

Susceptibilidad *in vitro* de *Candida albicans* y no *albicans* Aisladas de Prótesis Dentales de Pacientes con Estomatitis Protésica a Tres Sustancias de Desinfección

In vitro Susceptibility of *Candida albicans* and Non-*albicans* Isolated from Dental Prosthesis in Patients with Denture Stomatitis to Three Disinfectants

Diego Michel Castillo Saucedo^{*}; Ma. Concepción Tello Zavala^{**}; Luis Octavio Sánchez Vargas^{*}; Ma. Bertha Gómez Gutiérrez^{**}; Nadya Nava-Zárate^{*} & Saray Aranda-Romo^{*}

CASTILLO, S. D. M.; TELLO, Z. M. C.; SÁNCHEZ, V. L. O.; GÓMEZ, G. M. B.; NAVA-ZÁRATE, N. & ARANDA-ROMO, S. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida albicans* y no *albicans* aisladas de prótesis dentales de pacientes con estomatitis protésica a tres sustancias de desinfección. *Int. J. Odontostomat.*, 9(3):373-377, 2015.

RESUMEN: A pesar del gran número de productos disponibles para la limpieza de prótesis dentales, el 60% de los portadores hace uso de ellos, posiblemente por la situación económica. El objetivo fue determinar la susceptibilidad antifúngica *in vitro* que presenta *Candida* y sus especies a tres sustancias utilizadas para la desinfección de prótesis (hipoclorito de sodio, ácido acético y solución de superoxidación). Se obtuvieron aislados clínicos de *Candida* de pacientes portadores de prótesis diagnosticados con estomatitis protésica, para su posterior estudio de susceptibilidad *in vitro* a las diferentes sustancias. El hipoclorito de sodio al 0,5% mostró *in vitro* una mayor inhibición para las cepas de *Candida albicans* y *Candida no albicans*. El ácido acético y la solución de superoxidación no mostraron inhibición *in vitro* frente a ambas cepas. El hipoclorito de sodio al 0,5% tiene un efecto inhibitorio *in vitro* sobre las cepas de *C. albicans* y *Candida no albicans*.

PALABRAS CLAVE: *Candida albicans*, estomatitis protésica, hipoclorito de sodio.

INTRODUCCIÓN

Cuando se introduce dentro de la cavidad oral una prótesis dental, *Candida* es capaz de adherirse y colonizarla, aumentando su frecuencia a un 66,7% en éstos pacientes (Williams *et al.*, 2011). De acuerdo con varios estudios *in vitro*, la contaminación microbiana de la resina acrílica se produce rápidamente, y las levaduras se adhieren muy bien a la base de la prótesis (Jackson *et al.*, 2014; Koch *et al.*, 2013). Una vez que la *Candida* se adhiere sobre las superficies de éstas y coloniza, es capaz de desarrollar la formación de una comunidad de microorganismos unidos a una superficie y rodeados por una matriz extracelular polisacárida denominada biofilm (Williams *et al.*; Koch *et al.*). La transición de *Candida*, desde un comensal inocuo a organismo patógeno es compleja, y depende tanto de factores locales como sistémicos, que contribuyen al desarrollo de estomatitis protésica (EP), re-

portándose *C. albicans* como el principal agente etiológico en el 71,4% de los casos. La EP también se asocia a la mala higiene de la prótesis, lo que demuestra la importancia de su limpieza empleando métodos mecánicos o químicos (Williams & Lewis, 2000). Existen en el mercado diversos agentes utilizados para la desinfección de las prótesis de bajo costo, como el ácido acético (AC), un líquido astringente que tiene potencial antimicrobiano. Estudios *in vitro* han demostrado que las bajas dosis fungicidas del ácido acético inducen la apoptosis de *C. albicans*. La inmersión total de dentaduras en una solución de AC al 10% o 5% durante la noche, reduce las colonias (cfu/ml) de *Candida* en la saliva, así como la presencia de EP; el efecto de remoción es comparable con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% (Pinto *et al.*, 2008).

* Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

** Laboratorio de Microbiología Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

El NaOCl, actúa como agente anti-fúngico cuando es empleado en solución para sumergir las prótesis en caso de EP, debido a que reduce la capacidad de adhesión de *Candida* a las células epiteliales (Estrela *et al.*, 2013). Ha sido empleado por mucho tiempo como desinfectante protésico, ya que reduce el crecimiento microbiano sobre las superficies de la prótesis. Según estudios (Estrela *et al.*; Davi *et al.*, 2010), la inmersión de la prótesis en 0,5% de NaOCl, durante 5 minutos, es suficiente para eliminar *C. albicans*. Chau *et al.* (1995) establecen que una inmersión de 10 min en NaOCl al 5,25% es efectiva para desinfectar superficies internas y externas del acrílico de la prótesis, sin embargo, debe emplearse una vez a la semana ya que decolora el acrílico y afecta su fuerza de flexión.

