



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

**Resistencia a nistatina y fluconazol de levaduras de especie *Candida albicans*  
en saliva en pacientes diabéticos tipo 2 con distinto control metabólico.**

**Romina Huenchunao Avalos**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Juan Pablo Aitken**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dr. Alfredo Molina**

**Dra. Blanca Urzúa**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-002  
Santiago - Chile  
2016**



*Dedicada a Jaime, Jessica, Tiare, Leslie, Javiera, Catalina, Maxi, Thea, Arya y Luke.*

## **Agradecimientos**

A mis tutores por su disposición a transmitir su conocimiento y su entusiasmo por la ciencia.

A los integrantes del Laboratorio de Bioquímica y del Laboratorio de Farmacología, en especial a Andrea y César por su constante cooperación en todo lo que fuese necesario.

A Jaime González e Iliá Pérez por su trabajo previo que ayudó a cimentar las fundaciones de esta tesis.

A Mauricio Vargas por su ayuda en momentos de confusión estadística.

PS: El siguiente trabajo de investigación está Adscrito al Proyecto FIOUCH 13-002. Se compartieron fuentes de datos con la tesis adscrita de los alumnos Jaime González Saldaña e Iliá Pérez Vallespir, continuando el estudio.

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÍNDICE</b>   |           |
| <b>Resumen</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>Marco Teórico</b> .....                                      | <b>8</b>  |
| Diabetes Mellitus .....   | 8         |
| Clasificación DM .....  | 10        |
| Compensación metabólica de la DM e implicaciones.....           | 10        |
| Levaduras del género <i>Candida</i> .....                       | 13        |
| Antifúngicos: Nistatina .....                                   | 17        |
| Antifúngicos: Fluconazol .....                                  | 18        |
| <b>Hipótesis y objetivos</b> .....                              | <b>21</b> |
| <b>Materiales y métodos</b> .....                               | <b>22</b> |
| Tipo de estudio .....   | 22        |
| Criterios de inclusión y exclusión.....                         | 22        |
| Determinación de HbA1c.....                                     | 22        |
| Obtención de la muestra salival.....                            | 23        |
| Medición del pH salival .....                                   | 23        |
| Cultivos e identificación de levaduras .....                    | 24        |
| Determinación de susceptibilidad a antifúngicos.....            | 27        |
| Análisis de resultados.....                                     | 29        |
| <b>Resultados</b> .....   | <b>30</b> |
| Caracterización de la muestra .....                             | 30        |
| Presencia de <i>Candida spp</i> .....                           | 31        |
| Análisis pH.....  | 33        |
| Susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> a Antifúngicos ..... | 34        |
| <b>Discusión</b> .....  | <b>40</b> |
| <b>Conclusiones</b> .....                                       | <b>44</b> |
| <b>Referencias Bibliográficas</b> .....                         | <b>45</b> |
| <b>Anexos</b> .....   | <b>51</b> |

## RESUMEN

**Introducción:** La Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica altamente prevalente que debe ser rigurosamente monitoreada para evitar complicaciones asociadas a su descompensación, la cual es establecida cuando los sujetos presentan valores de Hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayores a 7%. Esto puede asociarse a una acidificación del pH salival, lo que afectaría el crecimiento y diferenciación de levaduras del género *Candida* provocando aparición de Candidiasis. Es relevante determinar número y especies de levaduras presentes en saliva de pacientes diabéticos y la susceptibilidad de éstas a los distintos antifúngicos para mejorar el enfoque terapéutico.

**Materiales y Métodos:** Se recogieron muestras de saliva no estimulada de 52 pacientes con DM2 de la Asociación de diabéticos de Chile (ADICH). Se les midió pH salival y se cultivaron en placas de Agar Sabouraud, realizando el recuento de colonias en UFC/ml. Se identificaron las especies en forma presuntiva en CHROMAgar *Candida*® confirmándose luego mediante PCR con partidores específicos. Se cultivaron los aislados de *C.Albicans* en Agar Sabouraud Tetraciclina con discos de difusión de Nistatina y Fluconazol para medir la susceptibilidad en milímetros. Se utilizó el test de Spearman para correlacionar las variables HbA1c, pH salival y cantidad de UFC/ml; también para HbA1c y susceptibilidad en mm. a los distintos antifúngicos, t-test para comparar ambos grupos y la prueba de Chi cuadrado para comparar valores entre pacientes compensados y no compensados. Se consideraron estadísticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

**Resultados:** El 50% de los pacientes estaban descompensados. El 66% del total de levaduras aisladas fue *Candida albicans*, 43,6% *Candida no albicans*, destacando *C. Glabrata*. En pacientes con DM2 descompensada, se observó asociación inversa entre valores de HbA1c y pH salival. A mayor acidificación salival se observó mayor diversidad y cantidad de levaduras del género *Candida*. No se observó relación entre valores de HbA1c y susceptibilidad a nistatina o fluconazol. Se observó una leve correlación inversa entre pH salival y susceptibilidad a nistatina.

**Conclusión:** La descompensación metabólica en pacientes con DM2 puede resultar en acidificación del pH salival afectando la cuantificación, diversidad de levaduras y la susceptibilidad de éstas a la terapia antifúngica.

## MARCO TEÓRICO

### Diabetes Mellitus

En Chile la Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica de alta prevalencia, lo que la convierte en un problema de Salud Pública. Alrededor del 9% de la población es diabética y se estima una proyección global del 50% al año 2030 (Minsal 2010 (a)).

La DM corresponde a un conjunto de enfermedades metabólicas crónicas originadas por defectos en la secreción y/o acción de la insulina en los distintos órganos, caracterizada por la hiperglicemia. El aumento plasmático sostenido de los niveles de glucosa se asocia a daño en distintos órganos y sistemas, como por ejemplo microangiopatía, neuropatía periférica, insuficiencia renal crónica, ceguera, muerte prematura, etc. (American Diabetes Association, junio 2014).

### Diagnóstico de DM

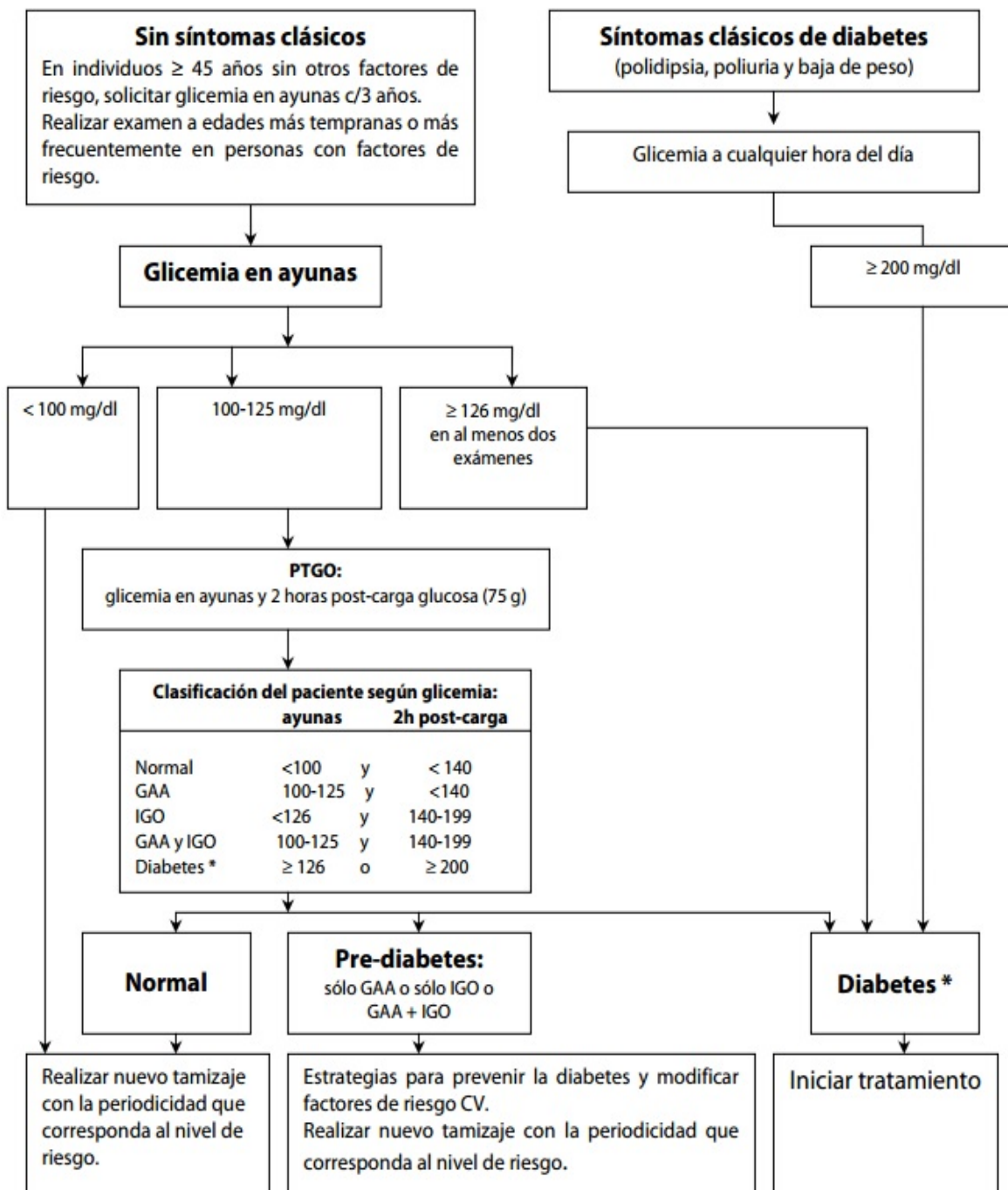
El paciente diabético puede o no presentar síntomas. En la figura 1, se describe el algoritmo de diagnóstico de diabetes y otras condiciones asociadas como intolerancia a la glucosa, mostrando los pasos a seguir en caso de sospecha de la condición según la guía clínica del Ministerio de Salud (Minsal 2010(c))

La Asociación Americana de Diabetes, "ADA" por sus siglas en inglés, indica la confirmación de diagnóstico al presentarse uno de los siguientes cuatro criterios (American Diabetes Association, 2011):

- *Hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayor o igual a 6,5 %.* La prueba debe realizarse en un laboratorio que use un método certificado y estandarizado.
- *Glicemia mayor o igual a 126 mg/dl en período de ayuno.* El ayuno se define como la no ingesta calórica por lo menos 8 horas.
- *Glicemia mayor o igual a 200 mg/dl 2 horas postprandial.* La prueba debe realizarse con una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. (Prueba de tolerancia oral a la glucosa).



- *Síntomas clásicos de crisis de hiperglicemia*, con valores de glicemia mayor o igual a 200 mg/dl en cualquier momento del día.



**Figura 1:** Algoritmo de diagnóstico de diabetes, glicemia en ayunas alterada (GAA) e intolerancia a la glucosa oral (IGO) (Minsal 2010(c))

## **Clasificación de la Diabetes Mellitus**

La **Diabetes Mellitus tipo 1 o Insulino dependiente**, es provocada por un ataque autoinmunitario a las células beta pancreáticas, lo que produce la ausencia de producción de insulina (Minsal 2013). Debuta en la niñez o adolescencia, corresponde aproximadamente al 8% de la población diabética. El tratamiento consiste de la administración de insulina subcutánea acompañada de dieta y ejercicio.

La **Diabetes Mellitus tipo 2**, está asociada principalmente a estilos de vida poco saludables, en los cuales hay un gran consumo de carbohidratos asociado a sedentarismo y corresponde a la mayoría de población diabética, alrededor del 90%. 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). El tratamiento es farmacológico acompañado de cambios en el estilo de vida del paciente.

