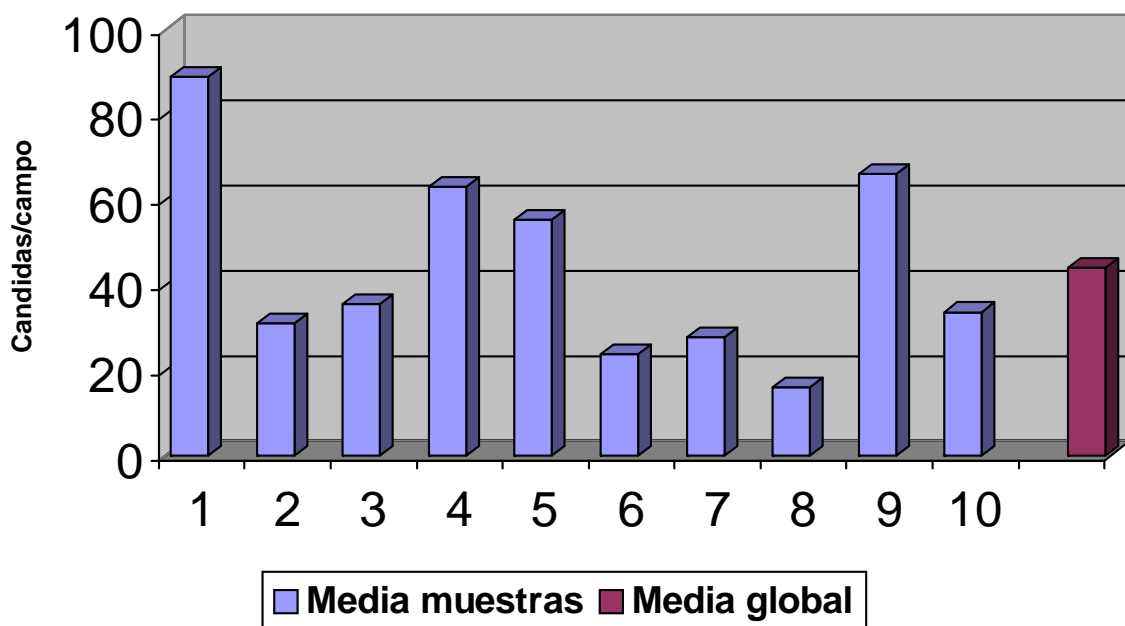


Gráfica 7: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 7 (Ruthinium<sup>®</sup>).



TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
8	1	88,9		
8	2	31,1		
8	3	35,6		
8	4	63,2		
8	5	55,3		
8	6	23,7		
8	7	27,8		
8	8	16,1		
8	9	66,2		
8	10	33,7		
			44,16	23,1

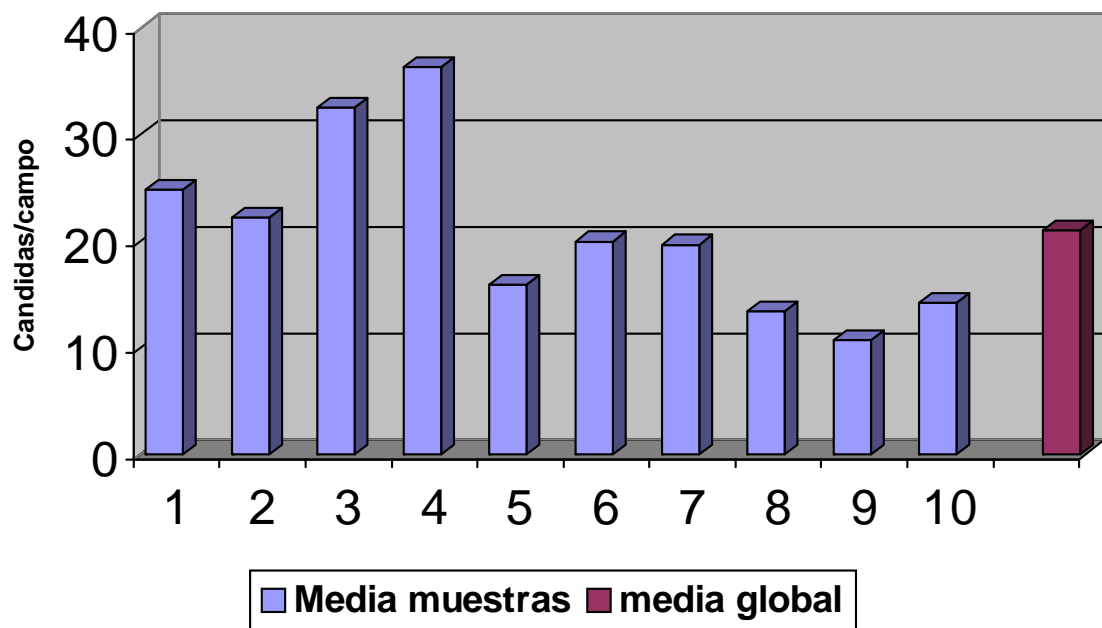
Tabla 8: resina 8; (Vertex<sup>®</sup>).



Gráfica 8: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 8 (Vertex<sup>®</sup>).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
9	1	24,9		
9	2	22,3		
9	3	32,6		
9	4	36,4		
9	5	15,9		
9	6	20		
9	7	19,7		
9	8	13,4		
9	9	10,7		
9	10	14,2		
			21,01	8,3

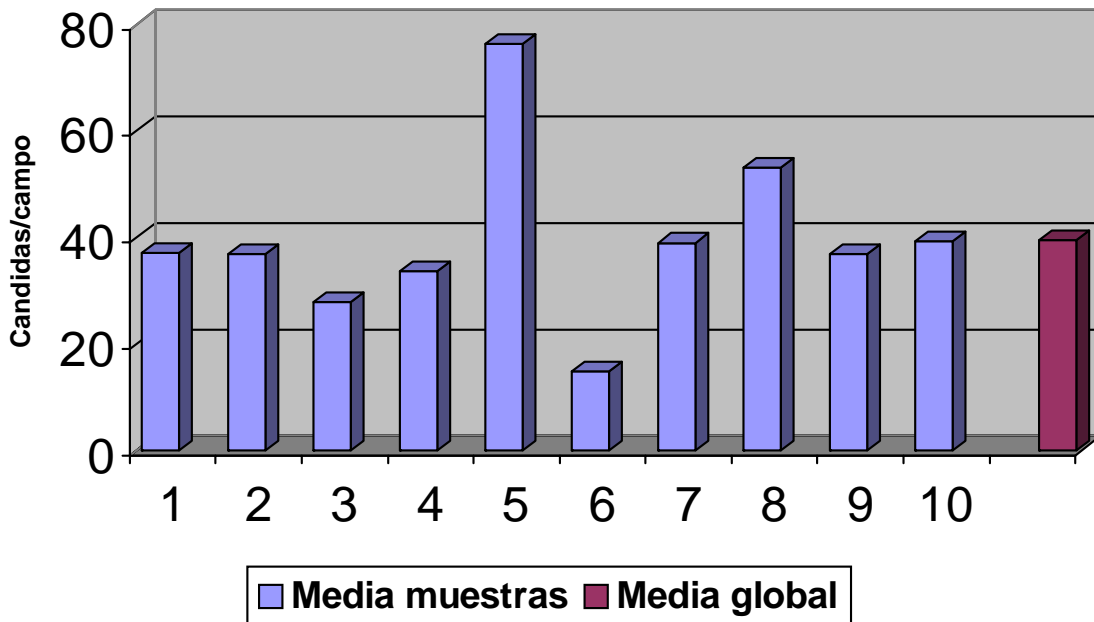
Tabla 9: resina 9; (SR Ivocap®).



Gráfica 9: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 9 (SR Ivocap®).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
10	1	37		
10	2	36,8		
10	3	27,9		
10	4	33,6		
10	5	76,4		
10	6	14,8		
10	7	39		
10	8	53,2		
10	9	36,9		
10	10	39,3		
			39,49	16,2

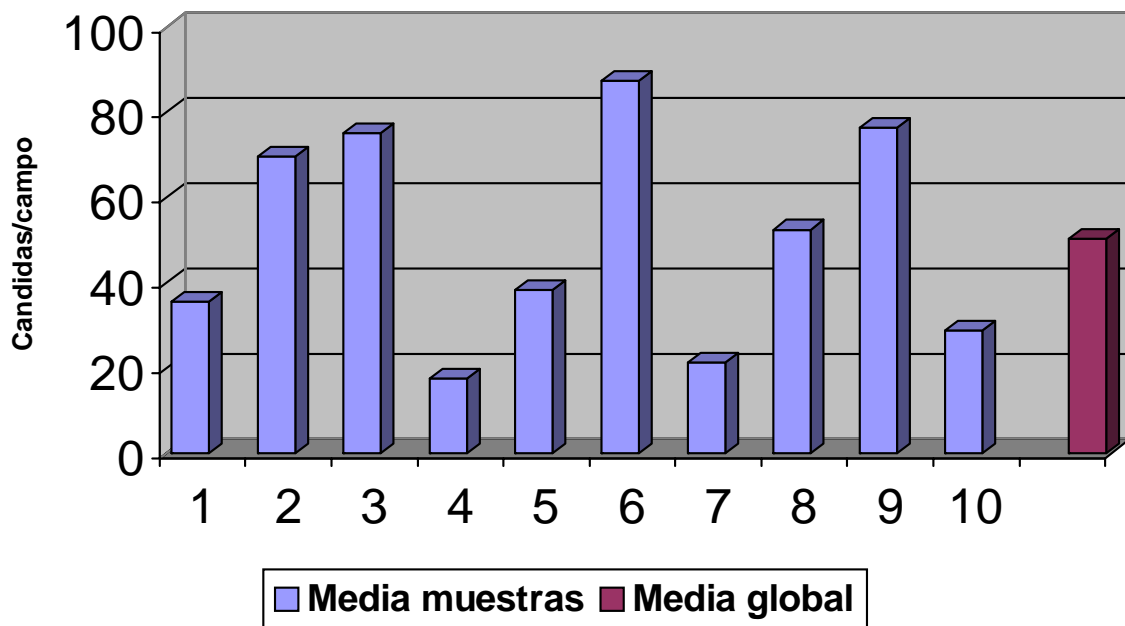
Tabla 10: resina 10; (Idoacryl<sup>®</sup>).



Gráfica 10: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 10 (Idoacryl<sup>®</sup>).

TIPO RESINA	MUESTRA	Media lev./campo	Media global	DS
11	1	35,7		
11	2	69,6		
11	3	75,1		
11	4	17,6		
11	5	38,3		
11	6	87,4		
11	7	21,4		
11	8	52,5		
11	9	76,5		
11	10	28,7		
			50,28	25,3

Tabla 11: resina 11; (Lucitone®).

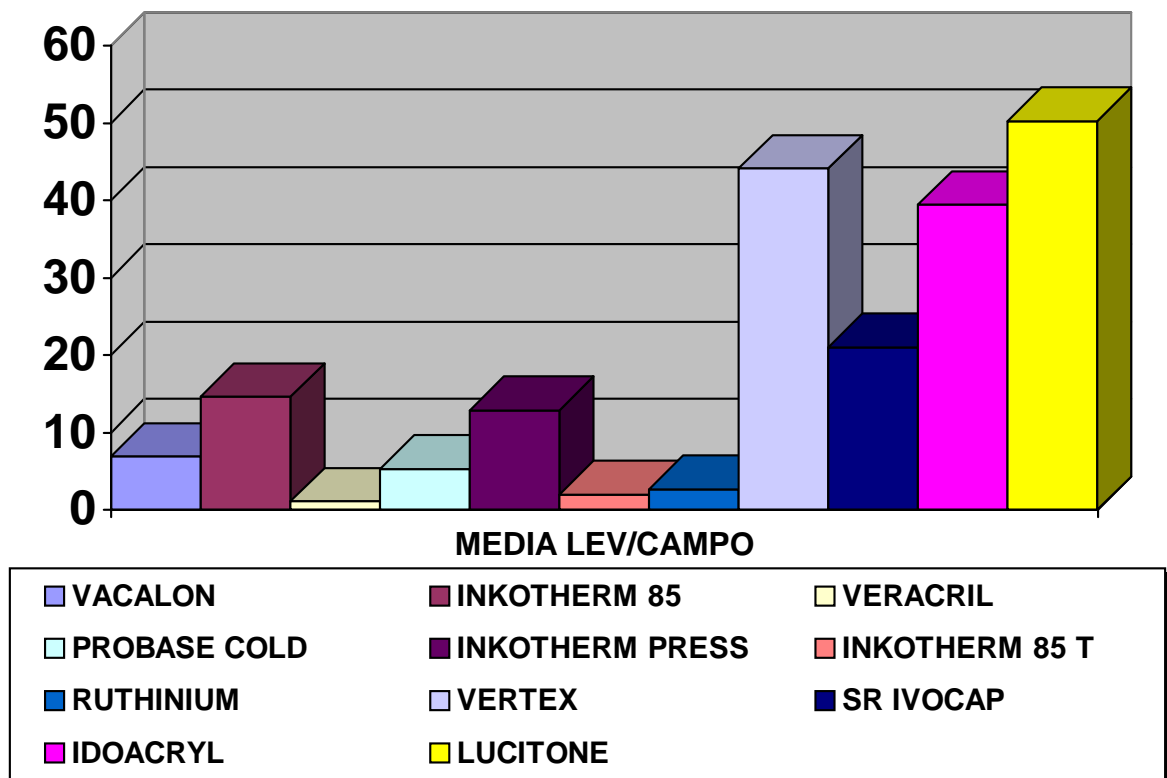


Gráfica 11: Media del recuento de levaduras /campo, por muestra y global para la resina 11 (Lucitone®).

TIPO DE RESINA	MEDIA LEV/CAMPO	MEDIA LEV/MM2
VACALON	6,89	46
INKOTHERM 85	14,57	95,85
VERACRIL	1,09	7,12
PROBASE COLD	5,3	34,9
INKOTHERM PRESS	12,91	84,93
INKOTHERM 85 T	1,96	12,8
RUTHINIUM	2,65	17,43
VERTEX	44,16	297,1
SR IVOCAP	21,01	138,2
IDOACRYL	39,49	264,4
LUCITONE	50,28	330,8

Tabla 12: medias de levaduras por campo y levaduras por mm<sup>2</sup> para cada tipo de resina.

En la gráfica 12 podemos apreciar en forma de diagrama de barras las diferencias de adhesión encontradas, mediante el empleo de microscopio de fluorescencia, entre los diversos tipos de resinas empleados.

