

Original

Invasión fúngica en tejido conectivo en pacientes con enfermedad gingivo-periodontal

Nicolás Agustín Rubio, Sebastian Puia, Silvia Toranzo y María Isabel Brusca*

Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 10 de julio de 2011

Aceptado el 5 de julio de 2012

On-line el 21 de julio de 2012

Palabras clave:

Candida

Biopsia

Periodontitis

R E S U M E N

Antecedentes: En los últimos años se ha descrito la presencia de microorganismos inusuales en el biofilm subgingival, posibles iniciadores o contribuyentes a la patogenia de la enfermedad periodontal, particularmente en personas que responden mal a la terapia.

Objetivos: Estudiar la invasión de levaduras del género *Candida* en el tejido conectivo gingival, y su relación con la portación en el biofilm subgingival.

Métodos: Se estudiaron 55 pacientes de ambos sexos, entre 21 y 55 años, con enfermedades gingivo-periodontales, inmunocompetentes, no fumadores y sin tratamiento antimicrobiano previo. Se tomaron muestras de tejidos blandos, de placa supragingival y subgingival, y biopsias de las bolsas periodontales. Se llevaron a cabo estudios microscópicos, cultivos, perfiles de asimilación y amplificación de ADN.

Resultados: En los cultivos realizados, el 35% de las muestras presentaban diferentes especies de *Candida*, con mayor prevalencia de *Candida albicans*. Se evidenció la presencia de hifas invadiendo el tejido conectivo en asociación con microorganismos anaerobios (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) en los pacientes con periodontitis.

Conclusiones: Las distintas especies de *Candida* podrían formar parte de la placa microbiana periodontal y jugar un papel fundamental en la adherencia de la misma a los tejidos, permitiendo la invasión en profundidad. Así también podrían infectar las bolsas de los pacientes con gingivitis, incluso en sitios sanos, cumpliendo un papel de comensal u oportunista.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Fungal invasion of connective tissue in patients with gingival-periodontal disease

A B S T R A C T

Background: In the last few years unusual microorganisms have been isolated from subgingival biofilm, as possible initiators or contributors to periodontal disease, especially in patients who show no improvement during treatment.

Aims: To study the *Candida* invasion of the connective tissue in relation to subgingival biofilm presence.

Methods: A total of 55 immunocompetent patients of both sexes, between 21 and 55 years of age, non-smokers, without previous antimicrobial treatment, suffering periodontal diseases, were studied. Soft tissues, supragingival and subgingival plaque samples, and periodontal pocket biopsies were taken. Microscopic studies, cultures, assimilation profiles, and DNA amplifications were performed.

Results: In 35% of the samples, different species of *Candida* were isolated in cultures, especially *Candida albicans*. Hyphae invasions in the connective tissue were observed, in association with anaerobic microorganisms (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) in patients with periodontitis.

Conclusions: Different species of *Candida* could be part of the periodontal plaque and could play an important role in the adherence to soft tissues, allowing deep invasion. They also could infect gingival pockets in patients with gingivitis, even in healthy locations, playing a commensal or opportunist role.

© 2011 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Keywords:

Candida

Biopsy

Periodontitis

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mariaisabelbrusca@gmail.com (M.I. Brusca).

En los últimos años ha crecido el interés por especies microbianas no halladas comúnmente en el biofilm subgingival, que pueden ser iniciadoras o contribuir a la patogenia de la enfermedad periodontal. Estos microorganismos inusuales pueden hallarse particularmente en pacientes que responden mal a la terapia.

Las enfermedades gingivo-periodontales se asocian a una compleja y diversa microbiota, vinculada a bacterias grampositivas, gramnegativas, microorganismos aerobios, anaerobios y posiblemente levaduras. Dichos microorganismos interactúan entre sí y con el hospedero, y sus mecanismos patogénicos no son conocidos íntegramente².