Se reconocen además, la **Diabetes Gestacional**, definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa de debut en el embarazo y otros tipos de **Diabetes atribuidas a causas específicas** tales como anomalías genéticas de células  $\beta$  del páncreas o acción de la insulina, enfermedades del páncreas, infecciones, alteraciones hormonales, síndromes y drogas, entre otras.

## **Compensación metabólica de la DM e implicaciones**

La DM como enfermedad crónica, debe ser cuidadosamente controlada por el individuo y permanentemente monitoreada clínicamente para evitar la descompensación del paciente. Al respecto, se ha establecido como marcador de progresión y complicaciones asociadas a la patología el nivel plasmático de Hemoglobina glicosilada (HbA1c).

Este examen proporciona los datos más certeros respecto de la verdadera condición del manejo de la enfermedad (Sacks, 2011). Refleja la glicemia media de un periodo de 3 meses y tiene un fuerte valor predictivo de complicaciones derivadas de la diabetes. Se debe realizar de forma rutinaria en todos los pacientes en la evaluación inicial y luego se recomienda una medición dos veces al año en aquellos pacientes estables que han logrado sus metas terapéuticas, y hasta cuatro determinaciones en un año en quienes se han realizado cambios en el esquema de tratamiento o no han logrado las metas (American Diabetes Association, 2014).

La hemoglobina es una proteína presente en los eritrocitos, donde el 90% de estas proteínas corresponde a la Hemoglobina A (HbA) (Goldstein y cols., 2004). La glucosa que circula en la sangre puede unirse a la cadena  $\beta$  de la hemoglobina, formando la HbA1c. La vida media de los eritrocitos es 120 días, y en consecuencia, el examen de hemoglobina glicosilada representa la concentración de glucosa promedio durante los 8 a 12 semanas anteriores (Sacks, 2011).

Nathan y cols. (2008) correlacionaron niveles de HbA1c y promedio de niveles de glucosa en plasma, indicando que existe una fuerte relación entre ambas variables ( $r = 0,92$ ), por lo que puede justificarse para su uso en el control de esta patología. La medición de hemoglobina glicosilada tiene ciertas ventajas y desventajas (**tabla 1**) (Sacks, 2011; Herman y cols., 2012):

| Ventajas   | Desventajas  |
|--|--|
| No requiere ayuno y puede obtenerse en cualquier momento del día                       | Puede ser alterada por factores no glicémicos como raza o etnia                        |
| Se usa una muestra única de sangre total   | Condiciones de salud como Anemias o Hemoglobinopatías pueden interferir en la medición |
| El resultado no se altera por factores agudos (estrés, ejercicio, enfermedades agudas) | Costo superior a otros exámenes relacionados   |
| Muy poca variabilidad biológica  | Puede no encontrarse disponible en algunas áreas                                       |
| Refleja concentraciones de glucosa a largo plazo                                       |  |

**Tabla 1:** Ventajas y desventajas de la medición de HbA1c (Herman y cols., 2012)

En pacientes diabéticos, uno de los objetivos terapéuticos es mantener los valores de HbA1c bajo el 7% lo que según la American Diabetes Association (ADA) se certifica como un buen control metabólico de la enfermedad o paciente compensado. Este valor no es arbitrario debido a que está descrito que porcentajes de HbA1c menor a 7% se traducen en una reducción de las complicaciones microvasculares de la DM2. Desafortunadamente, en el país solo un 36% de la población DM2 en tratamiento cumple con este parámetro (Minsal, 2013).

Personas con un mal control metabólico de la DM o descompensados, determinado por un valor de Hemoglobina Glicosilada igual o superior a 7%, relatan con mayor frecuencia xerostomía y disgeusia (Odds y cols., 1994; Moore et al, 2001; Prathibha y cols., 2013), además de otras alteraciones salivales cualitativas como: aumento en la concentración de glucosa salival (Syrjälä y cols., 2003), disminución del pH Salival (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 provocado por un aumento en la actividad microbiana o por proteínas del Fluido Gingival Crevicular (FGC), cambios en la concentración de electrolitos salivales (Prathibha y cols., 2013,) los que incluyen;

- Aumento de sodio
- Aumento de calcio,
- Aumento de potasio,
- Aumento de la concentración de urea,
- Disminución de Zinc.

Estos factores se traducen en un mayor riesgo en el desarrollo de periodontitis y caries (García y cols., 2000). Además, un control metabólico deficiente 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). Esto de igual forma se manifiesta en la cavidad oral mediante una mayor tasa de periodontitis, caries e infecciones por levaduras del género *Candida* (García y cols., 2000). Lo que se ve agravado por una disminución en la Velocidad de Flujo Salival (VFS) al afectar las funciones de arrastre, lubricación y protección de la saliva (Chávez y cols., 2001) (Prathibha y cols., 2013).

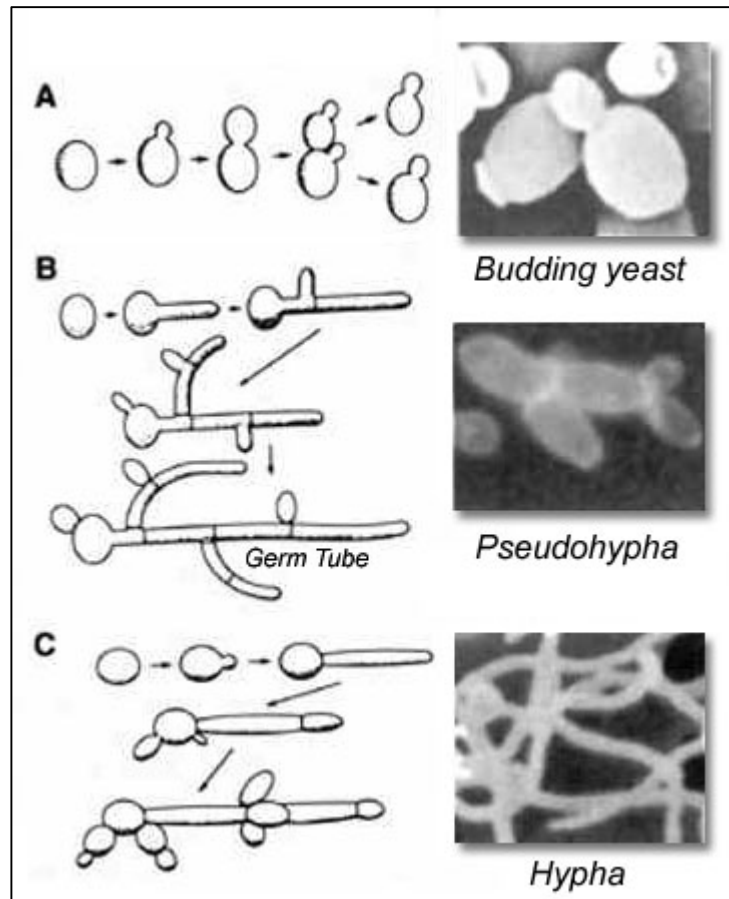
### **Levaduras del género *Candida***

*Candida* es un microorganismo perteneciente al Reino Fungi el cual se encuentra supeditado al Dominio *Eukarya*, este género engloba a más de 150 especies.

*Candida albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia en el ser humano, siendo un hongo unicelular oportunista normalmente presente en cavidad oral, tracto respiratorio alto, sistema gastrointestinal, tracto genitourinario y piel (López y cols., 2004).

Los principales factores de patogenicidad de *Candida albicans* son: switch fenotípico (cambio morfológico entre levadura, formación de hifas y pseudohifas) (**figura 2**), secreción enzimática, expresión diferencial de genes en respuesta al ambiente, síntesis de adhesinas y su capacidad para formar biofilms (Castrillón y

cols., 2005), las que contribuyen a la generación de resistencia a los antifúngicos (Ford y cols., 2015).



**Figura 2:** Se observan los cambios morfológicos de Levadura (a), pseudohifa (b) e hifas (c) de *Candida albicans*

Las infecciones por levaduras del género *Candida spp.* son especialmente relevantes ya que entre el 30 y 50% de los adultos sanos son portadores del microorganismo sin presentar signos ni síntomas de enfermedad (Fotos y cols., 1992). Sin embargo, la modificación de las condiciones ambientales a las que este microorganismo está sometido regularmente provoca la aparición de su patogenicidad, generando una “Candidiasis”, infección fúngica que puede ser local (solo de las mucosas) o diseminada, afectando a todo el organismo, lo que suele ocurrir en personas inmunocomprometidas (Rodríguez y cols., 2002).

Se ha observado que en pacientes con un mal control metabólico DM2 se presenta una mayor diversidad de cepas aisladas de la saliva o mucosas. En

estos se ha reportado una colonización mixta por *Candida albicans* y especies de *Candida no Candida albicans* (Torres y cols., 2002; Canton y cols., 2013). Las especies *no Candida albicans* generarían infecciones fúngicas de mayor severidad (Lee y cols., 2013) y resistencia a la acción de antifúngicos (Manfredi y cols., 2006).

Las cepas *no Candida albicans* más frecuentemente aisladas de pacientes diabéticos descompensados corresponden, en orden creciente, a *Candida krusei*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* (Torres y cols., 2002). La última emergiendo como un patógeno asociado a infecciones sistémicas, especialmente en personas inmunocomprometidas o que utilizan aparatos protésicos como válvulas cardíacas (Trofa y cols., 2008).

Como se mencionó anteriormente, el término Candidiasis hace alusión a la infección superficial (mucosas y/o tegumentos) o sistémica (vísceras y/o sangre) 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 se producen en huéspedes que presentan factores de riesgo, como uso de antibióticos de amplio espectro por tiempo prolongado, agentes inmunosupresores tales como glucocorticoides, condiciones como DM, SIDA, depresión de las funciones fagocíticas o alteraciones locales del sistema gastrointestinal (Castrillón y cols., 2005). Las afecciones sistémicas presentan una tasa de mortalidad cercana al 40%, mientras que aquellas locales, por lo general, no presentan riesgo vital, exceptuando pacientes inmunodeprimidos, como los pacientes VIH positivo y trasplantados (Martin y cols., 2011). Los protocolos actuales de tratamiento de la candidiasis son estándar (**tabla 2**), se aplican de igual modo a todos los pacientes que presenten la condición. Comúnmente el tratamiento comprende la administración de antifúngicos orales como nistatina o diversos azoles, entre ellos, el fluconazol (Koray y cols., 2005) (Minsal, 2010 (b)).

| <b>Droga</b>          | <b>Presentación</b>         | <b>Posología</b>  | <b>Observaciones</b>   |
|-----------------------|-----------------------------|---|--|
| <b>Anfotericina B</b> | Pastilla 10 mg              | Disolver lentamente en boca, 3-4 veces al día después de las comidas, por 2 semanas como mínimo.  | En caso de contar con registro del ISP, al momento de publicar esta guía.  |
|                       | Suspensión oral, 100 mg/ml  | Colocar en boca después de las comidas y retener cerca de lesiones, 4 veces al día por 2 semanas. |  |
| <b>Nistatina</b>      | Crema                       | Aplicar en zona afectada 3-4 veces diarias  | Absorción desde el tracto gastrointestinal despreciable. Puede causar náusea y vómitos a altas dosis.                            |
|                       | Pastillas, 100.000 unidades | Disolver lentamente después de las comidas, 4 veces al día, por 7 días.                           |  |
| <b>Clotrimazol</b>    | Crema                       | Aplicar en zona afectada 2-3 veces diarias, durante 3-4 semanas                                   | Efectos locales leves. Presenta actividad anti-estafilococo.   |
|                       | Solución                    | 5 ml 3-4 veces al día por 2 semanas como mínimo   |  |
| <b>Miconazol</b>      | Gel oral                    | Aplicar en zona afectada 3-4 veces diarias  | Ocasionalmente produce reacciones locales leves. Interactúa con anticoagulantes. Evitar en porfiria.                             |
|                       | Crema                       | Aplicar en zona afectada 2 veces diarias por 10 a 14 días después de que la lesión cure.          |  |
| <b>Ketoconazol</b>    | Tabletas                    | 200-400 mg 1 ó 2 veces al día con las comidas, por 2 semanas.                                     | Puede causar náusea, vómitos, prurito y daño hepático. Interactúa con anticoagulantes, cisaprida y astemizol.                    |
| <b>Fluconazol</b>     | Cápsulas                    | 50-100 mg una vez al día por 2 a 3 semanas  | Interactúa con anticoagulantes, terfenadina, cisaprida y astemizol. Puede causar diarrea, dolor de cabeza y disfunción hepática. |
| <b>Itraconazol</b>    | Cápsulas                    | 100 mg una vez al día, inmediatamente después de las comidas por 2 semanas.                       | Interactúa con terfenadina, cisaprida y astemizol. Puede causar náusea, neuropatía y rash.                                       |