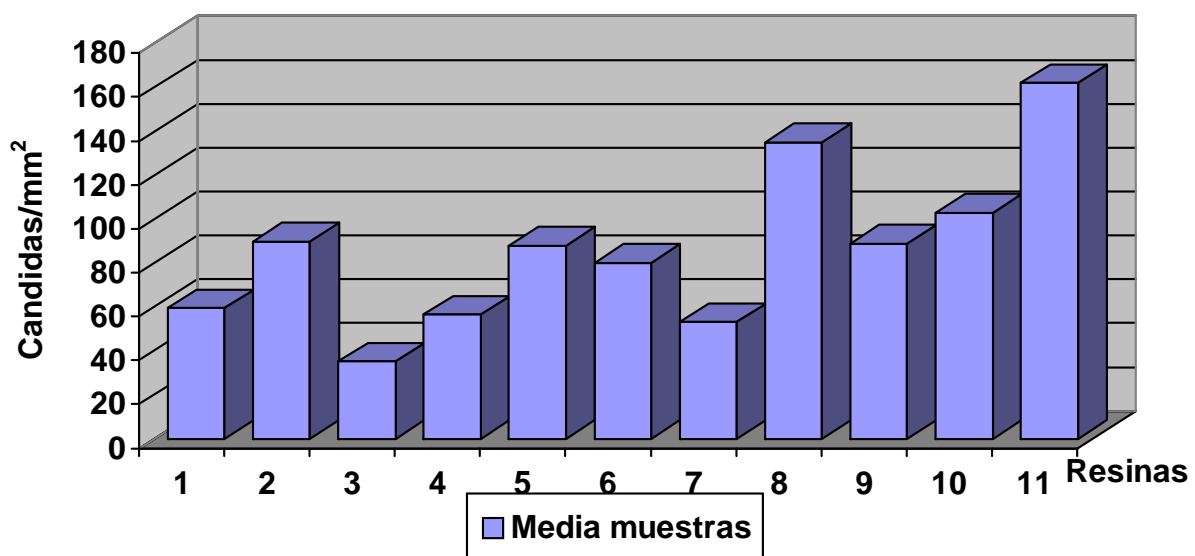


Gráfica 12: expresión en diagrama de barras de las medias finales de levaduras por campo mediante microscopio de fluorescencia para cada tipo de resina empleado.

## 2.2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DEL RECUENTO DE *CANDIDA ALBICANS* ADHERIDA A PMMA POR MEDIO DE CÁMARA DE CENTELLEO.

Los valores de adhesión de *Candida* obtenidos por medio del marcaje con metionina y posterior recuento en cámara de centelleo son recogidos en la tabla 13, los datos representan la adhesión de levaduras correspondiente a toda la superficie de cada muestra, también aparece reflejado el valor medio para cada tipo de resina y la desviación estándar.

La columna numérica de la izquierda muestra los valores correspondientes al número de centelleos registrado (DPM), por medio de unos tubos “en blanco”, con una concentración conocida de *Candida albicans*, se sabe cuántos centelleos corresponden por levadura (DPM/*Candida*), a partir de estos datos por simples reglas de tres podemos calcular el número total de *Candida albicans* por muestra de resina, y conocida la superficie de la resina (350 mm<sup>2</sup>), se obtiene también el número de *Candida albicans* por milímetro cuadrado.



Gráfica 13: expresa la media de *Candida* /mm<sup>2</sup> para cada resina, obtenida por medio de recuento con cámara de centelleo.

	DPM	DPM/candida	Candidas	Candidas/mm <sup>2</sup>	Media	D. S.
Resina1	50931	2,53	20131	57,5		
VACALON	80587	2,53	31852,5	91		
	8521	0,5	17042	48,7		
	9836	0,5	19672	56,2		
	7820	0,5	15640	44,7		
					59,62	9,1
Resina2	57672	2,53	22795,2	65,13		
INKOTHERM 85	76068	2,53	30066,4	85,9		
	11102	0,5	22204	63,4		
	15976	0,4	39940	114,1		
	16982	0,4	42455	121,3	89,97	39,7
Resina3	45685	2,53	18057,3	51,6		
VERACRIL	35100	2,53	13873,5	39,6		
	6305	0,5	12610	36,02		
	3294	0,4	8235	23,52		
	3535	0,4	8837,5	25,25	35,20	18,6
Resina4	46170	2,53	18249	52		
PROBASE COLD	67554	2,53	26701	76,3		
	9102,5	0,5	18205	52,01		
	8206	0,5	16412	46,9	56,80	3,6
Resina5	94624	2,53	37400,8	106,85		
INKOTHERM PRESS	67100	2,53	26521,7	75,8		
	11005	0,5	22009,6	62,9		
	18729	0,5	37457	107	88,14	0,1
Resina6	75316	2,53	29769,2	85,05		
INKOTHERM 85 T	108050	2,53	42707,5	122		
	10788	0,5	21576	61,65		
	9139	0,5	18278	52,2	80,23	23,2
Resina7	62957	2,53	24884,3	71,1		
RUTHINIUM	67922	2,53	26846,8	76,7		
	47141	2,53	18632,7	28,5		
	42625	2,53	16847,8	43		
	4981,1	0,5	9962,2	53,2		
	7538	0,5	15076	48,1	53,43	16,26
Resina8	108992	2,53	43080	123		
VERTEX	134637	2,53	53216,2	152		
	221928	0,5	44385,6	126,8		
	24341	0,5	48681	139	135,2	13,1
Resina9	91211	2,53	36051,6	103		
SR IVOCAP	74282	2,53	29360,6	83,9		
	77493	2,53	30629,8	87,5		
	13848	0,5	27695	79,13		
	15986	0,5	31972	91,35	88,98	9,0
Resina10	86322	2,53	34119,5	97,5		
IDOACRYL	89427	2,53	35346,7	101		
	16886	0,5	3372,8	96,5		
	20544	0,5	41088	117,4	103,1	9,7
Resina11	124556	2,53	49231,6	140,6		
LUCITONE	149960	2,53	59272,8	169,3		
	28582	0,5	57163	163,3		
	30701	0,5	61402	175,4	162,15	15,2

Tabla 13: valores de recuento de adhesión de *Candida albicans* por medio de cámara de centelleo.

## 2.3. VALORES DE LOS ÁNGULOS DE CONTACTO DE LOS DIFERENTES LÍQUIDOS EMPLEADOS PARA EL CÁLCULO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL DE LOS DISTINTOS TIPOS DE PMMA.

La tabla 14 nos muestra la media de los valores, en grados, de la tangente al ángulo que se forma entre la superficie de cada tipo de resina y una gota de cada uno de los diferentes líquidos empleados. Cada valor resultante para cada líquido es la media de 33 medidas.

	<i>Agua</i>	<i>Glicerol</i>	<i>Formamida</i>	<i>Diétilenglicol</i>	<i>Dimetilsulfóxido</i>	<i>T. Superficial</i>
RESINA 1						
Media arit.	70,52	65,39	50,94	33,82	16,70	40,86
RESINA 2						
Media arit.	72,52	66,76	51,33	33,30	15,88	40,93
RESINA 3						
Media arit.	71,97	67,12	48,82	32,52	14,97	41,2
RESINA 4						
Media arit.	70,76	67,48	49,61	32,85	14,64	40,6
RESINA 5						
Media arit.	67,48	64,91	49,79	34,06	15,79	40,1
RESINA 6						
Media arit.	71,42	65,06	49,82	34,55	14,94	40,3
RESINA 7						
Media arit.	62,15	66,12	48,30	34,48	15,36	40
RESINA 8						
Media arit.	69,76	67,00	49,18	32,18	15,67	40,45
RESINA 9						
Media arit.	70,48	69,09	53,55	36,00	21,97	38,78
RESINA 10						
Media arit.	71,67	66,61	49,36	33,36	14,12	40,62
RESINA 11						
Media arit.	68,64	68,70	52,18	35,85	22,33	

Tabla 14.

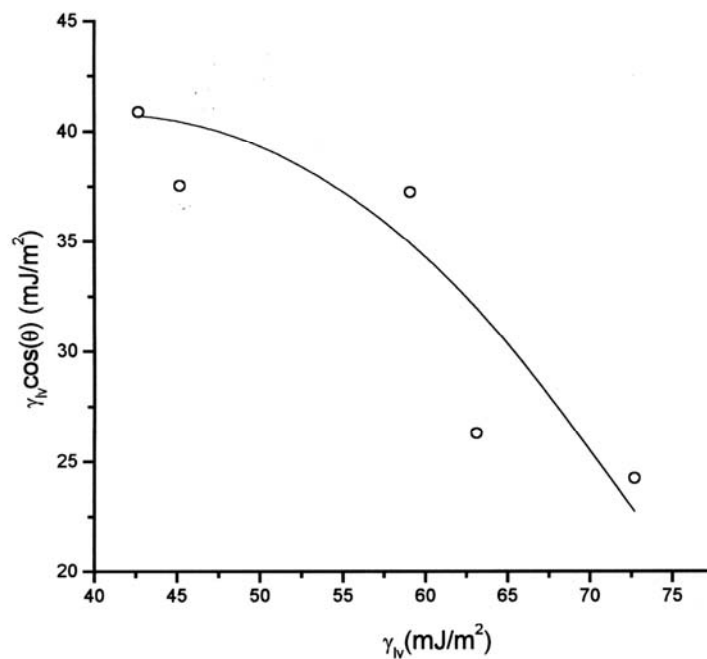
RESINA 1- VACALON.  
RESINA 2- INKOTHERM 85.  
RESINA 3- VERACRIL.  
RESINA 4- PROBACE COLD.  
RESINA 5- INKOTHERM PRESS.  
RESINA 6- INKOTHERM 85 T.

RESINA 7- RUTHINIUM.  
RESINA 8- VERTEX.  
RESINA 9- SR IVOCAP.  
RESINA 10- IDOACRYL.  
RESINA 11- LUCITONE.

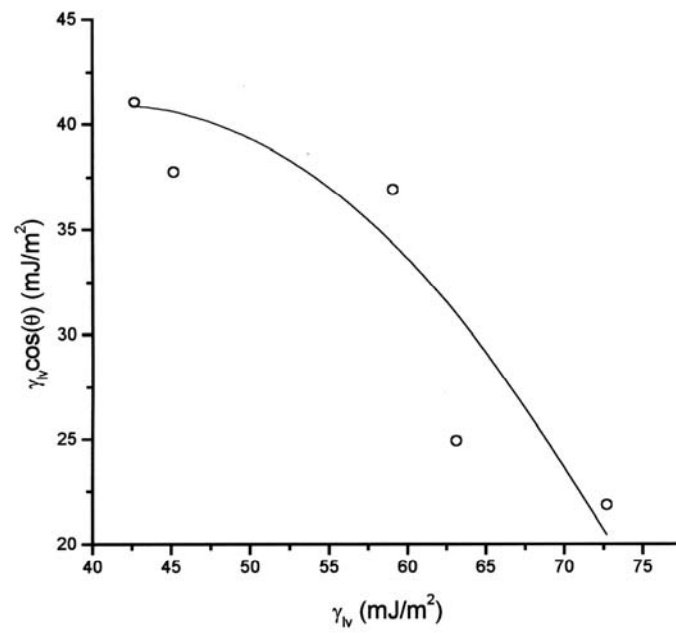


Partiendo de estos valores, y conociendo la tensión superficial de los distintos líquidos empleados, podemos determinar por medio de las ecuaciones de estado y un ajuste de mínimos cuadrados de la curva, el valor de la tensión superficial para cada tipo de resina empleado. Así las gráficas 14, 15 y 16 nos muestran como ejemplo las curvas de tensión superficial para las resinas 1 (Vacalon<sup>®</sup>), 2 (Inkootherm 85<sup>®</sup>) y 3 (Veracril<sup>®</sup>).

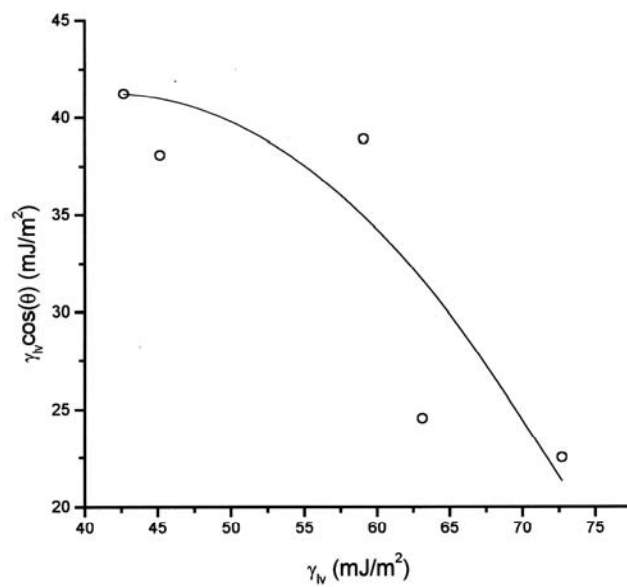
La curva de tensión superficial de una resina presenta en el eje de abscisas los distintos valores de tensión superficial de los líquidos y en las ordenadas el valor del coseno de la tangente al ángulo ( $\theta$ ) entre la gota de líquido y la resina.



Gráfica 14: curva de tensión superficial de la resina 1 VACALON<sup>®</sup>.



Gráfica 15: curva de tensión superficial de la resina 2 (INKOTHERM 85<sup>®</sup>).



Gráfica 16: curva de tensión superficial para la resina 3 (VERACRIL<sup>®</sup>).

### **3. ESTADÍSTICA ANALÍTICA.**

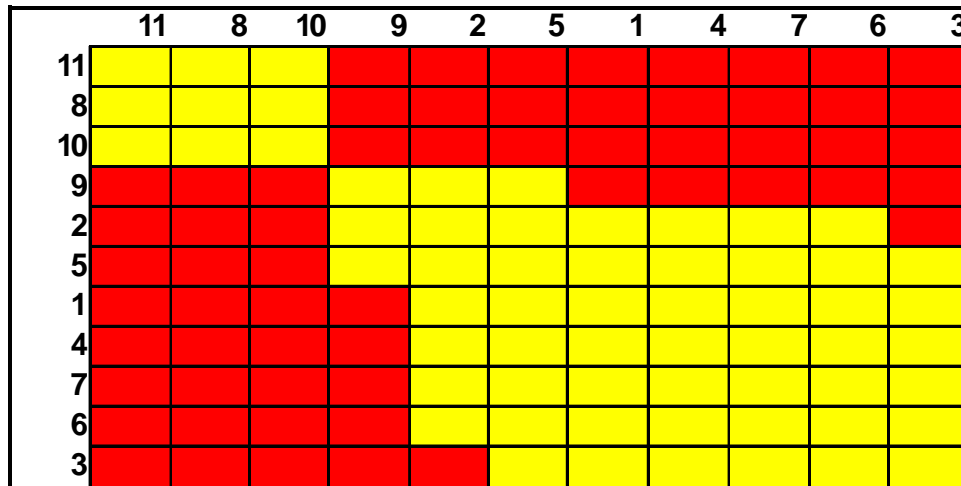
A los datos obtenidos se les aplica un test paramétrico de análisis de la varianza donde la variable dependiente es el número de levaduras adheridas y un test de comparación de muestras múltiples de Duncan para los distintos tipos de resina.

Los valores de recuento, tanto por el método óptico como por el de marcaje, en algunos casos cumplen de forma límite los requisitos de distribución normal y homogeneidad de la muestra necesarios para la aplicación correcta del test paramétrico, por ello se ha procedido también a realizar un test no paramétrico de Kruskal-Wallis para la aplicación del cual, no son necesarios los criterios de homogeneidad y distribución normal.