Candida albicans es la especie de levadura más frecuentemente asociada a estas infecciones. Otras especies emergentes con menor prevalencia pueden encontrarse también en dicha localización^{4,12}.

Para que las levaduras colonizadoras se transformen en patógenas se requieren alteraciones de los mecanismos defensivos del huésped, así como de los factores de virulencia en estos hongos. Las hifas de *Candida* penetran en los tejidos del huésped y se adhieren a su superficie con mayor habilidad en comparación con las formas levaduriformes.

Reynaud et al.¹⁰ postulan que las levaduras actúan en sinergia con bacterias patógenas, muchas de ellas con capacidad de invasión tisular como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. Sin embargo su papel como protagonista en la enfermedad periodontal no está claro. No obstante, su hallazgo en la bolsa gingival y periodontal representa un reservorio favorable para la multiplicación de estos microorganismos que podrían estar implicados en la patogénesis de la destrucción del tejido periodontal. Esto se confirmaría si se pudiera observar penetración de las levaduras en dichos tejidos.

Métodos

Se estudiaron 55 pacientes de ambos sexos, entre 21 y 55 años, con enfermedades gingivo-periodontales. Los pacientes participantes en este estudio eran inmunocompetentes, no fumadores, y no habían recibido ningún tratamiento antimicrobiano previo a la toma de la muestra. Se evaluaron los parámetros clínicos y radiográficos para clasificarlos. El grupo control se estableció con pacientes sin enfermedad gingivo-periodontal. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires.

Los indicadores clínicos se determinaron con sonda periodontal de presión controlada, midiéndose la profundidad al sondaje, la pérdida de inserción y la existencia de hemorragia al sondaje (considerando tras 30 segundos el resultado como positivo –1– o negativo –0).

También se calculó el índice de placa, haciendo la siguiente clasificación: 0: ausencia de depósito de placa; 1: placa descubierta tras pasar la sonda a lo largo del margen; 2: placa visible, y 3: placa abundante. El índice gingival también fue clasificado de la siguiente manera: 0: ausencia total de signos visuales de inflamación; 1: ligero cambio de color y textura; 2: inflamación visual y tendencia al sangrado del margen gingival después de pasar la sonda levemente a lo largo del margen gingival, y 3: inflamación manifiesta con tendencia al sangrado espontáneo. Se delimitó a su vez la ubicación del margen gingival y se verificó la movilidad dentaria con pinza de algodón. Se tomaron radiografías seriadas periapicales de ambos maxilares.

Se clasificaron como pacientes sin enfermedad gingivo-periodontal a aquellos sin hemorragia al sondaje, profundidad de sondaje < 2 mm, pérdida de inserción < 2 mm, sin movilidad, índice

de placa ≤ 1 , e índice gingival ≤ 1 . Los demás pacientes fueron considerados con enfermedad periodontal, que podía ser leve, moderada, o grave de acuerdo con la última clasificación de la Academia de Periodontología¹.

Se indicó la realización de un enjuague con solución estéril de cloruro de sodio al 0,98% antes de la toma de la muestra. Con un hisopo se tomaron muestras de los tejidos blandos, el paladar, la mucosa yugal y la lengua. Este se llevó a un tubo de ensayo con 1 ml de solución estéril de cloruro de sodio al 0,98%.

Se aisló la zona de toma con rollos de algodón y suctor de alta potencia, y con una parte activa de la cureta de Gracey 7/8 se eliminó la placa supragingival. Con la otra parte activa se tomó la muestra subgingival, que se colocó en tubos Eppendorf con 0,5 ml de solución estéril de cloruro de sodio al 0,98% y en medio de transporte VMGA III (Viability Medium Göteborg, preparado en anaerobiosis y esterilizado, que mantiene la viabilidad de los microorganismos sin permitir su multiplicación)⁵. Se llevaron a cabo estudios microscópicos en fresco y coloraciones de Giemsa y Gram. Las levaduras se cultivaron en medio cromógeno diferencial (CHROMagar *Candida*[®] BD, París, Francia) y se incubaron a 37 °C durante una semana. Las diferentes especies se identificaron de acuerdo con el color que desarrollaron en el medio cromógeno, observándose la presencia de una o más especies. Se observó la micromorfología en agar leche 1%-Tween 80 y se realizó una prueba de asimilación de hidratos de carbono por el sistema comercial API[®] ID 32D. Además, a las especies que desarrollaron color verde en el medio cromógeno se les realizó una prueba de asimilación de xilosa, y crecimiento a 45 °C. A los aislamientos con la identificación presuntiva de *Candida dubliniensis* se les realizó extracción de ADN para, posteriormente, amplificar con iniciadores específicos de especie.

