



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUIMICA

“Recuento y determinación de diversidad de especies de levaduras del género *Candida* y su asociación con pH Salival en Pacientes Diabéticos tipo 2, con distinto grado de control metabólico”

Ilia Mercedes Pérez Vallespir

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan Pablo Aitken Saavedra

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Blanca Regina Urzúa Orellana.

Dra. Irene Cecilia Morales Bozo.

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-002

Santiago - Chile

2015

DEDICATORIA

Me gustaría poder ser egocéntrica y decir que este trabajo es sólo resultado de mi esfuerzo o de mis creencias, pero claramente no es así, por lo que me permitiré este pequeño espacio para agradecer a algunas personas sin las cuales nada habría sido posible.

En primer lugar agradecer a mi núcleo familiar por todo, a mi mamá por siempre estar junto a mí, cuando fue necesario obligarme a estudiar y mantenerme firme. A mi papá por esforzarse tanto para que nunca nos faltase nada. A mi hermano por soportarme y ayudarme cuando lo necesité. A mi abuela por ser ella y siempre estar ahí para mí. Obvio que no puedo dejar de mencionar a mi Toyi, que siempre ha estado ahí, pendiente, aunque a veces no fuese físicamente, gracias por todo tu apoyo y consejos. A mi tía Peta por su cariño y estar siempre presente.

He de agradecer también a Franco por estar conmigo, aconsejarme y presionarme a trabajar cuando sacaba la vuelta, por creer en mí incluso cuando yo no lo hacía, dándome todo su amor y comprensión.

Al profe Aitken por permitirme participar en este proyecto, por su buena onda y disposición, por tenerme mucha paciencia e incluso por no enojarse por mi persecución y acoso constante, incluso al autoproclamarme su sombra.

A la profe Blanca, por tenerme tanta paciencia y siempre estar dispuesta a ayudarme y aclarar mis incesantes dudas.

A la gente del Laboratorio de Bioquímica, con quienes se compartió muchas cosas, especial mención a Andrea por la paciencia y enseñarme paso a paso todo, sin desesperarse cuando no entendía nada.

A la profe Clau por re-encantarme con el laboratorio y enseñarme muchas cosas, no sólo académicas, con su buena onda y entrega hace que todo sea mágico y entretenido, así como por su apoyo constante y sin esperar nada a cambio.

Y en último lugar, pero no por eso menos importante, agradezco a Jaime, porque fuiste parte fundamental de este proceso, sin ti nada habría sido posible, gracias a

tu ayuda y aportes desinteresados.

AGRADECIMIENTOS

Es imprescindible agradecer a la ADICH por su cordialidad, buena disposición y apoyo incondicional a este y otros proyectos.

También quiero agradecer al Laboratorio de Bioquímica, así como a todos sus integrantes, que sin su apoyo y trabajo continuo y buena disposición, este trabajo no habría llegado a buen término.

PD: El siguiente trabajo de investigación está Adscrito al Proyecto FIOUCH 13-002. Si bien se compartieron fuentes de datos y fotografías con la tesis adscrita del alumno Jaime González Saldaña, corresponde a un análisis diferente de éstos.

INDICE

Resumen	i
Marco Teórico	1
Diabetes Mellitus	1
Clasificación de la Diabetes Mellitus	1
Epidemiología de la Diabetes Mellitus	2
Diagnóstico de la Diabetes Mellitus	4
Monitoreo de la Diabetes Mellitus	5
Efectos de la Diabetes Mellitus en la Cavidad Oral	7
Alteraciones Salivales Producto de la Diabetes Mellitus	8
Levaduras del género <i>Candida</i>	11
Patogenicidad de <i>Candida albicans</i>	12
Diversidad de Especies de <i>Candida</i> en Pacientes con Diabetes Mellitus	14
Candidiasis	15
Relación Diabetes Mellitus- <i>Candida sp.</i> - pH Salival	16
Hipótesis y Objetivos	19
Materiales y Métodos	20
Tipo de Estudio	20
Caracterización de la Muestra	20
Procedimientos	21
Análisis de Resultados	33
Resultados	34
Caracterización de la Muestra	34
Compensación Metabólica	37
Determinación del pH Salival	38
Recuento de levaduras en Saliva de Pacientes DM2 en función del pH Salival	44

Diversidad de Especies de Levaduras en Saliva de Pacientes	
DM2 relacionado a su pH Salival	45
Pacientes DM2 No Portadores de Levaduras en Saliva	52
Discusión	53
Conclusiones	57
Comentarios y Proyecciones	58
Referencias Bibliográficas	59
Anexos y Apéndices	67
Anexo 1: Carta de Aprobación del Comité de Ética	68
Anexo 2: Carta de Aprobación del Comité de Bioseguridad	70
Anexo 3: Ficha Clínica	71
Anexo 4: Consentimiento Informado	72

1) RESUMEN

Introducción: Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica altamente prevalente que debe ser cuidadosamente controlada para evitar complicaciones asociadas a su descompensación, que se establece cuando los afectados presentan valores de Hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayores a 7%. Este fenómeno se asocia con alteraciones salivales, como la acidificación del pH, lo que podría afectar el crecimiento y diferenciación de levaduras del género *Candida* con la consecuente aparición de manifestaciones clínicas asociadas (candidiasis). Es importante determinar número y especies de levaduras presentes en saliva de pacientes diabéticos para mejorar el enfoque terapéutico.

Materiales y Métodos: Se recogieron muestras de saliva no estimulada de 52 pacientes con DM2 pertenecientes a la Asociación de diabéticos de Chile, a las que se les midió pH salival y se cultivaron en placas de Agar Sabouraud, realizando el recuento de colonias en UFC/ml. Posteriormente se identificaron las especies en forma presuntiva en CHROMAgar *Candida* confirmándose mediante PCR con partidores específicos para *Candida sp.* a 2 ó 4 representantes de cada especie presuntiva. En el caso de las especies no identificadas, se utilizó la galería API ID 32C[®] para su determinación. Se utilizó el test de Spearman para correlacionar las variables HbA1c, pH salival y cantidad de UFC/ml y la prueba de Chi cuadrado para comparar valores entre pacientes compensados y no compensados. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p \leq 0,05$.

Resultados: El 50 % de los pacientes estaban descompensados. El pH salival promedio fue de 7,54 (S=0,46). El 75% de los pacientes fueron portadores de levaduras, de cuyo total, el 66% fue *Candida albicans*, el 44% *Candida no Candida albicans*, el 0,05% *Rhodotorula*. El 0,35% no fue identificado. En pacientes con DM2 descompensada, se observó asociación inversa entre valores de HbA1c y pH

salival. A mayor acidificación salival se observó mayor diversidad, cantidad de levaduras del género *Candida* y mayor recuento de *Candida glabrata*.

Conclusión: La descompensación metabólica en pacientes con DM2 puede resultar en acidificación del pH salival afectando la cuantificación y la diversidad de levaduras presentes en boca lo que debiese ser considerado al momento de establecer un enfoque terapéutico.

2) MARCO TEÓRICO:

Diabetes Mellitus.

Diabetes Mellitus (DM) corresponde a un grupo de enfermedades metabólicas crónicas causadas por defectos en la secreción y/o acción de la insulina en los distintos órganos del cuerpo, cuya principal característica es la hiperglicemia producto de fallas en la secreción de insulina o en su capacidad de cumplir su rol hipoglicemiante. Este aumento plasmático de los niveles de glucosa, al ser sostenido en el tiempo, se asocia con daño en distintos órganos y sistemas, tales como microangiopatía, neuropatía periférica, insuficiencia renal crónica, ceguera, muerte prematura, etc. (Arteaga y cols., 1997; American Diabetes Association, junio 2014).

Clasificación de la Diabetes Mellitus.

De acuerdo a la American Diabetes Association se clasifica a la DM en:

- **DM tipo 1 (DM1):** Insulino dependiente, corresponde aproximadamente al 8% de la población diabética. Suele debutar en la niñez o adolescencia. Es causada por un ataque autoinmunitario a las células beta pancreáticas, lo que produce la ausencia de producción de insulina. (Minsal 2013 [b]). El tratamiento consiste en la administración de insulina subcutánea acompañada de dieta y ejercicio.

- **DM tipo 2 (DM2):** No insulino dependiente. Causada principalmente por estilos de vida poco saludables, corresponde al 90% población diabética. Suele diagnosticarse a mediana edad o adultez tardía (Chavez y cols., 2001). Se produce por combinación entre la resistencia a la acción de la insulina y una respuesta secretoria pancreática compensatoria inadecuada. (Minsal 2013 [b]). El tratamiento es farmacológico acompañado de cambios en el estilo de vida del paciente.

- **Diabetes gestacional (DG):** Se define como la resistencia a la insulina que se reconoce por primera vez durante el segundo o tercer trimestre de embarazo, debido a los efectos celulares producidos por las hormonas placentarias, especialmente el lactógeno placentario y el cortisol libre que, junto al aumento de estrógenos y progesterona, afectan el metabolismo de los carbohidratos (Guzmán y Madrigal, 2003). Se ha postulado como una variante de DM tipo 2 (National Diabetes Data Group. 1974). En nuestro país se estima una prevalencia entre 3 y 5% en embarazadas sanas, aumentando a un 10-14% en aquellas con factores de riesgo de DM (Minsal, 2008). La ocurrencia de esta patología es factor de riesgo para volver a desarrollarle en futuros embarazos y/o de desarrollar DM tanto por el infante como por la madre, sin embargo, tras el embarazo sólo entre un 5 y 10% de estas mujeres son diagnosticadas con DM, usualmente del tipo 2 (American Diabetes Association, 2014).

- **Otros tipos específicos de diabetes:** son de clasificación imprecisa o secundaria a otras patologías o al tratamiento de éstas. Ejemplos de estos son: defectos genéticos en la función de células β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino y aquellas inducidas por drogas o fármacos (tratamiento del VIH/SIDA y trasplantes) (National Diabetes Data Group, 2011)

Epidemiología de la Diabetes Mellitus.

La DM es un problema de salud pública global. En el año 2000 se calculaba que 171 millones de personas la padecían a nivel mundial y se espera que para el año 2020 esta cifra aumente a 366 millones, pudiendo esto ser atribuido al cambio de estilo de vida de la población y a la mayor prevalencia de obesidad e inactividad física. Dos tercios de esta cifra corresponde a países en vías de desarrollo como ocurre en África, Asia y Latinoamérica (Wild y cols., 2004).

En Chile la DM es un problema relevante: La Encuesta Nacional de Salud (ENS) del año 2003 señala que un 9,4% de la población padecía esta enfermedad, de la cual sólo un 50,05% está en tratamiento médico (Minsal 2009-2010 [a]). Sin embargo, según la Asociación de Diabéticos de Chile (ADICH), sólo el 17,6% se encuentra controlado (Solis y cols., 2008).

A nivel mundial, DM2 es la quinta enfermedad crónica más prevalente y la sexta causa de mortalidad en los adultos mayores. Afecta al 9% de los mayores de 65 años, cifra que ha aumentado en un 30 a 40% en los últimos 20 años (Chávez y cols., 2001). En Chile la tasa de mortalidad alcanzó el 17,1 por cien mil habitantes el año 2003. La prevalencia de esta enfermedad metabólica en nuestro país se estima entre 4,2% y 7,5% según las encuestas realizadas a nivel nacional los años 2003 y 2006, por el Ministerio de Salud y la ADICH, respectivamente. (Minsal, 2010 [b]).

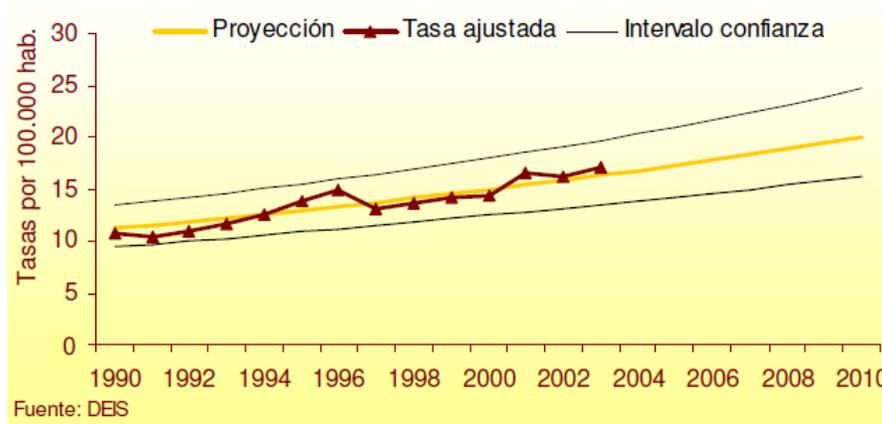


Figura 1. Mortalidad por Diabetes mellitus, ajustada por edad. Chile 1990-2003 y proyección 2004-2010. Fuente: Guía Clínica Diabetes tipo 2. Minsal, 2010.

Un buen control metabólico de la DM consiste en mantener niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) menores a 7%, lo que, en Chile sólo se cumple en un 36% de la población diabética en tratamiento, sin encontrarse diferencias significativas según sexo (Minsal, 2013).

Diagnóstico de Diabetes Mellitus.

En su publicación “Standards of Medical Care in Diabetes” del año 2012 de la American Diabetes Association, se indica que para la confirmación del diagnóstico de diabetes, debe presentarse al menos uno de los siguientes cuatro criterios:

- Hemoglobina glicosilada mayor o igual a 6,5%, realizado en un laboratorio con método estandarizado y certificado.
- Glicemia mayor o igual a 126 mg/dl, (7 mmol/L) en período de ayuno (8 horas sin ingesta calórica).
- Glicemia mayor o igual a 200 mg/dl, 2 horas después de una carga de 75g de glucosa (test de tolerancia oral a la glucosa).
- Síntomas clásicos de diabetes (poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso), crisis hiperglicémica o presentar una glicemia mayor o igual a 200 mg/dl en cualquier momento del día.

En la tabla 1 se presenta las pruebas de medición de glucosa con sus valores e interpretaciones correspondientes. Se debe destacar que para confirmar el diagnóstico de DM o prediabetes se debe repetir la prueba en un día diferente al examen original.

Tabla 1. Pruebas de medición de glucosa y su interpretación.

Prueba	Resultado	Diagnóstico
Glucosa en ayunas (mg/dl)	≤ 99	Normal
	100-125	Glucosa en ayunas alterada
	≥ 126	Diabetes
Glicemia 2h post carga de 75g (mg/dl)	≤ 139	Normal
	140-199	Intolerancia a la glucosa
	≥ 200	Diabetes
Hemoglobina glicosilada (%)	$\leq 5,4$	Normal
	5,7-6,4	Prediabetes
	$\geq 6,5$	Diabetes

Monitoreo de la Diabetes Mellitus.

Es necesario un monitoreo continuo del estado metabólico del paciente, y así llevar registro del control de la enfermedad, pudiendo en base a esto tomar decisiones clínicas y terapéuticas atinentes a cada caso. Los exámenes utilizados para esto son:

1.- Hemoglucotest

El control del estado glicémico inmediato del paciente suele realizarse mediante el hemoglucotest, examen rápido que mide la concentración de glucosa en el plasma sanguíneo del paciente en ese momento en particular. (Ver Tabla 2)

DIAGNÓSTICO	VALORES HEMOGLUCOTEST
Hipoglicemia	$\leq 50\text{mg/dl}$
Normoglicemia	70-100mg/dl ó 75-110mg/dl
Hiperglicemia	$\geq 128\text{mg/dl}$

Tabla 2: Valores de Referencia Hemoglucotest

2.- Hemoglobina Glicosilada

La hemoglobina es un compuesto químico constituido por un núcleo de hierro transportado por la sangre dentro de los glóbulos rojos, y permite la llegada del oxígeno a los tejidos del organismo. Los glóbulos rojos viven aproximadamente 120 días, y durante todo ese tiempo la hemoglobina sufre un proceso llamado glicosilación, que consiste en la incorporación de glucosa a su molécula. El aumento sostenido de la glicemia hace que la glicosilación sea más intensa, y así se ve incrementado el porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c) con respecto a la hemoglobina normal (Álvarez y cols., 2009), siendo esta alteración la que se utiliza para medir el grado de control del paciente en el tiempo.

El examen de HbA1c muestra el porcentaje de hemoglobina unida a glucosa en un lapso de 90 días, que es la vida promedio de los eritrocitos, razón por la cual no se ve afectada por el ayuno o la ingesta inmediata de comida. Se define que un

paciente se encuentra compensado cuando su valor de HbA1c es menor o igual a 7% y estará descompensado cuando este valor sea mayor. (Ver Tabla 1).

Efectos de la Diabetes Mellitus en la cavidad oral.