También existen agentes desinfectantes de costo elevado por ejemplo la solución electrolizada de súper-oxidación (SSO), una solución con pH neutro al 0,004% (40 ppm) de Cl activo, con un amplio espectro antimicrobiano, esto se atribuye al efecto de oxidación de los grupos sulfhidrilos y aminoácidos de la pared bacteriana, lo que afecta el proceso de respiración y nutrición de los microorganismos, se ha demostrado su eficacia para inactivar *C. albicans* en estudios realizados *in vitro* en los cuales un tiempo de exposición de 30 s fue suficiente para inactivar completamente todas las muestras (Zeng *et al.*, 2011; Ieri *et al.*, 2006).

El objetivo fue evaluar la susceptibilidad antifúngica *in vitro* sobre aislamientos clínicos de *Candida* obtenidos de las superficies de las prótesis dentales a 3 sustancias utilizadas para su desinfección.

MATERIAL Y MÉTODO

Ensayo de susceptibilidad *in vitro*. Se evaluaron soluciones desinfectantes de AC, NaOCl y SSO. Se utilizaron tres aislamientos de *C. albicans* y tres aislamientos de *Candida no albicans*, obtenidos previamente de las prótesis. Para determinar si el aislamiento correspondía a *C. albicans* se realizó la prueba del tubo germinal. Para la tipificación de *Candida no albicans*, se utilizaron placas de CHROMagar® siguiendo las especificaciones del fabricante, como control se emplearon cepas ATCC 24433 y ATCC 90028 de *C. albicans*. Se preparó una suspensión de cada una de las cepas de *C. albicans* y *Candida no albicans*

a una concentración de 0,5 de McFarland utilizando un nefelómetro. Se hicieron diluciones de NaOCl (5,25%) y AC (5%) como sigue: 0,5, 0,25, 0,125 y 0,062% en agua destilada estéril. La SSO se aplicó directamente sobre la placa de agar mediante una pipeta de volumen fijo (20 mL de SSO), debido a las instrucciones del fabricante. Con las diluciones preparadas se impregnaron discos de 6 mm de diámetro de papel filtro (Whatman® 40, Whatman Ltd. England UK) durante 5 min con cada una de las sustancias a evaluar. Cada una de las cepas y aislamientos de *C. albicans* y *Candida no albicans* a evaluar se sembraron en placas de agar dextrosa sabouraud. En cada placa ya inoculada se colocaron los discos de papel impregnados, distribuidos en la parte central de cada placa, como control negativo se colocaron discos impregnados en agua estéril. Las placas se incubaron a 37 °C y luego de 48 h de incubación se midió en milímetros el diámetro total de los halos de inhibición formados alrededor de cada disco.

Se realizó análisis descriptivo de las variables registradas utilizando medidas de tendencia central para las variables continuas y proporciones para las variables nominales.

RESULTADOS

Pruebas de sensibilidad *in vitro* de *C. albicans* y *Candida no albicans* a los diferentes desinfectantes.

El AC y la SSO a las diferentes concentraciones utilizadas no mostraron actividad antifúngica *in vitro* sobre los aislamientos de *C. albicans* y *C. no albicans*, por lo que fueron considerados resistentes. El promedio de las zonas de inhibición (mm) que mostraron las cepas de *Candida albicans*, *no albicans* y cepas ATCC a las diferentes concentraciones de NaOCl se muestran en las Tablas I, II, III respectivamente. El efecto antifúngico del NaOCl sobre los aislamientos de *C. albicans* fue dosis dependiente, mostrando un halo de inhibición mayor a una concentración de 0,5% (27 mm) el cual disminuyó conforme disminuyó la concentración, obteniendo un halo de inhibición de 13 mm a una concentración de 0,062% de NaOCl.

Con respecto a las cepas ATCC se obtuvo un halo de inhibición ligeramente mayor con respecto a *C. albicans* obtenida de prótesis dentales (31,5 mm vs 27 mm) a una concentración de 0,5% de NaOCl. Sin embargo a concentraciones de 0,125% y 0,062% las

Tabla I. Medidas de los halos de inhibición obtenidos de los aislamientos de *C. albicans* provenientes de prótesis dentales a las diferentes concentraciones de NaOCl.

