



Artículo original/Original article

## Evaluación de un antimicrobiano sobre la adhesión de *Candida albicans* a materiales de prótesis dentales

### Evaluation of an antimicrobial on the adhesion of *Candida albicans* to denture materials

Vera Mónica M<sup>1</sup>, Pascualini Carlos J<sup>2</sup>, Bojanich María A<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Odontología. Departamento de Rehabilitación Bucal. Cátedra "B" de Prosthodontia II.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Odontología. Departamento de Biología Bucal. Cátedra de Materiales Dentales.

<sup>3</sup>Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Odontología. Departamento de Biología Bucal. Cátedra "B" de Microbiología e Inmunología.

\*Correspondencia a/Corresponding to:

Dr. María Alejandra Bojanich

Cátedra "B" de Microbiología e Inmunología

Departamento de Biología Bucal.

Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba.

Pabellón Argentina, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina.

Correo electrónico/e-mail: mariaalejandraboja@gmail.com

DOI: 10.25014/revfacodont271.2023.33.3.3

<https://revistas.unc.edu.ar/index.php/RevFacOdonto>

Received 28 October 2022; Received in revised form 12 December 2022 Accepted 1 June 2023

**Citation:** Vera MM, Pascualini CJ, Bojanich MA. Evaluación de un antimicrobiano sobre la adhesión de *Candida albicans* a materiales de prótesis dentales. Rev Fac Odont (UNC). 2023; 33(2):3-8.

#### Abstract

**Objective:** to evaluate the effect of AlphaSan® on *C. albicans* adhesion to acrylic and polyamide resins. **Methods:** 2 x 2 mm squares were made with acrylic resin (AR) and polyamide resin (PR). Four study groups (n=12) were established: Group A: AR without AlphaSan®, Group B: AR with AlphaSan®, Group C: RP without AlphaSan®, Group D: RP with AlphaSan®. All groups were incubated in BHI broth with *C. albicans* ATCC at 36°C for 48 hours. Quantification of fungal adherence was performed by confocal microscopy (CM) and by means of an aqueous solution of crystal violet (CV), measuring the absorbance at 570 nm. **Results:** In the quantification of *C. albicans* adherence with CM, a 50% decrease (p =0.03) was observed between the treated groups (B and D) in relation to those not treated with AlphaSan® (A and C). No significant difference in *C. albicans* adherence was found between groups B and D (p > 0.5). *C. albicans* adherence, by CV, decreased by 55% (p= 0.01) in AR with AlphaSan® compared to AR without AlphaSan®. On the other hand, it was observed that fungal adherence decreased by 61% (p=0.01) in RP with AlphaSan® compared to RP without AlphaSan®. No significant difference was observed between the samples treated with the antifungal studied (p >0.05). **Conclusion:** Fungal adherence to the materials treated with AlphaSan® was limited to 50%, this would be due to the fact that the fungus presents a rigid cell wall (glucans and chitin), which provides a physical barrier for the penetration of different compounds. Consequently, it could be assumed that AlphaSan® would act on the cell wall, which would result in 50% of the fungi being able to adhere to the dental materials.