Personas con un mal control metabólico de la DM relatan con mayor frecuencia xerostomía y disgeusia (Dodds y cols., 1997; Moore y cols., 2001; Prathibha y cols., 2013), siendo este un factor de riesgo en el desarrollo periodontitis y caries (García y cols., 2000).

Se ha establecido que un mal control metabólico de la DM aumenta la susceptibilidad del paciente a contraer distintas infecciones (Olmos y cols, 2011) debido a una alteración en la inmunidad celular y humoral del paciente (Bremenkamp y cols., 2011), siendo las infecciones por levaduras del género *Cándida* las más prevalentes en la cavidad oral.

Existe consenso entre los diferentes autores con respecto a que un mal control metabólico de la diabetes conlleva a una disminución en la Velocidad de Flujo Salival (VFS), lo que se asocia con la neuropatía diabética (Dodds y cols., 1997; Chávez y cols., 200; Moore y cols., 2001; Shirzaii y cols., 2013). Esta asociación se explicaría ya que al verse afectadas las fibras del Sistema Nervioso Autónomo disminuye la capacidad de las glándulas salivales para responder ante diferentes estímulos neuronales u hormonales, lo que coincide con cambios en la microvascularización (Chávez y cols., 2001). También existen cambios en el parénquima glandular, existiendo infiltración de linfocitos autoinmunes, similar a lo que ocurre con las células beta pancreáticas en esta enfermedad (Masoomah y cols., 2013). Así mismo, un aumento de la concentración de glucosa sanguínea hace aumentar los gradientes osmóticos en las glándulas salivales, limitando su secreción (Moore y cols., 2001).

Siguiendo la misma línea, en los pacientes con DM2 se han descrito alteraciones estructurales de la glándula parótida, siendo una causa etiológica de Sialosis (alargamiento de la parótida, generalmente bilateral, no neoplásico ni inflamatorio). Esta hipertrofia glandular suele producirse por infiltración grasa o hipertrofia de los acinos glandulares (Carda y cols., 2006).

Junto al cambio macroscópico se producen también cambios microscópicos en las membranas de la glándula parótida, con lo que se vería alterada su capacidad de transferir moléculas, cambiando la composición salival, pudiendo producirse hipofunción salival y xerostomía (Chávez y cols., 2000).

Alteraciones salivales producto de la Diabetes Mellitus.

La saliva es un fluido orgánico glandular complejo de la cavidad oral producido en un 93% por las glándulas salivales mayores (parótida, submandibular y sublingual) y en un 7% por las glándulas salivares menores (las que se encuentran en todas las mucosas orales con excepción de la encía y porción anterior del paladar duro). Un 99% de su composición es agua y el 1% restante corresponde a moléculas orgánicas e inorgánicas (Llena y cols., 2006).

Cumple diferentes funciones, entre las que se destacan las masticatorias, digestivas, defensivas, gustativas, de fonación, de humectación y preservación de los tejidos mineralizados y mucosos (ver tabla 3). Es esencial para la mantención de la salud oral y faríngea, así como en la calidad de vida del paciente (Chávez y cols., 2000). Alteraciones en su cantidad o composición hacen al sujeto más susceptible a caries, infecciones oportunistas locales y sistémicas, así como disfagia, disgeusia y problemas para utilizar aparatos protésicos.

FUNCIONES	COMPONENTES
Lubricación	Mucina, Glicoproteínas Ricas en Prolina, Agua.
Acción Antimicrobiana	Lisozima, Lactoferrina, Lactoperoxidos, Mucinas, Cistinas, Histatinas, Inmunoglobulinas, Glicoproteinas Ricas en Prolina, IgA.
Mantención de la Integridad de la Mucosa	Mucinas, Electrolitos, Agua.
Limpieza	Agua.
Capacidad Buffer y Remineralización	Bicarbonato, Fosfato, Calcio, Estaterina, Proteínas Aniónicas Ricas en Prolina, Fluoruros.
Preparación de la Comida para tragar	Agua, Mucinas.
Digestión	Amilasa, Lipasa, Ribonucleasas, Proteasas, Agua, Mucinas
Sabor	Agua, Gustina.
Fonación	Agua, Mucina.

Tabla 3: Componentes de la Saliva y sus funciones

Fuente: Carmen Llena, Med. oral patol. oral cir. bucal 2006.

El mal control metabólico en los individuos con DM se genera:

- Aumento en la concentración de glucosa salival (Syrjälä y cols., 2003; Agrawal y cols., 2013),
- Disminución del pH Salival (García y cols., 2000; Carda y cols., 2006), producto de la alteración iónica de este fluido (Bernardi y cols., 2007),
- Alteraciones en la capacidad tampón (Carda y cols., 2006),
- Aumento de la concentración de proteínas totales (Masoomah y cols., 2013), debido a un aumento en la actividad microbiana o a proteínas del Fluido Gingival Crevicular (FGC) (Prathibha y cols., 2013),
- Cambios en la concentración de electrolitos salivales (Prathibha y cols., 2013, Shirzaii y cols., 2013; Ivanovski y cols., 2012; Carda y cols., 2006)
 - Aumento del sodio
 - Aumento del calcio,
 - Aumento del potasio,
 - Aumenta la concentración de urea,
 - Disminución del Zinc.

La disminución del flujo salival en pacientes diabéticos, fenómeno mayormente descrito en los más descompensados, facilitaría la proliferación y el desarrollo de patologías asociadas a levaduras. (Kaisa y cols., 1996; Navazesh y cols., 1995; Suárez y cols., 2013). Debemos considerar además que fármacos antihipertensivos (como el atenolol) se han asociado tanto a la disminución del flujo salival como a la xerostomía con las consecuencias ya descritas (Meurman y cols., 1998; Llena y cols., 2006). Es preciso mencionarlo, dada la fuerte asociación que existe entre la DM2 y la Hipertensión Arterial (HTA) y el consecuente uso de fármacos antihipertensivos en pacientes diabéticos.

Levaduras del género *Candida*.

Candida es un microorganismo perteneciente al Dominio Eukarya, dentro de éste al Reino Fungi. Este género engloba a más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual (Pardi y cols, 2001).

Candida albicans es la especie aislada con mayor frecuencia en el ser humano, siendo un hongo unicelular oportunista que forma parte de la microbiota normal de la cavidad oral, tracto respiratorio alto, sistema gastrointestinal, piel y tracto genitourinario (López y cols., 2004).

El género *Candida* se encuentra libre en la naturaleza, pudiendo producirse el contagio primario del ser humano en etapas muy tempranas, incluso en el alumbramiento, si es que la madre posee un canal vaginal colonizado por estas levaduras, por lo que no es infrecuente encontrar candidiasis en recién nacidos debido a la inmadurez de su sistema inmune (Mata de Henning y Perrone, 2001).

Se ha descrito que entre 30 y 50% de los adultos sanos portan estos microorganismos sin presentar signos ni síntomas de enfermedad (Fotos y cols., 1992). Sin embargo, ante cualquier cambio en las condiciones ambientales a las que este microorganismo está sometido regularmente aparece su patogenicidad, presentándose “Candidiasis”, infección fúngica que puede ser local (sólo de las mucosas) o diseminada (afecta a todo el organismo, lo que suele ocurrir en personas inmunocomprometidas) (Rodríguez y cols., 2002).

Las levaduras del género *Candida* son el principal agente de las IAAS (Infecciones Asociadas a la Atención en Salud) siendo *Candida albicans* el tercer o cuarto patógeno más frecuentemente aislado de sangre, sobrepasando la frecuencia de los bacilos Gram negativos (Castrillón y cols., 2005).

Patogenicidad de *Candida albicans*.

Patogenicidad se define como la capacidad de un microorganismo de producir enfermedad en un hospedero susceptible, es específica de cada género y especie. Por otro lado, los factores de patogenicidad, son los mecanismos que utiliza el microorganismo para causar daño al hospedero, asegurando así su sobrevivencia, incrementando su poder de penetración, invasión y evasión de la respuesta inmune del hospedero.

Los principales factores de patogenicidad de *Candida albicans* son: switch fenotípico (cambio morfológico entre levadura y la formación de hifas y pseudohifas), secreción enzimática, expresión diferencial de genes en respuesta al ambiente, síntesis de adhesinas y su capacidad para formar biofilms (Castrillón y cols., 2005).

Según las condiciones ambientales o estado de la infección *Candida albicans* puede presentarse como levadura y/o puede formar hifas o pseudo hifas, siendo este un estado reversible (Mata de Henning y Perrone, 2001, Villar-Vidal y cols, 2011. Fidel, 2002).

- **Levadura:**, Células redondeadas u ovaladas, mide de 2 a 4µm (Mata de Henning y Perrone, 2001), es esencial para la diseminación del microorganismo (Leito y cols., 2009).

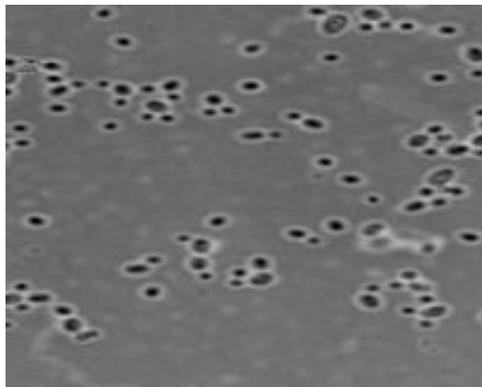


Figura 2: *Candida albicans* fenotipo de levadura (Aumento 40x).

Fuente: Germán Pardi. Acta odontol. Venez. 2001.

- **Hifa:** Forma virulenta de *Candida albicans*, facilita la invasión epitelial por penetración activa, incluyendo endocitosis por parte de las células del hospedero (Mata de Henning y Perrone, 2001; Martin, 2011).

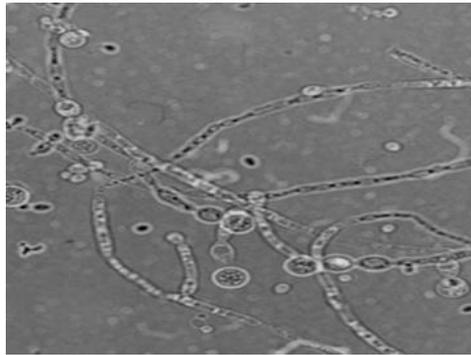


Figura 3: Producción de hifas por parte de *C. albicans* (Aumento 40x).

Fuente: Germán Pardi. Acta odontol. Venez. 2001.

Los hallazgos que sustentan que la formación de hifas se requiere para la patogenicidad de *Candida albicans* son (Castrillón y cols., 2005):

1. La formación de filamentos se produce a 37°C, a pH neutro.
2. Los tubos germinativos (hifas recién formadas) tienen mayor adherencia a las células del hospedero que la forma de levadura.
3. Cuando un macrófago fagocita una levadura esta produce filamentos, con lo que es capaz de provocar la lisis de la célula defensiva.
4. Basta el contacto físico con las células del hospedero para que inicie la formación de hifas y se activen los genes que median la adhesión (Martin y cols., 2011).

Diversidad de especies de *Candida* en Diabetes Mellitus.

Se ha observado que un mal control metabólico de los pacientes con DM2 va acompañado de una mayor diversidad de cepas aisladas de la saliva o mucosas. En pacientes descompensados, se ha reportado una colonización mixta por *Candida albicans* y especies de *Candida no Candida albicans* (Torres y cols., 2002; Suárez y cols., 2013). Las especies *Candida no Candida albicans* generarían infecciones fúngicas de mayor severidad (Lee y cols., 2013) y resistencia a la acción de antifúngicos (Manfredi y cols., 2006). Por esta razón, es indudable el riesgo de la presencia de especies de *Candida no Candida albicans* en la cavidad oral de los pacientes diabéticos descompensados.

En las últimas décadas, *Candida parapsilosis* ha emergido como un patógeno asociado a infecciones sistémicas, especialmente en personas inmunocomprometidas o que utilizan aparatos protésicos como válvulas cardíacas (Trofa y cols., 2008).

Las cepas de *Candida no Candida albicans* más frecuentemente aisladas de pacientes diabéticos descompensados corresponden, en orden decreciente, a (Torres y cols., 2002):

- *Candida parapsilosis*,
- *Candida tropicalis*
- *Candida krusei*.

Candidiasis.

Es el término con que se hace alusión a la infección superficial (mucosas y/o tegumentos) o sistémica (profundas) provocada por levaduras del género *Candida*, siendo *Candida albicans* el microorganismo más comúnmente aislado (O'Sullivan y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2002). Las candidiasis sistémicas presentan una tasa de mortalidad cercana al 40%, mientras que aquellas locales no presentan riesgo vital (Martin y cols, 2011).

Una Candidiasis sistémica se produce cuando el huésped tiene varios factores de riesgo, como el uso de antibióticos de amplio espectro por tiempo prolongado, esteroides u otros agentes inmunosupresores, DM, SIDA, depresión de las funciones fagocíticas o alteraciones locales del sistema gastrointestinal (Castrillón y cols., 2005).

En la Tabla 4 se presenta la Clasificación de Candidiasis Oral elaborada por Laskaris en 1998, y que se encuentra actualmente vigente.

Presentación Clínica	Patología
Formas Agudas	Candidiasis Pseudomembranosa
	Candidiasis Eritematosa
Formas Crónicas	Candidiasis Pseudomembranosa Crónica
	Candidiasis Eritematosa Crónica
	Candidiasis Hiperplásica Crónica
	Candidiasis Atrófica Crónica
Candidiasis asociadas con otras lesiones	Queilitis Angular
	Glositis Romboidal Media
	Estomatitis Subprotésica <ul style="list-style-type: none"> a) Hiperemia Puntiforme o tipo I b) Hiperemia Difusa Atrófica o tipo II, c) Hiperemia Papilomatosa o tipo III.

Tabla 4: Clasificación de Candidiasis Oral (Laskaris G. 1998).

Relación Diabetes Mellitus - Candidiasis - pH Salival.

Como se mencionó antes, pacientes con DM2, especialmente al estar descompensados, son más propensos a desarrollar enfermedades infecciosas (Olmos y cols., 2011). De hecho, es más frecuente aislar *Candida albicans* de la cavidad oral de pacientes diabéticos que de no diabéticos (Aly y cols., 1992).

Existe consenso en que pacientes diabéticos descompensados tienen mayor concentración de glucosa en la saliva (Sashikuma y Kannan, 2010) y menor tasa de flujo salival (Chávez y cols., 2001), lo que les predispondría al desarrollo de candidiasis.

Se ha descrito un pH salival inferior a lo normal en pacientes diabéticos, especialmente en aquellos descompensados (Arrieta y cols., 2003), existiendo una asociación inversa entre glicemia instantánea y pH salival. Sin embargo, hay escasa evidencia que asocie pH salival con niveles sanguíneos de HbA1c, gold estándar en el control metabólico de la enfermedad.

La acidificación salival provocaría un aumento en la actividad proteolítica de las especies de *Candida*, activando también la producción de fosfolipasas extracelulares (Darwazeh y cols., 1991).

A la fecha, existe evidencia científica que señala un switch fenotípico en *Candida albicans* en función del pH ambiental al que se vea sometida. Luo y cols lo hacen patente en una revisión bibliográfica del 2013, en que exponen que un mecanismo de virulencia de *Candida albicans* es justamente la formación de filamentos (hifas) a pH elevado. Davis en el 2003 describió un hallazgo similar y agrega que a pH ácido se ve favorecido el crecimiento de estas levaduras en su forma no invasiva.

En un estudio realizado por Araújo y cols. (2014) queda de manifiesto el cambio de fenotipo de *Candida albicans* al ser sometida a diferente pH ambiental, variando también la susceptibilidad de este microorganismo a Fluconazol (FLZ), así como su estructura y virulencia. En este estudio se describe que:

- A pH 4,0 no hubo cambios estructurales en las levaduras, pero aumentaba su secreción de proteinasas y fosfolipasas. Sólo se observó levaduras al microscopio y una menor susceptibilidad a FLZ.
- A pH 5,5 aumentó la población, habiendo mayor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC), se observó formación de biofilm, más grueso y voluminoso, con una menor secreción de proteinasas.
- A pH 7,0 se registró mayor susceptibilidad a FLZ. Se observó formación de hifas y mayor concentración de fosfolipasas, lo que aumentó la capacidad del microorganismo para colonizar y penetrar tejidos.

De lo anterior podemos concluir que el pH ambiental es un potencial inductor de diferenciación y desarrollo de *Candida albicans*, ya que un ambiente ácido favorece el desarrollo de levaduras mientras que uno alcalino la formación de hifas (Araújo y cols., 2014; Davis, 2003). También se ha descrito que entre más ácido el pH ambiental se requiere mayor concentración de FLZ para lograr su actividad antifúngica.