Especies de <i>Candida</i>	Solución desinfectante NaOCl			
	0,5%	0,25%	0,125%	0,062%
<i>C. albicans</i>	32*	19	17	15
<i>C. albicans</i>	24	18	13	11
<i>C. albicans</i>	25	16	10	13
Promedio	27	17,6	13,3	13

*Los números representan los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros.

Tabla II. Medidas de los halos de inhibición obtenidos de los aislamientos de cepas ATCC provenientes de prótesis dentales a las diferentes concentraciones de NaOCl.

Especies de <i>Candida</i>	Solución desinfectante NaOCl			
	0,5%	0,25%	0,125%	0,062%
ATCC24433	28*	27	13	13
ATCC90028	35	13	11	7
Promedio	31,5	20	12	10

*Los números representan los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros.

Tabla III. Medidas de los halos de inhibición obtenidos de *C. no albicans* provenientes de prótesis dentales a las diferentes concentraciones de NaOCl.

Especies de <i>Candida</i>	Solución desinfectante NaOCl			
	0,5%	0,25%	0,125%	0,062%
<i>C. no albicans</i>	19*	13	11	9
<i>C. no albicans</i>	20	14	8	6
<i>C. no albicans</i>	13	11	9	7
Promedio	17,3	12,6	9,3	7,3

*Los números representan los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros.

Tabla IV. Comparación de los halos de inhibición entre *C. albicans*, *C. no albicans* y Cepas ATCC.

Solución desinfectante	Especies de <i>Candida</i>		
	Cepas ATCC	<i>C. albicans</i>	<i>C. no albicans</i>
NaOCl 0,5%	31,5*	27	17,3
NaOCl 0,25%	20	17,6	12,6
NaOCl 0,125%	12	13,3	9,3
NaOCl 0,062%	10	13	7,3

*Los números representan el promedio en milímetros obtenido de cada cepa evaluada.

cepas ATCC mostraron un menor halo de inhibición con respecto a *C. albicans* (12 mm vs 13,3 mm y 10 mm vs 13 mm).

Los halos de inhibición observados sobre las cepas no *albicans* de igual manera fueron dosis dependiente, mostrando un halo de 17,3 mm a una concentración de 0,5% el cual disminuyó a 7,3 mm a una concentración de 0,062%. A todas las concentraciones los halos de inhibición mostraron un menor diámetro con respecto a *C. albicans* y cepas ATCC.

La comparación de los promedios obtenidos de los halos de inhibición de las especies evaluadas se muestra en la Tabla IV. Podemos observar que el efecto antifúngico del NaOCl, fue mayor en las cepas ATCC a las diferentes concentraciones excepto a una concentración de 0,062%, a esta concentración el mayor efecto antifúngico se obtuvo sobre las especies de *C. albicans*. El efecto antifúngico fue medido en base al tamaño de los halos de inhibición de tal forma que se consideró al mayor halo de inhibición que se obtuvo por cada dosis como el efecto antifúngico más eficaz. Con respecto a la susceptibilidad que mostraron las cepas no *albicans* al NaOCl se determinó que fueron las menos sensibles debido a que fueron las que obtuvieron los menores halos de inhibición a las diferentes concentraciones.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo reportamos la susceptibilidad antifúngica *in vitro*, que muestran aislamientos clínicos de *Candida* obtenidos de prótesis dentales a 3 sustancias utilizadas como desinfectantes. En primer lugar determinamos la susceptibilidad antifúngica *in vitro* al AC el cual no presentó ningún halo de inhibición, esto tal vez debido a que las concentraciones utilizadas no fueron las adecuadas para observar el efecto, este mismo fenómeno lo observaron Pinto *et al.*, los cuales reportaron que una solución de AC al 10% no eliminó *C. albicans* de las prótesis. Sin embargo otros estudios *in vitro* han demostrado que dosis bajas del ácido acético son fungicidas, ya que inducen la apoptosis en *C. albicans*, la inmersión total de dentaduras en una solución de AC al 10% o incluso 5% durante la noche, reduce las unidades formadoras de colonia (UFC/ml) de *Candida spp.* en saliva, así como la

presencia de EP. El efecto de remoción de la solución de AC al 5% o 10% es comparable con una solución de NaOCl al 1% (Ali-Jafari *et al.*, 2012).