**Key words:** dental materials, AlphaSan®, *Candida albicans*

## Resumen

Objetivo: evaluar el efecto de AlphaSan® sobre la adhesión *C. albicans* a resinas acrílicas y poliamidas. Métodos: se realizaron cuadrados de 2 x 2 mm con resina acrílica (RA) y con resina de poliamida (RP). Se establecieron 4 grupos estudios (n=12): Grupo A: RA sin AlphaSan®, Grupo B: RA con AlphaSan®, Grupo C: RP sin AlphaSan®, Grupo D: RP con AlphaSan®. Todos los grupos se incubaron en caldo BHI con *C. albicans* ATCC a 36°C durante 48 horas. La cuantificación de la adherencia fúngica se realizó por microscopía confocal (MC) y mediante una solución acuosa de cristal violeta (CV), midiendo la absorbancia a 570 nm. Resultados: En la cuantificación de la adherencia de *C. albicans* con MC, se observó una disminución del 50% ( $p=0,03$ ) entre los grupos tratados (B y D) en relación a los no tratados con AlphaSan® (A y C). No se encontró diferencia significativa de la adherencia de *C. albicans* entre los grupos B y D ( $p > 0,5$ ). La adherencia de *C. albicans*, mediante CV, disminuyó en un 55% ( $p=0,01$ ) en la RA con AlphaSan® comparada con RA sin AlphaSan®. Por otro lado, se observó que en la RP con AlphaSan® disminuyó la adherencia fúngica en un 61% ( $p=0,01$ ) en relación a la RP sin AlphaSan®. No se observó diferencia significativa entre las muestras tratadas con el antifúngico estudiado ( $p > 0,05$ ). Conclusión: La adherencia fúngica en los materiales tratados con AlphaSan® se limitó a un 50%, esto se debería a que el hongo presenta una pared celular rígida (glucanos y quitina), que proporciona una barrera física para la penetración de diferentes compuestos. En consecuencia, podría suponerse que el AlphaSan® actuaría sobre la pared celular, lo que se traduciría que un 50% de los hongos sean capaces de adherirse a los materiales dentales.

Palabras clave: materiales dentales, AlphaSan®, *Candida albicans*

## Introducción

En odontología, en el área de las prótesis removibles y otras restauraciones dentales, uno de los objetivos de importancia es prevenir la adhesión de microorganismos a estas superficies y su posterior diseminación para evitar la producción de las enfermedades orales<sup>1,2</sup>.

En las personas adultas se observa una elevada prevalencia de edentulismo. Para rehabilitar a estos pacientes, generalmente se confeccionan prótesis removibles (PR), que constituyen un cuerpo extraño al que se deben adaptar las mucosas y los tejidos blandos. Muchas veces, la higiene deficiente, las porosidades de las superficies, los desajustes y la presión negativa en la zona de contacto prótesis-mucosa favorecen la formación de la biopelícula microbiana, permitiendo la adhesión de microorganismos<sup>3</sup>. La adherencia de especies microbianas a prótesis dentales y a otros materiales de restauración dental y la subsiguiente formación de biopelículas en estas superficies, son factores que contribuyen a las enfermedades orales y sistémicas relacionadas con la biopelícula.<sup>4,5</sup>

En los últimos años se han incrementado las infecciones por el género *Candida*. Las especies de este género, son hongos considerados residentes habituales del microbiota oral. Cuando ocurre un desequilibrio en el ambiente bucal del huésped, el hongo pasa de ser oportunista a patógeno provocando la candidiasis<sup>5</sup>. Dentro de las diferentes especies

de *Candida* se encuentra *Candida albicans* (*C. albicans*). La bibliografía reporta que alrededor de 30% al 50% de las personas son portadoras de este microorganismo y que la tasa aumenta con la edad y en personas que portan prótesis dentales<sup>6</sup>.

Numerosos estudios han establecido una fuerte correlación entre *Candida albicans* y la estomatitis protésica, enfermedad que afecta hasta al 70% de los pacientes con prótesis removibles artificiales<sup>4,5</sup>. *C. albicans* ha sido estudiada en los procesos de adhesión la cual se ha visto influenciada por factores, tales como la rugosidad de la superficie, película salival, la energía libre de la superficie y el tipo de material de la prótesis<sup>7,8</sup>.