Cabe destacar que no sólo la DM2 provoca una disminución en el pH salival, sino que otras condiciones tienen el mismo efecto, como ocurre en pacientes con cáncer o en aquellos con alto índice de caries, en que debido a esta acidificación salival se ve incrementado el conteo de levaduras y un aumento en su actividad enzimática. (Mata de Henning y Perrone, 2001).

En última instancia, es interesante hacer notar que *Candida albicans* puede regular el pH ambiental, privando al medio de carbono, limitando la concentración de níquel y fosfato y aumentando el estrés nitrosativo (Martin y cols, 2011). Estas alteraciones del medio cambian su morfogénesis y favorecen la invasión primaria de la levadura.

La literatura describe que a medida que empeora el control metabólico de la DM, se acidifica la saliva observándose mayor prevalencia de candidiasis oral, asociada a *Candida albicans* y a especies de *Candida no Candida albicans*. Además, en un ambiente salival más ácido *Candida albicans* presenta una morfología menos invasiva pero más proliferativa, en comparación, a un pH neutro o básico (Sosinska y cols., 2011), Por otra parte, la efectividad de los antifúngicos se ve afectada tanto por la especie y forma fenotípica de las levaduras como por el pH ambiental.

A la fecha, no existe suficiente evidencia que correlacione cambios entre pH salival, recuento y diversidad de especies de levaduras, en saliva de pacientes con DM2 que presentan distinto grado de control metabólico medido con HbA1c, por lo que es de gran relevancia recopilar información sobre el comportamiento de estas variables.

En esta tesis, se estudió una posible relación entre el pH salival de pacientes diabéticos con distinto grado de control metabólico y su efecto en el recuento y diversidad de levaduras del género *Candida*, con la finalidad de aportar evidencia experimental que permita focalizar el tratamiento de las patologías orales provocadas por este microorganismo en estos pacientes.

3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

Hipótesis.

La descompensación metabólica en pacientes con DM2 produce acidificación salival, lo que aumenta el recuento y diversidad de especies de levaduras del género *Candida* presentes en este fluido con respecto a sus pares compensados metabólicamente.

Objetivo General.

Comparar pH salival, Recuento y Diversidad de Levaduras de la especie *Candida* entre pacientes con DM2 compensados y descompensados metabólicamente.

Objetivos Específicos.

1. Determinar los distintos grados de control metabólico de pacientes con DM2 mediante los niveles de HbA1c
2. Determinar el pH salival en pacientes con DM2 con distinto grado de control metabólico.
3. Determinar el recuento e identificación de especies de levaduras del género *Candida* presentes en saliva de pacientes con DM2 con distinto grado de control metabólico.
4. Asociar pH salival, recuento y especies de levaduras del género *Candida* presentes en saliva de pacientes con DM2 metabólicamente compensados y descompensados.
5. Comparar pH salival, recuento y diversidad de levaduras de la especie *Candida* entre pacientes DM2 compensados y descompensados metabólicamente.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS:

TIPO DE ESTUDIO REALIZADO.

Estudio observacional, analítico, de corte transversal.

MUESTRA.

Se estimó una muestra de 52 sujetos en base a un nivel de significación estadística de 0,05 y una potencia de 0,9.

Todos los sujetos reclutados pertenecían a la Asociación de Diabéticos de Chile (ADICH), institución privada sin fines de lucro que recibe a pacientes que consultan de forma espontánea o derivados del servicio público como privado. Se solicitó a los sujetos que aceptaron participar la firma de un consentimiento informado que cumple con las recomendaciones de la declaración de Helsinki (De Roy y cols., 2004). El trabajo de investigación se enmarca en el proyecto FIOUCH 13-002, aprobado por el Comité de Ética y de Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 1 y 2).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Sujetos de ambos sexos, de 30 años o mayores, con diagnóstico de DM2 confirmada en la ADICH conforme al criterio establecido por el Ministerio de Salud (MINSAL, 2005). Se consideraron DM2 aquellos individuos con una glicemia en ayunas mayor a 126 mg/dl y/o prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) con glicemia 2 horas post carga \geq 200 mg/dl, y/o hemoglobina glicosilada mayor o igual a 6,5% (American Diabetes Association, 2014).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Sujetos que presentaron: enfermedades reumatológicas, irradiados en zona de cabeza y cuello, embarazadas, enfermedades terminales, presencia de daño neurológico, procesos inflamatorios agudos en la cavidad oral (incluyendo candidiasis), o que hayan utilizado antibióticos o antifúngicos (locales en cavidad oral o sistémicos) durante los últimos tres meses.

PROCEDIMIENTOS.

Examen clínico y toma de muestras de saliva.

Un único operador, previamente entrenado, recolectó las muestras de saliva no estimulada en un tubo de centrifugación Falcon 50 mL (BD Falcon, USA), previamente pesado y rotulado conforme el protocolo descrito por Navazesh (Navazesh y cols, 1993). Los voluntarios debieron abstenerse de fumar, cepillarse los dientes o consumir alimentos durante al menos una hora previo a la toma de muestra. Posterior a un enjuague con agua destilada, y tras permanecer durante 5 minutos en un estado de relajación, se solicitó a los participantes tomar asiento cómodamente, con la cabeza gacha y depositar saliva durante 5 minutos en el tubo antes mencionado. Una vez recogida la muestra de saliva en el tubo, se mantuvo en un recipiente a 5°C hasta su transporte al laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Determinación de HbA1c.

A todos los pacientes voluntarios, se les solicitó los resultados de su examen de Hemoglobina glicosilada (HbA1c), la que debió tener una antigüedad no mayor a 2 días con respecto a la toma de muestra salival. Este examen se realiza en forma rutinaria en la ADICH para establecer el control metabólico de la enfermedad, utilizando el equipo Variant II de la marca Bio Rad, certificado ante el Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina de los Estados Unidos (Genuth y cols., 2003).

Se consideró como descompensación metabólica un porcentaje de HbA1c igual o mayor a 7%, mientras que valores menores a este porcentaje, se consideraron como compensación metabólica, de acuerdo al protocolo descrito por el comité de diagnóstico y clasificación de diabetes mellitus (Genuth y cols, 2003).

Determinación del pH salival.

La medición del valor del pH de las muestras salivales se llevó a cabo a temperatura ambiente, mediante el uso de un pH-metro digital (Modelo PL-600 EZDO-OMEGA que cumple la norma ISO-9001), que de forma automatizada ofrece el valor del pH con 2 decimales. Todas las mediciones se realizaron por el mismo operador y con la misma metodología (Kitasako y cols., 2008):

- i. Calibración del pH-metro;
- ii. Inmersión del electrodo en el tubo colector de saliva;
- iii. Lectura del valor del pH de la muestra durante 5 segundos tras la estabilización de ésta;
- iv. Lavado del electrodo con agua destilada;
- v. Conservación del electrodo en una solución tampón.



Figura 4: Lavado del Electrodo Posterior a La Calibración del pH-metro

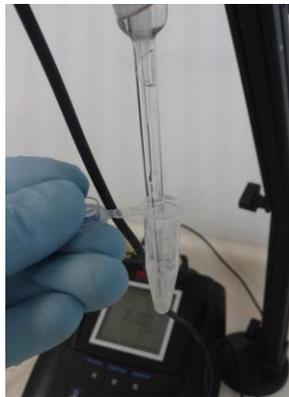


Figura 5: Medición del pH salival con el pH-metro

Crecimiento y Aislamiento de Levaduras.

Los aislados de levaduras se obtuvieron a partir de diluciones seriadas de la saliva en PBS 1/10; 1/100 y 1/1000, se agitó durante 15 segundos en Vórtex. Se sembró una alícuota de 100 μ l en placas de Agar Sabouraud Dextrosa con Tetraciclina (50 μ g/ml) y otra alícuota de 100 μ l en placas de CHROMagar Candida, e incubadas durante 48 horas a 30 °C. Transcurrido este tiempo se realizó el recuento desde la placa que ofreciese mayor facilidad para el recuento. La identificación por CHROMagar Candida produce colores específicos para diferentes especies de *Candida* (Odds y Bernaerts, 1994), debido a sustratos artificiales que son degradados por enzimas específicas y que dan colores para cada especie, como se muestra en la Tabla 5 y Figura 6:

Especie	Color
<i>C. albicans</i>	Verde claro a mediano
<i>C. tropicalis</i>	Azul verdoso a metálico
<i>C. krusei</i>	Rosado claro con borde blanco
<i>C. glabrata</i>	Lila a Morado

Tabla 5. Especies reconocidas en CHROMagar Candida y colores específicos.

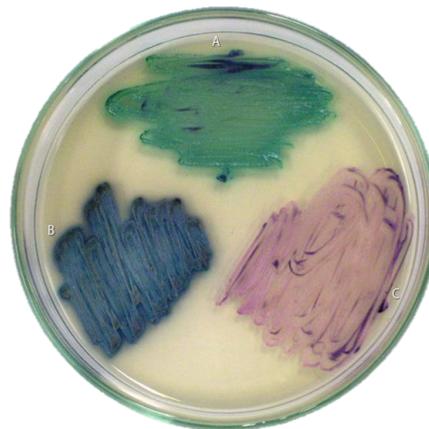


Figura 6: Imagen de Jaivo Ivo do Santos, CHROMagarCandida.

Las colonias fueron recuperadas y contadas en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) y almacenadas en placas independientes para su posterior identificación.

Según la identificación presuntiva obtenida mediante la siembra en CHROMagar Candida, se aislaron de 2 a 4 representantes de cada especie para verificar su identidad, los que se agregaron a 1,5 ml de medio de cultivo líquido Sabouraud-Tetraciclina (50µg/ml) e incubados durante 48 hrs. a 30°C, siendo posteriormente mezclados con 400µl de glicerol y almacenados a - 20°C.

Identificación de levaduras.

Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*

La identificación de los aislados de levaduras, aislados dese CHROMAgar Candida, se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con partidores específicos para detección de especies de *Candida*.

Se realizó diluciones de absorbancia hasta alcanzar una concentración de 2 Unidades de Absorbancia (UA) (475 µl de agua y 25 µl de medio líquido Sabouraud-Tetraciclina con cada representante), previa agitación a 30°C durante 16 hrs. Posteriormente se depositó 125 µl de la dilución de cada representante en filtros de papel para la extracción de DNA, dejando secar a 37°C por 20 minutos, para luego depositar 125 µl más de dilución de cada representante, siguiendo la técnica descrita por Lefimil y cols. el año 2013, en que utilizando un sistema de corte tipo sacabocados se obtuvo un círculo de aproximadamente 1mm de diámetro (punch) de cada representante, fué secado y luego procesado con 200 µl de hidróxido de sodio (NaOH 20mM) por 30 minutos y posteriormente con 200 µl de buffer TE por 5 minutos, luego fue secado a temperatura ambiente durante 1 hora.

Debido a que *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* comparten características morfológicas, fisiológicas y presentan patrones bioquímicos similares, no es posible diferenciarles mediante el uso de CHROMAgar Candida (Ambas son verdes en este medio de cultivo) (Pineda y cols., 2008), Para poder identificar aislados de estas especies se utilizó partidores específicos de pared celular para amplificar por PCR el gen HWP-1 que codifica para la proteína 1 de pared de la hifa (Romeo y cols., 2006).

Esta técnica produce amplificación de un fragmento de ADN que es de distinto tamaño dependiendo de la especie, como se muestra en la Tabla 6.

Espece	Segmento (Pb)
<i>C. dubliniensis</i>	930 Pb
<i>C. albicans</i>	1.180 Pb

Tabla 6. Fragmentos de ADN producidos por la técnica PCR con partidador HWP-1.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en tubos Eppendorf que contenían en 15 μ l: Buffer 10X; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM de dNTP's; Colorante 10X; 1M de Betaína; 0,1 U/ μ l de Taq Polimerasa; 1 μ M de Partidor WF (5'-GTTTTTGCAACTTCTCTTTGTA-3'); 1 μ M de Partidor WR (5'-ACAGTTGTATCATGTTTCAGT-3') 25uM; 6,6 μ l de agua bidestilada y ADN genómico (contenido en el punch).

Las etapas de esta amplificación constan de una denaturación inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 95°C durante 1 minuto, alineación a 50°C por 1 minuto y extensión a 72°C durante 2 minutos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos (Romeo y cols., 2006).

Los productos amplificados se separaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% utilizando marcadores de tamaño molecular de 50 y/o 100pb de la marca Bioline. El gel fue tratado con bromuro de etidio y los productos se visualizaron mediante el uso de un transiluminador UV y fueron registrados fotográficamente. Se utilizaron como control las cepas *C. albicans* ATCC 90029 y *C. dubliniensis* CD36. (Ver figuras 7 y 8).

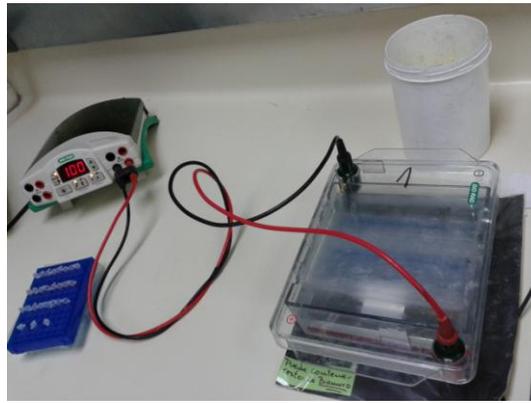


Figura 7: Cámara de Electroforesis

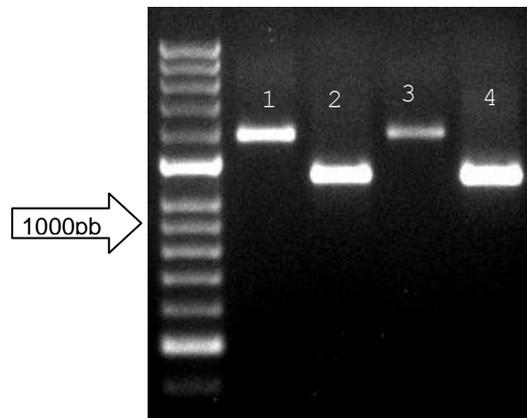


Figura 8: Foto gel de Agarosa 1,2% vista con transiluminador, de las cepas de referencia y 2 aislados clínicos.

En esta imagen, los dos primeros carriles corresponden a las cepas de control, la primera corresponde a *C. albicans* ATCC 90029, con 1180 pb y la segunda a *C. dubliniensis* CD36 con 930 pb. Los carriles 3 y 4 corresponden a aislados clínicos, correspondiendo 3 a *C. albicans* y 4 a *C. dubliniensis*.

Técnica de Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) para identificar *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*

A modo de control se realizó corte de los fragmentos con la enzima de restricción BamHI que permite diferenciar a ambas especies en un ensayo de verificación. Se agregó 10 µl del amplicón obtenido por PCR a un tubo con 0,2 µl de la enzima BamHI, 1,5 µl de Buffer K y 3,3 µl de agua. Para la mezcla de los controles se reemplazó 0,2 µl de enzima MspI por 0,2 µl de agua. Se mantuvo a 37 °C durante 3 horas y se agregó 3 µl de Colorante 10x para luego realizar la electroforesis en gel de agarosa. El ADN de *C. albicans* cortado con BamHI produce fragmentos de 793 y 387 pb., en cambio el ADN de *C. dubliniensis* no es cortado por esta enzima.

Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar especies de *Candida* no *Candida albicans*

Para distinguir las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. guilliermondii* se utilizó la técnica de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) acoplada a PCR (PCR-RFLP) con los partidores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), siguiendo la técnica descrita por Mirhendi y cols. el año 2006. Las especies fueron identificadas por el distinto tamaño de los amplicones. Se utilizó como control las cepas *C. albicans* ATCC 90029, *C. dubliniensis* CD36, *C. glabrata* ATCC 2001 y *C. tropicalis* ATCC 750. (ver tabla 7):

Espece	Segmento (pb)
<i>C. albicans</i>	535 pb
<i>C. glabrata</i>	875 pb
<i>C. parapsilosis</i>	520 pb
<i>C. tropicalis</i>	524 pb
<i>C. krusei</i>	510 pb
<i>C. guilliermondii</i>	608 pb

Tabla 7. Fragmentos de ADN producidos por PCR-RFLP con partidores ITS-1 e ITS-4.