Por otra parte la SSO con pH neutro en nuestro estudio no mostró inhibición alguna en las cepas de *C. albicans* y no *albicans*, sin embargo publicaciones previas han demostrado su efecto microbicida (Zeng *et al.*; Ileri *et al.*) Por ser producto de aparición reciente, cuenta con escasos reportes en la literatura, son necesarios más estudios para demostrar su eficacia.

Finalmente el desinfectante reconocido como "Estándar de oro" para la desinfección de prótesis colonizadas por *Candida*, es el NaOCl, en este estudio pudimos corroborar su eficacia, ya que mostró la mejor susceptibilidad antifúngica *in vitro*, esto debido a que fueron utilizadas las concentraciones adecuadas, previamente reportadas en la literatura, siendo la concentración al 0,5% la que mostró la mayor eficacia, esto coincide con lo reportado previamente (Skupien *et al.*, 2013) quienes analizaron diversos estudios *in vitro*, en donde se demostró que esta concentración es eficaz para desinfectar la superficies de las prótesis, por otro lado esta misma concentración fue evaluada *in vivo* por de Sousa Porta *et al.* (2013), quienes demostraron su eficacia en la reducción de microorganismos sin causar cambios significativos en el color o la rugosidad de la prótesis. En este sentido, para demostrar el efecto que tiene el NaOCl sobre la resina acrílica de la prótesis, McNeme *et al.* (1991) mostraron que no existen cambios de color en las resinas acrílicas después del uso de NaOCl en distintas concentraciones (0,525%, 1% y 5,25%), en un lapso de 72 h. Orsi & Andrade (2004) reportaron que no hay afectaciones en la fuerza de flexión de la prótesis después de una inmersión en NaOCl al 1%, 2,5% y 5,25%, en un lapso de inmersión de 10 min. Sin embargo debido al sabor y olor desagradable del NaOCl a estas concentraciones tan elevadas, la prótesis debe enjuagarse adecuadamente para remover el producto, además de que existe el riesgo de quemaduras en la mucosa de soporte de la prótesis, por tal motivo es preferible utilizar concentraciones más bajas demostrando su eficacia *in vitro* como lo reportado previamente por Davi *et al.*, donde describe que concentraciones al 1% de NaOCl son desinfectantes sin embargo son suficientes para influir en la estabilidad, color y fuerza de flexión de la prótesis, por lo tanto nosotros demostramos *in vitro* que concentraciones menores al 1% tienen buena actividad antifúngica.

Las cepas ATCC mostraron la mayor eficacia antifúngica, esto debido a que son cepas de referencia las cuales sirven de controles, no obstante los aislamientos recuperados de prótesis dentales debido a las condiciones y edad de las prótesis activan factores de virulencia y capacidades que les permiten su supervivencia a cualquier agente desinfectante, más aún cuando se encuentran en el biofilm (Sánchez *et al.*, 2013). Por otro lado identificamos que las especies sobre las cuales el NaOCl mostró una menor eficacia fueron las *C. no albicans*, esto es de gran relevancia ya que las especies que se aíslan con mayor frecuencia de las prótesis según el estudio realizado por Nayak *et al.* (2012) son las especies de *Candida no albicans*.

Una de las limitaciones de nuestro estudio fue el número de cepas evaluadas y la metodología utilizada ya que al ser un método cualitativo, no permite determinar las concentraciones mínima inhibitorias de las sustancias desinfectantes, una de las expectativas del estudio es evaluar estas sustancias por el método de microdiluciones, con un mayor número de aislamientos y además llevar a cabo ensayos clínicos controlados aleatorizados para demostrar su eficacia *in vivo*. El NaOCl al 0,5% mostró la mejor inhibición *in vitro* contra *C. albicans* y *Candida no albicans*, esta inhibición fue dosis dependiente.

CASTILLO, S. D. M.; TELLO, Z. M. C.; SÁNCHEZ, V. L. O.; GÓMEZ, G. M. B.; NAVA-ZÁRATE, N. & ARANDA-ROMO, S. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* and non-*albicans* isolated from dental prosthesis in patients with denture stomatitis to three disinfectants. *Int. J. Odontostomat.*, 9(3):373-377, 2015.

ABSTRACT: Despite the large number of products available for denture cleaning, less than 60% of denture wearers use them, possibly due to the economic situation. The aims were to determine the *in vitro* anti-fungal susceptibility of *Candida* species to three denture disinfectants (Sodium hypochlorite, acetic acid and super oxidized solution). Clinical isolates were obtained from denture wearers diagnosed with denture stomatitis for its posterior *in vitro* susceptibility study to the different substances. 0.5% Sodium hypochlorite showed the higher *in vitro* inhibitory effect on *Candida albicans* and non-*albicans*. Acetic acid and super oxidized solution showed no inhibition in both species. 0.5% Sodium hypochlorite has an *in vitro* inhibitory effect on *Candida* species.