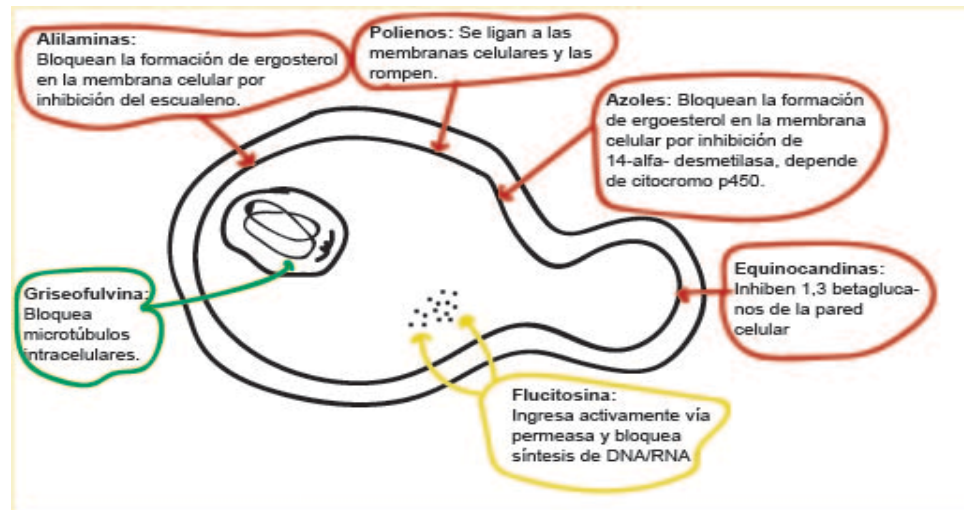
**Tabla 2:** Ejemplo de protocolo de tratamiento, correspondiente al tratamiento de candidiasis oral en el adulto mayor (Minsal 2010 (b))

## **Antifúngicos**

### **Nistatina**

Nistatina es un antifúngico perteneciente al grupo de los poliénoles, se obtiene de cultivos de *Streptomyces noursei*. Su función es dependiente de la concentración, pudiendo actuar tanto como fungistático ó como fungicida. Se fija a los ergosteroles de la membrana celular de los hongos, modificándola espacialmente, lo que altera la permeabilidad de la membrana resultando en pérdida de aminoácidos, purinas e iones por parte del hongo, con afectación del metabolismo celular (**figura 3**) (Martin, 1990). Nistatina tiene mayor afinidad por el ergosterol, el principal esteroles constituyente en las membranas celulares de los hongos, a diferencia del colesterol, el esteroles encontrado en las membranas celulares humanas. Sin embargo, igualmente posee afinidad por el colesterol, esta característica la convierte en un fármaco potencialmente tóxico, siendo desaconsejable utilizarla sistémicamente debido a que la integridad de membrana de células humanas se ve igualmente afectada, provocando la pérdida de potasio intracelular y otros contenidos celulares. Dado que las bacterias no contienen esteroides en sus membranas celulares, nistatina es ineficaz en contra de esta clase de organismos, así como también lo es contra protozoos, tricomonas y virus (Ghannoum y Rice, 1999).

Nistatina se administra por vía oral o tópica, presentando una mala absorción en el tracto gastrointestinal, por lo que tras la administración oral, es excretada casi completamente en forma inalterada por las heces (Minsal, 2010(b)).



**Figura 3:** Sitio de acción de diversos antifúngicos (Modificado desde Tapia, 2005).

### Fluconazol

El fluconazol es el compuesto triazólico más conocido y una alternativa terapéutica habitual en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas específicas. Estos compuestos actúan mediante la inhibición de la enzima lanosterol 14- $\alpha$  demetilasa en el complejo citocromo P-450 de los hongos. El resultado es la inhibición de la conversión de lanosterol a ergosterol, con la consecuente depleción de ergosterol, acumulación de precursores y una pérdida de la integridad de la membrana fúngica (Ghannoum y cols., 2002). Los triazoles interactúan en diferente grado con el complejo CYP-450 de la especie humana (**figura 3**) provocando interacciones con otros medicamentos, generando un potencial aumento de los niveles plasmáticos de otros fármacos que son metabolizados por estas enzimas facilitando la aparición de efectos adversos (Pea y cols., 2001).

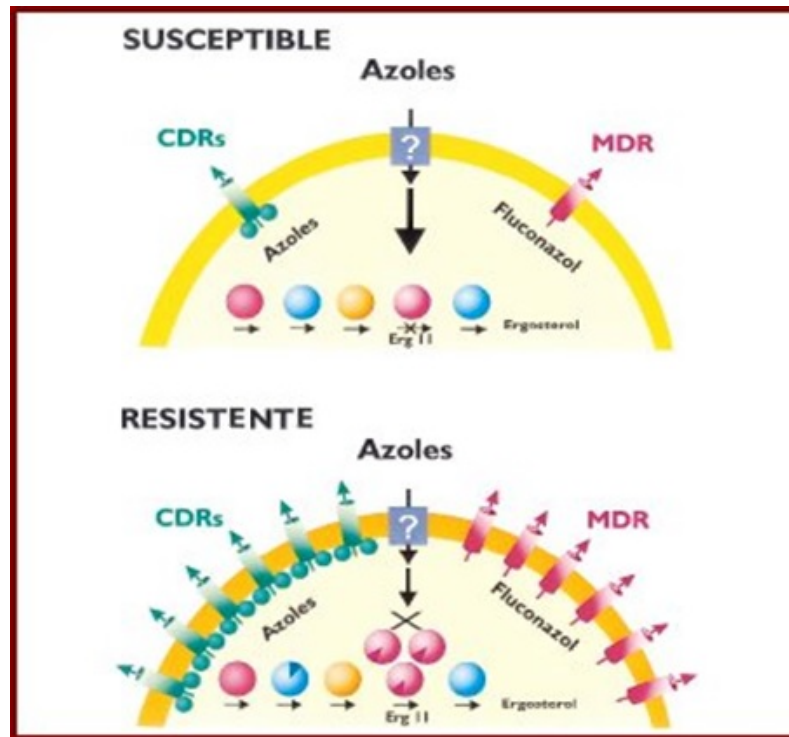
Este compuesto tiene una alta biodisponibilidad luego de su administración oral, alcanzando concentraciones plasmáticas equivalentes al 80% de las obtenidas en una dosis endovenosa. En su absorción no interfieren en forma significativa los fármacos inhibidores  $H^+$  o los alimentos; además, su prolongada vida media permite una administración diaria. Este compuesto presenta mayores concentraciones plasmáticas cuando se incrementa la dosis administrada. Debido a su alta biodisponibilidad, la mayor parte de los pacientes pueden ser tratados por

vía oral lo que presenta mayor aceptación e implica un menor costo a los pacientes.

Las limitaciones más importantes de fluconazol se deben a la resistencia natural de algunas levaduras contra este compuesto (*C. krusei*) y a la capacidad de adquirir resistencia en ciertas especies de *Candida*, a los ajustes de dosis necesarios en pacientes con compromiso renal y a las interacciones con otros medicamentos (Martin y cols., 1999).

La eficacia de fluconazol ha sido demostrada en varios estudios randomizados controlados, comparativos, en los cuales se evalúa el antifúngico contra anfotericina B deoxicolato, el cual era el antifúngico disponible históricamente para el manejo de las infecciones diseminadas por *Candida spp.* antes del advenimiento de fluconazol (Rex y cols., 1994, 2003).

Existe evidencia que distintas especies de candida desarrollan resistencia a los antifúngicos como el fluconazol (**figura 4**), debido a sus factores intrínsecos de patogenicidad, anteriormente descritos (Ford y cols., 2015) y que este no tiene el mismo efecto en un ambiente acidificado, tal como es la saliva en diabéticos (Bernardi y cols., 2007). Esto debido a la formación de un enlace hidrógeno entre la molécula de glucosa y fluconazol, con la consecuencia de la formación de un complejo entre ambos, disminuyendo la disponibilidad plasmática de fluconazol (Araújo y cols., 2014) (Mandal y cols., 2014). Además, se ha observado que la glucosa afecta el desarrollo y crecimiento de *Candida* mediante regulación genética positiva (Mandal y cols., 2014). Sin embargo, no existe evidencia suficiente en diabéticos con distinto control metabólico de su enfermedad.



**Figura 4:** Representación del mecanismo de resistencia de *Candida spp.* a azoles (Tapia, 2005).

Según los antecedentes entregados, levaduras del género *Candida* podrían ser más resistentes en la medida que el control metabólico en sujetos con diabetes es deficiente. El determinar la susceptibilidad antifúngica en sujetos diabéticos compensados y descompensados metabólicamente, podría ayudar a reorientar las terapias y protocolos antifúngicos en estos sujetos de acuerdo al control de la enfermedad, pudiendo ser más efectivas y con menos efectos adversos.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS.

Levaduras de especie *Candida albicans* son más resistentes al tratamiento con fluconazol o nistatina a mayor valor de hemoglobina glicosilada en sujetos con diabetes mellitus tipo 2.

### OBJETIVO GENERAL.

Asociar susceptibilidad de levaduras de especie *Candida albicans* tratadas con fluconazol o nistatina con valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar recuento e identificación de especies de levaduras del género *Candida* en saliva de pacientes con DM2 con distinto grado de control metabólico.
2. Asociar el pH salival, recuento y especies de levaduras del género *Candida* presentes en saliva de sujetos con DM2 metabólicamente compensados y descompensados.
3. Determinar susceptibilidad a fluconazol y nistatina de los aislados clínicos de *Candida albicans* obtenidos de sujetos con DM2 compensados y descompensados metabólicamente
4. Comparar susceptibilidad a fluconazol y nistatina entre los aislados clínicos de *Candida albicans* obtenidos de sujetos con DM2 compensados y descompensados metabólicamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **a. Tipo de estudio:**

Estudio observacional, analítico, de corte transversal.

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.

### **b. Criterios de inclusión:**

Se estimó una muestra de 52 sujetos en base a un nivel de significación estadística de 0,05 y una potencia de 0,9; estimando una sensibilidad de un 90% y un mínimo aceptable para el límite inferior de confianza de 0,75. Todos pacientes diabéticos tipo 2 con distinto grado de control metabólico pertenecientes a la Asociación de Diabéticos de Chile (ADICH)

### **c. Criterios de exclusión:**

Se excluyeron individuos que presentan 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.