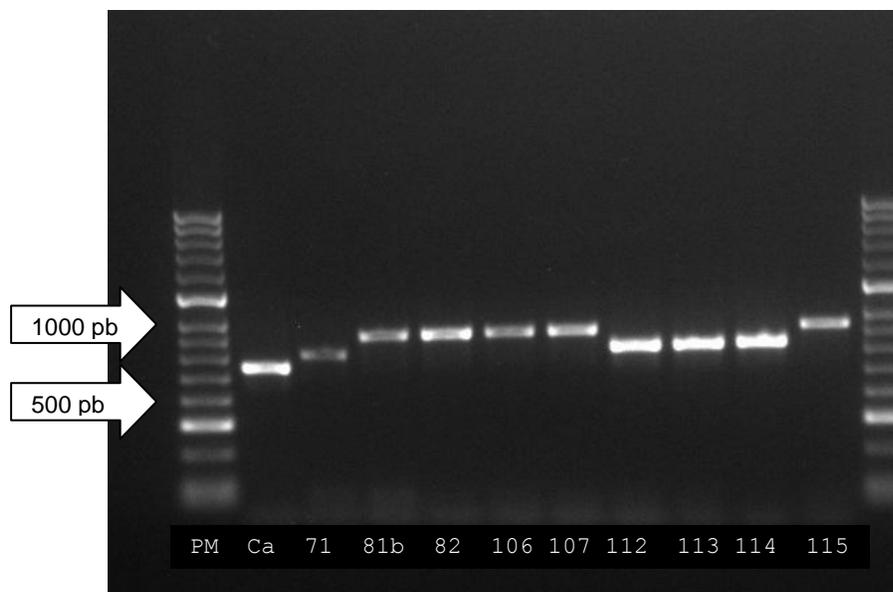


Figura 9: Electroforesis en Agarosa 1,2%, de aislados clínicos.

En la figura 9 podemos apreciar aislados clínicos de *C. albicans*. Ca corresponde al control de *Candida albicans*; los especímenes 71,112, 113 y 114 corresponden a *Candida guilliermondii*. Los aislados 81b, 82, 106, 107 y 115 no pueden ser identificados por esta técnica.

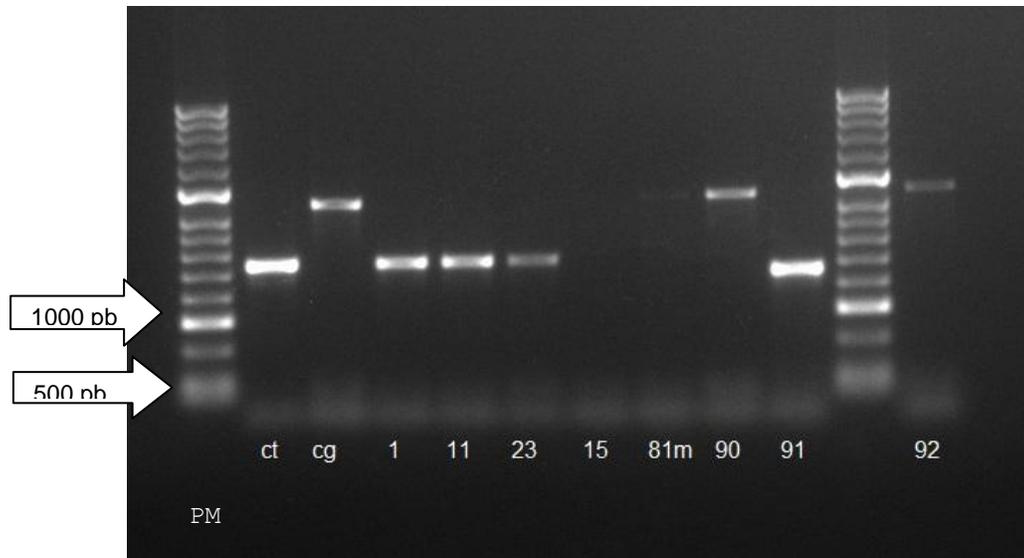


Figura 10: Electroforesis en gel de Agarosa 1,2%, de aislados clínicos de *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

En la figura 10, ct corresponde al control de *C. tropicalis* y cg al control de *C. glabrata*. Los aislados 1, 11 y 23 correspondieron a *C. tropicalis*, mientras que los aislados 90 y 92 fueron identificados como *C. glabrata*. El aislado 91 no pudo ser identificado mediante esta técnica.

Técnica de Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) para identificar especies de *Candida no Candida albicans*.

Como control se realizó digestión con la enzima MspI, se agregó 10µl del amplicón obtenido por PCR a un tubo con 0,2µl de la enzima MspI, 1,5µl de Buffer Tango y 3,3µl de agua. Para la mezcla de los controles se reemplazó 0,2µl de enzima MspI por 0,2µl de agua. Se mantuvo a 37°C durante 3 horas y se agregó

3µl de Colorante 10x para luego realizar la electroforesis en gel de agarosa. Este RFLP da fragmentos de 297pb y 238pb para *C. albicans*; de 557pb y 314pb para *C. glabrata*; de 340pb y 184pb para *C. tropicalis*; de 261 y 249 pb para *C. krusei*; de 371, 155 y 82 pb para *C. guilliermondii* y no corta *C. parapsilosis*, con lo que permanece de 520 pb.

Para identificar aquellas cepas que no pudieron ser clasificadas mediante las pruebas antes descritas se utilizó el sistema de galerías API ID 32C® (bioMérieux, L'Étoile, Francia). Este sistema estandarizado consiste en 32 ensayos miniaturizados de asimilación de distintas fuentes de carbono. A cada reacción se le asigna un número según la metabolización o no del compuesto, generando un código numérico que se compara con una base de datos existente.

Primero se obtuvo colonias puras de los aislados de levaduras a identificar, siendo incubados por 48hrs a 30°C en CHROMAgar Candida. Posteriormente 1 o dos colonias fueron sembradas y cultivadas en medio líquido Sabouraud Tetraciclina (50µg/ml) durante 24 hrs. con agitación constante. Pasado este tiempo, se diluyó un volumen del medio de cultivo en 2ml de agua destilada esteril, y se ajustó a una turbidez igual a un patrón 2de McFarland medido con el espectrofotometro.

Se depositó alícuotas de 250ul de la suspensión en ampollas que contenían 7 ml de medio API, proveído por el fabricante, siendo homogeneizadas mediante agitación suave.

Se tomó 135µl de cada cultivo en caldo y con ellas se inoculó cada uno de los 32 pocillos de cada galería, utilizando una galería distinta para cada cepa. Se tapó las galerías, y se les incubó durante 48hrs. a 30°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a leer las galerías de forma visual por un investigador calibrado, quien determinó el crecimiento del microorganismo inoculado, o ausencia de crecimiento del mismo.

Los ensayos se separaron en grupos de 3 dentro de cada galería. A cada pocillo se asignó el valor 1, 2 ó 4 si la reacción es positiva en el 1°, 2° o 3° pocillo ó 0 si

es negativa en el pocillo, siendo la suma de esos dígitos el valor de cada trío de pocillos, obteniendo así un número de 7 dígitos, que correspondió al perfil numérico del microorganismo.

Con el perfil numérico se procedió a codificar cada galería e identificar el microorganismo en cuestión en base a la comparación de su perfil numérico con la base de datos proporcionada por el proveedor del sistema comercial (BioMérieux).



Figura 11: Galería API ID 32 C® antes de ser utilizada

En el presente estudio se realizó la identificación de las especies de lavaduras mediante 3 métodos distintos: Fenotípica mediante el cultivo en CHROMAgar Candida (identificación presuntiva). Mediante métodos moleculares (PCR y RFLP) con la posterior visualización en el gel de Agarosa. Además se realizó identificación de forma bioquímica mediante la utilización del sistema API ID 32C®. Aquellas cepas que no pudieron ser identificadas mediante PCR ni el sistema API ID 32C® fueron clasificadas como “No Identificadas”.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Los datos se registraron en una planilla Excel®, para después proceder a su análisis estadístico.

Para determinar si las variables tenían distribución normal, se utilizó el Test de Shapiro Wilk.

Los datos HbA1c, pH salival y cantidad de UFC/ml no se distribuyeron normalmente, por lo que se utilizó el test no paramétrico de Spearman para correlacionarlos.

Para realizar comparaciones entre grupos se utilizó la Prueba de Chi cuadrado.

Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un $p \leq 0.05$.

El análisis estadístico se llevó a cabo con los software Stata 12 y Graph Pad Prism 5.

5) RESULTADOS.

A.- CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA.

A1. Edad.

La muestra corresponde a 52 pacientes, adultos, de entre 33 y 82 años, siendo 61 años la edad promedio del grupo de pacientes compensados y 65,38 la del grupo descompensado no encontrándose diferencias estadísticamente significativas, distribución que se enseña en el Gráfico 1, por motivos didácticos, se agrupó a los pacientes en mayores y menores de 50 años.

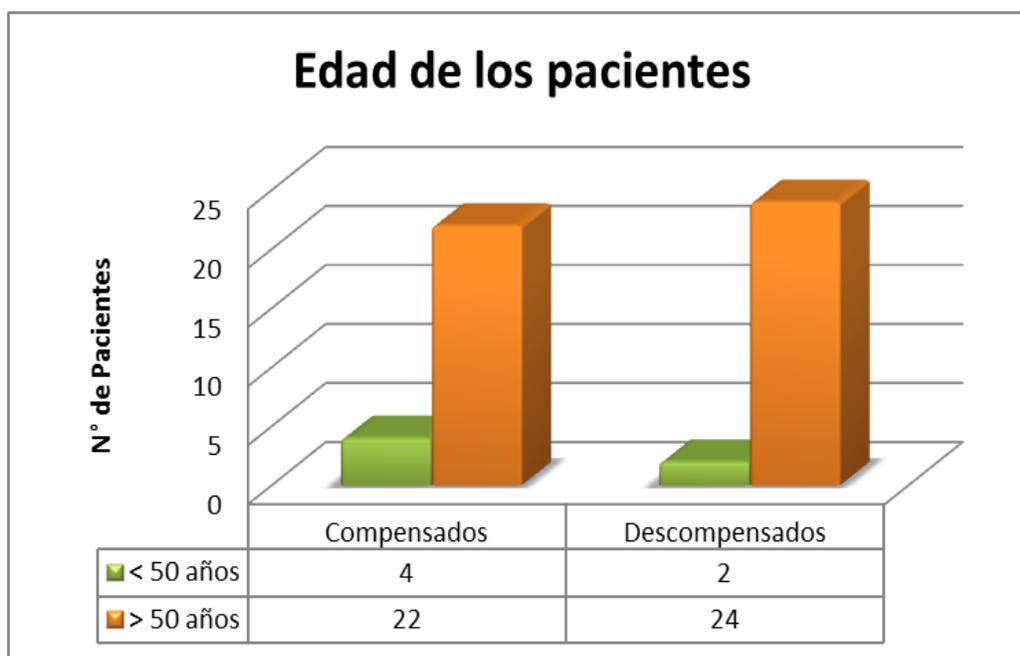


Gráfico 1. Edad de los pacientes en los grupos compensados y descompensados.

A2. Sexo.

La mayoría de los pacientes de la fueron mujeres (81%), como se observa en el Gráfico 2. Los que estuvieron distribuidos en forma equitativa entre el grupo de pacientes compensados y descompensados (Ver Gráfico 3).

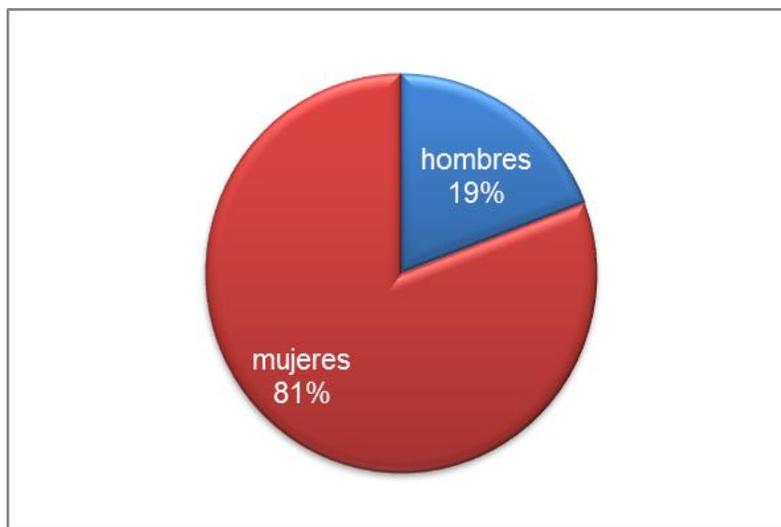


Gráfico 2. Proporción hombres Y mujeres del estudio.

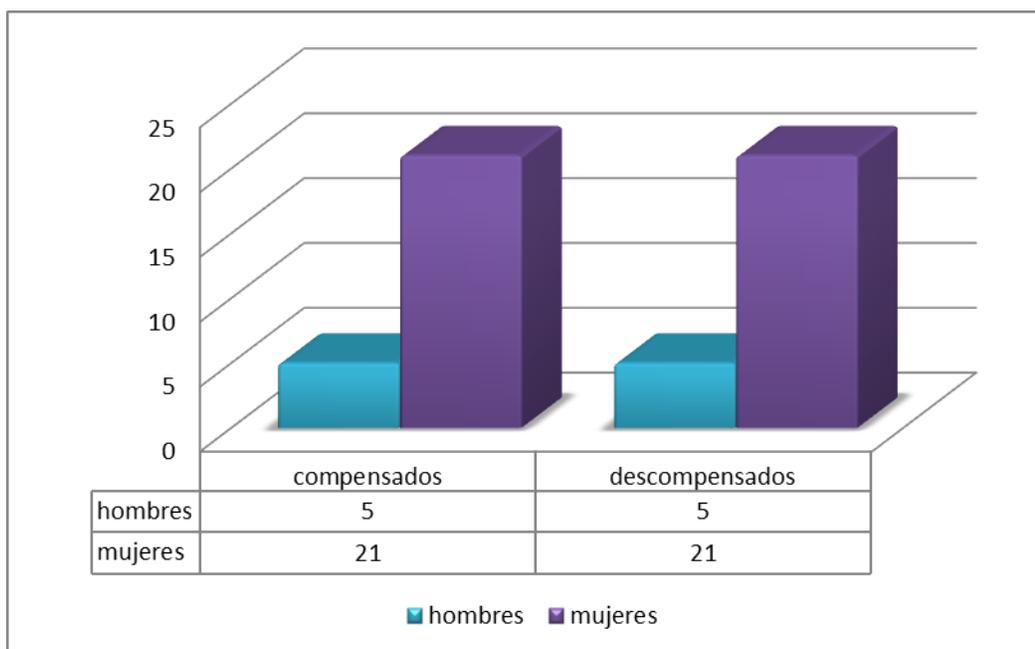


Gráfico 3. Distribución de los participantes según sexo en los grupos de trabajo.

A3. Tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la Diabetes Mellitus.

En promedio, los pacientes presentaban 6,5 años transcurridos desde el diagnóstico de la DM2 variando entre un mínimo de 4 meses, hasta un máximo de 44 años. El Grupo de Pacientes Compensados presentó un promedio de 9,2 años desde el diagnóstico de DM2 (Desviación Estándar (S): $\pm 10,54$ años) mientras que el Grupo de Pacientes Descompensados presentó un promedio de 9,2 años (S: $\pm 5,30$ años). Ver tabla 8.

	Compensados	Descompensados
0- 5 años	12	8
6-10 años	8	10
11-15 años	1	6
16-20 años	0	2
> 20 años	5	0
Total	26	26

Tabla 8. Años transcurridos desde el Diagnóstico de DM2.

B. COMPENSACIÓN METABÓLICA.

Del total de 52 pacientes, 26 se encontraban compensados ($HbA1c \leq 7\%$) y 26 descompensados ($HbA1c > 7\%$). En el grupo de pacientes compensados, la $HbA1c$ promedio fue de 6,4% (Mediana (Me): 6,95%; Moda (Mo): 6,9%; S: $\pm 2,05$), siendo el mayor valor de 7% y el menor de 5,7%. En el grupo de pacientes descompensados el promedio fue de 9,9% (Me: 9,65%; S: $\pm 1,48$), el mayor valor de $HbA1c$ fue de 12,6% mientras que el menor 7,6% (Ver tabla 9).

HbA1c	Número de pacientes compensados	HbA1c	Número de pacientes descompensados
5,5-6%	6	7,5-8,5%	5
6,1-6,5%	8	8,6-9,5%	8
6,6-7%	12	9,6-10,5%	5
		$\geq 10,5\%$	8
Total	26	Total	26

Tabla 9. Distribución de Pacientes según su $HbA1c$.

C. DETERMINACIÓN DEL pH SALIVAL.

C1. pH Salival en la Muestra Total.

El pH salival promedio obtenido en el total de la muestra fue de 7,54 (S: $\pm 0,46$, Me: 7,56), El menor valor de pH fue 6,59, correspondiendo a un paciente compensado (HbA1c: 6,7%). El máximo valor de pH registrado fue 8,58, correspondiendo también a un paciente compensado (HbA1c: 6,9%). Ver Gráfico 4.