En el procesado y manipulación de la masa del polímero de las prótesis dentales se pueden producir ciertos errores como: vaporización del monómero por exceso de temperatura, falta de homogeneidad en el momento de la polimerización y presión inadecuada, dando lugar a la aparición de poros. Estos son aptos para el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos, entre ellos *C. albicans*.<sup>9</sup>

El antimicrobiano AlphaSan® RC 5000 (MillikenChemical) contiene ingredientes activos de fosfato de sodio, plata, hidrógeno y circonio. Es utilizado en la fabricación de materiales plásticos y otros artículos como películas, fibras, materiales poliméricos y cerámicos, a bajos niveles (0.1% a 2.0%) en peso

del producto terminado. El efecto antimicrobiano de la plata se produce por la inactivación de proteínas, el desprendimiento de la pared celular y la condensación del ADN, llevando así a la destrucción celular. AlphaSan® es utilizado en equipos odontológicos (mangueras conductoras de agua) y en envases de plásticos que se encuentran en contacto con alimentos, con el fin de suprimir el crecimiento de bacterias, hongos y algas. Hasta el momento los datos de toxicidad indican que los ingredientes activos del AlphaSan® no son tóxicos para el ser humano <sup>10</sup>. No se ha encontrado en la bibliografía aplicaciones terapéuticas o preventivas de AlphaSan® a nivel odontológico, como potencial material que podría inhibir los microorganismos a nivel bucal y no ser perjudicial para las células humanas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de AlphaSan® sobre la adhesión *C. albicans* a resinas acrílicas y poliamidas.

## Métodos

### *Condiciones de crecimiento y preparación del inóculo*

El estudio fue experimental in vitro. Se utilizó una cepa de referencia de *C. albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection), que se sembró en un medio Agar Sabouraud Glucosado (ASG) (Sigma Aldrich) y se incubó durante 24 horas a 36°C con el fin de que las levaduras se desarrollen completamente <sup>11</sup>.

### *Elaboración de las muestras para el ensayo de adherencia*

Para la elaboración de las muestras se utilizó una resina acrílica convencional termocurada (elaborada por calentamiento a alta temperatura) y una resina de poliamida de alto impacto (elaborada a inyección). El grosor de todas las muestras se estandarizó en 2 mm, lo que representa el grosor medio de la zona central del paladar en la región posterior. Se realizaron muestras en forma de cuadrados de 2x2 mm (n=12), con resina acrílica convencional termocurada (n=6) y con resina de poliamida de alto impacto (n=6). En la elaboración de algunas muestras se adicionó el antimicrobiano AlphaSan® RC 5000 con una concentración de 0,5mg, teniendo en cuenta la etiqueta de su uso (0,1% al 2,0% en peso del producto acabado-

Milliken Chemicals EPA Reg. No. 11631-2). Se establecieron 4 grupos de estudios:

*Grupo A:* 3 cuadrados de resina acrílica termocurada sin AlphaSan®.

*Grupo B:* 3 cuadrados de resina acrílica termocurada con el agregado de AlphaSan®.

*Grupo C:* 3 cuadrados de resina de poliamidas sin AlphaSan®.

*Grupo D:* 3 cuadrados de resina de poliamida con el agregado de AlphaSan®.

Todas las muestras se pulieron hasta conseguir una superficie lisa, utilizando un cepillo blando, piedra pómez y pasta de pulir. Luego se mantuvieron en agua destilada estéril, por dos días para retirar los excesos de monómero que pudieran quedar después de la polimerización. Posteriormente fueron esterilizadas con etanol al 95% y 1 h de iluminación ultravioleta (reticulador UV; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) antes de la inoculación con *C. albicans*.

### *Ensayo de adherencia*

Todas las muestras se incubaron en caldo BHI, con una suspensión de *C. albicans* de  $1 \times 10^8$  UFC/mL (escala de Mc Farland). Las suspensiones se mantuvieron a 36°C durante 48 horas para lograr la adherencia fúngica <sup>11</sup>.

### *Cuantificación de la adherencia de C. albicans*

Las muestras se lavaron 3 veces con PBS (solución buffer fosfato) para remover las células que no lograron adherirse. Luego se fijaron con calor seco a 50°C por 1 hora. La cuantificación se realizó por dos métodos diferentes:

[1]. Microscopía confocal de exploración laser (OLYMPUS LEXT OLS4000) (MCEL). Esto se realizó en el laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X de FAMA-UNC.