### **d. Determinación de HbA1c.**

Este examen se realiza en forma rutinaria en la ADICH para establecer 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). El porcentaje que describe la

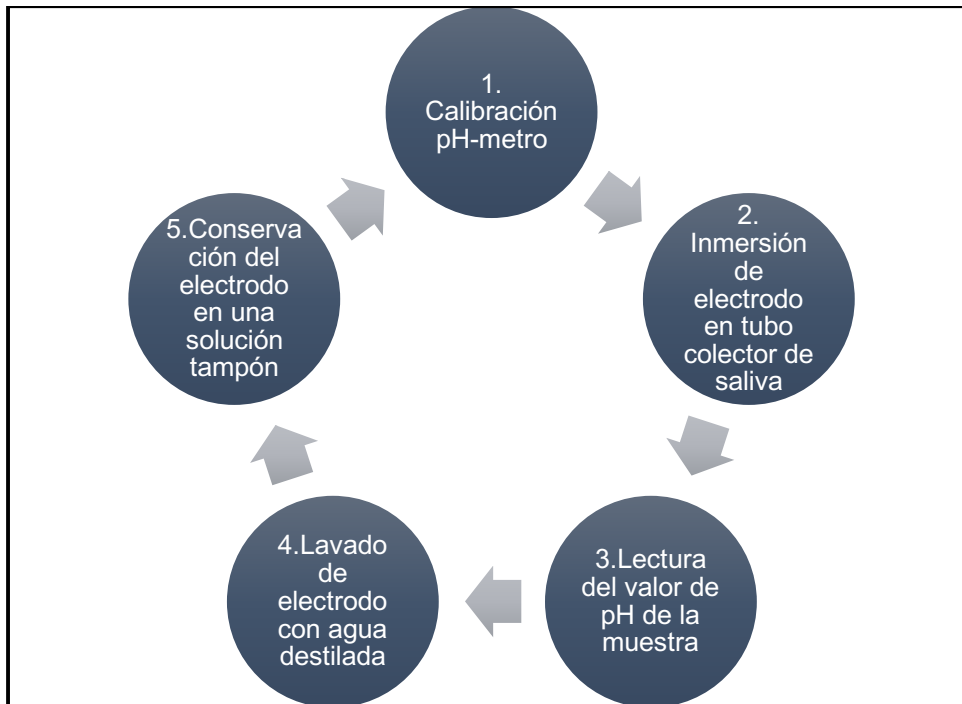
metodología, se obtiene mediante cromatografía por afinidad que calcula la hemoglobina A total e indirectamente la HbA1c mediante una ecuación de regresión lineal y el inmunoanálisis, que determina específicamente el porcentaje de HbA1c mediante la reacción de anticuerpos monoclonales (Ragnar, 2010). Se considera conforme con el protocolo descrito por el comité de diagnóstico y clasificación de diabetes mellitus (Genuth y cols., 2003), compensados metabólicamente sujetos con valores de hemoglobina glicosilada menores a 7% y descompensados metabólicamente, sujetos con valores de hemoglobina glicosilada iguales o mayores a 7%. Este test debe haber sido realizado como máximo, 1 mes antes de la toma de muestra salival.

#### **e. Obtención de la muestra salival:**

Las muestras de saliva fueron tomadas por un único cirujano dentista, previamente entrenado, conforme el protocolo descrito por Navazesh (Navazesh 1993). Los individuos no fumaron, no se cepillaron los dientes, ni consumieron alimentos durante una hora previa a la toma de muestra. Luego de un enjuague con agua destilada y de 5 minutos de un estado de relajación previa, se solicitó a los pacientes asumir la posición de cochero descrita por Shultz y utilizada por Navazesh. Una vez recogida la muestra de saliva en un tubo de centrifugación Falcon de 50 ml, 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, donde se realizaron cultivos aislados de las distintas especies de *Candida*.

#### **f. Medición 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, directamente a la muestra y sin centrifugar (Kitasako y cols., 2008):



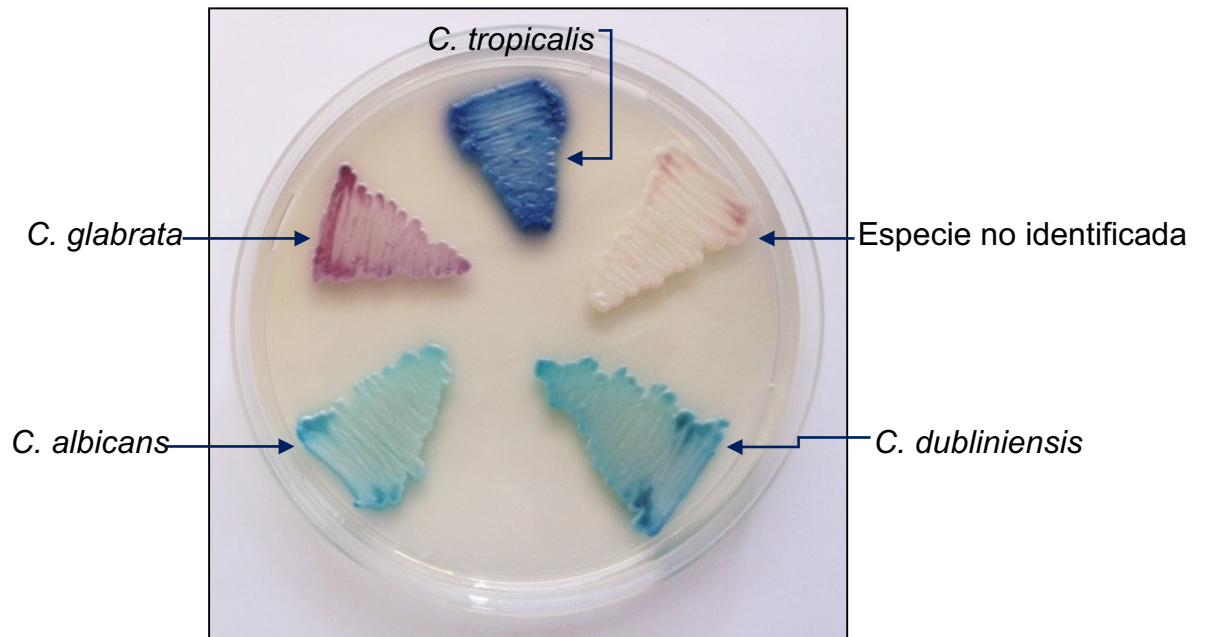
**Figura 5:** Descripción del proceso de utilización del pH-metro (Kitasako y cols.,2008)

#### **g. Cultivos e identificación de levaduras.**

El tubo que contenía la muestra fue agitado mediante Vortex por 15 segundos. 100 µl de saliva donada por cada sujeto participante fue sembrada en placas agar Sabouraud Tetraciclina (50 µg/ml), posteriormente en placas de CHROMagar *Candida*®, y fueron incubadas durante 48 horas a 30 °C. Se obtuvieron aislados de levaduras que fueron sometidas a recuento del número total de unidades formadoras de colonias (UFC) por individuo.

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 **Figura 6**:





**Figura 6:** Placa de CHROMagar Candida ®, donde se observan especies de levaduras que producen diferentes colores en este medio sólido.

Debido a que *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* comparten características morfológicas, fisiológicas y presentan patrones bioquímicos similares, no es posible diferenciarlos mediante el uso de CHROMagar Candida ® (Ambas son verdes en este medio de cultivo) (Pineda y cols., 2008). Se utilizó la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para discernir entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. La identificación de los aislados de levaduras, aislados desde 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 realizaron 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 (2013), en que utilizando un sistema de corte tipo sacabocados se obtuvo un círculo de aproximadamente 1mm de diámetro (punch) de cada representante, fue 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. 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 3**.

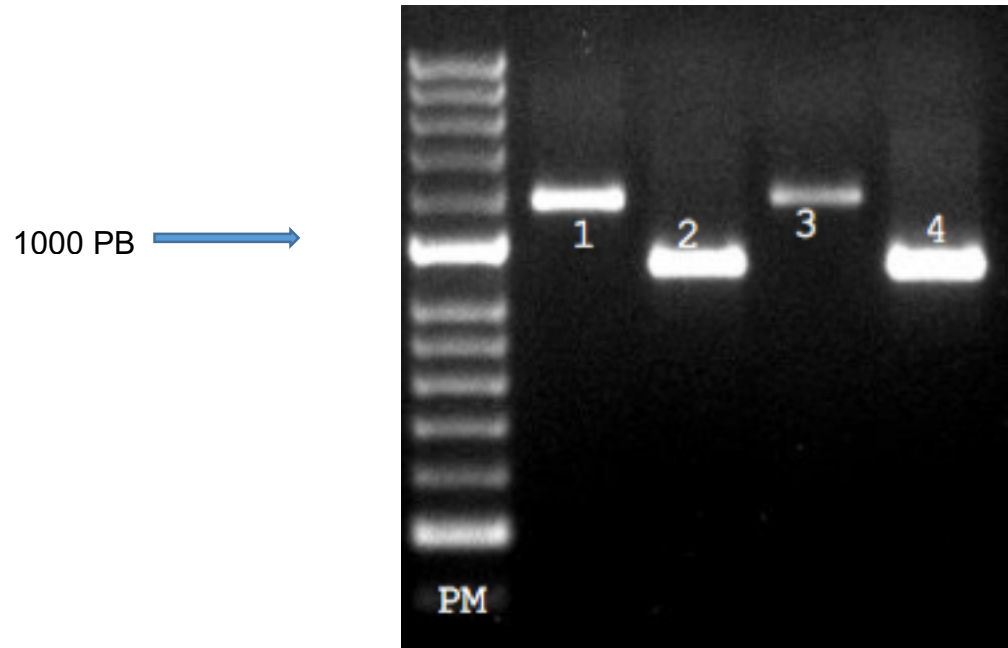
| Especie                | Segmento (Pb) |
|------------------------|---------------|
| <i>C. dubliniensis</i> | 930 Pb        |
| <i>C. albicans</i>     | 1.180 Pb      |

**Tabla 3:** 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 µl: Buffer 10X; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTP's; Colorante 10X; 1M de Betaína; 0,1 U/µl de Taq Polimerasa; 1 µM de Partidor WF (5'-GTTTTTGCAACTTCTCTTTGTA-3'); 1 µM de Partidor WR (5'-ACAGTTGTATCATGTTTCAGT-3') 25µM; 6,6µl de agua bidestilada y ADN genómico (contenido en el punch).

Las etapas de esta amplificación constan de una desnaturalización 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 (**figura 7**).



**Figura 7:** Identificación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante PCR

Foto gel de Agarosa 1,2% vista con transiluminador, de las cepas de referencia y 2 aislados clínicos. En esta imagen, PM es el marcador de peso molecular, los carriles 1 y 2 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*.

#### **i. Determinación de susceptibilidad a antifúngicos:**

Se utilizó el método CLSI M44-A (Espinel-Ingroff, 2007) para realizar la prueba de susceptibilidad de las distintas cepas de *Candida albicans* a la terapia con fluconazol y nistatina *in vitro*, descrito a continuación:

Desde el cultivo en CHROMagar *Candida*® de 24 h a 35 °C se preparó un inóculo de turbidez 0,5 McFarland en solución 0,15 M de cloruro de sodio estéril.