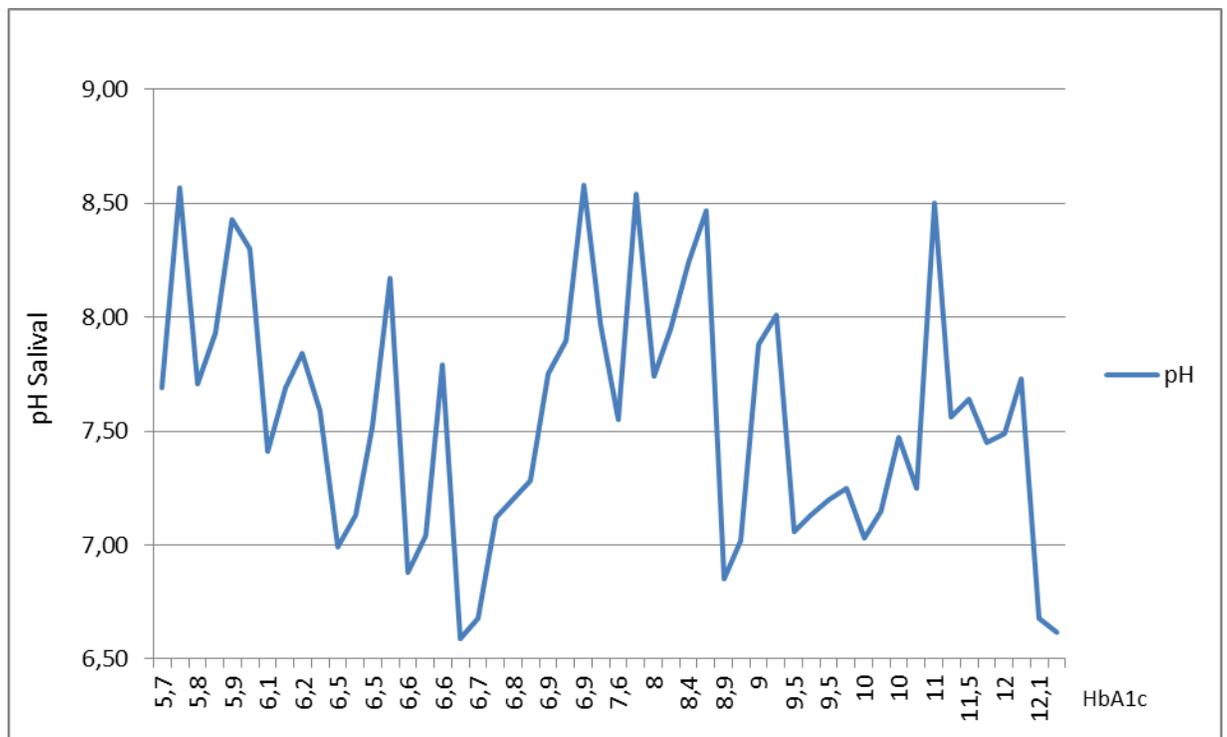


Gráfico 4. pH en Función de la HbA1c.

Se determinó que ninguna de las variables (HbA1c y pH) se distribuía de forma normal.

El análisis estadístico arrojó un rho de -0,25 y un p de 0,07.

C2. pH Salival por grupos.

C2i. pH Salival en Pacientes Compensados Metabólicamente.

En el Grupo de Pacientes Controlados Metabólicamente, se obtuvo un pH promedio de 7,61 (S: $\pm 0,56$; Me: 7,69). El pH mínimo fue 6,59 correspondiente a una HbA1c de 6,7%. El pH máximo fue de 8,58 correspondiente a una HbA1c de 6,9%.

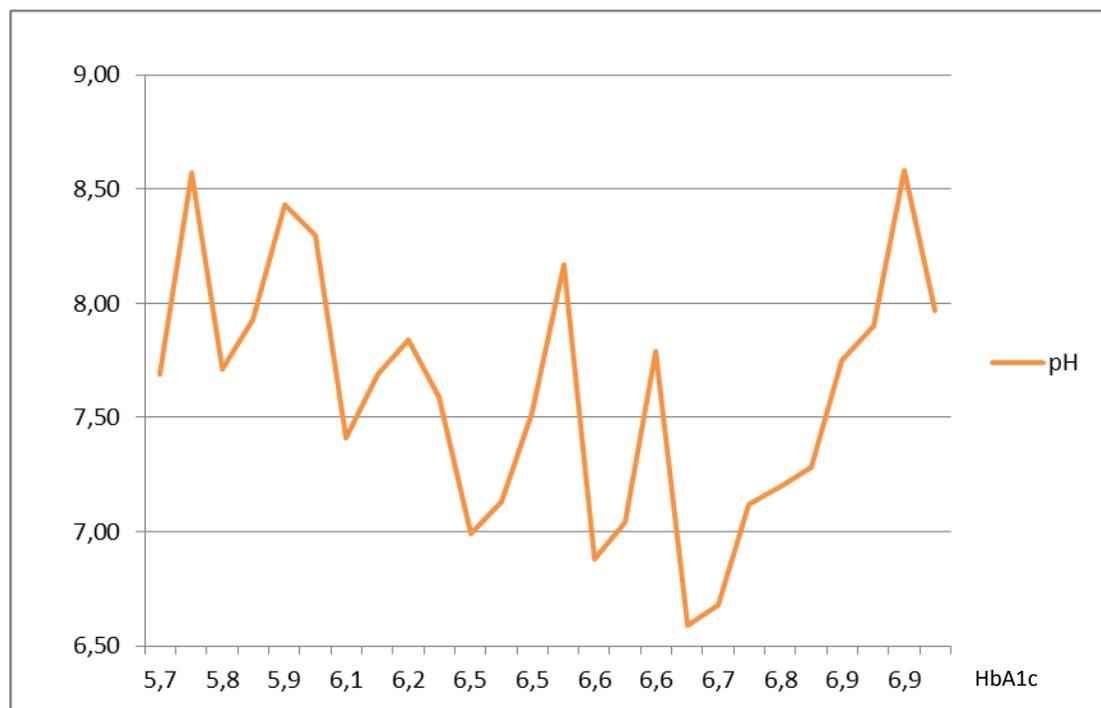


Gráfico 5. pH Salival en Función de la HbA1c en Pacientes DM2 Compensados

pH Salival

El análisis estadístico dio como resultado un valor rho de -0,25 y un p 0,23.

C2ii. pH Salival en Pacientes Descompensados Metabólicamente.

El Grupo Descompensado Metabólicamente tuvo un pH promedio de 7,52 (S: \pm 0,54; Me: 7,48), siendo su valor mínimo 6,62, en relación a una HbA1c de 12,6% . El pH más alto fue 8,54 que correspondía a una HbA1c de 7,8%.

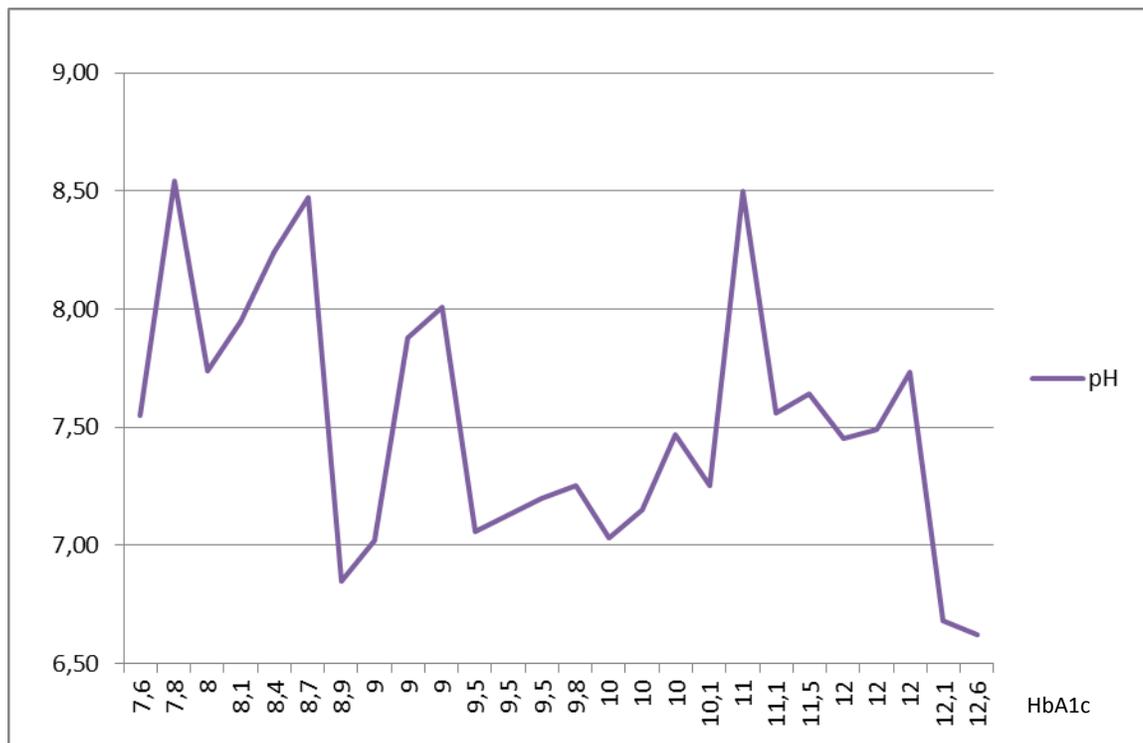


Gráfico 6. pH Salival en Función de la HbA1c en Pacientes DM2 Descompensados

pH Salival

El análisis estadístico dio como resultado un rho: -0,4 y un p: 0,04.

C2iii. Comparación pH salival entre pacientes compensados y descompensados metabólicamente.

Al analizar en conjunto a los grupos de pacientes compensados y descompensados metabólicamente, nos encontramos con que no existen diferencias estadísticamente significativas en ningún rango de pH evaluado, estando la máxima concentración de pacientes en el rango de pH 7,01-7,5 en los pacientes descompensados, y entre 7,51 y 8 en los pacientes compensados metabólicamente. (Ver tabla 10).

Rango pH Salival	N° de Pacientes		X ²
	Compensados	Descompensados	
6,5-7	4	3	p= 0,7
7,01-7,5	6	11	p= 0,2
7,51-8	11	7	p= 0,3
>8	5	5	p= 1
Total	26	26	

Tabla 10. Comparación pH salival pacientes DM2 metabólicamente compensados y descompensados.

D. RECUENTO DE LEVADURAS EN SALIVA DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 RELACIONADO A SU pH SALIVAL.

D1. Relación entre pH Salival con el Status de Portador o No Portador de Levaduras.

Del total de 52 pacientes, 39 (75%) presentaron crecimiento de 1 o más UFC/ml de levaduras en agar Sabouraud, a estos se les agrupó como portadores.

13 pacientes (25%) que no presentaron crecimiento de levaduras en las muestras salivales (no portadores), de estos 8 eran compensados y 5 descompensados (Ver tabla 11).

pH	Portador	No portador	χ^2
6,5-7	6	1	p= 0.058
7,1-7,5	13	2	p= 0.004
7,6-8	15	5	p= 0.02
> 8	5	5	p=1
Total	39	13	

Tabla 11. Relación pH salival – Condición de Portador de Levaduras.

La diferencia entre portadores y no portadores es estadísticamente significativa en el rango de pH 7,1 - 8.

Rango de pH	N° de Pacientes Portadores		X ²	N° de Pacientes No portador		X ²
	Compensados	Descompensados		Compensados	Descompensados	
6,5-7	2	3	0,6	2	0	0,2
7,1-7,5	5	9	0,3	1	1	1
7,6-8	8	5	0,4	3	2	0,6
> 8	2	3	0,6	3	2	0,6
Total	17	20	0,6	9	5	0,2

Tabla 12. Comparación entre Status de Portador entre pacientes compensados y descompensados metabólicamente versus pH salival

Como muestra la tabla 12, no hay diferencias significativas al comparar ambos grupos de estudio (pacientes compensados y descompensados).

Al hacer una comparación dentro de los mismos grupos, no se encontró diferencias estadísticamente significativas en el grupo de los Pacientes DM2 compensados, mientras que en el grupo de pacientes DM2 descompensados hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,01$) entre portadores y no portadores sólo en el rango de pH comprendido entre 7,5 y 8.

D2. Recuento total de levaduras en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en función del pH salival.

Del total de muestras, 4 presentaron crecimiento en forma de césped (el número inicial de bacterias por unidad de superficie es muy alto como para ser contado), de los cuales 3 corresponden al grupo de pacientes compensados y 1 a los descompensados.

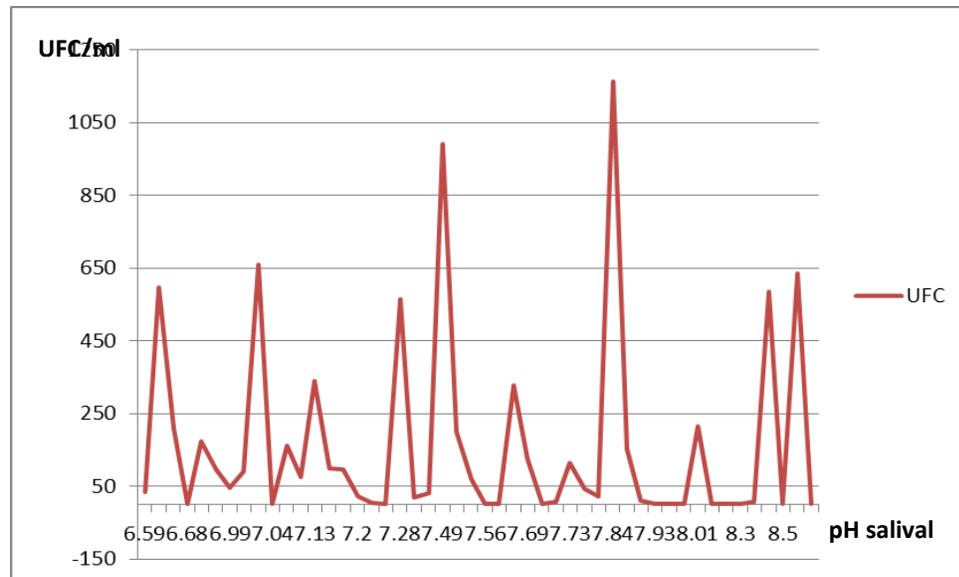


Gráfico 7. Recuento de Levaduras versus pH Salival en la muestra total

Del análisis estadístico se obtuvo un ρ : -0,26 y $p=0,06$.

Rango de pH	Recuento de Levaduras (UFC/ml)		
	Compensados	Descompensados	X ²
6,5-7	177	978	p= 0
7,01-7,5	684	2471	p= 0
7,51-8	1528	704	p= 0
>8	7	1436	p= 0
Total	2396	5589	p= 0

Tabla 13. Comparación Recuento de levaduras versus pH salival entre pacientes compensados y descompensados.

Las diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los rangos de pH al comparar a los pacientes compensados versus los descompensados.

E. DIVERSIDAD DE ESPECIES DE LEVADURAS EN SALIVA DE PACIENTES DM2 RELACIONADO A SU pH SALIVAL.

E1. Especies de levaduras aisladas en la muestra total en función del pH salival.

Del total de portadores de levaduras, se encontró *Candida albicans* en 38 pacientes (73%), *Candida Glabrata* en 11 pacientes (21%), *Candida dubliniensis* en 1 paciente (1,9%), *Candida tropicalis* en 3 pacientes (5,8%), *Candida guilliermondii* en 2 pacientes (3,8%), *Rhodotorula* en 1paciente (1,9%) y en 3 pacientes (5,8%) hubo cepas que no pudieron ser identificadas.

Al análisis en conjunto de todas las muestras de saliva, se obtuvo un total de 55985 UFC/ml de levaduras, observándose claras diferencias en la distribución de levaduras al agrupar las muestras en 4 categorías en función de intervalos de pH salival, como se observa en el gráfico 8.

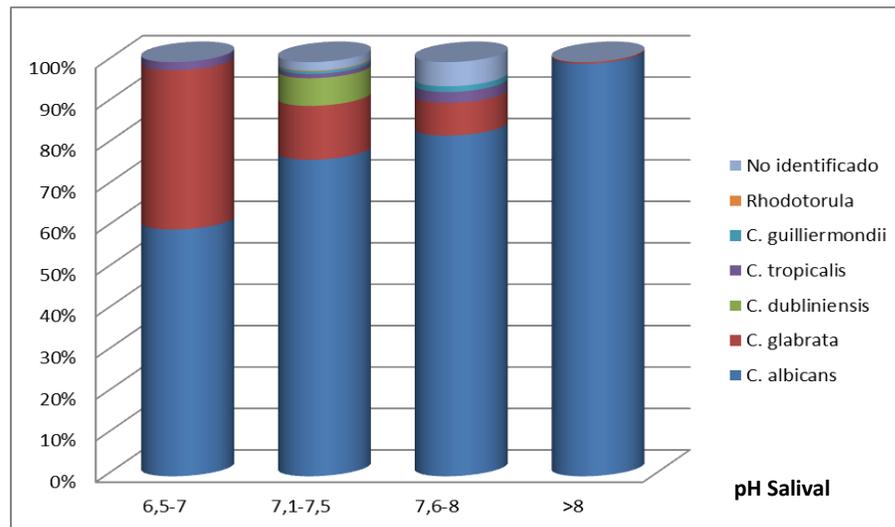


Gráfico 8. Diversidad de Especies Levaduras versus pH Salival en el Total de Muestras Salivales.