[2]. Solución acuosa de cristal violeta (0.1%): se sumergieron las muestras en esta solución, se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y luego se lavaron 3 veces con solución fisiológica estéril. Finalmente se sumergieron en etanol 90%, para remover la mayor cantidad posible de cristal violeta. Se midió la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro UV/Visible (Modelo 3100 PC. Numak). Se estandarizó a 1 la

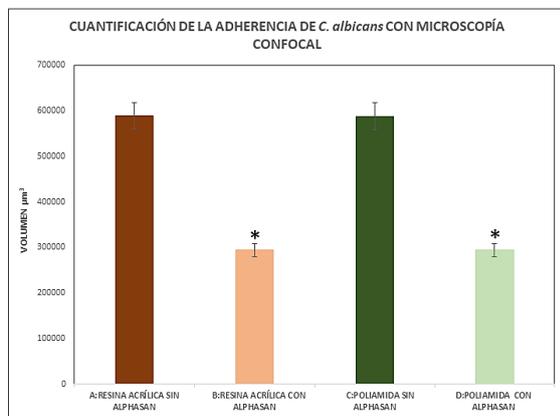
densidad óptica (DO) de las muestras sin AlphaSan®<sup>12</sup>.

**Análisis Estadístico**

Se realizó el test estadístico de Kruskal Wallis, considerando para la significación estadística un  $p < 0,05$ .

**Resultados**

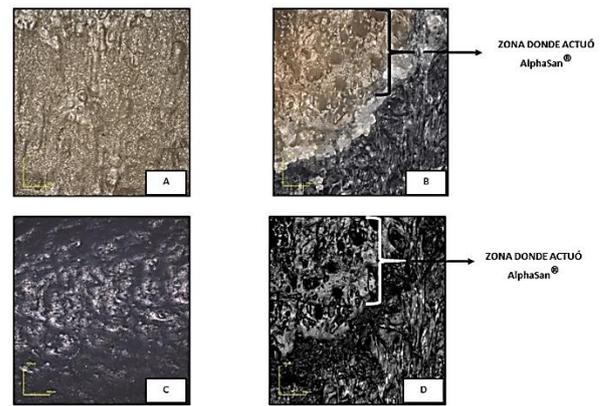
En la cuantificación de la adherencia de *C. albicans* con MCEL, se observó una disminución estadísticamente significativa del 50% ( $p = 0,03$ ) entre los grupos tratados (B y D) en relación a los no tratados con AlphaSan® (A y C) (Fig. 1).



**Figura 1:** \*Adherencia de *C. albicans* en resina acrílica termocurada y poliamida con AlphaSan®. Prueba de Kruskal Wallis considerando la mediana (rango) y un  $p = 0,03$ .

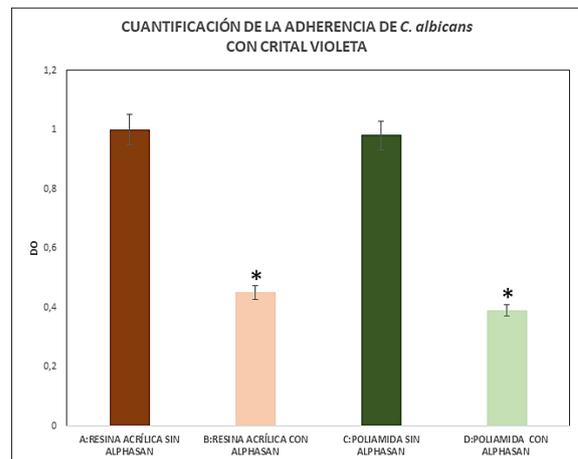
El volumen de la biomasa fúngica adherida fue expresado en  $\mu\text{m}^3$ . No se encontró diferencia significativa de la adherencia de *C. albicans* entre las muestras B y D ( $p > 0,5$ ).