#### **3.1. ESTADÍSTICA ANALÍTICA DEL RECuento DE *CANDIDA ALBICANS* ADHERIDA A PMMA POR MEDIO DE MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.**

El análisis de la varianza ofreció un valor de  $p=0,0001$  lo que nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los valores de adhesión de *Candida albicans* a los distintos tipos de resinas recogidos por éste método.

La gráfica 17, obtenida a partir de los valores que nos proporciona el test de comparaciones múltiples de Duncan, nos muestra en forma de cuadro cómo entre algunas resinas existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).



---> Resinas con diferencias estadísticamente significativas  
 ---> Resinas con diferencias estadísticamente no significativas

(Alpha=0,05)

Gráfica 17: cuadro que resume la comparación de unas resinas con otras, mediante test paramétrico, y donde se aprecia entre cuáles hay o no diferencia estadísticamente significativa. Los números de la gráfica se corresponden con los diferentes tipos de PMMA según la siguiente relación:

- |                     |               |
|---------------------|---------------|
| 1- VACALON.         | 7- RUTHINIUM. |
| 2- INKOTHERM 85.    | 8- VERTEX.    |
| 3- VERACRIL.        | 9- SR IVOCAP. |
| 4- PROBACE COLD.    | 10- IDOACRYL. |
| 5- INKOTHERM PRESS. | 11- LUCITONE. |
| 6- INKOTHERM 85 T.  |               |

El test no paramétrico de Kruskal-Wallis nos ofrece un valor de chi cuadrado= 106,98 con un valor de  $p=0,000$ , obtenemos también como resultado una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), con lo que, igual que en el caso del test paramétrico, tenemos que rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) según la cual no habría diferencias en la adhesión de *Candida albicans* entre los diferentes tipos de resinas. Realizamos por tanto el test de comparaciones múltiples asociado.

Los resultados del Test de Kruskal-Wallis los podemos observar en la gráfica 18, hay que destacar que con este test las diferencias significativas en la adhesión de *Candida albicans* entre las distintas muestras es menor.

	11	10	8	9	2	5	1	4	7	6	3
11											
10											
8											
9											
2											
5											
1											
4											
7											
6											
3											

---> Resinas con diferencias estadísticamente significativas  
 ---> Resinas con diferencias estadísticamente no significativas

(Alpha=0,05)

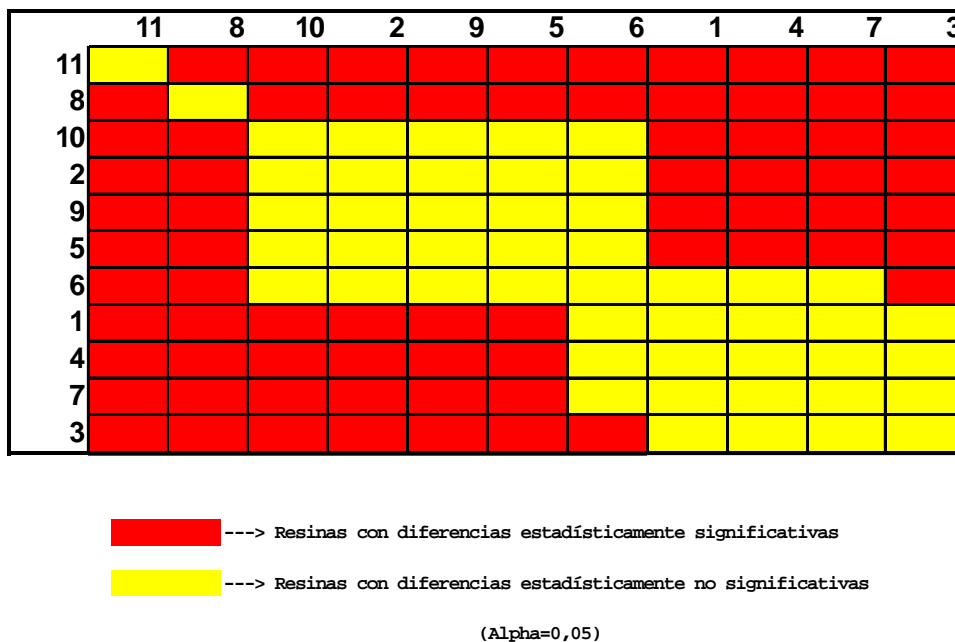
Gráfica 18: cuadro que resume la comparación de unas resinas con otras, mediante test no paramétrico, y donde se aprecia entre cuáles hay o no diferencia estadísticamente significativa. Los números de la gráfica se corresponden con los diferentes tipos de PMMA según la siguiente relación:

- |                     |               |
|---------------------|---------------|
| 1- VACALON.         | 7- RUTHINIUM. |
| 2- INKOTHERM 85.    | 8- VERTEX.    |
| 3- VERACRIL.        | 9- SR IVOCAP. |
| 4- PROBASE COLD.    | 10- IDOACRYL. |
| 5- INKOTHERM PRESS. | 11- LUCITONE. |
| 6- INKOTHERM 85 T.  |               |

### 3.2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA DEL RECUENTO DE *CANDIDA ALBICANS* ADHERIDA A PMMA POR MEDIO DE CÁMARA DE CENTELLEO.

Igual que en el apartado anterior, aplicamos en primer lugar test paramétrico con un análisis de la varianza seguido de un Test de Duncan para comparar la adhesión de *Candida albicans* entre los distintos tipos de resinas. El análisis de la varianza nos ofrece un valor de  $p = 0,0001$  por lo que rechazamos la hipótesis nula (igualdad de las medias) y existen diferencias significativas en la adhesión de levaduras a los distintos tipos de PMMA.

La gráfica 19 nos muestra entre qué resinas la diferencia de adhesión de *Candida albicans* es estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

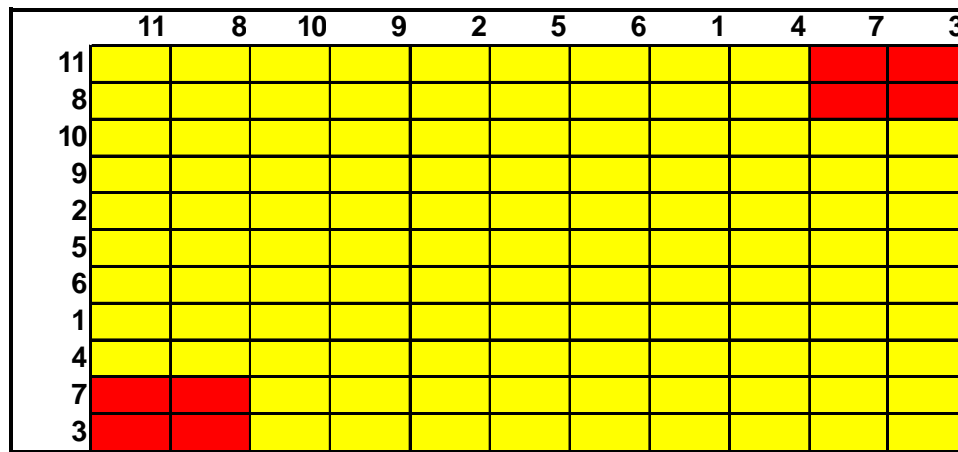


Gráfica 19: cuadro que resume la comparación de unas resinas con otras, mediante test paramétrico, y donde se aprecia entre cuáles hay o no diferencia estadísticamente significativa. Los números de la gráfica se corresponden con los diferentes tipos de PMMA según la siguiente relación:

- |                     |               |
|---------------------|---------------|
| 1- VACALON.         | 7- RUTHINIUM. |
| 2- INKOTHERM 85.    | 8- VERTEX.    |
| 3- VERACRIL.        | 9- SR IVOCAP. |
| 4- PROBACE COLD.    | 10- IDOACRYL. |
| 5- INKOTHERM PRESS. | 11- LUCITONE. |
| 6- INKOTHERM 85 T.  |               |

Realizamos posteriormente una comparación entre los distintos tipos de resinas aplicando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que nos ofrece un valor de chi cuadrado = 38,736 para el cual la  $p = 0,0001$ , por lo tanto aplicamos el test de comparaciones múltiples asociado.

Los resultados los podemos observar en forma de cuadro en la gráfica 20 que nos muestra para qué resinas la diferencia de adhesión de *Candida albicans* es estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).



---> Resinas con diferencias estadísticamente significativas  
 ---> Resinas con diferencias estadísticamente no significativas

(Alpha=0,05)

Gráfica 20: cuadro que resume la comparación de unas resinas con otras, mediante test no paramétrico, y donde se aprecia entre cuáles hay o no diferencia estadísticamente significativa. Los números de la gráfica se corresponden con los diferentes tipos de PMMA según la siguiente relación:

- |                     |               |
|---------------------|---------------|
| 1- VACALON.         | 7- RUTHINIUM. |
| 2- INKOTHERM 85.    | 8- VERTEX.    |
| 3- VERACRIL.        | 9- SR IVOCAP. |
| 4- PROBASE COLD.    | 10- IDOACRYL. |
| 5- INKOTHERM PRESS. | 11- LUCITONE. |
| 6- INKOTHERM 85 T.  |               |

### 3.3. ESTADÍSTICA ANALÍTICA DE LA COMPARACIÓN DE AMBOS MÉTODOS DE RECuento DE ADHESIÓN DE *CANDIDA ALBICANS* A LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA.

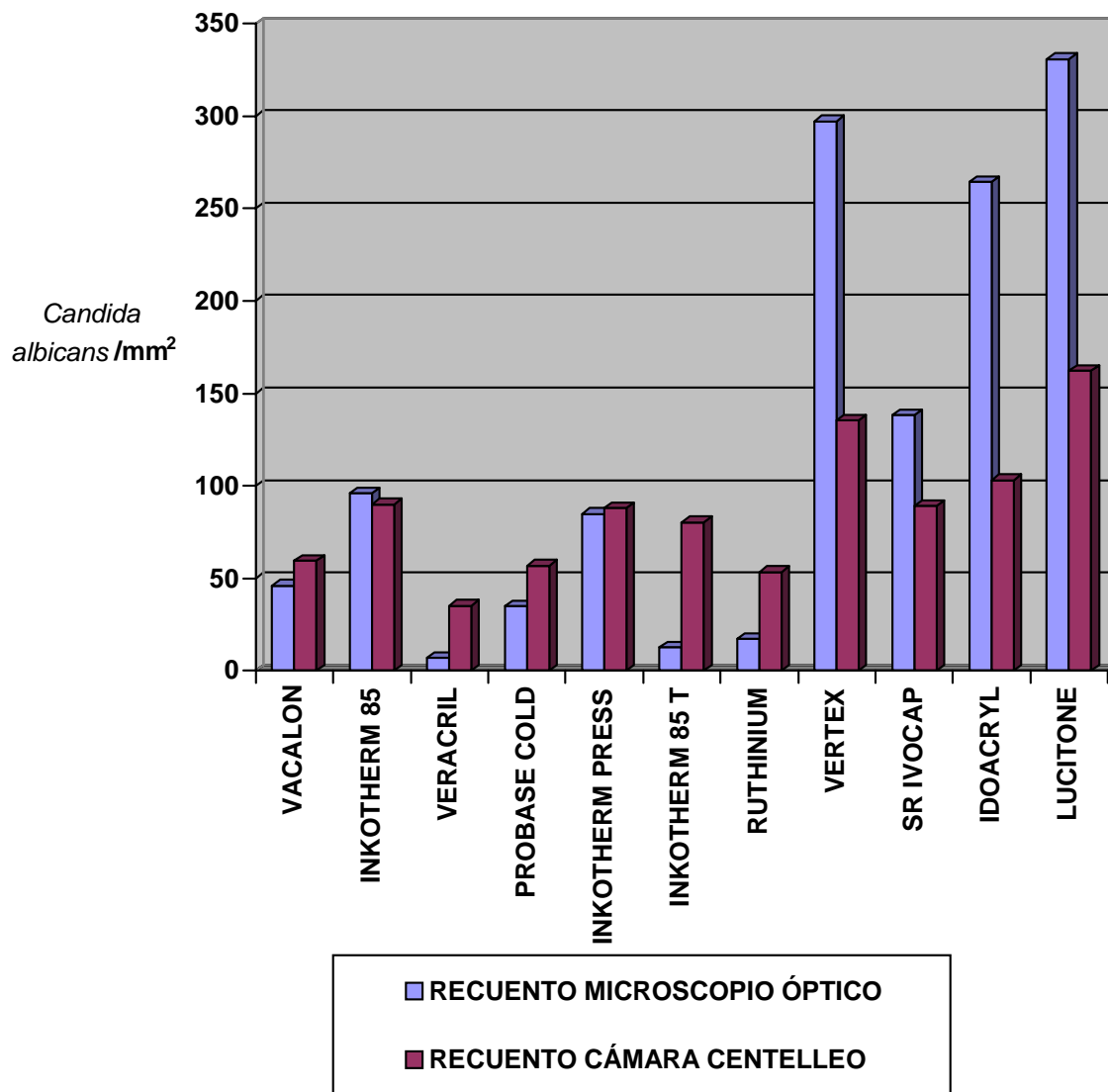
Para comparar los valores de adhesión de *Candida albicans* obtenidos por ambos métodos empleamos un Test de t de Student en donde la hipótesis nula ( $H_0$ ) es la igualdad de las varianzas obteniendo los valores que podemos observar en la tabla 15.