Se sembraron 20 μ l de las muestras provenientes del VMGA III en agar sangre lacada y otros 20 μ l en medio triptona soya vancomicina-bacitracina para evaluar la presencia de *A. actinomycetemcomitans*. Las placas para anaerobios se incubaron en System Anaerocult[®], Merck, durante 7 días a 36 \pm 1 °C.

En la siguiente sesión se tomaron biopsias de las bolsas combinadas, incidiendo 2 mm supragingivales. Dichas muestras fueron colocadas en formol al 10% y en solución tampón de fosfatos (pH 7,4). Estas últimas se trituraron en mortero y luego fueron sembradas. Se efectuaron las mismas técnicas microbiológicas que las descritas para las muestras tomadas de las bolsas subgingivales. Con las muestras provenientes del formol, se realizaron técnicas con coloraciones de PAS, tricrómica de Masson y hematoxilina-eosina (figs. 1 y 2).

Resultados

Todas las periodontitis graves fueron positivas para *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis* y *Candida*. Destacaba la presencia de *C. albicans*, *Candida krusei*, y la aparición de otras dos especies en un mismo paciente: *Candida guilliermondii* y *Candida parapsilosis*. Estas especies fueron las menos frecuentes en los casos de invasión de tejidos en los cortes histológicos (fig. 3).

La mayor cantidad de cultivos positivos provenían de las muestras tomadas con hisopo, después las de bolsa y luego las de biopsia. Todos los pacientes con cultivo positivo en biopsia presentaron cultivo positivo en bolsa, excepto uno (paciente con periodontitis moderada).

La invasión fúngica tisular se asoció con las formas más graves de la enfermedad periodontal. Las biopsias evidenciaron presencia de levaduras en 15 pacientes, y también de seudomicelios en 6 de ellos (pacientes con periodontitis grave o moderada) (figs. 4–6). Al mismo tiempo, se recuperó *P. gingivalis* en 10 de las

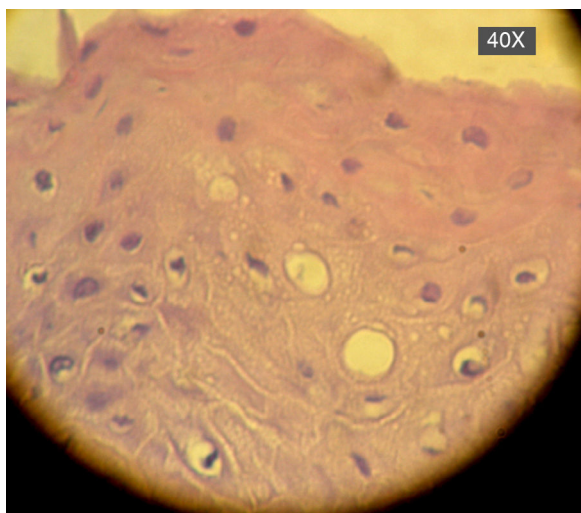


Figura 1. Observación de tejido gingival con tinción de hematoxilina-eosina en un paciente sano.