En el gráfico 8 se observa que existe una mayor diversidad de especies en los sujetos cuyo pH salival se encuentra en el rango de pH que va entre 7,1 y 8. También podemos observar que *Candida glabrata* se encuentra en mayor proporción en un menor pH salival, disminuyendo en su proporción con respecto a las otras especies a medida que aumenta el pH, *Candida albicans*, se encuentra en mayor proporción en las muestras de saliva con pHs más alcalinos.

E2. Recuento de *Candida albicans* en Pacientes DM2 versus pH Salival.

Se aisló un total de 30891 UFC/ml de *Candida albicans* (56% del total de levaduras aisladas). El mayor recuento de *Candida albicans*, se encontró en los pacientes que tuvieron valores de pH entre 7 y 7,5. Sin embargo, un paciente tuvo crecimiento en césped de *Candida albicans*, al considerarlo, el recuento sería mayor en el rango de pH mayor a 8. Se observó además que no hay asociación entre recuento de *Candida albicans* y pH salival (rho: -0,13, p=0,36). Ver gráfico 9 y tabla 14.

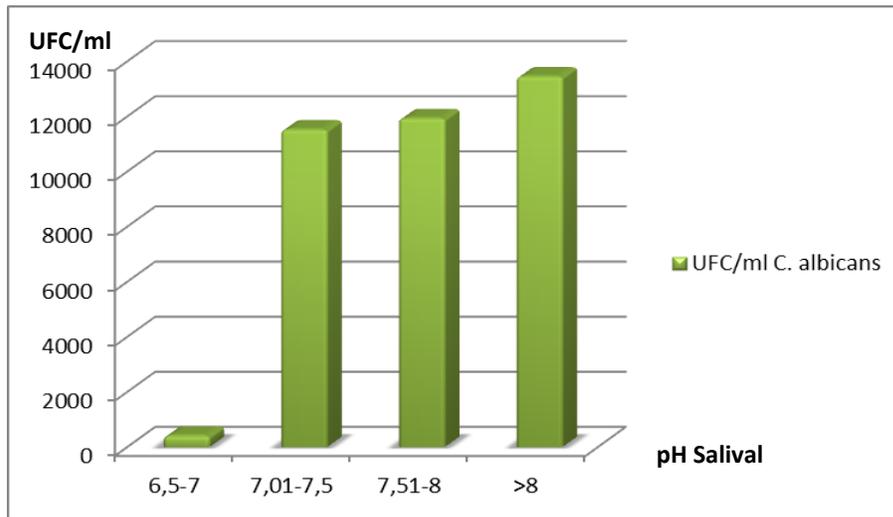


Gráfico 9. Distribución de *Candida albicans* en pacientes DM2 versus pH salival.

Rangos de pH	UFC/ml según compensación metabólica		X ²
	Compensados	Descompensados	
6,5-7	286	123	p= 0,01
7,01-7,5	8845	2677	
7,51-8	5112	399	p= 0
>8	12007	1442	p= 0

Tabla 14: Recuento de *Candida albicans* en pacientes DM2 compensados y descompensados versus pH salival.

Hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar a los pacientes compensados y descompensados en los distintos intervalos de pH analizados.

E3. Recuento de *Candida glabrata* en pacientes DM2 versus pH salival.

Se aisló un total de 21476 UFC/ml de *Candida glabrata* (38,36% del total de levaduras), siendo el rango de pH comprendido entre 7,1 y 8 donde se observó mayor recuento de *Candida glabrata*. (grafico 10). Además, se observó que existe una relación discreta e inversa (ρ : -0,3 y $p=0,029$) entre pH Salival y recuento de *Candida glabrata*. Ver gráfico 10 y tabla 15.

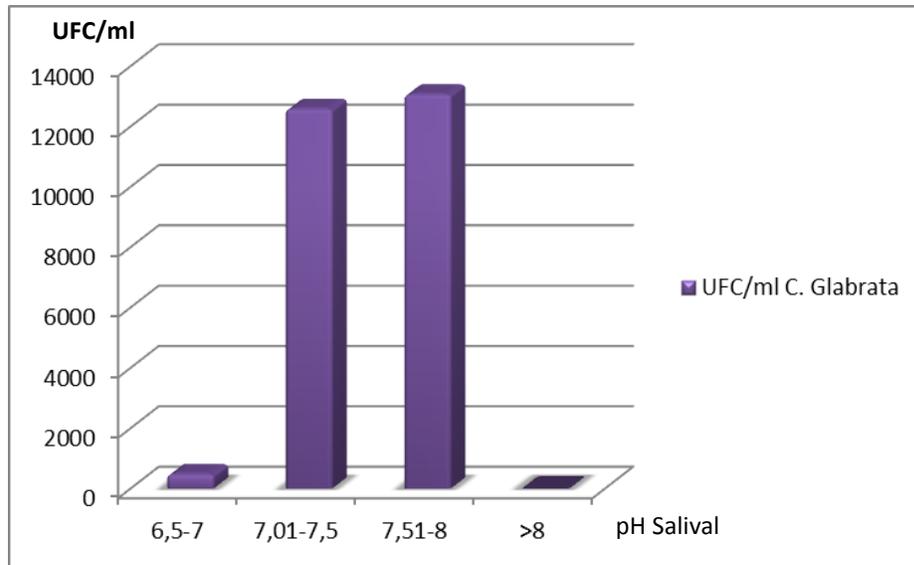


Gráfico 10. Distribución de *Candida glabrata* versus pH salival en pacientes DM2.

Rangos de pH	UFC/ml según compensación metabólica		χ^2
	Compensado	Descompensado	
6,5-7	99	381	$p=0$
7,01-7,5	3855	8730	$p=0$
7,51-8	8407	0	$p=0$
>8	0	4	$p=0,04$

Tabla 15: Recuento de *Candida glabrata* en pacientes DM2 compensados y descompensados versus pH salival.

Hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar a los pacientes compensados y descompensados en los distintos intervalos de pH estudiados.

E4. Recuento de otras especies de levaduras saliva de pacientes DM2 en función de su pH salival.

E4i. *Candida dubliniensis*.

Solamente se observó en un paciente descompensado, con un total de 992 UFC/ml (1,77% de las levaduras aisladas en las muestras de saliva total) a pH 7,49. Cabe destacar que este paciente no presentó otras especies de levaduras. (Ver tabla 16)

E4ii. *Candida tropicalis*.

Se encontró un total de 1830 UFC/ml de *Candida tropicalis* (3,27% del total de levaduras aisladas) distribuidas entre 3 pacientes: 2 descompensados (uno presentó 21 UFC/ml en versus pH 6,85. El segundo presentó 1800 UFC/ml en relación a un pH 7,47. El paciente compensado presentó 9 colonias en relación a un pH 7,75. (Ver tabla 16)

E4iii. *Candida guilliermondii* .

Se encontró un total de 114 UFC/ml de *Candida guilliermondii* (0,2% del total de levaduras aisladas), estuvo presente en saliva de dos individuos, uno compensado presentó 56 UFC/ml en un pH 7,28 y uno descompensado, quién presentó 58 UFC/ml en un pH de 7,64. (Ver tabla 16)

E4iv. *Rhodotorula sp.*

Este microorganismo, no pertenece al género *Candida*. Se encontró 3 UFC/ml de *Rhodotorula* a pH 7,2 en un paciente compensado, correspondiendo al 0,05% del total de levaduras aisladas. (Ver tabla 16)

E4v. Especies de Levaduras No identificadas.

Solamente 2 pacientes descompensados presentaron levaduras que no pudieron ser identificados presuntivamente mediante CHROMAgar ni mediante PCR. Estas fueron 198 UFC/ml a pH 7,03 y 247 UFC/ml a pH 7,64, correspondiendo al 0,35% del total de levaduras aisladas. (Ver tabla 16)

Especie de Levadura	UFC/ml según Rango pH				N° Pacientes	
	6,5-7	7,01-7,5	7,51-8	>8	Compensados	Descompensados
<i>C. dubliniensis</i>	0	992	0	0	0	1
<i>C. tropicalis</i>	0	1800	9	0	1	2
<i>C. guilliermondii</i>	0	56	58	0	1	1
<i>Rhodotorula</i>	0	3	0	0	1	0
<i>No identificada</i>	0	198	247	0	0	2

Tabla 16. Distribución de Especies de levaduras distintas de *Candida albicans*, en UFC/ml, distribuidas según pH salival en pacientes compensados y descompensados.

Tabla 16: Las especies de levaduras distintas a *Candida albicans* se desarrollaron en un rango de pH salival que va desde 7,01 hasta 8. Un mayor número de pacientes descompensados metabólicamente presentaron estos microorganismos, aunque no fueron exclusivos de ese grupo de pacientes.

E5. Coexistencia de Especies de levaduras en Relación al pH Salival.

Del total de pacientes de la muestra, 13 (25%) no presentaron levaduras (medida en UFC/ml), 25 (48%) sólo presentaron una especie, 8 (15,4%) presentaron coexistencia de dos especies y en 6 pacientes (11,5%) coexistieron 3 especies de levaduras (ver Gráfico 11).

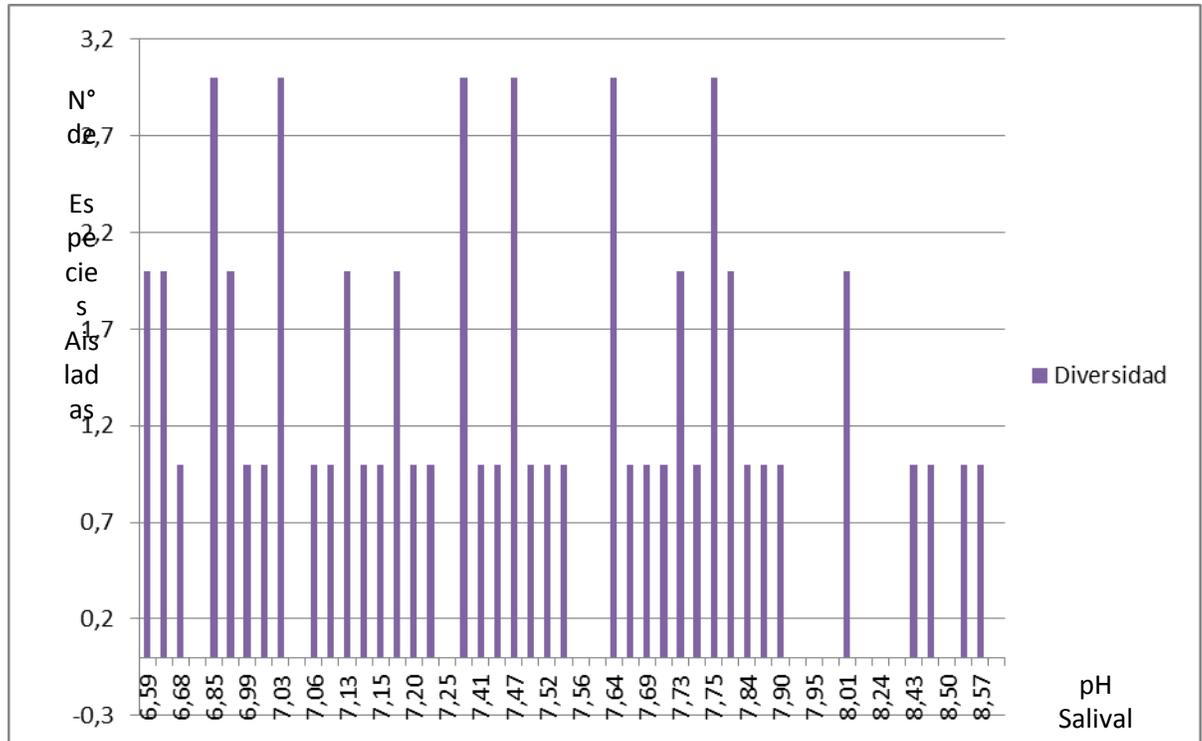


Gráfico 11. Coexistencia de Especies de Levaduras en función del pH Salival .

Este gráfico muestra la coexistencia de levaduras de la muestra total, tomando en consideración cada valor de pH existente.

Al analizar estos resultados se obtuvo un rho: -0,39 y p:0,05.

La especie predominante en esta muestra fue *Candida albicans* y también la que presentó mayor asociación con otras levaduras en los distintos grados de compensación metabólica y pH, como se observa en la Tabla 17.

ESPECIES				NÚMERO DE PACIENTES					
				COMPENSA- DOS	DESCOMPEN- SADOS	RANGO pH			
						6,5 - 7	7,0- 7,5	7,5 1-8	>8
3	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	1	2	1	1	1	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. guilliermondii</i>	1			1		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	No identificado		1		1		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. guilliermondii</i>	No identificado		1			1	
2	<i>C. albicans</i>	No identificado			1			1	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>		4	2	3	1	1	1
	<i>C. albicans</i>	<i>Rhodotorula</i>			1		1		
1	<i>C. albicans</i>			12	12	2	9	9	4
	<i>C. dubliniensis</i>				1		1		
0	-			8	5	1	2	5	5
Total				26	26	7	17	18	10

Tabla 17. Coexistencias de Especies de Levaduras en Saliva de pacientes DM2.

N° de Especies Coexistentes	N° de Pacientes		X ²
	Compensados	Descompensados	
3	2	4	p= 0,4
2	4	4	p= 1
1	12	13	p= 0,8
0	8	5	p= 0,4
Total	26	26	

Tabla 18. Comparación diversidad de especies entre pacientes compensados y descompensados metabólicamente.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre pacientes compensados y descompensados metabólicamente al comparar el número de especies de levaduras coexistentes en su saliva,

F. PACIENTES DIABETICOS TIPO 2 NO PORTADORES DE LEVADURAS EN SALIVA.

Como se mencionó antes, hubo 13 pacientes que no fueron portadores de levaduras, de estos 8 estaban compensados y 5 descompensados, lo que no es estadísticamente significativo. Cabe destacar que en otros pacientes se encontró presencia de levaduras en esos mismos pHs. (Ver tabla 19)

Rango pH	N° de Pacientes		X ²
	Compensados	Descompensados	
6,5-7	1	0	p= 0,3
7,01-7,5	1	1	p= 1
7,51-8	3	2	p= 0,6
>8	3	2	p= 0,6
Total	8	5	

Tabla 19. Distribución de los pacientes Diabéticos tipo 2 no portadores de levaduras según pH salival y compensación metabólica

Tanto las diferencias entre pacientes no portadores de Levaduras con respecto al pH salival como con respecto a su estado metabólico no fueron estadísticamente significativas.

6) DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio fue asociar pH salival con el recuento y diversidad de levaduras del género *Candida* en pacientes DM2 con distinto grado de control metabólico.

Según relata la literatura, pacientes con DM2, independiente de su control metabólico, pueden presentar un menor pH salival en comparación con pacientes no diabéticos. Prathibha y sus colaboradores, en el año 2013 describen en promedio, un pH salival de 6,69 en pacientes diabéticos en comparación con pacientes sanos que presentan un pH neutro o muy cercano a ello. En nuestro estudio, si bien no hubo diferencias en el pH salival entre los pacientes compensados y descompensados, se observó una acidificación del pH salival en el grupo de pacientes con control metabólico deficiente de la enfermedad ($HbA1c > 7\%$), fenómeno no observado en el grupo de pacientes compensados .

La literatura relata que pacientes con DM2 compensados metabólicamente, presentan valores de pH considerados normales según lo descrito por Negroni en el 2009 (pH entre 6,5 y 7). Llama la atención entonces que sólo 7 pacientes de nuestro estudio (de los cuales, 4 eran compensados), presentasen un pH salival que podría ser considerado como normal. Si usamos el criterio descrito por Sánchez y cols. ese mismo año, que considera normal rangos de pH entre 6,5 y 7,5; 9 del total de pacientes tenían un pH salival normal. Este fenómeno podría explicarse por factores no considerados en este estudio como la glicemia instantánea del paciente, factor que ha sido relacionado inversamente con el pH salival en pacientes diabéticos (Arrieta y cols., 2003), así como a la presencia de factores locales como caries dental o alteraciones en los electrolitos salivales.