RESINA	VALOR F'	PROB>F'	SIGNIFICATIVO
VACALON	1,26	0,7039	NO
INKOTHERM 85	2,18	0,3041	NO
VERACRIL	60,72	0,0001	SI
PROBASE COLD	3,21	0,1521	NO
INKOTHERM PRESS	1,64	0,4965	NO
INKOTHERM 85 T	12,51	0,0029	SI
RUTHINIUM	2,59	0,2031	NO
VERTEX	161,75	0,0014	SI
SR IVOCAP	36,89	0,0034	SI
IDOACRYL	147,93	0,0016	SI
LUCITONE	120,51	0,0022	SI

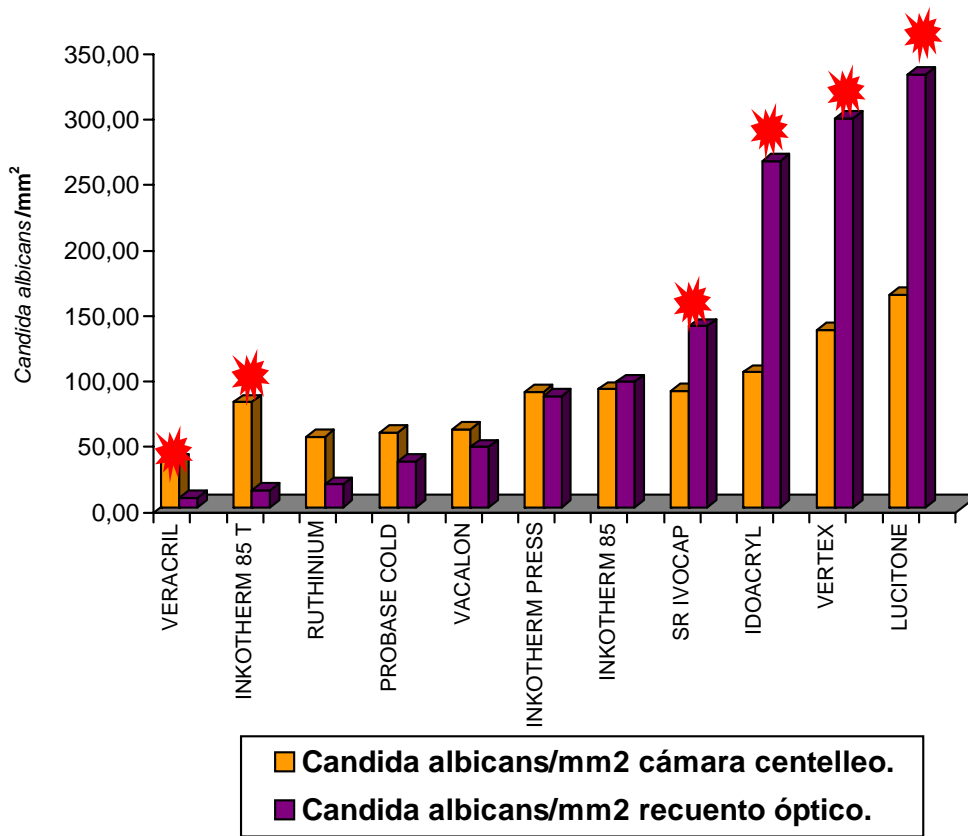
Tabla 15: resultados de la aplicación del Test de t de Student en la comparación de la adhesión de *Candida albicans* por recuento óptico y por cámara de centelleo.




Los datos de las tablas 12 y 13 los podemos observar en forma de diagrama de barras en la gráfica 21, donde están representados los valores de adhesión de *Candida albicans* a los distintos tipos de resinas obtenidos con cada uno de los dos métodos, en la gráfica 22 están representados esos mismos valores pero ordenados de forma creciente, los que tienen una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) tienen un asterisco.



Gráfica 21: comparación de los valores de adhesión de *Candida albicans* obtenidos por recuento con microscopio óptico y los obtenidos por recuento con cámara de centelleo.



 Diferencia de adhesión estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ )

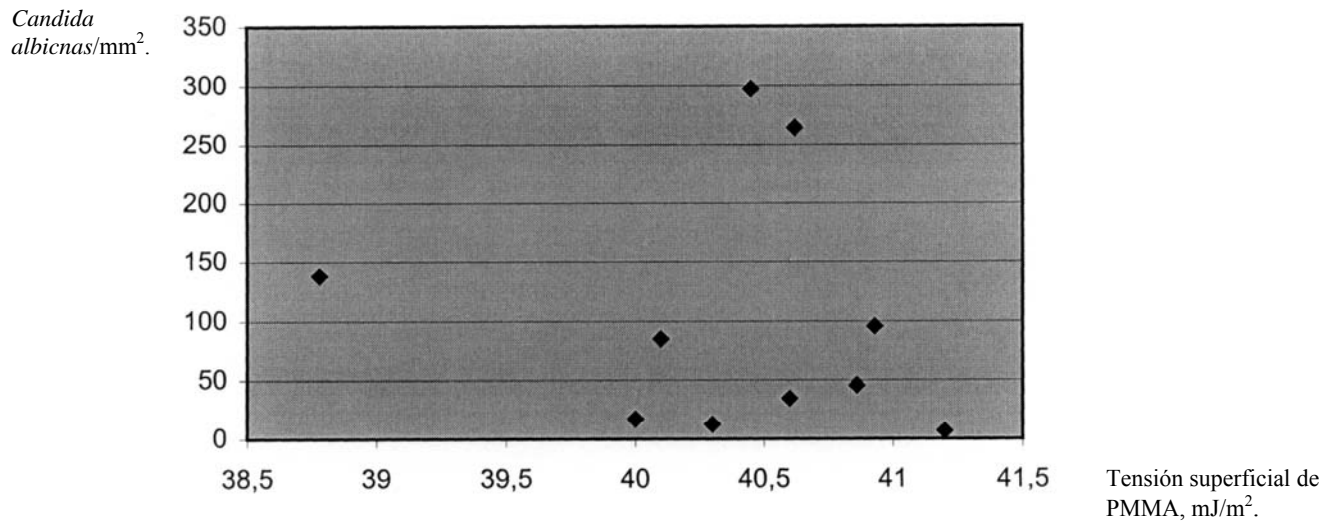
Gráfica 22: comparación de los valores de adhesión de *Candida albicans* obtenidos por recuento con microscopio óptico y los obtenidos por recuento con cámara de centelleo, en orden creciente y marcando con un asterisco aquellos con diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4. ESTADÍSTICA ANALÍTICA DE LA ADHESIÓN DE *CANDIDA ALBICANS* Y LA TENSIÓN SUPERFICIAL DE LAS DISTINTAS MUESTRAS DE PMMA.

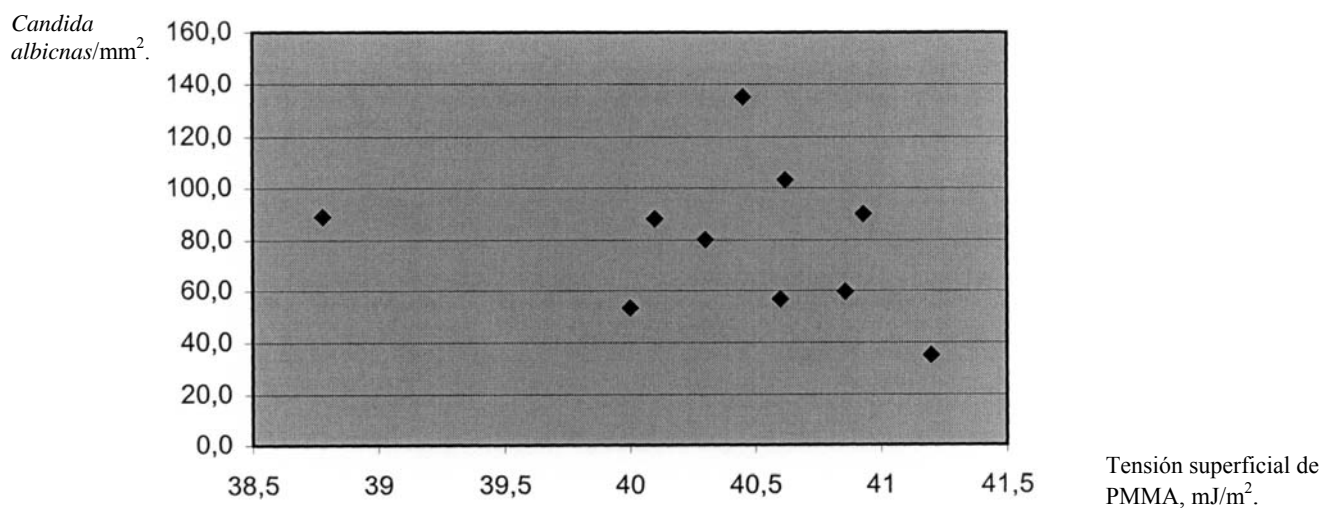
Los distintos valores de adhesión de *Candida albicans* se comparan con los diferentes valores de tensión superficial (tabla 14) de las muestras de PMMA por medio de un análisis de regresión simple, este procedimiento se realiza para los valores

obtenidos tanto por el método de recuento óptico como para los obtenidos por recuento de cámara de centelleo, no obteniéndose valores significativos en ninguno de los casos.

Esta comparación entre la adhesión y la tensión superficial la podemos observar en las gráficas 23 y 24.



Gráfica 23: valores de tensión superficial relacionados con los valores de adhesión obtenidos por recuento óptico.



Gráfica 24: valores de tensión superficial relacionados con los valores de adhesión obtenidos por recuento con cámara de centelleo.

# V. DISCUSIÓN

# V. DISCUSIÓN.

## 1. DISCUSIÓN DE MATERIAL Y MÉTODO.

La asociación de *Candida albicans* con la estomatitis protésica es importante pero no constituye un factor determinante de la aparición de la enfermedad. Este hecho se desprende de los estudios de determinación de microorganismos presentes en la placa asociada a la estomatitis protésica, en donde, dependiendo del grado de enfermedad encontramos más o menos frecuente la presencia de *Candida albicans* (Budtz-Jørgensen et al, 1983 A, B; Ceballos et al, 1990; Kulak et al, 1997; Romero et al, 1997).

La adhesión de *Candida albicans* a la superficie de PMMA es muy compleja por la gran cantidad de factores involucrados. Por ello, algunos de los trabajos in vitro realizados hasta ahora ofrecen resultados que, en ocasiones, son contradictorios. Así ocurre por ejemplo con respecto al papel que desempeña la saliva, aunque se acepta que juega un papel protector con respecto a estomatitis protésica (Samaranayake et al, 1980 B; Canon et al, 1995 B; Navazesh et al, 1995), existen trabajos que encuentran mayor adhesión de *Candida albicans* en las muestras de PMMA tratadas con saliva (Edgerton et al, 1993; Nikawa et al, 1993).

El método de estudio de la adhesión de microorganismos a polímeros plásticos, y concretamente de *Candida albicans* a PMMA, no está determinado de forma estandarizada de tal modo que exista un protocolo experimental, los sistemas más comúnmente empleados son el recuento óptico de microorganismos por campo (Samaranayake et al, 1980 A, B; McCourtie et al, 1981; Minagi et al, 1985; Nair et al, 1994; Verran et al, 1997; Waters et al, 1997; Radford et al, 1998; Maza et al, 2001) y el marcaje de microorganismos con elementos radiactivos como metionina [ $^{35}\text{S}$ ] o uridina [ $^3\text{H}$ ] (Vasilas et al, 1992; Edgerton et al, 1993; Webb et al, 1995) para el posterior recuento mediante cámara de centelleo. Otros sistemas menos empleados son el recuento por medio de microscopio electrónico (Okita et al, 1991; Nikawa et al, 1993; Waltimo et al, 1999), determinación de la variación del pH (Nikawa et al, 1994, 1995), o la capacidad de crecimiento de colonias después de diluciones seriadas (Burns et al, 1987; Spiechowicz et al, 1990). Cada autor o cada grupo de trabajo

emplea uno u otro método dependiendo de la disponibilidad o dominio de la técnica, pero sin fundamentar su elección.

La diversidad de métodos empleados hace difícil la comparación de resultados, incluso empleando un mismo sistema, al no existir un protocolo establecido, cada autor o grupo de trabajo emplea la cepa de *Candida albicans* que le parece más adecuada para su estudio, igual ocurre con respecto a la concentración de levaduras, tiempo y temperatura de incubación, procedimiento para eliminar levaduras no adheridas o método de tinción.

En nuestro estudio se ha empleado una cepa de *Candida albicans* estandarizada (IFO 1385), por ser una de la más corrientemente empleada (Minagi et al, 1985; Nikawa et al, 1993, 1994, 1995). Al igual que el método de recuento de microorganismos, la elección de la cepa depende del investigador, ya que no hay nada estandarizado, solamente en casos puntuales se selecciona un tipo determinado de cepa por presentar características concretas como sucede en el trabajo de Vasilas (1992) que estudia la variación morfológica y su influencia en la adhesión a PMMA.

La concentración de levaduras/ml empleada en estudios similares varía, según autores, entre  $10^5$  lev/ml (Nikawa et al, 1993) y  $10^8$  lev/ml (Segal et al, 1988; Waltimo et al, 1999), en nuestro caso se ha escogido una concentración intermedia de  $1,3 \pm 0,6 \times 10^7$  lev/ml, que es ampliamente empleada (Samaranayake et al, 1980 A, B; Minagi et al, 1985; Verran et al, 1987, 1997; Nikawa et al, 1990, 1992, 1994, 1995; Spiechowicz et al, 1990; Waters et al, 1997; Radford et al, 1998). Esta concentración de levaduras/ml se ha determinado por medio de un espectrofotómetro de absorción, corresponde con una densidad óptica de 1 a 540 nm (Waltimo et al, 1999). Dicha concentración se comprobó por medio de diluciones seriadas.

Otro aspecto que afecta al método, y al que hacen referencia pocos autores, es la capacidad de adsorción de agua de las resinas, que supone alrededor del 0,23% de su peso y requiere un tiempo para su saturación de 17 días (Vega del Barrio, 1996). En el presente trabajo las muestras de PMMA se han mantenido en agua destilada estéril, que se reemplazaba cada día, durante 17 días.

Esta capacidad de adsorción puede modificar o alterar la adhesión de *Candida albicans* a las muestras de PMMA, en algunos estudios no se hace referencia a este hecho (Nikawa et al, 1993; Webb et al, 1995), mientras que en otros, el tiempo que mantienen las muestras en agua destilada varía desde un día (Edgerton et al, 1993; Verran et al, 1997), hasta dos o tres semanas (Samaranayake et al, 1980 B; Segal et al, 1988). Además no hacen referencia a esta capacidad de adsorción de agua, si no, que este tiempo de permanencia de las muestras de resina en agua destilada tendría como fin el eliminar el exceso de monómero que no ha polimerizado. Este propósito contrasta con estudios realizados por Sadamori (1992) y Vallittu (1995) en los cuales, si bien en los primeros 14 días de permanencia de una resina en agua hay una mayor liberación de monómero residual, transcurrido este tiempo la cantidad de monómero presente en la estructura de la resina se estabiliza en torno al 2-3% y continúa durante años, liberándose la mayor parte de este monómero al cabo de 4 ó 5 años.

La temperatura y el tiempo de incubación de la suspensión de levaduras con las muestras de PMMA fue de 37 °C durante dos horas. Respecto a la temperatura, para reproducir la existente en boca. En cuanto al tiempo de incubación, la mayoría de los autores emplean una hora (Samaranayake et al, 1980 B; Minagi et al, 1985; Verran et al, 1997; Waters et al, 1997; Radford et al, 1998; Waltimo et al, 1999), o dos horas (Okita et al, 1991; Vasilas et al, 1992; Nikawa et al, 1993; Webb et al, 1995), pero hay autores que mantienen el tiempo de incubación hasta un día como Burns (1987). De acuerdo con Maza (2001) el máximo de adhesión in vitro se alcanza a las dos horas.

Otro problema dentro de la metodología es la elección del sistema de tinción adecuado para el recuento de levaduras por campo. Empleando un tipo de PMMA transparente autopolimerizable, se pueden obtener muestras de polímero lo suficientemente delgadas para permitir el recuento de levaduras mediante microscopio óptico de transmisión y el empleo de un colorante como violeta cristal (McCourtie et al, 1981; Klotz et al, 1985; Minagi et al, 1985; Verran et al, 1987; Okita et al, 1991) o una tinción de Gram (Samaranayake et al, 1980 B; Burns et al, 1987; Nair et al, 1994; Virga et al, 2001), esto se puede conseguir empleando dos cristales entre los cuales se coloca el polímero en su fase plástica, de tal forma que al presionar se obtiene un espesor fino. La superficie resultante de la muestra de PMMA con este sistema es similar a la que tendría un

PMMA termopolimerizable (Davenport, 1972; Samaranayake et al, 1980 B; Mc Courtie et al, 1981; Klotz et al, 1985; Nikawa et al, 1994).