La observación de ambos materiales estudiados mediante MCEL reveló, en las muestras sin AlphaSan® una biomasa fúngica abundante y densa cubriendo toda la superficie de las mismas (Fig. 2. A y C). Mientras que en las muestras tratadas con AlphaSan®, se observó una disminución de la adherencia de *C. albicans* en zonas donde se concentró el anti-fúngico utilizado (Fig. 2. B y D).



**Figura 2:** Muestras sin AlphaSan®: Acrílico termocurado (A) y Poliamida (C). Muestras tratadas con AlphaSan®: Acrílico termocurado (B) y poliamida (D), mediante microscopía confocal de exploración láser 428X.

Con respecto a la valoración de la adherencia de *C. albicans* mediante el ensayo con cristal violeta, se observó que en la resina acrílica termo-curada con el agregado de AlphaSan® disminuyó en un 55% ( $p = 0,01$ ) en comparación de la resina acrílica termocurada sin AlphaSan®. Por otro lado, se observó que en la resina de poliamida con AlphaSan® disminuyó la adherencia fúngica en un 61% ( $p = 0,01$ ) en relación a la resina de poliamida sin AlphaSan®. No se observó diferencia significativa entre las muestras tratadas con el anti-fúngico estudiado ( $p > 0,05$ ) (Fig. 3).



**Figura 3:** \*Adherencia de *C. albicans* sobre resina acrílica y poliamida con AlphaSan®. DO: densidad óptica. Prueba de Wilcoxon: considerando la mediana (rango) y un  $p = 0,01$ .

**Discusión**

Se han señalado diversos mecanismos que promueven la capacidad de adherencia por parte de *C. albicans* a la superficie de acrílico de las

prótesis dentales. Esta adherencia puede suscitarse por intermedio del polímero extracelular fúngico<sup>13</sup>, a través de la capa de fibrillas unida a las manoproteínas de la pared celular fúngica<sup>14</sup> o por intermedio de las proteínas de la saliva<sup>15</sup>. En un estudio de adherencia de *C. albicans*, realizado por Chandra et al., observaron que este microorganismo a partir de las 11 h de inoculación, empieza a aglutinarse en las áreas irregulares de la resina acrílica, lo cual crea reservorios protegidos para el hongo. En nuestro estudio se observaron resultados similares, en nuestras muestras la adherencia fue a las 48 h<sup>14</sup>. En un estudio realizado por Koch et al. se encontró asociación estadísticamente significativa en la proliferación de *C. albicans* según el material que se utiliza para la fabricación de bases de la dentadura ( $p < 0,001$ ). Concluyó que la adherencia y proliferación del hongo no aumenta, necesariamente, en los materiales de base que se someten a temperatura o a ciclos térmicos para la polimerización de la resina<sup>16</sup>. En nuestro trabajo no se obtuvo este tipo de asociación, probablemente debido a la forma de manipular los diferentes materiales estudiados.

En nuestro estudio se observó una disminución de la adherencia fúngica en forma irregular, similar a excavaciones o puntos de perforación en las superficies donde actuó el AlphaSan®.

La adherencia fúngica en los materiales tratados con el antifúngico se limitó a un 50%. Esto se debería a que el hongo presenta una pared celular compuesta aproximadamente por un 80 a 90% de carbohidratos. Además, posee polímeros microfibrilares de glucanos y quitina formando un esqueleto rígido que proporciona una barrera física a la célula para la penetración de diferentes compuestos o para la acción de enzimas degradativas del entorno<sup>17</sup>. En consecuencia, podría suponerse que el AlphaSan® actuaría sobre la pared celular, lo que se traduciría que un 50% de los hongos sean capaces de adherirse a los materiales dentales.

Nuestros resultados presentan algunas limitaciones; habría que evaluar el rendimiento de este anti-fúngico en un período de tiempo determinado en pacientes con prótesis removibles. De este modo se podrían realizar recomendaciones clínicas sobre su uso<sup>18</sup>.