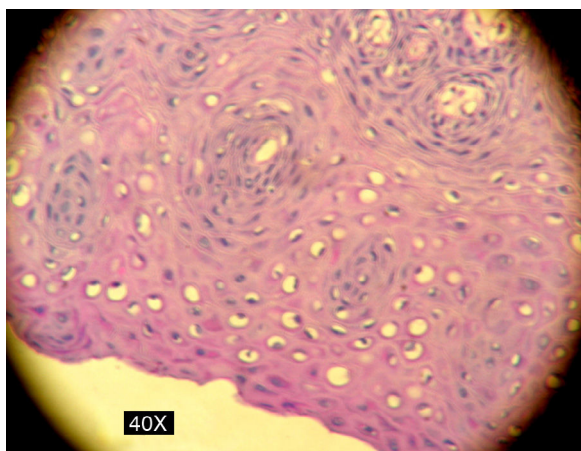


Figura 2. Tejido gingival de paciente sano (tinción de PAS).

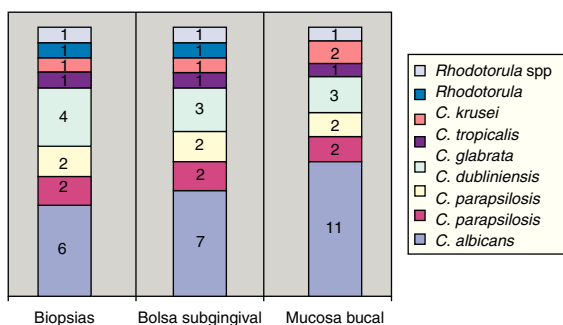


Figura 3. Distribución de aislamientos de cada especie según el sitio.

biopsias estudiadas, *P. intermedia* en 11 de ellas y *A. actinomycetem-comitans* en 3 casos (fig. 7).

En general, los hallazgos clínicos, microbiológicos e histopatológicos de los pacientes con enfermedad periodontal infectados con *Candida* no difieren significativamente de los de aquellos enfermos y no infectados. La histología de las muestras fue típica, con un infiltrado inflamatorio inespecífico, similar al que se encuentra cuando existen formas miceliales, y la observación en ocasiones

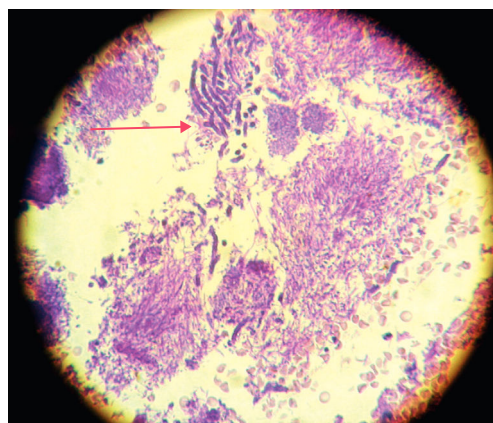


Figura 4. Levaduras y pseudomicelios presentes en el biofilm subgingival de un paciente con periodontitis grave (corte de tejido gingival, tinción con hematoxilina-eosina, 40X). La flecha señala pseudomicelios de *Candida*.

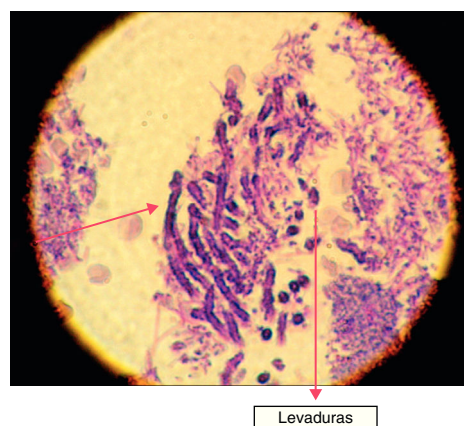


Figura 5. Levaduras y pseudomicelios en el tejido gingival de un paciente con periodontitis grave (tinción PAS, 100X). Las flechas señalan pseudomicelios y levaduras de *Candida* en un biofilm bacteriano PAS positivo.