Si las muestras se confeccionan de distintos tipos de PMMA, debido a los diferentes métodos de polimerización de cada uno y a la adición de colorantes, no es posible prepararlas de tal forma que se pueda emplear un microscopio de transmisión, ya que la luz no puede atravesar el espesor del polímero. Por ello para visualizar las levaduras adheridas a la superficie, es necesario usar una tinción fluorescente en la que la luz llegue por epiluminación, sin necesidad de atravesar la muestra de PMMA (Verran et al, 1997; Waters et al, 1997; Maza et al, 2001). En nuestro caso el colorante fluorescente ha sido la naranja de acridina, el cual ya ha sido empleado con anterioridad (Verran et al, 1997; Waters et al, 1997), pero la elección también ha estado condicionada por la disponibilidad y conocimiento de la técnica. Existen otros colorantes fluorescentes que se han empleado con el mismo propósito como el blanco de calcoflúor al 0,1 % (Maza et al, 2001) o al 1% (Sentandreu et al, 1997).

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras de PMMA son aclaradas durante un minuto con PBS mediante agitación manual suave repitiendo este proceso dos veces. Este sencillo sistema es el empleado por la gran mayoría de autores para separar las levaduras no adheridas, si bien, con pequeñas diferencias en cuanto al tiempo de aclarado, número de veces que se repite el proceso y líquido utilizado (Verran et al, 1997; Waltimo et al, 1999; Maza et al, 2001).

El método seguido para realizar el marcaje de *Candida albicans* con metionina [<sup>35</sup>S] está basado en el empleado por Vasilas (1992) y Edgerton (1993), que nos ha servido de referencia.

Algunos autores han utilizado de forma simultánea dos métodos para el estudio de la adherencia de *Candida albicans*, así Burns (1987) empleó la determinación de las unidades formadoras de colonias y el recuento óptico, Okita (1991), combina dos métodos ópticos como el microscopio óptico y el electrónico, y Nikawa (1993), emplea medición del descenso del pH y microscopio electrónico. No obstante, ninguno compara los datos obtenidos por uno u otro método, y el microscopio electrónico generalmente les sirve únicamente para visualizar la disposición y morfología de *Candida albicans*.



No tenemos conocimiento de ningún trabajo en el que el recuento de la adhesión *de Candida albicans* se haya realizado por dos métodos distintos y los resultados se comparen posteriormente para ver la concordancia cualitativa y cuantitativa de los datos.

Aunque lo ideal hubiera sido realizar los dos procedimientos de recuento sobre las mismas muestras de PMMA, las condiciones de experimentación requeridas al trabajar con marcadores de isótopos radiactivos hacen inviable este proceso, por lo cual, las muestras de PMMA se distribuyeron de forma aleatoria y se les aplicó uno u otro procedimiento.

El cálculo de la tensión superficial de los distintos tipos de PMMA empleados, se ha efectuado de acuerdo con procedimientos estandarizados basados en la medición de la tangente del ángulo de contacto de diversos líquidos con la superficie de los distintos tipos de PMMA (Kwok et al, 1997, 1998).

La elección de los líquidos está basada en su tensión superficial, que es conocida, de tal forma que los valores comprendan un rango amplio que varía de 42,68 mJ/m<sup>2</sup> para el dimetilsulfóxido hasta 72,7 mJ/m<sup>2</sup> para el agua.

Cuanto mayor sea la diversidad de líquidos utilizados para obtener la curva de tensión superficial del sólido, más exacta será la determinación del valor de la energía de superficie de dicho sólido. Llama la atención el trabajo de Minagi (1985) en el que obtiene los valores de la energía de superficie de las diferentes muestras de PMMA empleando solamente agua destilada. Este cálculo, basado en el valor obtenido de un solo líquido, está sujeto a posibles errores, ya que las variaciones originadas por inexactitud en la medida repercuten en sensibles variaciones de los valores de tensión superficial.

## 2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En el presente trabajo los datos obtenidos por medio del recuento óptico de la adhesión de *Candida albicans* a los distintos tipos de PMMA, tras aplicar un análisis mediante un test paramétrico (ANOVA), indican que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) (gráfica 17).

Estas diferencias de adhesión de *Candida albicans* a las distintas muestras de resinas las encuentran también otros autores como Minagi (1985), Klotz (1985), Segal (1988) Waters (1997) y Radford (1999); dichos resultados tendrían su origen en los mecanismos que intervienen en la primera fase de la adhesión y están determinados por la energía de superficie del PMMA y la energía de superficie de *Candida albicans* (Quiryneen et al, 1995).

Un hecho a destacar en el recuento óptico es la gran variación que podemos encontrar de unos campos a otros dentro de la misma muestra de PMMA. En las resinas que más adherencia de *Candida albicans* muestran, se observan disposiciones de levaduras en forma arracimada que hacen muy difícil la realización de un recuento exacto (imágenes 14 y 15).

Estas variaciones están originadas por la adherencia tremendamente irregular de *Candida albicans* a la superficie, dentro de una misma muestra de PMMA podemos observar campos con el microscopio con muy pocas levaduras frente a otros con agregados en forma de racimos muy numerosos (imagen 16), este hecho es recogido por otros autores como Verran (1997) y Radford (1999).

Existe también una gran discrepancia en los recuentos efectuados entre las muestras del mismo tipo de PMMA. Estas diferencias también quedan reflejadas en los trabajos de otros autores, Minagi (1985) encuentra recuentos de *Candida albicans* en los que se puede observar una media de  $1749 \text{ lev/mm}^2$  y una desviación estándar de  $\pm 559$ . Waters (1997) nos muestra un valor medio de  $\text{lev/mm}^2$  de 373 con una desviación estándar de  $\pm 102$ .

Estas diferencias generalmente son más acentuadas cuanto mayor es la media de levaduras adheridas, así encontramos que las diferencias entre las medias de recuento de *Candida albicans* adherida a las distintas muestras de la resina número 3 (Veracril®) (imagen 17) son mucho menores que las de la resina número 11 (Lucitone®) (imagen 18).

Debido a estas amplias variaciones, los datos obtenidos de los recuentos están en el límite de los requisitos de normalidad y homogeneidad de la varianza necesarios para la aplicación de test paramétricos, por ello aplicamos un test no paramétrico que no requiere estos preceptos, aunque las diferencias de adhesión de *Candida albicans* son estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) tiene menor poder discriminatorio por lo que las resinas que muestran diferencias de adhesión de levaduras estadísticamente significativas son menores (gráfica 18).

Las medias de los valores de recuento obtenidos en cámara de centelleo, por medio de marcaje con isótopo radiactivo (metionina [ $^{35}\text{S}$ ]), de *Candida albicans* adherida a los distintos tipos de PMMA, al someterlas a un test paramétrico (ANOVA) también muestran diferencias de adhesión estadísticamente significativas de *Candida albicans* a los diferentes tipos de resinas (gráfica 19).

Al igual que el método de recuento por medio de microscopio óptico de fluorescencia, los datos obtenidos sobre el número de levaduras adheridas están en el límite de los requisitos de normalidad y homogeneidad de la varianza necesarios para la correcta aplicación de test paramétricos. Por eso aplicamos a las medias de los valores de adhesión en el recuento, un test no paramétrico (Kruskal-Wallis) con su correspondiente prueba de comparaciones múltiples asociada. El resultado muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas (gráfica 20) pero sólo los valores extremos de adhesión de *Candida albicans* a los distintos tipos de PMMA ofrecen dichas diferencias estadísticamente significativas. Esto es debido en primer lugar a la menor capacidad discriminatoria del test no paramétrico, y en segundo lugar a la imposibilidad de realizar el ensayo con un mayor número de muestras de cada tipo de resina.

Los valores de recuento de *Candida albicans* adherida a los distintos tipos de PMMA son la media de los recuentos obtenidos de cuatro muestras de cada tipo de resina cuando los resultados ofrecen valores similares, si presentan disparidad pronunciada en los valores de recuento, se realizan más muestras hasta un máximo de seis.

Las diferencias en el recuento de unas muestras a otras, dentro del mismo tipo de resina, por ser un número bajo pueden producir más alteración en el resultado de la media final que en el caso de recuento óptico que se han empleado diez muestras de cada tipo de PMMA. Aunque el número de muestras puede parecer bajo, Vasilas (1992) emplea en sus trabajos de adhesión un número de cuatro, y Edgerton (1993) un número de seis muestras.

La superficie de las muestras de resina (imagen 7) no ha recibido ningún tratamiento de pulido, únicamente la limpieza del yeso del enmuflado o recubrimiento requerido para su proceso de polimerización. El PMMA posee una rugosidad intrínseca pequeña (Davenport, 1972) observándose en su superficie la protusión de las esferas que forman parte de su estructura (Ellis et al, 1980).

La falta de tratamiento de la superficie de las muestras de PMMA, se debe a que la porción de apoyo mucoso de base de la prótesis no recibe por lo general ningún tipo de pulido tras la eliminación y limpieza de los restos del yeso de recubrimiento del enmuflado que se realiza para el proceso de polimerización. Por ello la superficie de las muestras de las resinas empleadas en ambos métodos de estudio de la adherencia de *Candida albicans* reproducen este mismo tipo de superficie. Se ha tenido en cuenta que el yeso empleado para recubrir las muestras para su procesado condiciona la superficie resultante final (Davenport, 1972), es por ello, por lo que el yeso es el mismo en el procesado de todas la muestras.

El umbral de rugosidad de la superficie para la retención bacteriana se ha establecido por medio del perfilómetro en  $0,2 \mu\text{m}$  (Bollen et al, 1997) por debajo del cual los materiales no ofrecen rugosidad suficiente para permitir un anclaje mecánico de los microorganismos.

La máxima adhesión de *Candida albicans* a superficies de PMMA se ha encontrado con media de rugosidades de superficie de 0,01 a 1,20  $\mu\text{m}$ . La superficie que resulta de la polimerización de PMMA contra un cristal (Samaranayake et al, 1980 A, B); Nikawa et al, 1993) presenta una rugosidad media de 0,1  $\mu\text{m}$ , mientras que la superficie que se puede obtener con distintos medios de pulido varía de 0,03 a 7,2  $\mu\text{m}$ , por otra parte antes del pulido se han medido rugosidades de sólo 0,01  $\mu\text{m}$ , (Bollen et al, 1997). Esto indica que los estudios realizados puliendo las superficies de las muestras de PMMA (Vasilas et al, 1992; Verran et al, 1997; Waltimo et al, 1999) dependiendo del sistema empleado pueden presentar gran variación en cuanto al valor medio de la rugosidad de la superficie.

El sistema que permite una estandarización mejor de la superficie es el empleo de cristales contra los que presionar las muestras de PMMA durante el proceso de polimerización (Samaranayake et al, 1980 A, B; Nikawa et al, 1993), pero este procedimiento no es aplicable a todos los variados sistemas de polimerización empleados.

Cuando comparamos los resultados de las medias de los recuentos de adhesión de *Candida albicans* a las distintas muestras de PMMA obtenidas por medio de microscopio óptico de fluorescencia o mediante el empleo de un isótopo de marcaje radioactivo como la metionina [ $^{35}\text{S}$ ], encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para los valores más extremos, es decir, para las medias de recuento con mayor y menor número de *Candida albicans* / $\text{mm}^2$ .

Estas diferencias estadísticamente significativas las encontramos para Veracril<sup>®</sup> e Inkotherm 85T<sup>®</sup>, que tienen las medias de los recuentos de *Candida albicans* / $\text{mm}^2$  más bajas por medio del microscopio óptico de fluorescencia, y para SR Ivocap<sup>®</sup>, Idoacryl<sup>®</sup>, Vertex<sup>®</sup> y Lucitone<sup>®</sup> que tienen las medias de los recuentos de *Candida albicans* / $\text{mm}^2$  más altos por medio del microscopio óptico de fluorescencia.

La discrepancia entre ambos métodos en el recuento de *Candida albicans* adherida a las distintas muestras de PMMA que ofrece valores más bajos, puede tener su origen en el hecho de que mediante el microscopio óptico de fluorescencia, se realiza el recuento de diez campos por muestra de resina y las áreas donde se efectúa el recuento no están próximas a los bordes si no que están situadas en el área interior de la

muestra de PMMA. El recuento que se efectúa con el marcado de *Candida albicans* mediante metionina [ $^{35}\text{S}$ ] en cámara de centelleo comprende toda la superficie de la muestra de PMMA, incluidos los bordes y laterales siendo en estos lugares donde las muestras pueden presentar mayor irregularidad en su superficie, debido a esta mayor facilidad de anclaje mecánico de las levaduras son áreas en las que muy probablemente la media de *Candida albicans*/mm<sup>2</sup> es mayor que en otras superficies de la muestra de PMMA.

Las diferencias estadísticamente significativas en el recuento de la adhesión entre ambos métodos, que encontramos para las muestras que presentan valores de *Candida albicans*/mm<sup>2</sup> más altos, se pueden explicar por la acción conjunta de varios factores.

Como hemos comentado anteriormente, cuando hay que efectuar el recuento de *Candida albicans* adherida por medio de microscopio de fluorescencia, y el número de levaduras por campo es elevado, la disposición que adoptan en agregados con forma de racimos tridimensionales hace difícil el recuento que además se debe efectuar en varios planos de enfoque (Vasilas et al. 1992; Verran et al, 1997).

La tinción con naranja de acridina se produce por su afinidad a los ácidos nucleicos (Voet et al, 1992; Waters et al, 1997), tanto ARN como ADN, su estructura aromática plana le permite intercalarse entre dos bases (Montgomery et al, 1998). La incorporación de la metionina [ $^{35}\text{S}$ ] se produce en las células que tienen actividad metabólica. Por tanto el recuento óptico se produce sobre todas las levaduras, tanto las viables y activas como las inviables (Verran et al, 1984), mientras que el recuento con cámara de centelleo nos proporciona valores de *Candida albicans* adherida pero que ha tenido actividad metabólica para incorporar la metionina.

Por tanto la mayor adhesión en áreas laterales y bordes de las muestras tiende a incrementar los recuentos de *Candida albicans*/mm<sup>2</sup>, y por otro lado si las levaduras no han tenido actividad metabólica, no han incorporado metionina [ $^{35}\text{S}$ ] con lo cual los valores más elevados de adherencia de *Candida albicans*/mm<sup>2</sup> se ven disminuidos al existir levaduras adheridas a las muestras de resina que no son captadas mediante la cámara de centelleo. Ambos factores son contrarios, y así en las muestras de resina con

menor recuento en la adhesión de levaduras, predominaría el primero y en las muestras de mayor recuento lo haría el segundo.