Es importante hacer notar que si bien en la literatura se describe que a más años desde el diagnóstico de DM2 existe mayor recuento de levaduras del género *Candida* en boca debido al daño acumulativo producto de la enfermedad (García y cols., 2000), en nuestro estudio estas variables no se vieron asociadas.

La relación inversa entre pH salival y grado de control metabólico en pacientes con DM2 descompensados que se establece en este estudio, podría explicar en parte la mayor predisposición de estos pacientes a desarrollar candidiasis ya que un entorno más ácido repercutiría en un aumento del número de levaduras (Araujo y cols., 2014), así como en la activación de proteinasas y fosfolipasas, lo que también se ve favorecido al existir un ambiente rico en glucosa (Samaranayake y cols., 1984). Sin embargo, en este estudio no pudimos evaluar esto debido a que la presencia de candidiasis clínica fue un criterio de exclusión.

En el presente estudio, no se encontró una relación entre el pH salival y el recuento de levaduras, lo que se contradice con lo mayoritariamente descrito en la literatura, pero coincide, por ejemplo con los estudios de Hibino y cols. (2009), y Suárez y cols. (2013), quienes no encontraron relación entre el pH salival y el estatus de portador o no de *Candida sp.* o entre éste y el recuento de levaduras.

En este estudio 75% de los pacientes resultó ser portador de por lo menos una especie de levadura, siendo *Candida albicans* el microorganismo mayoritariamente aislado (en un 73% de los pacientes), valor independiente del control glicémico y del pH salival, similar resultado al de Suárez y cols. (2013) quienes evaluaron la prevalencia de especies del género *Candida* en DM2 en Cali, Colombia y hallaron porcentajes similares (74,8% de portación de *Candida sp.*).

La mayor cantidad y diversidad de especies de levaduras se observó en el rango de pH entre 7,01 y 8; lo que condice con lo descrito por Negroni en su libro "Microbiología Estomatológica, Fundamentos y Guía Práctica", según esta autora "la mayoría de los microorganismos presentes en la cavidad bucal requieren de un pH cercano a la neutralidad para subsistir".

Respecto del total de levaduras aisladas, se encontró un 43,6% de *Candida no Candida albicans*, un 0,05% del género *Rhodotorula*. El 0,35% de especies de levaduras no pudieron ser identificadas. Vale decir, encontramos un 44% de levaduras distintas de *Candida albicans*, todas las cuales han sido antes aisladas en pacientes diabéticos y asociadas con resistencia a los azoles, pero con susceptibilidad a Anfotericina B y Flucitosina (Bremenkamp y cols., 2011.; Bokor-

Bratic y cols., 2013).

Esta alta proporción de levaduras distintas a *Candida albicans* encontradas en nuestro estudio, debiese otorgar evidencia respecto a la necesidad de modificar el enfoque terapéutico de las candidiasis. El clínico, al verse enfrentado a una infección de este tipo, generalmente lo asocia a la presencia de *Candida albicans* y se administra al paciente una terapia antifúngica basada en nistatina, clotrimazol o algún otro miembro de la familia de los azoles, sin importar su condición sistémica u otros factores asociados. Estos fármacos no necesariamente tienen efecto sobre estas especies de levaduras, lo que permite la persistencia de la infección y favorece mayor resistencia a antifúngicos.

Candida glabrata estaría inversamente relacionada con el pH, pero no así con el control metabólico de la enfermedad, siendo este el segundo microorganismo más aislado, resultados que en general no concuerdan con la literatura que describen niveles de cuantificación menor (Bokor-Bratic y cols., 2013; Bremenkamp y cols., 2011).

En tres pacientes compensados se encontró *Rhodotorula*, levadura del phylum Basidiomycetus, que produce pigmentos carotenoides (Miceli y cols., 2011). Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en distintos sitios como en el suelo, aire, ecosistemas acuáticos, plantas y frutas. En humanos se ha aislado de uñas, piel, esputo, orina, heces y manos. Tradicionalmente se le consideraba un saprófito no virulento (Meneses y cols., 2013), pero en las últimas décadas ha emergido como un patógeno oportunista, especialmente asociado a pacientes inmunocomprometidos o portadores de válvulas cardíacas, siendo el cuarto tipo de levadura no *Candida* más frecuentemente aislada en estos pacientes (Orlandi y cols., 2014). La presencia de *Rhodotorula* en la cavidad oral de pacientes diabéticos no es novedad, ya en 1995 Aly y sus colaboradores encontraron este microorganismo en la cavidad oral de pacientes diabéticos mediante el uso del sistema API, al igual que en este estudio. En 2004, Nowakowska y sus colaboradores encontraron presencia de este microorganismo en cavidad oral de embarazadas diabéticas y con diabetes gestacional. La presencia de este

microorganismo en la saliva de pacientes diabéticos, debe ser tomado en cuenta dado que ha sido descrita su resistencia a la familia de los azoles y todos sus derivados, inclusive itraconazol (García y cols., 2001).

En la literatura se ha descrito mayor diversidad de especies del género *Candida* en pacientes diabéticos, especialmente en aquellos descompensados (Suárez y cols., 2013; Bremenkamp y cols., 2011), lo que no se replicó en este estudio, ya que, si bien hubo mayor cantidad de pacientes descompensados que presentaron levaduras distintas de *Candida albicans*, no hubo asociación entre el control metabólico y diversidad de levaduras presentes en saliva de los pacientes diabéticos. Sin embargo encontramos una relación inversa entre diversidad y número de especies de levadura coexistentes en saliva de pacientes con DM2 y su pH salival, lo que otorga mayor evidencia a la necesidad de modificar el enfoque terapéutico de las infecciones micóticas de la cavidad oral de los pacientes diabéticos basados en la acidificación salival de éstos.

Se ha descrito en la literatura que el Fluconazol no tiene el mismo efecto en un ambiente acidificado (Araújo y cols., 2014), fenómeno que se encontraría en aquellos pacientes con DM2 descompensados. Así mismo, se ha descrito que *Candida albicans* es capaz de disminuir el pH del medio si este es rico en glucosa (Samaranayake y cols., 1984). En este estudio, encontramos también mayor diversidad de especies presentes, de las cuales muchas son resistentes a los antifúngicos del tipo azoles, lo que hace pensar en la necesidad de replantear las actuales guías terapéuticas y la forma de abordar al paciente diabético, que claramente requerirá cuidados y tratamientos especiales para poder dar solución integral al problema que le aqueja.

7) CONCLUSIONES:

- 1.- Existe una relación inversa entre pH salival y grado de control metabólico, medido mediante HbA1c en pacientes DM2 descompensados.
- 2.- Existe mayor recuento de levaduras, medidos en UFC/ml, en pacientes con DM2 descompensados con respecto a sus pares compensados.
- 3.- *Candida albicans* es la levadura más frecuentemente aislada de saliva de pacientes con DM2, independientemente del estado de control metabólico y pH salival que presente el paciente.
- 4.- *Candida glabrata* se asocia inversamente con el pH salival en pacientes DM2.
- 5.- Existe presencia de especies de levaduras en saliva, distintas de *Candida albicans* en pacientes con DM2 dentro de las cuales, *Candida glabrata* fue la más aislada.
- 6.- Existe una correlación inversa, entre diversidad de especies de levaduras y su coexistencia con el pH salival en pacientes con DM2.
- 7.- No hay asociación entre coexistencia de levaduras salivales y la compensación metabólica de pacientes con DM2.

8) COMENTARIOS Y PROYECCIONES

Dado que es preciso seguir estudiando la problemática de los pacientes con DM2 dada la alta prevalencia de candidiasis oral en éstos, se necesita ampliar el tamaño de la muestra, idealmente mediante la realización un estudio multicéntrico en nuestro país para así identificar las levaduras más prevalentes en la población Chilena, estableciendo protocolos de atención más certeros, además de obtener análisis estadísticos extrapolables así a nuestra población diabética.

En base a lo anteriormente enunciado, se hace patente la necesidad de obtener muestras de lesiones producto de candidiasis oral en estos pacientes o desde sus prótesis en caso de que las utilicen, para así tener una visión más integral de los microorganismos presentes en la cavidad oral de estos individuos.

Finalmente, si bien en el presente estudio no se pretendió analizar la eficacia de CHROMAgar Candida como método de identificación de levaduras de la especie *Candida*, es necesario mencionar que en la gran mayoría de los casos (más del 90%) la identificación presuntiva obtenida por este medio fue ratificada mediante métodos moleculares, como el PCR por lo que CHROMAgar Candida sería un método costo-efectivo en la realización de estudios epidemiológicos.

9) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aguirre J.; Echebarría M.; Eguía A. (2004). Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida: Manifestaciones en la Cavidad Bucal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 9, 148-157

- Aly F.; Blackwell C.; Mackenzie D.; Weir D.; Clarke B. (1992). Factors Influencing Oral Carriage of Yeasts Among Individuals With Diabetes Mellitus. *Epidemiol Infect* 1992; 109: 507-518.

- Álvarez E.; González T.; Cabrera E.; Conesa A.; Parlá J.; González E. (2009). Algunos Aspectos De Actualidad Sobre La Hemoglobina Glucosilada Y Sus Aplicaciones. *Rev Cubana Endocrinol* v.20 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic. 2009.

- American Diabetes Association. (2011) Standards Of Medical Care In Diabetes--2012. *Diabetes Care*. 2011 Enero ;35 Suppl 1:S11-63.

- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014 Enero; 37(1): 81-90.

- Araújo A.; Machado L.; Antoninha A.; José W. (2014) Environmental pH Influences Candida Albicans Biofilms Regarding Its Structure, Virulence And Susceptibility To Fluconazole. *MicrobialPathogenesis*. Aceptado 20 de Marzo de 2014.

- Arrieta J.; Bartolomé B.; Jiménez E.; Saavedra P.; Arrieta F. (2003). Problemas Bucodentales En Pacientes Con Diabetes Mellitus (I): Índice De Placa Y Caries Dental. *Medicina Oral* 2003;8:97-109.

- Arteaga A.; Maiz A.; Olmos P.; Velasco N. (1997). Manual De Diabetes Y Enfermedades Metabólicas. Depto. Nutrición, Diabetes Y Metabolismo. Escuela De Medicina. P. Universidad Católica De Chile. 1997.

- Bokor-Bratic M; Cankovic M.; Dragnic N. (2013). Unstimulated Whole Salivary Flow Rate And Anxiolytics Intake Are Independently Associated With Oral Candida Infection In Patients With Oral Lichen Planus. Eur J Oral Sci 2013; 121: 427–433.

- Bremenkamp R.; Caris A.; Jorge A.; Back-Brito G.; Mota A.; Balducci I.; Brighenti F.; Koga-Ito C. (2011). Prevalence And Antifungal Resistance Profile Of Candida spp. Oral Isolates From Patients With Type 1 And 2 Diabetes Mellitus. Archives of Oral Biology 56 (2011) 549 – 555.

- Carrasco E.; Pérez-Dravo F.; Dorman J.; Mondragón A.; Santos J. (2005). Increasing Incidence Of Type 1 Diabetes In Population From Santiago Of Chile: Trends In A Period Of 18 Years (1986-2003). DiabMETab Res Rev 2005.

- Castrillón L.; Palma A.; Padilla C. (2005). Factores de Virulencia en *Candida sp.* Dermatología Rev Mex 2005;49:12-27.

- Chávez E.; Borrell L.; Taylor G.; Ship J. (2001) .A Longitudinal Analysis Of Salivary Flow In Control Subjects And Older Adults With Type 2 Diabetes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 Feb;91(2):166-73.

- Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). (1993). Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos. ISBN 92 9036 056 9. Ginebra, 1993, pp.53-56.

- Darwazeh A.; Macfarlane T.; Mccuish A.; Lamey P. (1991). Mixed Salivary Glucose Levels And Candidal Carriage In Patients With Diabetes Mellitus. J Oral Pathol 1991; 20: 280-283.

- Davis D. (2003). Adaptation To Environmental pH In *Candida Albicans* And Its Relation To Pathogenesis. *Curr Genet* 2003; 44: 1-7.

- De Roy PG. (2004). Helsinki And The Declaration Of Helsinki. *World Med J* 2004; 50(1): 9-11.

- Fotos P.; Vincent S.; Hellstein J. (1992) Oral Candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74: 41–49.

- García J.; Boj J.; Espasa E. (2000). Influencia Del Control Y De La Duración De La Diabetes Mellitus No Insulinodependiente Sobre La Salud Bucodental. *Ejdr* Número 5 - 2000 - Artículo 22.

- García P., Domínguez I., Marín P., García R., Aoufi S., Mira J. (2001). Sensibilidad a Antifúngicos de Levaduras patógenas Emergentes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 19. Num. 06. P. 249-256.

- Genuth S.; Alberti KG.; Bennett P.; Buse J.; Defronzo R.; Kahn R.; Kitzmiller J. y colaboradores. (2003). Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus2, Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160–3167.

- Guzmán N.; Madrigal E. (2003). Revisión de las Características Clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*, vol. 28, N° 2, 14-23.

- Hibino K., Samaranayake L., Hägg U., Wong R., Lee W. (2009). The Role Of Salivary Factors In Persistent Oral Carriage Of *Candida* In Humans. *Archives of Oral Biology* 54 (2009) 678 – 683.

- Huidobro A.; Fulford A.; Carrasco E. (2004). Incidencia De Diabetes Gestacional Y Su Relación Con Obesidad En Embarazadas Chilenas. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 931-938.

- Kitasako Y.; Burrow MF.; Stacey M.; Huq L.; Reynolds E.; Tagami J. (2008). Comparative analysis of three commercial saliva testing kits with a standard saliva buffering test . *Aust Dent J.* 2008 Jun;53(2):140-4.

- Laskaris G. (1998). *Color Atlas of Oral Diseases.* Editorial Thieme. 3° Edición. Pags. 200-204.

- Lee X.; Gómez L.; Vergara C.; Astorga E.; Cajas N.; Ivankovic M. (2013). Asociación entre Presencia de Levaduras del Género *Candida* y Factores del Paciente Adulto Mayor con y sin Estomatitis Protésica. *Int. J. Odontostomat.* vol.7 no.2 Temuco ago. 2013.

- Leito, J.; Ligtenberg, A.; Nazmi, K.; Veerman, E. (2009). Identification Of Salivary Components That Induce Transition Of Hyphae To Yeast In *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 9(7), 1102–10.

- López R.; Méndez L.; Hernández F.; Castañon R. (2004). *Micología Médica*; 2da Edición. Editorial Trillas; Mexico, 2004: 99-111.

- Lefimil C.; Lozano C.; Morales-bozo I.; Plaza A.; Maturana C.; Urzúa B. (2013), DNA From Oral Bacteria By Sodium Hydroxide–paper Method Suitable For Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 433 (2013) 129–131.

- Luo S.; Skerka C.; Kurzai O.; Zipfel P. (2013). Complement And Innate Immune Evasion Strategies Of The Human Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Molecular Immunology* 56 (2013) 161–169.

- Martin, R.; Wächtler, B.; Schaller M.; Wilson D.; Hube, B. (2011). Host-Pathogen Interactions And Virulence-Associated Genes During *Candida albicans* Oral Infections. *International Journal of Medical Microbiology* : 301(5), 417–22.

- Mata de Henning M.; Perrone M. (2001). Factores Determinantes De Patogenicidad En Relacion A La Ecologia De *Candida albicans* En Cavidad. Bucal. Revisión Bibliográfica. Acta odontol. Venez v.39 n.2.

- Meneses J.; Bizerra F.; Carmona R.; Lopes A. (2013) . Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Profile, and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Rhodotorula* Species Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. January 2013 Volume 57 Number 1. p.382–389.

- Miceli M.; Díaz J.; Lee S. (2011). Emerging Opportunistic Yeast Infections. Lancet Infect Dis. 2011 Feb;11(2):142-51.

- Ministerio De Salud. (2008). Guía Clínica Examen De Medicina Preventiva. Páginas 11-12.

- Ministerio de Salud. (2010) Encuesta Nacional De Salud (ENS) Chile 2009-2010. Tomo 1. [Http://Web.Minsal.Cl/Portal/Url/Item/Bcb03d7bc28b64dfe040010165012d23.Pdf](http://Web.Minsal.Cl/Portal/Url/Item/Bcb03d7bc28b64dfe040010165012d23.Pdf). Visto 23 de Septiembre, 0:46 hrs.

- Ministerio de Salud. (2010). Guía Clínica Diabetes Mellitus Tipo 2. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/72213ed52c3e23d1e04001011f011398.pdf>. Visto 23 de Septiembre, 0:50 hrs.