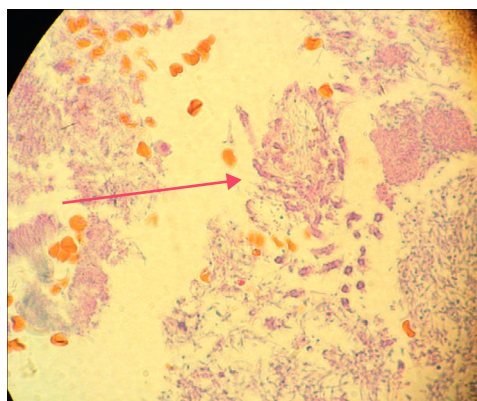


Figura 6. Observación de levaduras y pseudomicelios (flecha) de *Candida* presentes en el biofilm subgingival de un paciente con periodontitis grave (corte de tejido gingival con tinción tricrómica, 40X).

de microabscesos. Estos últimos se encontraron asociados a otros microorganismos de la placa.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el método ANOVA ($p < 0,05$) (tabla 1). Este método permite determinar el efecto que la invasión fúngica del tejido conectivo tiene sobre la patología periodontal.

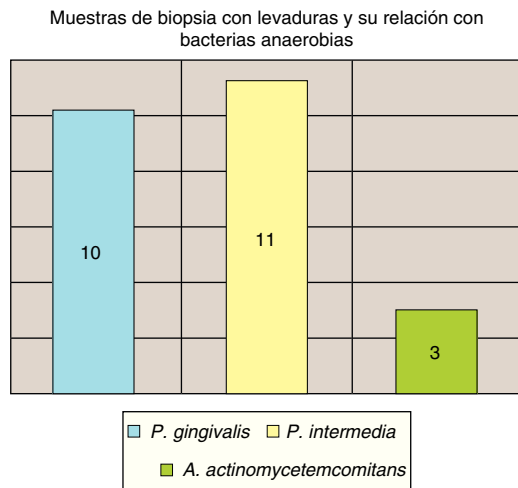


Figura 7. Muestras de biopsia con levaduras en concomitancia con bacterias anaerobias.

Tabla 1
Análisis de la varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza-media cuadrática
Entre grupos	0,2407	2	0,1204
En el grupo	24,39	105	0,2323
Total	24,63	107	

Discusión

La infección periodontal puede considerarse una agresión patógena seguida de una respuesta inmunoinflamatoria continua de alcance sistémico debido a la gran superficie de epitelio ulcerado. Este permite a los patógenos y sus productos difundirse al resto del organismo y causar daños a diferentes niveles.

Por otro lado, desde su hábitat normal, los hongos del género *Candida* pueden invadir diversos tejidos produciendo alguna patología. Dicha invasión dependerá de alguna alteración en los mecanismos de defensa o de la presencia de factores predisponentes³.

La bolsa y el fluido subgingival son ambientes favorables para el crecimiento de levaduras y su transformación en seudomicelios, hecho demostrado en este trabajo (prevalencia del 30% en este sitio), coincidiendo así con otros trabajos previamente presentados^{4,9,13}, y con las observaciones de las tinciones de los cortes histopatológicos.

Los seudomicelios de *Candida* tienen la capacidad de penetrar en el tejido del huésped y adherirse a las superficies con mayor facilidad que las formas levaduriformes. Por ello los seudomicelios son importantes en la posterior evolución de la enfermedad.

Nuestros hallazgos sugieren que las especies de *Candida* podrían formar parte de la placa microbiana periodontal y tener un papel en la adherencia de la misma al tejido periodontal de acuerdo con la gravedad de la enfermedad periodontal^{9,11}. Los tejidos gingivales están compuestos en un 60% por colágeno tipo IV y tipo I. Tanto *P. gingivalis* como las diferentes especies de *Candida* se adhieren al mismo, propiedad que podría ser útil para la invasión de los tejidos profundos.