Independientemente de estas diferencias estadísticamente significativas hay que destacar el hecho de que las resinas con media más alta de recuento de *Candida albicans*/mm<sup>2</sup> se registran tanto con el método óptico como con el de marcaje radiactivo y también las resinas con menor media de recuento se registran por ambos métodos, es decir, el orden de menor a mayor en los valores de recuento de levaduras adheridas por milímetro cuadrado coincide para ambos métodos (excepto para la resina Inkotherm 85 T<sup>®</sup>) pero no los valores de dichos recuentos.

Tenemos que hacer mención especial a los valores de recuento de *Candida albicans*/mm<sup>2</sup> obtenidos para la resina Inkotherm 85 T<sup>®</sup> por los dos diferentes métodos. Para este tipo de resina obtenemos una cifra de adhesión baja por medio del recuento con microscopio óptico, mientras que con la cámara de centelleo obtenemos un valor que no se sitúa entre los más bajos que nos ofrece éste método. Esto contrasta con el resto de los tipos de PMMA empleados, que como hemos comentado, mantienen el mismo orden de menor a mayor valor de adhesión.

Los valores obtenidos mediante el recuento con cámara de centelleo nos ofrecen una media de *Candida albicans*/mm<sup>2</sup> de 80,23, similar a los valores obtenidos para los otros dos tipos de PMMA ensayados, que pertenecen a la misma casa comercial, como son Inkotherm Press<sup>®</sup> (88,14 lev/mm<sup>2</sup>) e Inkotherm 85<sup>®</sup> (89,97 lev/mm<sup>2</sup>). Los valores obtenidos mediante el recuento por medio de microscopio óptico de fluorescencia nos dan una media de 12,8 lev/mm<sup>2</sup>, muy alejada de los valores obtenidos para los otros dos tipos de resina de esta marca (84,93 lev/mm<sup>2</sup> para Inkotherm Press<sup>®</sup> y 95,85 lev/mm<sup>2</sup> para Inkotherm 85<sup>®</sup>)

Esta diferencia se debe posiblemente a la suma de dos efectos. El primero, que ha sido comentado, vendría determinado por la mayor adhesión de *Candida albicans* a los bordes y áreas laterales de las muestras de PMMA. En el caso de recuento óptico no influye pero sí lo hace en el recuento mediante cámara de centelleo. El segundo efecto, que puede haber contribuido a esta diferencia, es el número reducido de muestras empleadas para obtener la media de recuento por medio de marcaje radiactivo y cámara

de centelleo. Como hemos comentado con anterioridad, se han empleado entre cuatro y seis muestras de cada tipo de resina (tabla 13), es suficiente que se obtengan valores más elevados, debidos al azar, en una o dos de las muestras para que se eleve considerablemente la media final de *Candida albicans*/mm<sup>2</sup> para este tipo de resina. Todo ello teniendo en cuenta que otros autores han empleado tamaños de muestra muy similares (Vasilas et al, 1992; Edgerton et al, 1993).

La energía de superficie del PMMA, sin sustancias adicionales como colorantes agentes de entrecruzamiento o estabilizantes que mejoren sus propiedades para su empleo en Odontología, es de  $38,5 \pm 0,5$  mJ/m<sup>2</sup> (Kwok et al, 1998). Los valores de energía de superficie obtenidos de los distintos tipos de PMMA utilizados varían entre un valor mínimo de 38,78 mJ/m<sup>2</sup> y uno máximo de 40,93 mJ/m<sup>2</sup>. Como se puede observar en la tabla 14 las variaciones en la composición de los distintos tipos de PMMA no se traducen en grandes diferencias de energía de superficie.

Estos valores de energía de superficie contrastan con los obtenidos por Minagi (1985) que encuentra una variación mucho mayor que oscila entre menos de 20 mJ/m<sup>2</sup> y más de 40 mJ/m<sup>2</sup>.

Estas discrepancias en los resultados obtenidos respecto a la energía de superficie pueden tener su origen en la diferencia de líquidos empleados para calcular su valor. Minagi sólo emplea agua destilada y realiza el cálculo con la media de las tangentes al ángulo que forma el agua con la superficie de la resina. El valor obtenido con un solo líquido está sujeto a un error más elevado que cuando se utilizan más líquidos (puesto que a mayor número de líquidos más exacta es la determinación de la energía de superficie). La energía de superficie se obtiene a través de una curva que resulta de una ecuación de estado ajustada por un proceso de mínimos cuadrados (gráficas 14, 15 y 16).

La resina Lucitone<sup>®</sup> no tiene valor de energía de superficie (tabla 14), esto es debido a que con los datos obtenidos a partir de la tangente al ángulo de contacto de los distintos líquidos, no ha sido posible realizar el ajuste de la curva por mínimos cuadrados.



Este error puede estar ocasionado por alteraciones de los ángulos por interacción de varios de los líquidos empleados con alguno de los componentes del PMMA. Para que el cálculo de la energía de superficie sea correcto no tiene que existir interacción entre el material a estudiar y los líquidos empleados para determinar la tangente al ángulo de contacto.

Los valores de adhesión de *Candida albicans*/mm<sup>2</sup> obtenidos por ambos métodos de recuento se relacionan con la energía de superficie de los distintos tipos de PMMA, obteniendo como resultado la inexistencia de relación alguna entre la adhesión de *Candida albicans* y los valores de energía de superficie de los distintos tipos de PMMA empleados (gráficas 23 y 24).

Este resultado es distinto al obtenido por Minagi (1985) que encuentra una relación lineal positiva entre la energía de superficie y la adhesión de *Candida albicans*. Esta misma relación está apoyada por los trabajos de Klotz (1985) pero a diferencia de Minagi emplea además de PMMA materiales plásticos muy distintos como el poliestireno o el teflón.

Otros autores como Waters (1997) no comparten esta asociación tan clara entre el grado de adhesión y la energía de superficie, señalando que interviene también la energía de superficie del microorganismo y la tensión superficial del medio donde se realiza el cultivo de la suspensión de levaduras con las muestras de PMMA (Panagoda et al, 2001).

Estas diferencias en la adhesión podrían también estar motivadas por la acción sobre la *Candida albicans* de ciertos componentes de las muestras de PMMA. Así ocurre con algunos productos de los rebases blandos y adhesivos para prótesis que son los responsables de una menor adhesión y una inhibición del crecimiento de *Candida albicans* (Wright, 1980; Nikawa et al, 1994, 1995; Wright et al, 1998; Makihira et al, 2001).

Entre estas sustancias relacionadas con un efecto inhibitorio encontramos el dibutilin dilamato, vinil silano o el dimetil ditiocarbamato de zinc (Wright, 1980). En el caso del PMMA no se ha establecido ninguna sustancia concreta, pero el monómero

residual produce diferencias en la carga superficial de la resina que pueden afectar a la adhesión (Verran et al, 1987).

Por tanto la energía de superficie del material donde se adhiere *Candida albicans* juega un papel que no está determinado de forma clara, ya que intervienen otras variables como la energía de superficie del microorganismo y la del medio. Las propias sustancias componentes del material pueden modificar el grado de adherencia, y así mismo la adherencia también varía cuando se somete al polímero a un número elevado de ciclos térmicos, posiblemente por modificación de sustancias residuales (Anil et al, 2001; Nikawa et al, 2001 A, B).

La posible importancia de estos factores en la adhesión de *Candida albicans* es superada cuando interviene la rugosidad de la superficie y la película proteica adquirida dependiente de la saliva.

# **VI. CONCLUSIONES**

# VI. CONCLUSIONES.

1. La falta de protocolos establecidos para la determinación de la adhesión de *Candida albicans* a PMMA hace muy difícil la comparación y valoración de resultados obtenidos de los distintos estudios realizados.
2. Para una superficie de igual rugosidad, las muestras de distintos tipos de PMMA revelan diferencias de adhesión de *Candida albicans* por mm<sup>2</sup> que son estadísticamente significativas.
3. Las diferencias de adhesión de *Candida albicans* a los distintos tipos de resinas acrílicas se ponen de manifiesto tanto por el método de recuento por microscopio de fluorescencia como por el recuento mediante cámara de centelleo.
4. Ambos métodos coinciden en las diferencias de adhesión obtenidas, pero muestran discrepancias estadísticamente significativas en la apreciación cuantitativa del número de *Candida albicans* por mm<sup>2</sup>.
5. Las variaciones en la composición de los distintos tipos de PMMA no afectan de forma importante a su energía de superficie y por lo tanto no se podría imputar las variaciones de adhesión de *Candida albicans* a este factor.
6. Con ninguno de los dos métodos empleados para determinar la adhesión de *Candida albicans* a los distintos tipos de PMMA, se ha podido establecer una relación entre la adhesión de *Candida albicans* y la energía de superficie de las muestras de PMMA.
7. Estos resultados obtenidos “in vitro” indican que existen en el mercado ciertos tipos de PMMA que, por tener menor adhesión de *Candida albicans*, podrían ser empleados en individuos susceptibles de desarrollar una estomatitis protésica.

## **VII. ICONOGRAFÍA**

# VII. ICONOGRAFÍA.

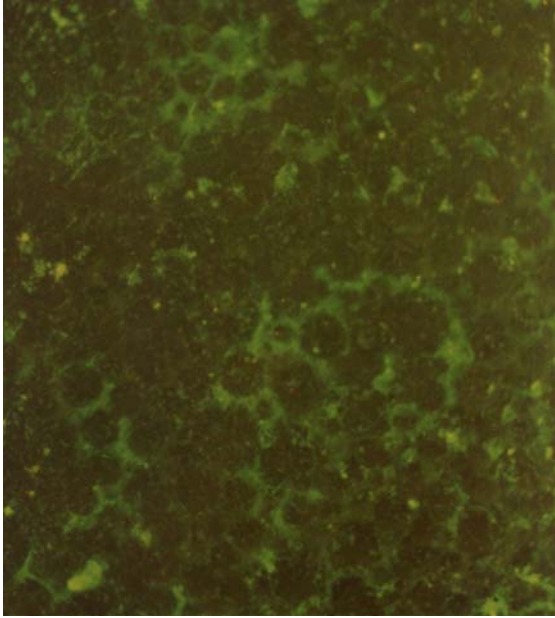


Imagen 1.  
Estructura esférica del PMMA vista con  
microscopio de fluorescencia (400 x).

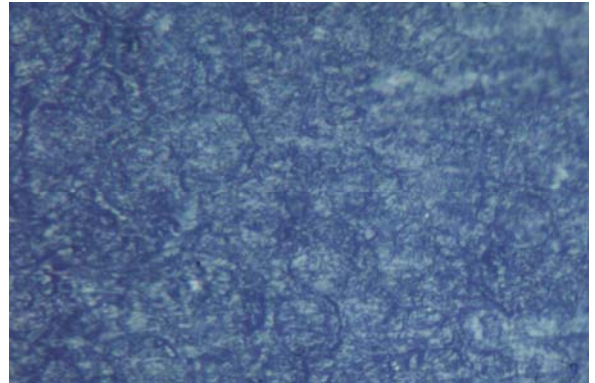


Imagen 2.  
Estructura esférica del PMMA vista con  
microscopio metalográfico (400 x).

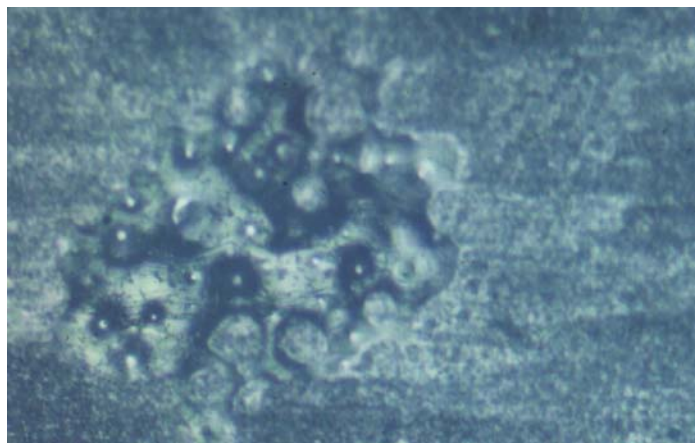


Imagen 3.  
Poro superficial en muestra de PMMA observado  
con microscopio metalográfico (400 x).



Imagen 4.  
Microscopio óptico de fluorescencia.



Imagen 5.  
Goniómetro analizador de ángulos de contacto.



Imagen 6.  
Contador de centelleo.

Imagen 7.  
Muestras de PMMA





Imagen 8.  
Máquina de electrovacío necesaria para la  
polimerización de la resina Vacalon®.



Imagen 9.  
Máquina de temperatura y presión para la  
polimerización de PMMA de vertido.



Imagen 10.  
Detalle de gradilla y tubos para  
depositar las muestras de PMMA y  
realizar recuento en cámara de  
centelleo.





Imagen 11.  
Detalle de micropipeta,  
deposita una gota de líquido  
sobre la muestra de PMMA.

Imagen 12.  
Ajuste de la horizontal del  
goniómetro de contacto.

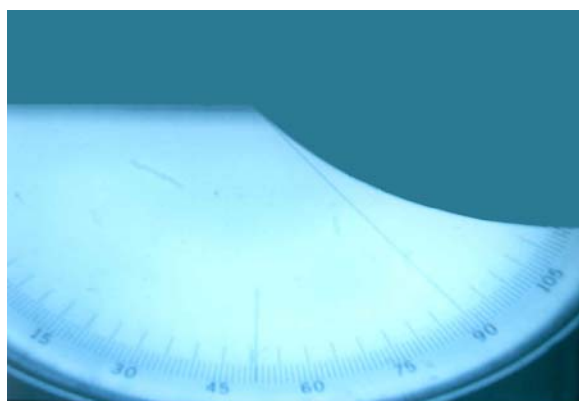
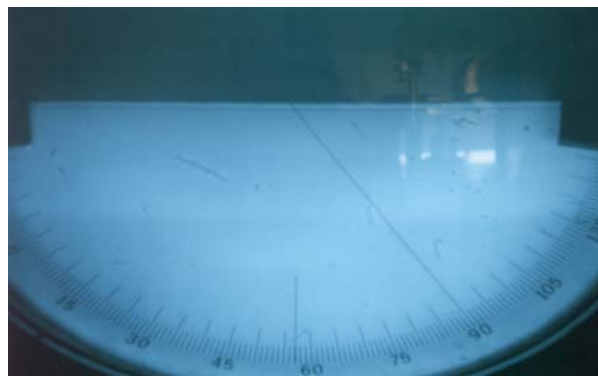


Imagen 13.  
Gota de agua sobre muestra  
de PMMA, se puede observar  
la tangente ajustada al ángulo  
de contacto.