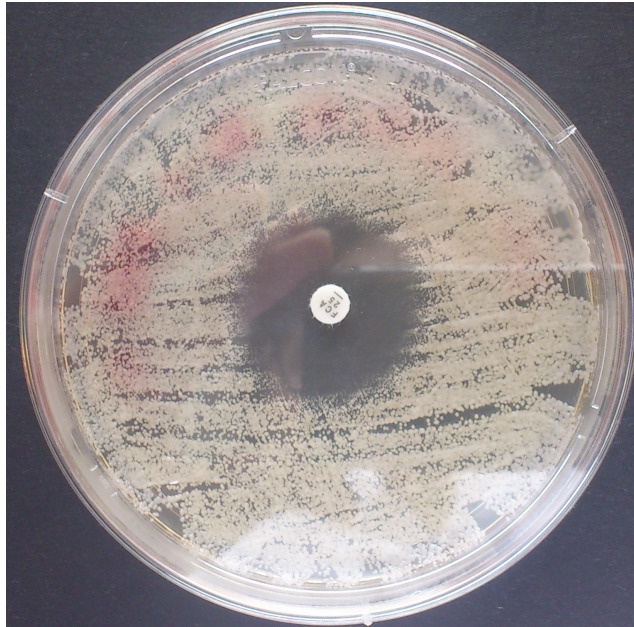
Para el método de difusión se utilizaron placas de Petri de 100 mm de diámetro, con 20 ml de agar Sabouraud cloranfenicol.

La superficie de cada placa de Petri fue hisopada en tres direcciones con el inóculo correspondiente y se dejó secar durante 10 a 15 minutos en estufa, a 35 °C. Posteriormente, se colocó un disco, ya sea de fluconazol (OXOID®) o nistatina (OXOID®) de 6 mm por placa separados equidistantemente de los márgenes. Luego de ser incubadas por 24 h a 35 °C, las placas fueron examinadas sobre una superficie negra no reflectante iluminada con luz reflejada (**figura 8**). Los diámetros que rodean a los discos fueron medidos desde el milímetro más cercano hasta el punto donde hay reducción prominente del crecimiento. Microcolonias aisladas al borde de la zona o largas colonias dentro de la zona fueron ignoradas. Si el crecimiento de las levaduras fue insuficiente, las placas fueron examinadas nuevamente a las 48 hrs (24 horas después).

Se realizó un control de calidad ya definido en el método, el cual de no coincidir con los valores esperados (**tabla 4**), demostrará un cambio en la susceptibilidad inherente de la(s) cepa(s) al fluconazol y a nistatina, por lo que de ser necesario, se obtuvo una nueva muestra aislada.

| ESTATUS           | FLUCONAZOL | NISTATINA   |
|-------------------|------------|-------------|
| <b>SENSIBLE</b>   | > 20 mm.   | > 15 mm.    |
| <b>INTERMEDIA</b> | 12-19 mm.  | 10-11 mm.   |
| <b>RESISTENTE</b> | ≤ 11 mm    | No hay halo |

**Tabla 4:** Parámetros de observación de susceptibilidad a los antifúngicos (Rosco Diagnostics, 2011)



**Figura 8:** Placa de petri con Agar Sabouraud tetraciclina, conteniendo cultivo de *C. Albicans* y disco de fluconazol.

#### **f. Análisis de Resultados:**

Los datos fueron registrados en una planilla Excel y el análisis se realizó con el software STATA® 12.0

Para los datos referidos a las variables edad, HbA1c (%), cantidad de UFC/ml total por paciente y mm de halos de inhibición por Fluconazol/Nistatina, se aplicó el test de Shapiro-Wilk para determinar distribución de las variables.

Para comparar susceptibilidad al tratamiento con fluconazol/nistatina entre levaduras de especie *Candida* entre pacientes con DM2 compensados y descompensados metabólicamente, se utilizó el t-test por la distribución anormal de las variables.

Para la asociación entre mm de halos de inhibición por fluconazol/nistatina y valores de HbA1C, se utilizó el test de Spearman debido a la distribución anormal de las variables. Se consideró una significancia de 95% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Caracterización de la muestra

#### a.1 Estado Metabólico

Este estudio incluyó la participación de 52 pacientes diagnosticados con DM2. El promedio de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) de la muestra total fue de  $8,16 \pm 2,05$  %, presentando un rango entre 5,7 y 12,6 %.

La muestra se dividió en 2 grupos para su estudio, en relación a su compensación metabólica. Se consideró un porcentaje de HbA1c menor o igual a 7% como compensación metabólica, mientras que valores iguales o mayores a este porcentaje se consideraron como descompensados metabólicamente. El valor promedio de HbA1c fue de  $6,42 \pm 0,41$  % para el grupo compensado y de  $9,89 \pm 1,49$  % para el grupo descompensado.

| GRUPOS A ESTUDIAR      | VALOR HbA1c     | PARTICIPANTES | PROMEDIO HbA1c |
|------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| <b>COMPENSACIÓN</b>    | HbA1c $\leq$ 7% | 26            | 6,42 %         |
| <b>DESCOMPENSACIÓN</b> | HbA1c $>$ 7%    | 26            | 9,89 %         |

**Tabla 5:** Muestra total dividida en relación al estado metabólico

#### a.2 Edad

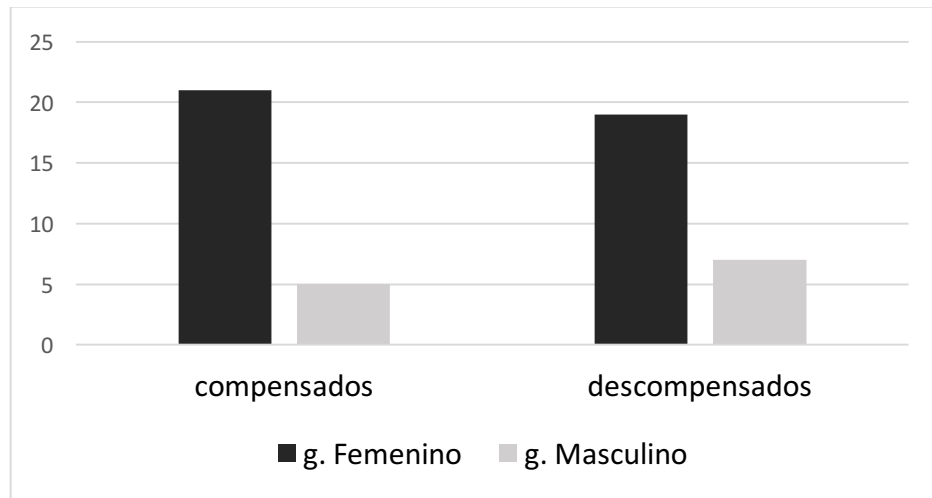
La edad promedio de la muestra fue de  $63,3 \pm 10,5$  años, con un rango entre 33 y 82 años. La mediana correspondió a 64 años. Al analizar la edad en relación al género, el promedio de edad de mujeres fue de  $64,0 \pm 10,3$  años y el de hombres fue de  $60,9 \pm 11,2$ .

|                | Promedio/D.E. | Mediana | Rango |
|----------------|---------------|---------|-------|
| <b>Mujeres</b> | 64,0 (10,3)   | 65      | 33-82 |
| <b>Hombres</b> | 60,9 (11,2)   | 63      | 34-75 |
| <b>total</b>   | 63,3 (10,4)   | 64      | 33-82 |

**Tabla 6:** Edad de la muestra total y dividida según género, expresada en promedio, mediana y rangos de edad.

### a.3 Género

De la totalidad de la muestra, 40 (76,9 %) eran mujeres y 12 (23,1 %) eran hombres (proporción 3,3:1). El promedio del valor de HbA1c en el grupo de mujeres fue de  $8,12 \pm 2,05$  % y en hombres fue de  $8,27 \pm 2,16$  %.



**Figura 9:** Muestra total de sujetos en relación al estado metabólico y género. El estado metabólico se midió con la variable  $HbA1c \leq 7$  %. De los sujetos compensados 21 (53,8 %) corresponden al género femenino y 5 (41,7 %) al género masculino, mientras que en los sujetos descompensados 7 (58,3 %) corresponden al género masculino y 19 (46,2 %) al femenino.

## b. Presencia de *Candida spp.*

### b.1 Unidades formadoras de colonias

La presencia de levaduras en los sujetos fue medida mediante la variable dicotómica “portador” y “no portador”. De la muestra total, 39 sujetos (75%) eran portadores de *Candida*, mientras que 13 sujetos (25%) no eran portadores.

Al analizar la portación de levaduras en relación al género, 32 mujeres (80 %) y 7 hombres (53,8 %) tenían presencia de especies de *Candida* en la cavidad oral. Se aplicó el test exacto de Fisher, que arrojó diferencias no significativas para estos resultados ( $p = 0,13$ ).

La relación entre estado metabólico y portación de levaduras muestra que en el grupo de pacientes compensados, 18 sujetos (69,2 %) tenían presencia de

levaduras, mientras que 21 sujetos (80,8 %) de los pacientes descompensados eran portadores de levaduras del género *Candida*. Las diferencias no fueron significativas ( $p = 0,23$ ) al aplicar el test exacto de Fisher.

|                       | $\leq 400$<br>UFC/ML | $> 400$<br>UFC/ML |
|-----------------------|----------------------|-------------------|
| <b>COMPENSADOS</b>    | 16                   | 10                |
| <b>DESCOMPENSADOS</b> | 8                    | 18                |
| <b>TOTAL</b>          | 24                   | 28                |

**Tabla 7:** Cantidad de unidades formadoras de colonias acorde al estado metabólico.

### b.2 Identificación de especies presentes

Se identificaron 6 especies de levaduras en la muestra total, de las cuales el mayor porcentaje correspondió a *C. albicans* (66,1 %), seguida por *C. glabrata* (20,7 %) y *C. dubliniensis* (8,23 %). En menor porcentaje se encontraron *C. tropicalis* (1,73 %) y *C. guilliermondii* (0,96 %). El 0,02 % correspondió a una especie perteneciente al género *Rhodotorula* (identificada presuntivamente) y el 2,21 % de las muestras no pudieron ser identificadas. Estos datos son presentados en la **Tabla 8**.

| ESPECIE                  | % MUESTRA |
|--------------------------|-----------|
| <i>C. ALBICANS</i>       | 66,1 %    |
| <i>C. GLABRATA</i>       | 20,7 %    |
| <i>C. DUBLINIENSIS</i>   | 8,23 %    |
| <i>C. TROPICALIS</i>     | 1,73 %    |
| <i>C. GUILLIERMONDII</i> | 0,96 %    |
| <i>RHODOTORULA SP.</i>   | 0,02 %    |
| NO IDENTIFICADAS         | 2,21 %    |

**Tabla 8:** Porcentaje de especies de levaduras presentes en la muestra total de pacientes portadores de *Candida*.



### c. Análisis de pH

#### c.1 pH y UFC

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. Hubo mayor recuento de levaduras en los pacientes descompensados en todos los rangos de pH, salvo en el comprendido entre 7,51-8. Todas las diferencias en los rangos de pH entre pacientes compensados y descompensados fueron estadísticamente significativas (**tabla 9**).