KEY WORDS: *Candida albicans*, denture stomatitis, sodium hipoclorite.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali-Jafari, A.; Falah-Tafti, A.; Hossein, M.; Zahraei, A. & Kazemi, A. Vinegar as a removing agent of *Candida albicans* from acrylic resin plates. *Jundishapur J. Microbiol.*, 5(2):388-92, 2012.
- Chau, V. B.; Saunders, T. R.; Pimsler, M. & Elfring, D. R. In-depth disinfection of acrylic resins. *J. Prosthet. Dent.*, 74(3):309-13, 1995.
- Davi, L. R.; Peracini, A.; Ribeiro Nde. Q.; Soares, R. B.; da Silva, C. H.; Paranhos, Hde. F. & de Souza, R. F. Effect of the physical properties of acrylic resin of overnight immersion in sodium hypochlorite solution. *Gerodontology*, 27(4):297-302, 2010.
- de Sousa Porta, S. R.; de Lucena-Ferreira, S. C.; da Silva, W. J. & Del Bel Cury, A. A. Evaluation of sodium hypochlorite as a denturecleanser: a clinical study. *Gerodontology*, 32(4):260-6, 2015.
- Estrela, C.; Ribeiro, R. G.; Estrela, C. R.; Pécora, J. D. & Sousa-Neto, M. D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz. Dent. J.*, 14(1):58-62, 2003.
- Ileri, C.; Sezen, Y. & Dimoglo, A. Investigation of the efficacy of electrolyzed acid water on the standard strains of some pathogenic microorganisms. *Mikrobiyol. Bul.*, 40(4):317-24, 2006.
- Jackson, S.; Coulthwaite, L.; Loewy, Z.; Scallan, A. & Verran, J. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *J. Prosthet. Dent.*, 112(4):988-93, 2014.
- Koch, C.; Bürgers, R. & Hahnel, S. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. *Gerodontology*, 30(4):309-13, 2013.
- McNeme, S. J.; von Gonten, A. S. & Woolsey, G. D. Effects of laboratory disinfecting agents on color stability of denture acrylic resins. *J. Prosthet. Dent.*, 66(1):132-6, 1991.
- Nayak, S.; Kavitha, B.; Sriram, G.; Saraswathi, T. R.; Sivapathasundharam, B. & Dorothy, A. L. Comparative study of *Candida* by conventional and CHROMagar method in non-denture and denture wearers by oral rinse technique. *Indian J. Dent. Res.*, 23(4):490-7, 2012.
- Orsi, I. A. & Andrade, V. G. Effect of chemical disinfectants on the transverse strength of heat-polymerized acrylic resins submitted to mechanical and chemical polishing. *J. Prosthet. Dent.*, 92(4):382-8, 2004.
- Sánchez-Vargas, L. O.; Estrada Barraza, D.; Pozos-Guillen, A. J. & Rivas-Caceres, R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Arch. Oral Biol.*, 58(10):1318-26, 2013.
- Skupien, J. A.; Valentini, F.; Boscato, N. & Pereira-Cenci, T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. *J. Prosthet. Dent.*, 110(5):356-62, 2013.
- Pinto, T. M.; Neves, A. C.; Leão, M. V. & Jorge, A. O. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* spp. in complete denture wearers. *J. Appl. Oral Sci. Rev.*, 16(6):385-90, 2008.
- Williams, D. W. & Lewis, M. A. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.*, 6(1):3-11, 2000.
- Williams, D. W.; Kuriyama, T.; Silva, S.; Malic, S. & Lewis, M. A. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol.* 2000, 55(1):250-65, 2011.
- Zeng, X.; Ye, G.; Tang, W.; Ouyang, T.; Tian, L.; Ni, Y. & Li, P. Fungicidal efficiency of electrolyzed oxidizing water on *Candida albicans* and its biochemical mechanism. *J. Biosci. Bioeng.*, 112(1):86-91, 2011.

Dirección para Correspondencia:

Saray Aranda-Romo

Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología

Facultad de Estomatología

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

San Luis Potosí

MÉXICO

Email: aran_sa77@hotmail.com

Recibido : 07-03-2015

Aceptado: 03-10-2015