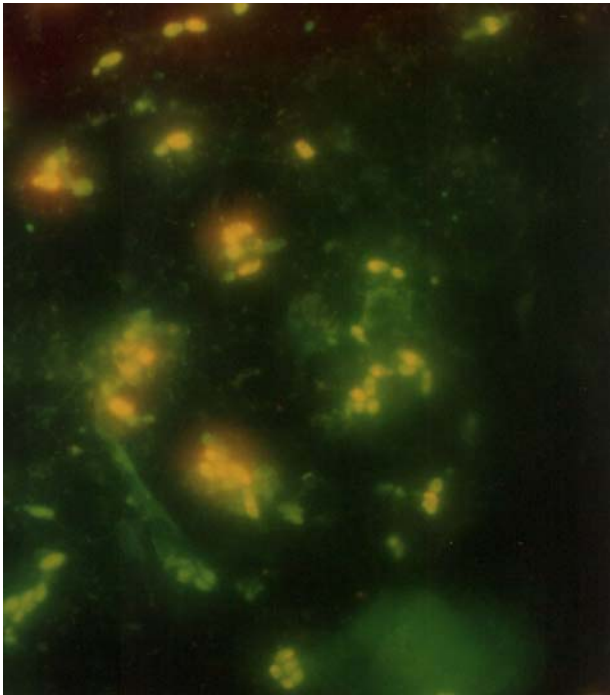


Imagen 14.  
*Candida albicans* vista con  
microscopio óptico de  
fluorescencia, tinción con naranja  
de acridina, obsérvese cómo  
tienden a agruparse (400 x).

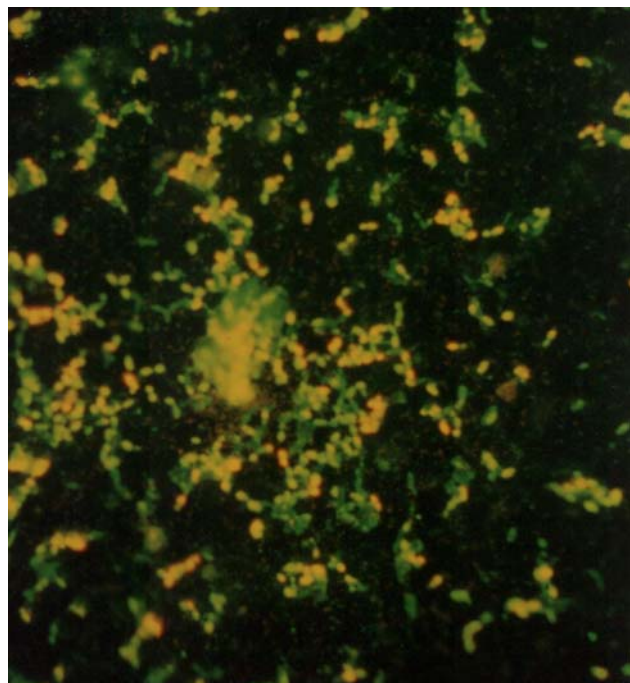


Imagen 15.  
*Candida albicans* en  
disposición arracimada, visión  
con microscopio de  
fluorescencia, tinción con  
naranja de acridina (200 x).

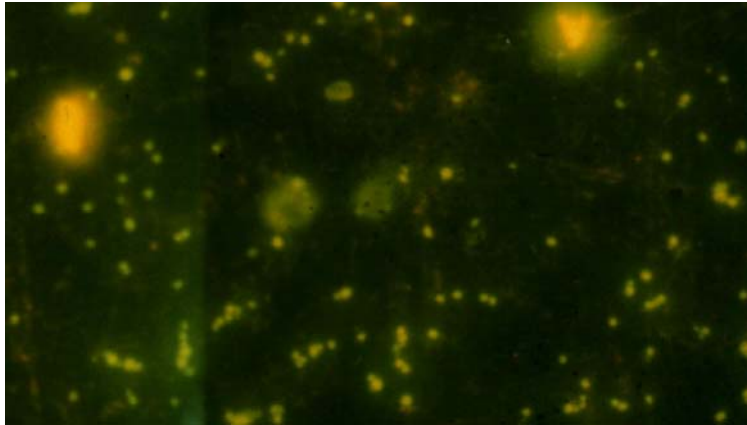


Imagen 16.  
Muestra de PMMA donde se puede observar, mediante microscopio de fluorescencia y tinción con naranja de acridina, una adhesión media de *Candida albicans*, pero donde existen dos puntos con grupos arracimados tridimensionales (400 x).

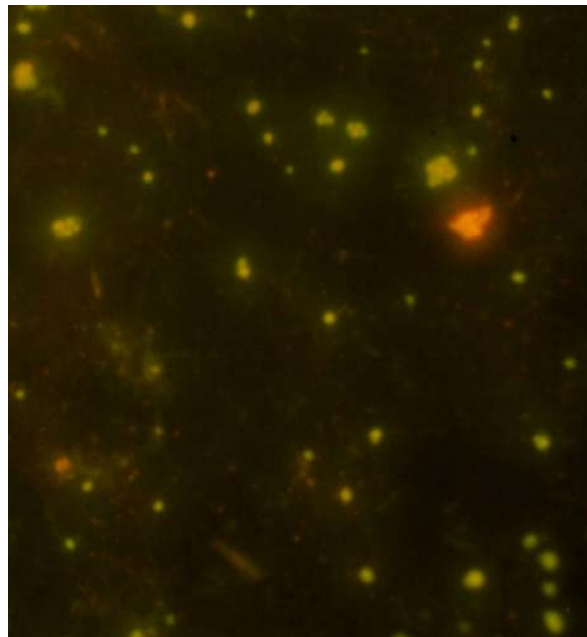


Imagen 17.  
Muestra de PMMA donde se evidencia, mediante microscopio de fluorescencia y tinción con naranja de acridina, poca adhesión de *Candida albicans* (400 x).

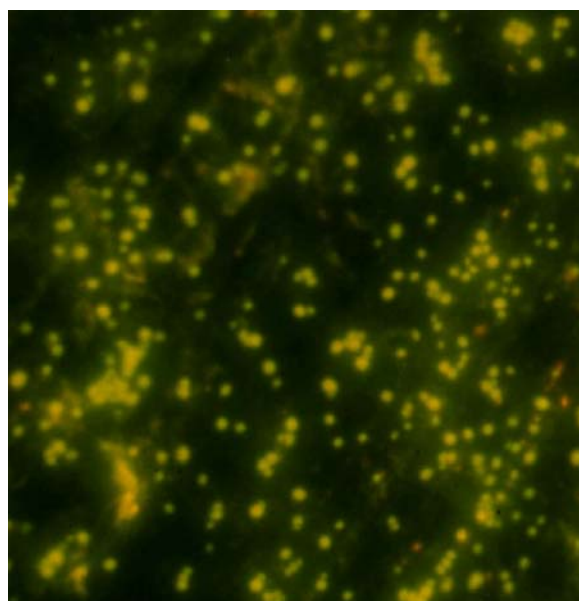


Imagen 18.  
Muestra de PMMA donde se observa, mediante microscopio de fluorescencia y tinción con naranja de acridina, elevada adhesión de *Candida albicans* (400 x).

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

## VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Abu Elteen K.H., Abu Elteen R.M.** The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. *New Microbiol* 1998; 21:41-8.
- Aguirre J.M., Zamacona J.M., Kutz R., Echebarria M.A.** Estomatitis protética. II. Aspectos histopatológicos, diagnósticos y terapéuticos. *Rev Act Odonto-Estomatol* 1990; 50: 31-37.
- Aguirre J.M., Verdugo F., Zamacona J.M., Quindós G., Pontón J.** Cytological changes in oral mucosa in denture stomatitis. *Gerodontol* 1996; 13: 10-3.
- Allison R.T., Douglas W.H.** Micro-colonization of the denture-fitting surface by *Candida albicans*. *J Dent* 1973; 1: 198-201.
- Anil S. Ellepola A.N.B., Samaranayake L.P.** The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Dis* 2001; 7: 119-22.
- Arendorf T.M., Walker D.M.** Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil* 1987; 14: 217-27.
- Axell T., Samanarayake L.P., Reichart P.A., Olsen I.** A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol* 1997; 84: 111-12.
- Bagán J.V., Ceballos A., Bermejo A., Aguirre J.M., Peñarrocha M.** *Medicina Oral*. Barcelona: Ed. Masson S.A.; 1995. P 154-155.
- Bascones A., Llanes F.** *Medicina Bucal*. Tomo II. Madrid 2ª Edición: Ed. Avances Médicodentales S.L.; 1996. P 686-687.
- Bascones A., Manso F.J., Campo J.** Candidosis orofaríngea. Diagnóstico y tratamiento. Madrid: Ed. Avances Médicodentales S.L.; 1999. P 36-38.
- Bergendal T.** Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1-year follow-up study. *Scand. J Dent Res* 1982; 90: 227-38.
- Bergendal T., Isacson G.** A combined clinical, mycological and histological study of denture stomatitis. *Acta Odontol. Scand.* 1983; 41: 33-44.
- Bermejo Fenoll A.** *Medicina Bucal Vol. I*. Madrid: Ed. Síntesis S.A.; 1998. P 139-51.

- Blanco Carrión A., López López J., Beiro Fuentes R., Gándara Rey J. M., Chismenos-Kütsner E.** La candidosis oral (I). Concepto y etiopatogenia. *Odonto Estomatol Práctica Clin* 1999; 2: 31-41.
- Bollen M. L., Lambrechts P.** Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of literature. *Dent Mat* 1997, 13; 258-69.
- Budtz-Jørgensen E., Bertram U.** Denture stomatitis I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontol Scand* 1970; 28: 71-92.
- Budtz-Jørgensen E.** The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res* 1974; 2: 151-90.
- Budtz-Jørgensen E., Theilade E. (A)** Regional variations in viable bacterial and yeast counts of 1-week-old denture plaque in denture-induced stomatitis. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 288-95.
- Budtz-Jørgensen E., Theilade E., Theilade J. (B)** Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 134-42.
- Burns D.R., Burns D.A.** Response of processed resilient denture liners to *Candida Albicans*. *J Prosthet Dent*, 1987; 57: 507-12.
- Calderone R.A.** Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends in Microbiol* 1998; 4: 55-56.
- Cannon R.D., Nand A., Jenkinson H.F. (A)** Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiol* 1995; 141: 213-19.
- Cannon R.D., Holmes A.R., Mason A. B., Monk B.C. (B)** *Oral Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis?. *J Dent Res* 1995; 7: 1152-61.
- Cannon R.D., Chaffin W.L.** Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10: 359-83. Review.
- Caycik S., Jagger R.G.** The effect of cross-linking chain length on mechanical properties of a dough-molded poly(methylmethacrylate) resin. *Dent Mater* 1992; 8: 153-57.
- Ceballos A., González-Moles M.** Estomatitis por prótesis. Su relación con la *Cándida Albicans*. *Av Odontoestomatol* 1990; 6: 151-54.
- Ceballos A., Urquía M., Jiménez M.** Estudio sobre la posible influencia de la diabetes en la aparición de la candidiasis bucal y de lesiones de aspecto liquenoide. *Av Odontoestomatol* 1991; 7: 683-86.

- Challacombe S. J.** Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 202-10.
- 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.
- Chimenos E., López J., Blanco A., Gándara J.M.** Infecciones micóticas en odontoestomatología. *Arch Odontoestomatol* 2000; 16: 497-507.
- Davenport J.C.** The denture surface. *Br Dent J* 1972; 133: 101-5.
- Davenport J.C.** The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Br Dent J* 1970; 18: 151-56.
- Delvin H., Watts D.C.** Acrylic allergy? *Br Dent J* 1984; 157: 272-75.
- Douglas L.J., Houston J.G., McCourtie J.** Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells after growth on different carbon sources. *FEMS Microbiol Lett* 1981; 12: 241-3.
- Edgerton M., Levine M.J.** Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent* 1992; 68: 683-91.
- Edgerton M., Scannapieco F.A., Reddy M.S., Levine M.J.** Human Submandibular-Sublingual Saliva Promotes Adhesion of *Candida albicans* to Polymethylmetacrilate. *Infect Immun* 1993; 61: 2644-52.
- Egusa H., Ellepola A.N., Nikawa H., Hamada T., Samaranayake L.P.** Exposure to subtherapeutic concentrations of polyene antifungals suppresses the adherence of *Candida* species to denture acrylic. *Chemotherapy* 2000; 46 (4): 267-74.
- Ellis B., Souza A.A.** The structure and surface topography of acrylic denture base materials. *J Dent* 1980; 8: 102-8.
- Epstein J.B., Kimura L.H., Menard T.W., Truelove E.L., Pearsall N.N.** Effects of specific antibodies on the interaction between the fungus *Candida albicans* and human oral mucosa. *Arch Oral Biol* 1982; 27: 469-74.
- Epstein J.B., Truelove E.L., Izutzu T.** Oral Candidiasis: Pathogenesis and Host Defense. *Rev Infect Dis* 1984; 6: 96-102.
- Ettinger R.L.** The etiology of inflammatory papillary hyperplasia. *J Prosth Dent* 1975; 34: 254-61.
- Fernández Bravo L., López Muñoz S., Mañes Ferrer J.F., Selva Otaolaurruchi E. J.** Estomatitis protética: Aspectos etiológicos, patogénicos, diagnósticos y de tratamiento. Puesta al día. *Arch Odontoestomatol* 1998; 14: 467-75.

- Fotos P.G., Vincent S.D., Hellstein J.W.** Oral candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol* 1992; 74: 41-49.
- Frank R.M., Steuer P.** Transmission electron microscopy of plaque accumulations in denture stomatitis. *J Prosth Dent* 1985; 53: 115-24.
- García-Pola M.J., García J.M., Junquera I.M., López J.S.** Candidiasis Oral. *JANO* 1997; 1197: 28-38.
- García-Rodríguez J.A., Picazo J.J.** *Microbiología Médica General*. Madrid: Ed Mosby Doyma; 1996. P 625-628.
- Graig R.G.** *Materiales de Odontología Restauradora*. Capítulo 6: Polimeros y polimerización. 1ª Ed. Mexico: Editorial Harcourt Brace; 1998. P. 127-35.
- Holmstrup P., Axéll T.** Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 57-59.
- Kennedy M.J., Rogers A.L., Hanselmen L.R., Soll D.R., Yancey R.J. Jr.** Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *Mycopathologia* 1988; 102: 149-56.
- Klotz S.A., Drutz D.J.** Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun.* 1985; 50: 97-101.
- Koopmans A.S.F., Kippuw N., Graaf J.** Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. *J Dent Res* 1988; 67: 1246-50.
- Kulak Y., Arikan A., Kazazoglu E.** Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil* 1997; 24: 788-90.
- Kwok D.Y., Gietzelt T., Grundke K., Jacobasch H.J., Neumann A.W.** Contact Angle Measurements and Contact Angle Interpretation. 1. Contact Angle Measurements by Axisymmetric Drop Shape Analysis and a Goniometer Sessile Drop Technique. *Langmuir.* 1997; 13: 239-43.
- Kwok K.Y., Leung A., Lam C.N.C., Li A., Wu R., Neumann A.W.** Low-Rate Dynamic Contact Angles on Poly(methacrylate) and the Determination of Solid Surface Tensions. *J Colloid Interface Sci* 1998; 206: 44-51.
- Lewis E.A., Ogle R.E., Sorensen S.E., Zysik D.A.** Clinical and laboratory evaluation of visible light-cured denture base resins and their application to orthodontics. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1988; 94: 207-14.
- Liébana Ureña J.** *Microbiología Oral*. Características generales de los hongos patógenos humanos. 1ª Ed. Madrid: Mc Graw.Hill Interamericana de España; 1995. P 362-75.