Järvensivu et al.⁶ demostraron que *C. albicans*, al desarrollar el seudomicelio, se adhiere al tejido conectivo y forma parte de la placa microbiana durante el proceso de la enfermedad periodontal.

Jobbins et al.⁸ estudiaron los mecanismos de adhesión intermicrobiana entre *C. albicans* y diversas bacterias bucales, tales como cepas de *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* y

Actinomyces viscosus, sugiriendo que existían diferentes mecanismos de unión entre ellos. Uno de estos se encuentra a cargo de las lectinas (proteínas bacterianas), que favorecen la unión de *F. nucleatum* y *A. viscosus* con *C. albicans*.

En nuestro trabajo encontramos la asociación de *Candida* con especies anaerobias de importancia en el desarrollo de la enfermedad periodontal, tales como *P. intermedia* y *P. gingivalis* (hecho observado microbiológica e histopatológicamente).

El papel de las especies de levaduras en la enfermedad periodontal, incluyendo especies emergentes que se caracterizan por presentar una sensibilidad disminuida a los antifúngicos, como *C. dubliniensis* o *C. guilliermondii*, no está totalmente estudiado y es necesario demostrar el significado clínico de estos hallazgos⁷. Sin embargo, *C. albicans* es uno de los pocos microorganismos normalmente encontrados en la bolsa subgingival que tiene la capacidad de penetrar la superficie epitelial, invadir tejidos profundos y provocar inflamación.

Las hifas formadas deben considerarse como un factor de virulencia, asociadas con una mayor capacidad invasora, penetración en los tejidos y mayor resistencia a la fagocitosis.

Conclusiones

A la luz de lo observado y estudiado, pensamos que las especies de *Candida*, una vez que forman parte del biofilm subgingival y se asocian a bacterias anaerobias, podrían participar activamente en la patogenia de la enfermedad periodontal, ya que está demostrado que *C. albicans* puede secretar proteinasas capaces de degradar tejidos del huésped como colágeno y fibronectina, similares a las producidas por ciertas bacterias como *P. gingivalis*.

En nuestro estudio tuvimos también pacientes con periodontitis infectados con levaduras que en los cortes histopatológicos no evidenciaron el desarrollo de seudomicelios.

Dejamos abierto el camino para investigar con técnicas inmunohistoquímicas las citoquinas que predominan en respuesta a los mecanismos de patogenicidad de las levaduras.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- American Academy of Periodontology. International Workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999;4: 8–38.
- Barros LM, Boriollo MF, Alves AC, Klein MI, Gonçalves RB, Höfling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. Arch Oral Biol. 2008;53:1172–8.
- Brusca MI, Rosa AC, Albaina O, Moragues MD, Verdugo F, Pontón J. The impact of oral contraceptives on women's periodontal health and the subgingival occurrence of aggressive periodontopathogens and *Candida* species. J Periodontol. 2010;81:1010–8.
- Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastri ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. Acta Odontol Latinoam. 2010;23:20–6.
- Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. Oral Microbiol Immunol. 1993;8:375–82.
- Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial films in vivo. Oral Dis. 2004;10:106–12.
- Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, Sordelli N, Malzone MC, Pola SJ, et al. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. Oral Microbiol Immunol. 2008;23:505–9.
- Jobbins J, Bagg J, Parsons K, Finlay I, Addy M, Newcombe RG. Oral carriage of yeasts, coliforms and staphylococci in patients with advanced malignant disease. J Oral Pathol Med. 1992;21:305–8.
- Miranda TT, Vianna CR, Rodrigues L, Monteiro AS, Rosa CA, Correa Jr A. Diversity and frequency of yeasts from the dorsum of the tongue and necrotic

- root canals associated with primary apical periodontitis. *Int Endod J.* 2009;42: 839–44.
10. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 2001;28:860–4.
 11. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Höfling JF, Gonçalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci.* 2010;52:177–85.
 12. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol.* 2008;46:783–93.
 13. Zinge V, van Leewen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *Plos One.* 2010;5:e9321.