Las proyecciones futuras para continuar este trabajo serían investigar el mecanismo de acción, a nivel celular, del AlphaSan® en relación a la biopelícula formada por *Candida albicans* sobre

diferentes materiales de prótesis dentales y evaluar el efecto del AlphaSan® sobre otras especies de *Candida*.

#### Conflicto de intereses/Conflict of interest

Todos los autores declaran que no existen conflictos potenciales de interés con respecto a la autoría y / o publicación de este artículo.

All authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

#### Referencias

1. Campbell SD, Cooper L, Craddock H, Hyde TP, Nattress B, Pavitt SH, Seymour DW. Removable partial dentures: The clinical need for innovation. *J Prosthet Dent* 2017 ;118(3):273-280.
2. Papadiochou S, Polyzois G. Hygiene practices in removable prosthodontics: A systematic review. *Int J Dent Hyg* 2018;16(2):179-201.
3. Urushibara Y, Ohshima T, Sato M, Hayashi Y, Hayakawa T, Maeda N, Ohkubo C. An analysis of the biofilms adhered to framework alloys using in vitro denture plaque models. *Dent Mater J*. 2014;33(3):402-14.
4. Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. *Med Mycol*. 2018; 1;56(6):653-667.
5. Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun* 2010 ;78(9):3650-9.
6. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol* 2019;13(1):25-32.
7. Lee Muñoz X et al. Ocurrencia de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica antes y después del tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 2015; 8(1):31-37.
8. Bertolini M, Ranjan A, Thompson A, Diaz PI, Sobue T, Maas K, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida albicans* induces mucosal bacterial dysbiosis that promotes invasive infection. *PLoS Pathog* 2019; 22;15(4).
9. Rodríguez Acosta EJ, da Silva PM, Jacobina M, Lara VS, Neppelenbroek KH, Porto VC. *Candida albicans* adherence to denture base material: chemical disinfection and the effect of acquired salivary pellicle formation. *Journal of Prosthodontics* 2014; 24:200-206.
10. Vera M M, Pascualini C J y Bojanich M A. Evaluación Microbiológica de Mangueras de Equipos Odontológicos tratadas con un Bacteriostático. *Rev Fac Odont* 2020; 30 (2) 47- 49.

11. Aslanimehr M, Rezvani S, Mahmoudi A, Moosavi N. Comparison of Candida Albicans Adherence to onventional Acrylic Denture Base Materials and Injection Molding Acrylic Materials. *J Dent (Shiraz)* 2017;18(1):61-64.
12. Atriwal T, Azeem K, Husain FM, Hussain A, Khan MN, Alajmi MF, Abid M. Mechanistic Understanding of Candida albicans Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition. *Front Microbiol* 2021;30-40.
13. Sato M, Ohshima T, Maeda N, Ohkubo C. Inhibitory effect of coated mannan against the adhesion of Candida biofilms to denture base resin. *Dental Materials Journal* 2013; 32(3): 355–360.
14. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM . Biofilm of Candida albicans: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol* 2021;131(1):11-22.
15. Holmes AR, Rodrigues E, van der Wielen P, Lyons KM, Haigh BJ, Wheeler T, Dawes PJD, Cannon RD. Adherence of Candida albicans to silicone is promoted by the human salivary protein SPLUNC2/PSP/BPIFA2. *Mol Oral Microbiol* 2014;29(2):90-8.
16. Koch C, Bürgers R, Hahnel S. Candida albicans adherence and proliferation on the surface of denture base materials. *Gerodontology*. 2013; 30(4):309-13. doi: 10.1111/ger.12056.
17. Gow Neil AR , Latge Jean-Paul , Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr* 2017;5(3).
18. Manzon L, Fratto G, Poli O, Infusino E. Patient and Clinical Evaluation of Traditional Metal and Polyamide Removable Partial Dentures in an Elderly Cohort. *J Prosthodont* 2019;28(8):868-875



**Publisher's Note:** This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution(CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)