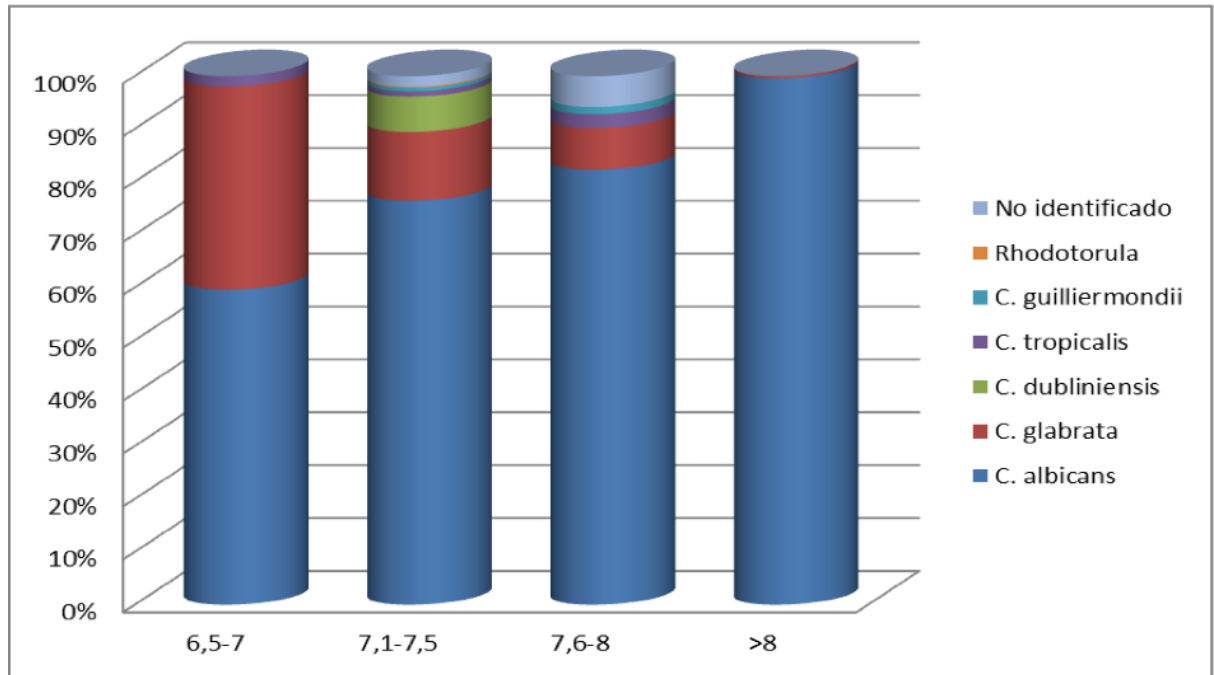
| RECuento DE LEVADURAS (UFC/ML) |             |                |        |
|--------------------------------|-------------|----------------|--------|
|                                | Compensados | Descompensados | X2     |
| <b>6,5-7</b>                   | 177         | 978            | p<0,01 |
| <b>7,01-7,5</b>                | 684         | 2471           | p<0,01 |
| <b>7,51-8</b>                  | 1528        | 704            | p<0,01 |
| <b>&gt;8</b>                   | 7           | 1436           | p<0,01 |
| <b>TOTAL</b>                   | 2396        | 5589           | p<0,01 |

**Tabla 9:** Comparación Recuento de levaduras versus pH salival entre pacientes compensados y descompensados.

#### c.2 pH y diversidad de especies presentes

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 la **figura 10**.

En la **figura 10** 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 pH más alcalino.



**Figura 10:** Diversidad de Especies Levaduras versus pH Salival en el Total de Muestras Salivales.

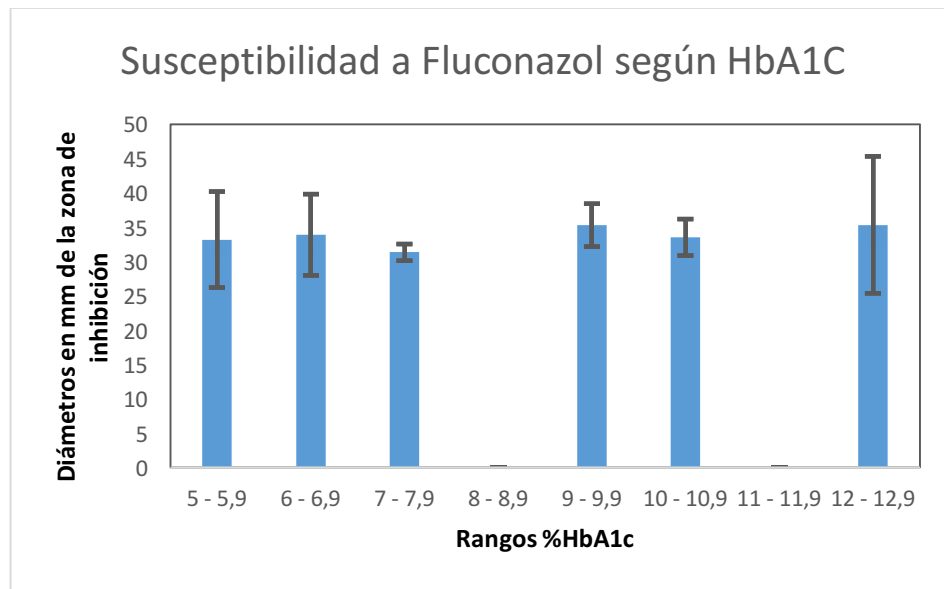
#### d. Susceptibilidad de *Candida albicans* a Antifúngicos

##### d.1 Susceptibilidad a Fluconazol

##### d.1.1 Susceptibilidad según HbA1c

Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para el análisis de la distribución de las variables, observándose una distribución anormal de éstas. Los valores se encuentran dentro de los rangos aceptados de susceptibilidad de la especie, no encontrándose ninguna cepa resistente (Ver tabla 4).

Se observa una tendencia a una leve correlación negativa entre las variantes ( $r = -0.0649$ ), lo que es sugerente que a mayores porcentajes de HbA1c, las cepas serían menos susceptibles a fluconazol, sin embargo, la tendencia es mínima y no alcanza significancia estadística ( $p = 0.4596$ ) (figura 11).



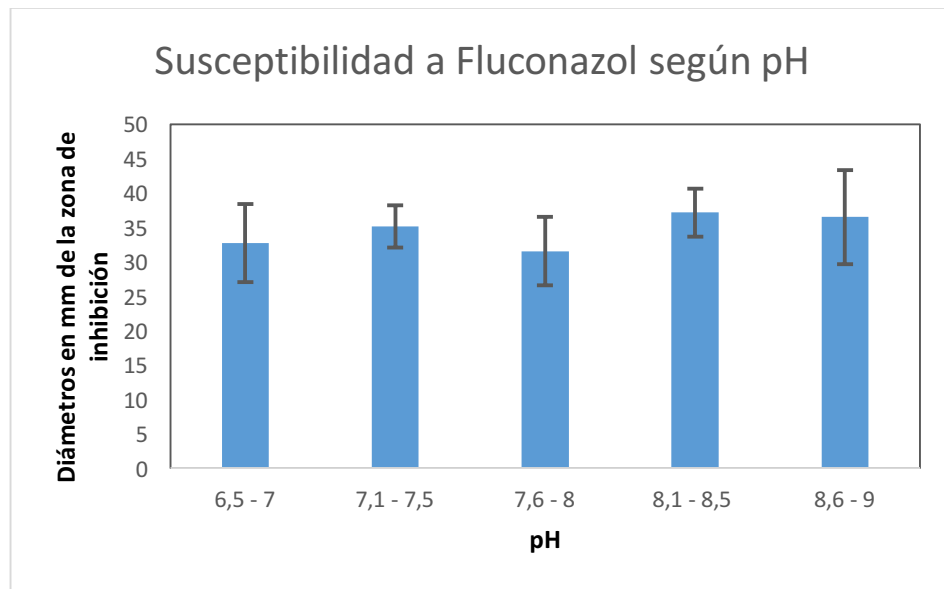
**Figura 11:** El eje X Representa los rangos de HbA1c, el eje Y grafica los promedios de halos de inhibición en mm a Fluconazol y sus desviaciones estándar.

#### d.1.2 Comparación entre ambos grupos

Se realizó la comparación entre el grupo de pacientes compensados y descompensados metabólicamente usando t-test. Como se mencionó anteriormente se consideró como valor de corte HbA1c < 7%. Se observa un valor de  $t = -0.7395$  con un  $p = 0.4626$ , es decir, existe una tendencia a una correlación negativa entre ambas variables pero no es estadísticamente significativa.

#### d.1.3 Susceptibilidad según pH

Se observa una tendencia leve a una correlación positiva entre las variantes ( $r = 0.1681$ ), es decir, a un pH más alto o básico, habría una mayor susceptibilidad a fluconazol, sin embargo la tendencia no es estadísticamente significativa ( $p=0.0540$ ).



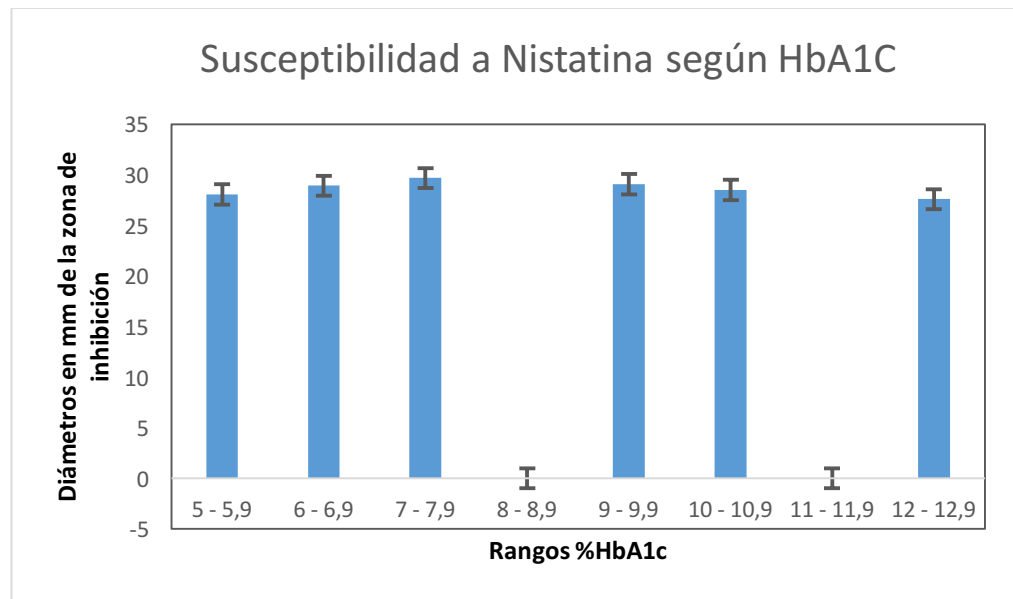
**Figura 12:** El eje X Representa los rangos de valores de pH, el eje Y grafica los promedios de halo de inhibición en mm a Fluconazol y sus desviaciones estándar.

## d.2 Susceptibilidad a Nistatina

### d.2.1 Susceptibilidad según HbA1c

Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para el análisis de la distribución de las variables, observándose una distribución anormal de éstas. Los valores se encuentran dentro de los rangos aceptados de susceptibilidad de la especie, no encontrándose ninguna cepa resistente (**Ver tabla 4**).

Se observa una tendencia a una correlación negativa entre los valores de HbA1c y el diámetro de los halos de inhibición producidos por nistatina ( $r = -0.1183$ ), lo que implica que a mayores porcentajes de HbA1c, las cepas serían menos susceptibles a Nistatina; sin embargo, la tendencia es leve y no alcanza significancia estadística ( $p = 0.1767$ ) (figura 13).