- López López J., Jané Salas E., Chismenos-Kütsner E., Roselló Llabrés X.** Actualización de la candidiasis oral. Arch Odontoestomatol 1997; 13: 259-71.
- Lucas V.S.** Association psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. Community Dent Oral Epidemiol 1993; 21: 313-6.
- Lynch D.** Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78: 189-93.
- Llena Plasencia J.M<sup>a</sup>.** Prótesis completa. 1º Ed. Barcelona: Editorial Labor; 1996. P. 2.
- Macura A.B.** The influence of some antifungal drugs on in vitro adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. Mycoses 1987; 31: 371-6.
- Makihira S., Nikawa H., Satonobu S.V., Jin C., Hamada T.** Growth of *Candida* species on commercial denture adhesives in vitro. Int J Prosthodont 2001; 14: 48-52.
- Maza J.L., Fernández M.P., Elguezal N., Pontón J.** Influencia de la temperatura sobre el grado de adhesión de *Candida Albicans* a resinas restauradoras dentales. Rev Vasca Odonto Estomatol 2001; 11: 24-28.
- McCourtie J., Douglas L.J.** Relationship between cell surface composition of *Candida Albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. Infect Immun 1981; 32: 1234-41.
- McCourtie J., Douglas L.J.** Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*. Infect Immun 1984; 45: 6-12.
- McCourtie J., MacFarlane T.W., Samaranayake L.P.** Effect of saliva and serum on the adherence of *Candida* species to chlorexidine-treated denture acrylic. J Med Microbiol 1986; 21: 209-13.
- McCullough M.J., Ross B.C., Reade P.C.** *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. Int J Oral Maxillofac Surg 1996; 25: 136-44.
- Millsap K.W., Bos R., Van Der Mei H.C., Busscher H.J.** Dot assay for determining adhesive interactions between yeasts and bacteria under controlled hydrodynamic conditions. J Microbiol Methods 2000; 40: 225-32.
- Minagi, S., Miyake Y., Inagaki K., Tsuru H., Suginaka H.** Hydrophobic Interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Adherence to Various Denture Base Resin Materials. Infect Immun. 1985; 47: 11-14.
- Montgomery, Conway, Spector.** Bioquímica. Casos y texto. Mexico: Ed. Harcourt Brace; 1998.P. 475-476.

- Morrow R.M., Brown C.E. Jr, Stansbury B.E., DeLorimier J.A., Powell J.M., Rudd K.D.** Compatibility of alginate impression materials and dental stones. *J Prosthet Dent* 1971; 25: 556-66.
- Navazesh M., Wood G.J., Brightman V.** Relationship between salivary flow rates and *Candida albicans* counts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 80: 2854-58.
- Nair R.G., Samaranayake L.P.** The effect of commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An in vitro study. *J Dent Res* 1994;73:(IADR Abstracts 2313).
- Nater J.P., Groenman N.H., Wakkers-Garritsen B.G., Timmer L.I.H.** Etiologic factors in denture sore mouth syndrome. *J Prosth Dent* 1978; 40: 367-73.
- Newton A.V.** Denture sore mouth, a possible aetiology. *Br Dent J* 1962; 112: 357-60.
- Nikawa H., Chen J., Hamada T., Nishimura M., Polyzois G.** (A) *Candida albicans* colonization on thermal cycled maxillofacial polymeric materials in vitro. *J Oral Rehabil* 2001; 28: 526-33.
- Nikawa H., Hamada T.** Binding of salivary or serum proteins to *Candida albicans* in vitro. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 571-73.
- Nikawa H., Hayashi S.** Interactions between denture lining material, protein pellicles and *Candida Albicans*. *Arch Oral Biol* 1993; 38: 631-34.
- Nikawa H., Iwanaga H., Kameda M., Hamada T.** In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. *J Prosthet Dent* 1992; 68:804-8.
- Nikawa H., Jin C., Hamada T., Makihira S., Kumagai H., Murata H.** (A) Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans* in vitro. Part II. Effects on fungal colonization. *J Oral Rehabil* 2000; 27: 124-30.
- Nikawa H., Jin C., Hamada T., Makihira S., Polyzois G.** (B) *Candida albicans* growth on thermal cycled materials for maxillofacial prostheses in vitro. *J Oral Rehabil* 2001; 28: 755-65.
- Nikawa H., Jin C., Hamada T., Murata H.** (B) Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans* in vitro. Part I. Effects on fungal growth. *J Oral Rehabil* 2000; 27: 41-51.
- Nikawa H., Kotani H., Sadamori S., Hamada T.** Denture stomatitis and ABO blood types. *J Prosthet Dent* 1991; 66: 391-94.

- Nikawa H., Nishimura H., Hamada T., Kumagai H., Samaranayake L. P.** Effects of dietary sugars and saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycopathologia* 1997; 139: 2, 87-91.
- Nikawa H., Nishimura H., Makihira S., Hamada T., Sadamori S., Samaranayake L.P.** (C) Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses* 2000;43:139-43.
- Nikawa H., Nishimura H., Yamamoto T.** Role of denture pellicles in *Candida albicans* biofilm development in vitro. *J Dent Res* 1995; 74: 371.
- Nikawa H., Yamamoto T., Hayashi S. Nikawa Y., Hamada T.** Growth and/or acid production of *Candida albicans* on soft lining materials in vitro. *J Oral Rehabil* 1994; 4: 585-94.
- Okita N., Orstavik D.** In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. *Dent Mat* 1991; 7: 155-60.
- Olsen I.** Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol Scand.* 1974; 32: 329-33.
- Olsen I., Haanaes H.R.** Experimental palatal candidosis and saliva flow in monkeys. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 134-41.
- Olsen I.** Oral adhesion of yeast. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48: 45-53.
- Ostlund S.G.** The effect of complete dentures on the gum tissues. *Acta Odontol Scand* 1958; 16: 1-43.
- Panagoda G.J., Ellepola A.N., Samaranayake L.P.** Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001; 44: 29-35.
- Poirier Aldea C., Chimenos Küstner E., Ferrer Benaiges M., López López J., Caballero Herrera R.** Importancia de los factores predisponentes en la candidiasis bucal. *Med Oral.* 1997; 2: 21-37.
- Pontón J., Bikandi J., Moragues M.D., Arilla M.C., Elósegui R., Quindós G., et al.** Reactivity of *Candida albicans* Germ Tubes with Salivary Secretory IgA. *J Dent Res* 1996; 75: 1979-85.
- Pumarola A., Torres A.R., García J.A., Piedrón G.** *Microbiología y Parasitología Médica.* 1ª Ed. Barcelona: Ed. Salvat; 1985. P 733-737.
- Quindós G., Pontón J.** Candidiasis de la cavidad oral, etiología. *Med Oral* 1996; 2: 21-31.

- Quirynen M., Bollen M.L.** The influence of surface roughness and surface-free energy on supra-and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 1-14.
- Radford D.R., Radford J.R.** A SEM study of denture plaque and oral mucosa of denture-related stomatitis. *J Dent* 1993; 21: 87-93.
- Radford D.R., Challacombe S.J., Walter J.D.** Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 99-116.
- Radford D.R., Sweet S.P., Challacombe S.J., Walter J.D.** Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent* 1998; 26: 577-83.
- Ramage G., Vande Walle K., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L.** Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3234-40.
- Reisbick M.H.** Materiales dentales en O. Clínica. Mexico: Ed. El Manual Moderno; 1985. P 287-296.
- Rodney D. Phoenix.** Materiales para base de dentaduras. *Clín Odontol Norteam* 1996; Vol 1: 119-26.
- Romero M.J., Rodriguez Armijo A., López M.J., Guerrero J.A., Martín E.** Estudio microbiológico de *Candida* SP en la estomatitis protésica respecto a grupos controles. *Av. Odontoestomatol* 1997; 13: 57-61.
- Sadamori S., Kotani H.** The usage period of dentures and their residual monomer contents. *J Prosth Dent* 1992; 68: 374-76.
- Sakki T.K., Knuuttila M.L., Läärä E., Anttila S.S.** The association of yeasts and denture stomatitis with behavioral and biologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84: 624-29.
- Samaranayake L.P., MacFarlane T.W.** Factors affecting the in-vitro adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. *Arch Oral Biol* 1982; 27: 869-73.
- Samaranayake L.P., MacFarlane T.W.** (A) An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980; 25: 603-9.
- Samaranayake L.P., McCourtie J., MacFarlane T.W.** (B) Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980; 25: 611-15.

- Samaranayake L.P.** Nutritional factors and oral candidosis. *J Oral Pathol* 1986; 15: 61-5.
- Sandin R.L.** The attachment to human buccal epithelial cells by *Candida albicans*: an in vitro kinetic study using concanavalin A. *Mycopathologia* 1987; 98: 179-84.
- San Millán R., Ezkurra P., Quindós G., Robert R., Senet J.M., Pontón J.** Effect of monoclonal antibodies directed against *Candida albicans* cell wall antigens on the adhesion of the fungus to polystyrene. *Microbiology* 1996; 142: 2271-77.
- Scheld W.M., Calderone R.A., Brodeur J.P., Sande M.A.** Influence of preformed antibody on the pathogenesis of experimental *Candida albicans* endocarditis. *Infect Immun* 1983; 40: 950-5.
- Sentandreu M., Nieto A., Iborra A., Elorza M.V., Pontón J., Fonzi W.A., et al.** Cloning and Characterization of *CSP37*, a Novel Gene Encoding a Putative Membrane Protein of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1997; 179: 4654-63.
- Segal E., Lehrman O., Dayan D.** Adherence in vitro of various *Candida* species to acrylic surfaces. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 66: 670-3.
- Skinner E.W., Phillips R.W.** La ciencia de los materiales dentales. Argentina (Buenos Aires): Ed. Monai; 1970. P 160-178, 179-193 y 194-213.
- Smith G.N., Wright S., Brown D.** Utilización clínica de los materiales dentales. 2ª Ed. Barcelona: Masson S.A.; 1996. P 129-136 y 231-236.
- Sobel J.D., Obedeau N.** Effects of subinhibitory concentrations of ketoconazole in vitro adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol* 1983; 2: 445-52.
- Spiechowicz E., Santarpia R.P., Pollok J.J., Renner R.P.** In vitro study on the inhibiting effect of different agents on the growth of *Candida albicans* on acrylic resin surfaces. *Quintessence Int* 1990; 21: 35-40.
- Tarbet W.J.** Denture plaque: Quiet destroyer. *J Prosth Dent* 1982; 48: 647-52.
- Tejerina Lobo J.M., Bagan Sebastián J.V., Ramón Muñiz J.** La estomatitis por prótesis dental: consideraciones etiopatogénicas y terapéuticas. *Av. Odontoestomatol* 1989; 5: 263-67.
- Tojo M., Shibata N., Mikami T., Suzuki M., Suzuki S.** Participation of peptide moieties in adhesive behavior of antigenic mannans of *Candida albicans* to the plastic microtiter plate in enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem* 1987; 33: 1925-8.

- Tronchin G., Bouchara J-P., Robert R., Senet J-N.** Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. *Infect Immun* 1988; 56: 1987-93.
- Ueta E., Osaki T., Yoneda K., Yamamoto T.** Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 168-74.
- Vallittu P., Miettinen V.** Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dent Mat* 1995; 11: 338-42.
- Vasilas A., Molina L.** The influence of morphological variation on *Candida Albicans* adhesion to denture acrylic *in vitro*. *Arch Oral Biol* 1992; 37:613-22.
- Vega del Barrio J.M<sup>a</sup>.** Materiales en Odontología. Fundamentos biológicos, clínicos, biofísicos y físico-químicos. 1<sup>a</sup> Ed Barcelona: Editorial Avances; 1996. P 222-232 y 279-289.
- Verran J, Grant A.A.** Studies on the adherence of *Candida albicans* to opaque denture materials. *J Dent Res* 1984; 63: 269.
- Verran J. Motteram K.L.** The effect of adherent oral streptococci on the subsequent adherence of *Candida albicans* to acrylic *in vitro*. *J Dent* 1987; 15: 73-6.
- Verran J., Maryan C.J.** Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997; 77: 535-9.
- Virga C., Cornejo L.S., Calamari S.E., Bojanich A., Landa C., Beltramo D., et al.** Efecto de polímeros en la agregación y adherencia sobre hidroxiapatita de cepas autóctonas de *St. Mutans* y *C Albicans*. *Rev Vasca Odonto Estomatol* 2001; 11: 30-9.
- Vitkov L., Weitgasser R., Lugstein A., Noack M.J., Fuchs K., Krautgartner W. D.J.** Glycaemic disorders in denture stomatitis. *Oral Pathol. Med* 1999; 28:406-9.
- Voet D., Voet J.G.** Bioquímica. Barcelona: Ed Omega; 1992. P 867.
- Vudhichamnong K., Walher D.M., Ryley H.C.** The effect of secretory immunoglobulin A on the *in vitro* adherence of the yeast *Candida albicans* to human oral epithelial cells. *Arch Oral Biol* 1982; 27: 617-21.
- Waltimo T., Tanner J., Vallittu P., Haapasalo M.** Adherence of *Candida albicans* to the Surface of Polymethylmetacrylate-E Glass Fiber Composite Used in Dentures. *Int J Prosthodont* 1999; 12: 83-6.
- Warnakulasuriya K.A.A.S., Samaranayake L.P., Peiris J.S.M.** Angular cheilitis in a group of Sri Lankan adults: a clinical and microbiologic study. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 172-75.

- Waters M.G.J., Williams D.W., Jagger R.G., Lewis M.A.O.** Adherence of *Candida albicans* to experimental denture soft lining materials. *J Prosthet Dent* 1997; 77: 306-12.
- Webb B.C., Thomas C.J.** The effect of sodium hypochlorite on potential pathogenic traits of *Candida albicans* and other *Candida* species. *Oral Microbiol Immun* 1995; 10: 334-41.
- Wilkieson C., Samaranayake L.P., MacFarlane T.W., Lamey P.J., MacKenzie D.** Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 13-6.
- Wright P.S.** The effect of soft lining materials on the growth of *Candida albicans*. *J Dent* 1980; 8: 144-51.
- Wright P.S., Katherine A. Young, Paul D. Riggs, Sandra Parker, Siddugari Kalachandra.** Evaluating the effect of soft lining materials on the growth of yeast. *J Prosthet Dent* 1998; 79: 404-9.
- Yoon K.J., Edgerton M., Levine M.J.** Binding of *Candida albicans* to human saliva and acquired pellicles [Abstract]. *J Dent Res* 1989; 68 (spec iss. No 1389), 355.
- Zamacona J.M., Aguirre J.M., Kutz R., Echebarria R.A.** Estomatitis protética. I. Aspectos clínico-patológicos y etiopatológicos. *Rev Act Odonto-Est* 1990; 393: 87-99.
- Zinsser, Wolfgang K. Joklik, Hilda P. Willett, Bernard D. Amos.** Microbiología. Micología médica. 18ª Edición. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 1986. P 1257-1263 y 1334-1336.