- Ministerio de Salud. 2010. Guía Clínica 2010 Salud Oral Integral para Adultos de 60 años. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7221747c2c9484b7e04001011f0141a4.pdf>. Visto 23 de Septiembre, 01:00 hrs.

- Ministerio de Salud. (2013). Guía Clínica Auge, Diabetes Mellitus Tipo 1. <File:///C:/Users/Usuario/Desktop/Tesis/B554e8e580878b63e04001011e017f1e.Pdf>.

- Mirhendi H, Makimura K; Khoramizadeh M.; Yamaguchi H. (2006). A One-Enzyme PCR-RFLP Assay For Identification Of Six Medically Important Candida Species. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 47(3):225-9.

- National Diabetes Data Group. (1979). Classification And Diagnosis Of Diabetes Mellitus And Other Categories Of Glucose Intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-4.

- Navazesh M. (1993). Methods For Collecting Saliva. *Ann N Y Acad Sci*; 694: 72-77.

- Nayak S.; Kavitha B.; Sriram G.; Saraswathi T.; Sivapathasundharam B., Dorothy A. (2012). Comparative Study Of *Candida* By Conventional And CHROMagar Method In Non-Denture And Denture Wearers By Oral Rinse Technique. *Indian Journal of Dental Research*, volume 23, issue 4, page 490-497.

- Negroni M. 2009. *Microbiología Estomatológica, Fundamentos y guía práctica*. Editorial Panamericana S.A. Segunda Edición. Pag. 229.

- Nowakowska D.; Kurnatowska A.; Stray-Pedersen B.; Wilczyński J. (2004). Species distribution and influence of glycemic control on fungal infections in pregnant women with diabetes. *Journal of Infection*, volume 48, capítulo 4, pags 339-346.

- Sánchez N.; Sosa M.; Urdane L.; Chidiak S.; Jarpa P. (2009). Cambios de pH Salival en Individuos Consumidores de Chimó. *Revista Odontológica de los Andes*, volumen 4 N° 1- Enero-Junio 2009. Pags. 6-13.

- Odds F.; Bernaerts R. (1994). CHROMagar Candida, A New Differential Isolation Medium For Presumptive Identification Of Clinically Important Candida Species. *J Clin Microbiol* ;32(8):1923-9.

- Olmos C.; De La Espriella A.; Escobar L. (2011). Inmunodeficiencias Secundarias. Volume 11, N°1. [http://http://www.scp.com.co/precop/precop_files/ano11/11_2_cont.pdf](http://www.scp.com.co/precop/precop_files/ano11/11_2_cont.pdf). Visto 23 de Septiembre, 01:20 hrs.

- Pineda G.; Scollo K.; Santiso G.; Lehmann E.; Arechavala A. (2008). Aislamiento De *Candida dubliniensis* En Distintos Materiales Clínicos. Análisis De Métodos Fenotípicos De Diferenciación Con *Candida albicans*. Revista Argentina De Microbiología (2008) 40: 211-217.

- Prathibha K.; Johnson P.; Ganesh M.; Arcot S. Subhashini A. (2013). Evaluation Of Salivary Profile Among Adult Type 2 Diabetes Mellitus Patients In South India. Journal of clinical and diagnostic research. 2013 aug, vol-7(8): 1592-1595.

- Ragnar Hanas. (2010). Consensus Statement On The Worldwide Standardization Of The Hemoglobin A1C Measurement. Diabetes Care; 33(8): 1903–1904.

- Rodríguez J.; Miranda J.; Morejón H.; Santana J. (2002). Candidiasis De La Mucosa Bucal. Revisión Bibliográfica. Rev Cubana Estomatol V.39 N.2.

- Romeo O.; Racco C. y Criseo G. (2006). Amplification of the Hyphal Wall Protein 1 Gene To Distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. J. Clin. Microbiol. July 2006 vol. 44 no. 7, pags.2590-2592.

- Sashikumar R.; Kannan R. (2010). Salivary Glucose Levels And Oral Candidal Carriage In Type II Diabetics. Oral Medicine. Vol. 109 No. 5 May 2010.

- Solís C.; Aguirre M.; Godorecci S. (2008). Prevalencia de Diabetes Mellitus en Chile. Revista ALAD; Vol XVI.

- Trofa D.; Gácsér A.; Nosanchuk J. (2008). *Candida parapsilosis*, An Emerging Fungal Pathogen. ClinMicrobiol Rev.21:606–625.

- Vylkova S.; Carman A.; Danhof H.; Collette J.; Zhou H.; Lorenz M. (2011). The Fungal pathogen *Candida Albicans* Autoinduces Hyphal Morphogenesis By Raising Extracellular pH. MBio 2011.

- Wild S.; Roglic G.; Green A.; Sicree R.; King H. (2004) Global Prevalence Of Diabetes: Estimates For The Year 2000 And Projections For 2030. Diabetes Care 2004;27:1047–53.

10) ANEXOS Y APÉNDICES:

ANEXO 1: Aprobación Del Protocolo De Investigación Por El Comité De Ética.

ANEXO 2: Aprobación Del FIOUCH Por Parte Del Comité De Bioseguridad.

ANEXO 3: Ficha Clínica.

ANEXO 4: Consentimiento Informado.



UNIVERSIDAD DE CHILE

Comité de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°31

Santiago, 26 de Marzo de 2014.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación FIOUCH 2013, titulado "Validación del biomarcador alfa-2-macroglobulina en saliva humana como herramienta complementaria para el control metabólico de pacientes con diabetes tipo 2." El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. Juan Pablo Aitken Saavedra, Académico del Departamento de Patología y Medicina Oral.

El CIB certifica que la Facultad mencionada anteriormente, cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el Investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Aitken para ser presentado a la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta



24/05/2013

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2013/01

1. Acta de aprobación de protocolo de estudio N° 2013/01
2. Miembros permanentes del comité ético-científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dra. Claudia Lefmil
Secretaría del CEC

Dra. Karín Lagos
Miembro permanente del CEC

Dr. Eduardo Rodríguez
Miembro permanente del CEC

Dra. Ximena Lee
Miembro permanente del CEC

3. Fecha de Aprobación: 22/05/2013
4. Título completo del proyecto: "Validación de α 2-macroglobulina detectada en saliva, como indicador de control metabólico de la diabetes tipo 2" Anteproyecto de tesis de Magister Ciencias Odontológicas, Mención Patología y Medicina Oral", Versión del 25 de Abril 2013.
5. Investigador responsable: Prof. Dr. Juan Pablo Aitken, académico del Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
6. Institución: Facultad de Odontología, Universidad de Chile
7. Documentación Revisada:
 - Anteproyecto de Tesis "Validación de α 2-macroglobulina detectada en saliva, como indicador de control metabólico de la diabetes tipo 2" Versión del 25 de Abril 2013.
 - CV del Tutor principal
 - Documento y Formulario de Consentimiento Informado enmendado edición del 22/05/2013.
 - Carta Compromiso ADICH
8. Carácter del estudio y de la muestra: En este estudio de corte transversal con reclutamiento prospectivo, se determinará la exactitud de α -2-macroglobulina en saliva para diagnosticar control metabólico de sujetos con diabetes tipo 2 establecido mediante el test de HbA1en sangre. Se tomará una muestra de 140 sujetos socios de la asociación de diabetes de Chile (ADICH), que serán muestreados por conveniencia.



24/05/2013

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

9. Fundamentación de la aprobación ética

En los sujetos que padecen de diabetes tipo 2, resulta fundamental la periodicidad en el control de la enfermedad. Hasta ahora el análisis de hemoglobina glicosilada en sangre constituye el único mecanismo de evaluación del control de la enfermedad. El poder desarrollar diferentes estrategias de diagnóstico y/o seguimiento a través de métodos modernos como las pruebas en saliva, nos permitirían tener una alternativa eficaz aprovechando las ventajas de este fluido (método de recolección no invasivo, de bajo costo y fácil de evaluación). En este estudio se propone analizar en 140 pacientes, diagnosticados con diabetes tipo 2, los niveles de α -2-macroglobulina en saliva y si existe una asociación con los valores de HbA1c en sangre, de modo de determinar la exactitud de este método para diagnosticar control metabólico. Este protocolo así presentado muestra gran utilidad para los participantes y la sociedad con escaso riesgo, pues entregará datos objetivos, con un amplio potencial en la generación de un biomarcador salival que beneficiará el tratamiento y evaluación del estado de progresión de las enfermedades crónicas, y también, repercutirá en la calidad de vida de los sujetos que padecen de estas enfermedades. Se ha señalado la debida protección a los participantes, teniendo en cuenta las Buenas Prácticas Clínicas y debidamente informada en un Consentimiento Informado que el participante firma libre e informadamente.

En caso de daños eventuales o problemas vinculados como resultado de la investigación el Comité deberá ser informado en un lapso no mayor a 48 horas.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, APRUEBA el estudio: "VALIDACIÓN DE α 2-MACROGLOBULINA DETECTADA EN SALIVA, COMO INDICADOR DE CONTROL METABÓLICO DE LA DIABETES TIPO 2". Anteproyecto de tesis Magister Ciencias Odontológicas, Mención Patología y Medicina Oral, Versión del 25 de Abril 2013, que será realizado por el Dr. Juan Pablo Aitken, bajo la supervisión del Dr. Gonzalo Rojas.

Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si fuera necesario y una vez finalizado el estudio el comité deberá ser informado de los resultados del estudio




Dra. Claudia Lefmil
Presidente(s) del CEC

C/C.

Investigador Principal.
Secretaría C.E.C.

Fecha _____ Hora: _____

FICHA CLINICA



Nombre: _____ Edad _____

Teléfono: _____ Rut: _____

Mail: _____

Dirección: _____ Talla: _____ Peso: _____

Perfil Lipídico: _____ Fuma (cuanto) _____

Nefropatias _____

Neuropatia _____

Retinopatía _____

Hipertension _____

METFORMINA: _____

INSULINA: _____

OTRO: _____

Anamnesis:

Edad de diagnóstico de diabetes _____

HbA1c

Fecha _____

Glicemias:

NO

SI

1. ¿Siente la boca seca usualmente?

2. ¿Siente la saliva espesa?

3. ¿Siente sensación de ardor en la lengua?

4. ¿Necesita tomar líquidos para tragar la comida?

5. ¿Tiene dificultades para tragar?

Mucosa Oral: _____

Lengua: _____

Ed-22/05/2013



Acta de Consentimiento Informado

Fecha: _____

Esta acta de consentimiento, tiene como fin entregar a Ud. toda la información necesaria y explotar los compromisos suyos, como paciente y el de los Investigadores, para que su participación en el estudio: "validación del biomarcador alfa-2-macroglobulina en saliva humana como herramienta complementaria para el control metabólico de pacientes con diabetes tipo 2" sea libre, informada y voluntaria.

A continuación, usted declara que:

1. Al firmar este documento, voluntariamente doy mi consentimiento para participar de una investigación, patrocinada por la Asociación de diabéticos de Chile (ADICH), institución de asistencia social sin fines de lucro, ubicada en la calle Quebec 496 y por la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, domiciliada en Sergio Livingstone Polhammer 943. El profesional responsable de esta investigación es el Dr. Gonzalo Rojas Alcayaga y es realizado además, por los Doctores Juan Pablo Aitken, Irene Morales y Alejandro Escobar, todos académicos de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
2. Estoy en conocimiento que esta investigación tiene como objetivo validar en saliva humana, una sustancia proteica que circula en el cuerpo de las personas denominada alfa-2-macroglobulina y que pretende en lo sucesivo, ser de utilidad para el pronóstico y control metabólico de la diabetes mellitus tipo 2.
3. Comprendo que se me realizará una entrevista con algunas preguntas relacionadas con mi estado de salud y sintomatología asociada a patrones salivales. Además, comprendo que se me realizará un examen clínico bucal y toma de muestra de saliva por parte de un cirujano dentista.
4. Autorizo a que el cirujano dentista responsable de la investigación, tenga acceso a mi ficha clínica única y exclusivamente para obtener el dato de la Hemoglobina Glicosilada en caso que yo lo ignore. Este dato es necesario para validar a alfa-2-macroglobulina. En caso que este dato sea de mi conocimiento y entregue esta información al profesional con el documento que lo certifique, el cirujano dentista no podrá acceder a mi ficha.
5. El cirujano dentista puede estar acompañado por alumnos de pregrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, a quienes autorizo para que estén presentes, realizando labores de colaboración al profesional, pero no tendrán acceso a la ficha clínica.
6. Podrán ser reclutados para esta investigación, sujetos de ambos sexos mayores de 30 años con diagnóstico de diabetes tipo 2 confirmada en la ADICH conforme el criterio establecido por el Ministerio de Salud (MINSAL). No podrán ser reclutados los voluntarios que presenten enfermedades reumatológicas, que hayan sido irradiados en zona de cabeza y cuello, con enfermedades terminales, con daño neurológico, con procesos inflamatorios agudos en boca y mujeres embarazadas.
7. Comprendo que el odontólogo, me realizará algunas preguntas relacionadas con mi estado de salud y posteriormente me solicitará juntar saliva durante 5 minutos en un tubo plástico estéril. Durante este procedimiento, deberá permanecer sentado y no conversará mientras se realice la medición. Además, no debo haber ingerido alimentos, fumado, masticado chicles ni haberme lavado los dientes, por lo menos, una hora antes de la recolección salival. Deberé además, apagar o mantener en silencio mi celular.
8. Declaro que mi participación en este estudio es libre y voluntaria, pudiendo incluso abandonarlo en el momento que desee, lo que no me afectará de ningún modo.



Ed-22052013

9. Comprendo que ninguno de los procedimientos mencionados (examen clínico, entrevista y depósito de saliva) tendrá costo para mi persona.
10. Comprendo que no hay un beneficio directo para mi persona, pero mi participación podría ayudar a encontrar un método clínico no invasivo (sin necesidad de punción venosa) para la medición del control metabólico de la diabetes mellitus tipo 2, que podría beneficiar a todos los pacientes diabéticos.
11. Estoy en conocimiento que no está considerada una retribución económica para mí. Sin embargo, y por el hecho de participar en el estudio, tendré el derecho a que se me informe sobre los resultados de los exámenes que se me practicarán y a recibir un consejo u orientación y/o posible derivación médica o dental según corresponda, en el caso de observarse alguna condición o lesión patológica observada. En este caso, no existe obligación de la institución a cargo (Facultad de Odontología de la Universidad de Chile) o a los investigadores, a hacerse cargo en forma gratuita del tratamiento de su enfermedad. Sin embargo, contare con el beneficio de ser derivado Facultad de Odontología de la Universidad de Chile para tratamiento odontológico.
12. Entiendo que la información obtenida de mi persona, será tratada de manera absolutamente confidencial, y únicamente utilizada para fines de investigación sin fines de lucro. Mi nombre y datos personales jamás serán identificados públicamente.
13. Estoy en conocimiento que los investigadores, podrán obtener a partir de mi saliva, además de la información de la alfa-2-macroglobulina, datos del pH, concentración de proteínas libres y capacidad buffer.
14. Comprendo que los resultados que se obtengan de la investigación, pueden ser divulgados en congresos o publicados en una revista de investigación, manteniendo mi identificación en estricta confidencialidad. Si lo sugiero, los investigadores me harán llegar un resumen con los principales resultados obtenidos.
15. Comprendo que los datos obtenidos serán codificados y sólo se usarán para este estudio, según lo que dicta la ley 19.628 sobre protección de datos de carácter personal y disposiciones aplicables al secreto profesional.
16. Si necesito aclarar cualquier duda respecto de esta investigación y de mi participación en el o si necesito más información para tomar la decisión de participar, debo dirigirme al Dr. Juan Pablo Aitken, al Dr. Gonzalo Rojas o al Dr. Alejandro Escobar. Dirección: Sergio Livingstone Polhammer 943, Independencia. Teléfono 9781811 de lunes a viernes entre 8:00 AM y 13:00 AM. Correo electrónico: jaikens@u.uchile.cl.
17. Para cualquier aclaración sobre mis derechos como voluntario para esta investigación, puedo tomar contacto con el Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Profesora Marta Angelica Torres. Dirección: Sergio Livingstone Polhammer 943, Independencia.

Leí la Información precedente o me la leyeron. He tenido la oportunidad de hacer preguntas acerca de ella y todas las preguntas que se me hicieron, fueron respondidas a mi entera satisfacción. Consiento voluntariamente participar en estudio y entiendo que tengo el derecho a retirarme del procedimiento de recolección salival en cualquier momento, sin poner en riesgo ni mi salud ni mi integridad física.

Fecha de aplicación _____

Nombre del voluntario _____

Firma del voluntario _____

Nombre del Investigador que toma el C.I. _____

Firma del Investigador _____

Nombre del Investigador responsable del proyecto. _____

Firma del Investigador _____

Se ha entregado una copia de este documento al participante