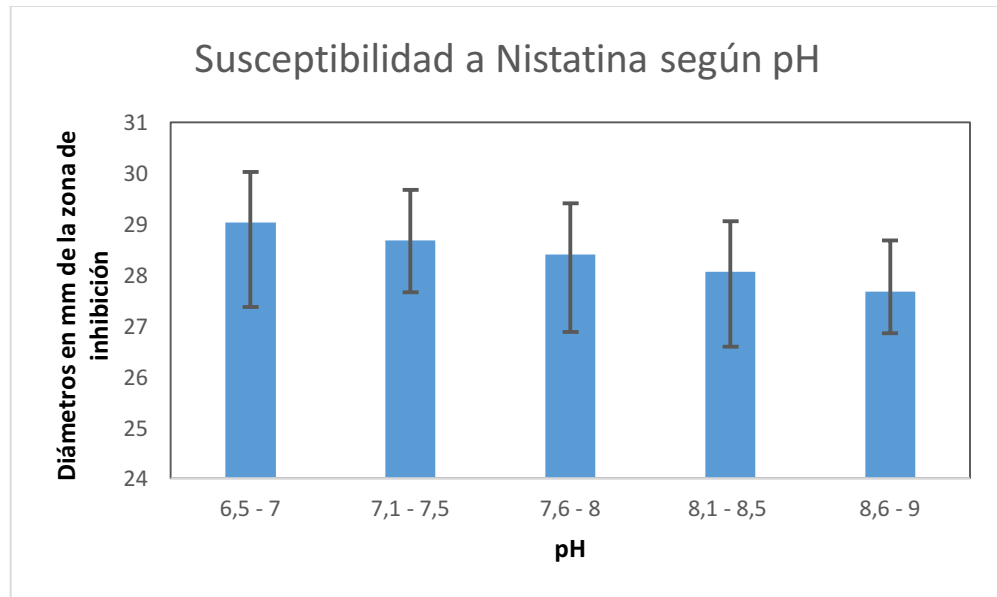
**Figura 13:** El eje X Representa los rangos de valores de HbA1c, el eje Y grafica los promedios de halos de inhibición en mm a Nistatina y sus desviaciones estándar.

#### **d.2.2 Comparación entre ambos grupos**

Se realizó la comparación entre el grupo de pacientes compensados y descompensados metabólicamente usando t-test. Como se mencionó anteriormente se consideró como valor de corte HbA1c  $\leq 7\%$ . Se observa un valor de  $t = 0.83333$  con un  $p = 0.7598$ , es decir, existe una tendencia a la correlación positiva entre ambas variables pero no es estadísticamente significativa.

#### **d.2.3 Susceptibilidad según Ph**

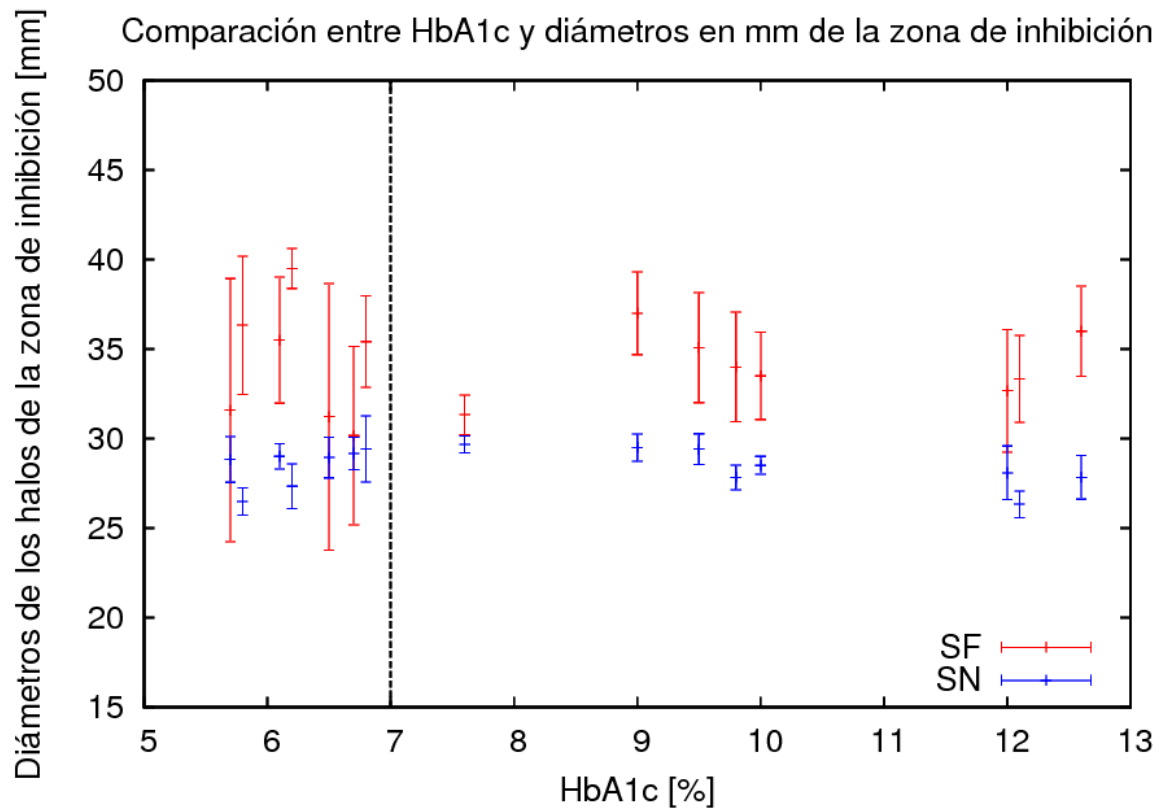
Se observa una leve tendencia a una correlación negativa entre las variantes ( $r = -0.2234$ ), estadísticamente significativa ( $p = 0.01$ ) lo que implica que a mayor pH o pH más básico, las cepas de *C. albicans* son menos susceptibles a Nistatina, a su vez, a menor pH, o pH más ácido, las cepas de Nistatina serían más susceptibles al tratamiento.



**Figura 14:** El eje X Representa los rangos de valores de pH, el eje Y grafica los promedios halos de inhibición en mm. a Nistatina y sus desviaciones estándar.

### **d.3 Susceptibilidad comparada a Fluconazol y Nistatina**

Se observan mayores valores de inhibición a fluconazol que a nistatina (Promedio=  $33,87 \pm 5,02$ . Sin embargo, los valores de corte son distintos para las pruebas *in vitro* para ambos antifúngicos (ver tabla 4), por lo que esto no es significativo clínicamente. Existe una mayor predictibilidad de los datos asociados a nistatina (Promedio= $28,59 \pm 1,45$ )



**Figura 15:** Comparación de ambos antifúngicos. SF: diámetros en mm de los halos de inhibición para Fluconazol. SN: diámetros en mm de los halos de inhibición para Nistatina.

## DISCUSIÓN

Al igual que la resistencia a los antibióticos, actualmente la resistencia a los antifúngicos es un tema trascendental. Cada vez nos encontramos con cepas de distintos microorganismos de diversas especies a las cuales no podemos hacerles frente con los medios que disponemos (Courvalin, 2016; Meziane-cherify y Courvalin, 2014; Albataineh y cols., 2015; Cannon y Holmes, 2015).

A su vez, la diabetes es una enfermedad de alta incidencia con una prevalencia en aumento debido a los estilos de vida en la población nacional y mundial (Minsal 2010 (a)). Al asociar la condición diabética y su compensación metabólica a la resistencia a antifúngicos, buscamos contribuir al repertorio de herramientas que disponemos para enfrentar el desafío en nuestro quehacer clínico.

El objetivo de nuestro estudio fue determinar si la condición metabólica, determinada por sus valores de HbA1c, de los pacientes diabéticos influye en la susceptibilidad a antifúngicos, específicamente fluconazol o nistatina. Si bien, en este estudio no se alcanzó la significancia estadística para respaldar nuestra hipótesis, sienta un precedente, en la investigación para una mejor elección de un antifúngico por sobre otro para el tratamiento de las infecciones por *C. albicans* en pacientes diabéticos compensados o descompensados metabólicamente, mostrando tendencias que sin embargo deben ser confirmadas mediante la ampliación de la muestra. Actualmente existen estudios similares en pacientes diabéticos, sin embargo aquellos, relacionan la susceptibilidad a los valores de glicemia (Mandal y cols., 2014; Manfredi y cols. 2006) y no a los de hemoglobina glicosilada, a pesar de que este último método es un mejor indicador del control metabólico de la diabetes (Sacks, 2011; Herman y cols., 2012). Al apreciarse tendencias en cada una de las relaciones entre variables estudiadas, cabe preguntarse si la significancia estadística podría alcanzarse al utilizar una muestra mayor.

Es importante destacar el resultado que se obtuvo entre las variables pH / Susceptibilidad a Nistatina, donde a mayor pH observamos halos de inhibición menores, lo que sugiere que en pacientes con pH más ácidos obtendríamos una



ventaja clínica al tratarlos con Nistatina por sobre aquellos pacientes con un pH alcalino.

Acorde a la literatura, pacientes que presentan DM2, independiente de su control metabólico, pueden presentar un menor pH salival en comparación con pacientes no diabéticos, describiéndose en promedio un pH salival de 6,69 en pacientes diabéticos, a diferencia de los pacientes sanos que presentan un pH neutro o muy cercano a ello (Prathibha y cols., 2013), además se indica que el pH tiende a acidificarse a medida que empeora el control metabólico (Aitken y cols., 2015).

Un pH acidificado en la cavidad oral favorece el crecimiento de levaduras por sobre el de microbiota bacteriana normal, debido a que las levaduras de género *Candida*, toleran valores de pH muy ácidos (Rautemaa y Ramage, 2011).

La disminución del pH salival en pacientes diabéticos podría deberse a la presencia de glucosa en saliva, la cual forma productos reversibles de glicosilación con proteínas en los tejidos orales durante episodios hiperglicémicos, los que se acumulan en las células bucales epiteliales, aumentando la cantidad de receptores disponibles para *Candida* y con ello su adhesión al epitelio. La glucosa presente en saliva también sirve de nutriente para *Candida* y suprime la capacidad de eliminarlas de los neutrófilos, lo que acentúa aún más la colonización de la mucosa oral por parte de éstas en pacientes diabéticos descompensados (Balan y cols., 2015).

Dados los resultados obtenidos en nuestro estudio y según lo mencionado anteriormente en la literatura, podríamos sugerir que la Nistatina tendría mejor efecto en pacientes descompensados.

En la contraparte referida a pH / Susceptibilidad a Fluconazol se observaba la tendencia inversa, pero no fue estadísticamente significativo el resultado, de haberlo sido, podríamos entregar mayor respaldo científico a la elección de un antifúngico por sobre otro acorde al pH del paciente.

Sería positivo además sugerir que para futuros estudios se realice una investigación a cabalidad de la historia clínica del paciente, que antifúngicos ha consumido anteriormente y si hay alguna relación con el tratamiento farmacológico que recibe para el tratamiento de la diabetes y la susceptibilidad a antifúngicos, ya

que se describe en la literatura que medicamentos de tipo Sulfoniureas, Tiazolidinedionas y Meglitinidas que se utilizan en el tratamiento de la DM presentan mayor interacción farmacológica con otros medicamentos que interactúan con el complejo CYP-450, como fluconazol (Scheen, 2005). Es necesario también, incluir antecedentes de las condiciones locales de la cavidad oral del paciente como Caries, Enfermedad periodontal o portación de prótesis removibles, ya que la habilidad excepcional de las levaduras para adherirse a las superficies de materiales artificiales, como éstas, aumenta el riesgo de presentar candidiasis en los pacientes portadores (Rautemaa y Ramage, 2011), además la literatura describe pH salivales más ácidos en presencia de caries y más alcalinos en presencia de periodontitis (Rajesh y cols., 2015) lo que también podría influir en la susceptibilidad de *Candida albicans* ante los distintos antifúngicos.

Igualmente hay que considerar que uno de nuestros criterios de exclusión fue “presencia de procesos inflamatorios agudos en la cavidad oral (incluyendo candidiasis)” por lo que cabe preguntarse si obtendríamos resultados distintos en pacientes que presenten un proceso agudo, debido a los cambios innatos en la virulencia de *Candida albicans* (Ford y cols., 2015).

La relación entre HbA1c y susceptibilidad presenta una tendencia más marcada frente a nistatina que a fluconazol. Actualmente existen numerosos estudios innovando en el formato de entrega de nistatina, como por ejemplo en forma de colutorio (Hu y cols., 2013; Bakhshi y cols., 2012) de nanocompuesto (Hussein-Al-Ali y cols., 2014) y como parte de acondicionadores de tejidos (Lima y cols., 2016) por lo que en el futuro será interesante evaluar la eficacia de dichos formatos clínicamente.

## CONCLUSIONES

- 1.- Existe mayor recuento de levaduras, medido en UFC/ml, en pacientes con DM2 descompensados en comparación a sus pares compensados.
- 2.- Existe presencia de diversas especies de levaduras, en la saliva de los pacientes DM2, de las cuales *C. Albicans* fue la más frecuentemente aislada seguida de *C. Glabrata* independientemente del estado de control metabólico y pH salival que presente el paciente.
- 3.- Existe una correlación negativa entre pH salival y grado de control metabólico, medido mediante HbA1c en pacientes DM2 descompensados.
- 4.- Existe una correlación negativa, entre diversidad de especies de levaduras y su coexistencia con el pH salival en pacientes con DM2.
- 5.- Existe una correlación negativa entre pH salival y susceptibilidad a nistatina.
- 6.- No existe correlación entre pH salival y susceptibilidad a fluconazol.
- 7.- No existe correlación entre valor de HbA1c y susceptibilidad a nistatina.
- 7.- No existe correlación entre valor de HbA1c y susceptibilidad a fluconazol.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albatineh MT, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold NP. (2015)** Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2015 Dec 28. pii: S0891-5520(15)00115-4. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.014. [Epub ahead of print]
- Aitken JP, Ortiz C, Morales-Bozo I, y cols. (2015)**  $\alpha$ -2-macroglobulin in saliva is associated with glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Dis Markers.* 2015;2015:128653. doi: 10.1155/2015/128653. Epub 2015 Mar 3.
- American Diabetes Association. (2014).** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2014 Enero; 37(1): 81-90.
- American Diabetes Association. (2011)** Standards Of Medical Care In Diabetes--2012. *Diabetes Care.* 2011 Enero ;35 Suppl 1:S11-63.
- Araújo A.; Machado L.; Antoninha A.; José W. (2014)** Environmental pH Influences Candida Albicans Biofilms Regarding Its Structure, Virulence And Susceptibility To Fluconazole. *Microb Pathog.* 2014 Apr-May;69-70:39-44.
- Bakhshi M, Taheri JB, Shabestari SB y cols.(2012).** Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. *Gerodontology.* 2012 Jun;29(2):e680-4. doi: 10.1111/j.1741-2358.2011.00544.x. Epub 2011 Nov 30.
- Balan P, B Gogineni S, Kumari N S, y cols. (2015)** Candida Carriage Rate and Growth Characteristics of Saliva in Diabetes Mellitus Patients: A Case-Control Study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2015 Fall;9(4):274-9. doi: 10.15171/joddd.2015.048. Epub 2015 Dec 30.
- Bernardi MG, Reis A, Loguercio AD, y cols. (2007)** Study of the Buffering Capacity, pH and Salivary Rate in type 2 well-controlled and poorly controlled diabetic patients. *Oral Health Prev Dent.* 2007; 5(1):73-8.
- Bremenkamp R.; Caris A.; Jorge A.; y cols. (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.

- Cannon RD, Holmes AR (2015)** Learning the ABC of oral fungal drug resistance. *Mol Oral Microbiol.* 2015 Dec;30(6):425-37. doi: 10.1111/omi.12109. Epub 2015 Jul 2.
- Cantón E, Pemán J, Iñiguez C, y cols. (2013)** Epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for six *Candida* species as determined by the colorimetric Sensititre YeastOne method. *J Clin Microbiol.* 2013 Aug;51(8):2691-5.
- Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, y cols. (2006).** Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 11(4):309-314
- 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.
- Courvalin P (2016)** Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease? *Clin Microbiol Infect.* 2016 Jan 21. pii: S1198-743X(16)00028-8. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.012. [Epub ahead of print]
- Espinel-Ingroff A. (2007)** Standardized Disk Diffusion Method for Yeasts. *Clinical Microbiology Newsletter* 29:13.
- Ford CB, Funt JM, Abbey D y cols. (2015)** The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *Elife.* 2015 Feb 3;4:e00662.
- 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.
- Genuth S, Alberti KG, Bennett P, y cols. (2003)** Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2, Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160–3167

**Ghannoum MA, Rice LB. (1999)** Antifungal agents: mode of actions, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 501–517.

**Ghannoum M A, Kuhn D M. (2002)** Voriconazole. Better chances for patients with invasive mycosis. *Eur J Med Res* 2002; 7: 242-56.

**Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, y cols (2004).** Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care.* 27(7):1761-73.

**Herman WH, Cohen RM (2012).** Racial and ethnic differences in the relationship between HbA1c and blood glucose: implications for the diagnosis of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(4):1067-72.

**Hu R, Jiang X, Wu Y.(2013)** Prospective trial finds nystatin mouthwash effective prophylaxis for pulmonary invasive fungal infections that originate in the throat of patients with hematologic malignancies. *Neoplasma.* 2013;60(3):315-21. doi: 10.4149/neo\_2013\_042.

**Hussein-AI-Ali SH, El Zowalaty ME, Kura AU, y cols.(2014)** Antimicrobial and controlled release studies of a novel nystatin conjugated iron oxide nanocomposite. *Biomed Res Int.* 2014;2014:651831. doi: 10.1155/2014/651831. Epub 2014 May 12.

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

**Koray M, Ak G, Kurklu E, y cols. (2005)** Fluconazole and/or hexetidine for management of oral candidiasis associated with denture-induced stomatitis. *Oral Dis.* 2005 Sep;11(5):309-13.

**Lee X.; Gómez L.; Vergara C.; y cols. (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.

**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.

**Lima JF, Maciel JG, Arrais CA, y cols.(2016)** Effect of incorporating antifungals on

the water sorption and solubility of interim resilient liners for denture base relining. *J Prosthet Dent*. 2016 Jan 13. pii: S0022-3913(15)00640-X. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.09.029. [Epub ahead of print]

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

**Mandal SM, Mahata L, Migliolo D, y cols. (2014)** Glucose directly promotes antifungal resistance in the fungal pathogen, *Candida* spp. *J Biol Chem*. 2014 Sep 12;289(37):25468-73.

**Manfredi M, McCullough MJ, Polonelli L, y cols. (2006)** In vitro antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Jun;21(3):177-82.

**Martin M V. (1999)** The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: A review. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 429-37.  
Martin MV. Antifungal agents. Oral candidosis. London: Wright Publishers; 1990.p. 238–51.

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

**Meziane-Cherif D, Courvalin P. (2014)** Antibiotic resistance: to the rescue of old drugs. *Nature*. 2014 Jun 26;510(7506):477-8. doi: 10.1038/510477a.

**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 22 de Agosto, 10:30 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 17 de Agosto 14:50 hrs

**Ministerio de Salud (2010)** Guía Clínica Auge, Diabetes Mellitus Tipo 2. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/72213ed52c3e23d1e04001011f011398.pdf> Visto 30 de Noviembre 01:22 hrs

**Ministerio de Salud (2013)** Guía Clínica Auge, Diabetes Mellitus Tipo 1. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/b554e8e580878b63e04001011e017f1e.pdf> Visto 15 de Agosto 19:12 hrs

**Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, y cols. (2001)** Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Sep;92(3):281-91.

**Nathan DM, Kuenen J, Borg R, y cols. (2008)** A1c-Derived Average Glucose Study Group. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care.* 31(8):1473-8.

**Navazesh M. (1993)** Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci,* 1993; 694: 72-77

**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://http://www.scp.com.co/precop/precop_files/ano11/11_2_cont.pdf). Visto 20 de Agosto, 15:47 hrs.

**O'Sullivan JM1, Jenkinson HF, Cannon RD. (2000)** Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology.* 2000 Jan;146 ( Pt 1):41-8.

**Pea F, Furlanut M. (2001)** Pharmacokinetic aspects of treating infections in the intensive care unit. Focus on drug interactions. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 833-68.

**Prathibha K.; Johnson P.; Ganesh M.; y cols (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.* 2010 August; 33(8): 1903–1904.

**Rajesh KS, Zareena, Hegde S, Arun Kumar MS. (2015)** Assessment of salivary calcium, phosphate, magnesium, pH, and flow rate in healthy subjects,



periodontitis, and dental caries. *Contemp Clin Dent.* 2015 Oct-Dec;6(4):461-5. doi: 10.4103/0976-237X.169846.

**Rautemaa R, Ramage G.(2011)** Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol.* 2011 Nov;37(4):328-36. doi: 10.3109/1040841X.2011.585606. Epub 2011 Jul 21.

**Rex J H, Bennett J E, Sugar A M y cols. (1994)** A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. *N Engl J Med* 1994; 331: 1325-30

**Rex J H, Pappas P G, Karchmer A W y cols. (2003)** A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in non neutropenic subjects. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1221-8

**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.

**Rosco Diagnostics (2011)** Susceptibility testing of yeasts 2011. [http://www.rosco.dk/pdf/applicationsheet\\_-\\_susceptibility\\_testing\\_YeastsB\\_-\\_g%C3%A6lden\\_-\\_web-version%E2%80%A6.pdf](http://www.rosco.dk/pdf/applicationsheet_-_susceptibility_testing_YeastsB_-_g%C3%A6lden_-_web-version%E2%80%A6.pdf) Visto 14 de Enero 2016, 18:30 hrs.

**Sacks DB (2011).** A1C versus glucose testing: a comparison. *Diabetes Care.* 34(2):518-23.

**Scheen AJ (2005)** Drug interactions of clinical importance with antihyperglycaemic agents: an update *Drug Saf.* 2005;28(7):601-31

**Syrjälä AM, Niskanen MC, Ylöstalo P, Knuutila ML (2003)** Metabolic control as a modifier of the association between salivary factors and dental caries among diabetic patients. *Caries Res.* 2003 Mar-Apr;37(2):142-7.

**Tapia C. (2005)** Mechanisms of action, adverse reactions and new antifungal agents. *Medwave* 2005 Abr;5(4):e3548 doi: 10.5867/medwave.2005.04.3548

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

**Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM y cols. (2002)** Relationship between salivary flow rates and Candida counts in subjects with xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Feb;93(2):149-54

## ANEXOS Y APÉNDICES

### ANEXO N°1: Ficha Clínica.

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Rut: \_\_\_\_\_

Mail: \_\_\_\_\_ Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Fuma

(Cuánto): \_\_\_\_\_

Nefropatía \_\_\_\_\_

Neuropatía \_\_\_\_\_

Retinopatía \_\_\_\_\_

Hipertensión \_\_\_\_\_

Anamnesis: \_\_\_\_\_

Edad de diagnóstico de diabetes: \_\_\_\_\_

Fármacos: \_\_\_\_\_

HbA1c: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Glicemia: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

SI NO

- |  |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. ¿Siente la boca seca usualmente?                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. ¿Siente la saliva espesa?                       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. ¿Siente sensación de ardor en la lengua?        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. ¿Necesita tomar líquidos para tragar la comida? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. ¿Tiene dificultades para tragar?                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Mucosa oral: \_\_\_\_\_

Lengua: \_\_\_\_\_

Resumen salud oral: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO N°2: Aprobación Del Protocolo De Investigación Por El Comité De Ética.



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 Lefimil  
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  $\alpha$ 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 Altken, 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ -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  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -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 Altken, 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 Letimil  
Presidente(s) del CEC

C/C.  
Investigador Principal.  
Secretaría C.E.C.

**ANEXO 3: Aprobación Del FIOUCH Por Parte Del Comité De Bioseguridad.**

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

## ANEXO 4: Consentimiento informado.

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 conversaré 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-22/05/2013

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, contaré 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 solo 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: [aitkenj@pa.uchile.cl](mailto:aitkenj@pa.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 Angélica 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





