Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *CANDIDA* AISLADAS DE LA MUCOSA BUCAL Y SU SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA EN PACIENTES CON Y SIN DIABETES MELLITUS TIPO 2

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN PATOLOGÍA Y MEDICINA BUCAL

PRESENTA

Manuel Arturo Romero de la Vega

Comité tutorial

Co-Directora: M. en S.P. Estela de la Rosa García

Co-Directora: Dra. María Esther Irigoyen Camacho

Asesora: Dra. Aida Hamdan Partida

Asesor externo: Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas

Ciudad de México, abril 2018

La Maestría en Patología y Medicina Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el registro 5020

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Xochimilco aprobó la ICR que presentó:

MANUEL ARTURO ROMERO DE LA VEGA

Comité Tutorial:

_____
Co-Directora: M. en S.P. Estela de la Rosa García

_____
Co-Directora: Dra. María Esther Irigoyen Camacho

_____
Asesora: Dra. Aida Hamdan Partida

_____
Asesor externo: Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas

Jurado:

_____
Dra. Velia Aydée Ramírez Amador
(Presidenta)

_____
Dra. Irma Gabriela Anaya Saavedra
(Secretaria)

_____
Dr. Marcos Agustín Muñiz Lino
(Vocal)

_____
M. en P. y M.B. Itzel Castillejos García
(Vocal)

_____
M. en P. y M.B. Martha Estela García Sánchez
(Vocal)

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá por siempre confiar en mi y apoyarme incondicionalmente

A Talia por siempre escucharme y animarme cuando pensaba que no podía lograrlo

A mis amigos de la maestría por su ayuda y por los momentos que vivimos juntos

A mi comité tutorial por la confianza y paciencia

A la Dra. Estela de la Rosa por su valiosa ayuda y disposición

A cada uno de mis profesores del posgrado por su tolerancia, conocimiento brindado y exigencias

A todos mis familiares y amigos que confiaron en mi y cuando necesité de ellos siempre estuvieron para mi.

Todos lo hicieron posible

ÍNDICE Pág.

Abreviaturas..... I
Índice de cuadros..... II
Índice de figuras..... III
Resumen..... IV
1. Antecedentes..... 1
1.1 *Candida* spp..... 1
1.1.1 Colonización por *Candida* spp..... 1
1.1.2 Factores de virulencia de especies de *Candida*..... 1
1.2 Candidosis bucal..... 3
1.2.1 Respuesta inmune en candidosis bucal..... 3
1.2.2 Características clínicas de candidosis bucal..... 5
1.2.3 Diagnóstico de candidosis bucal..... 6
1.2.4 Tratamiento de candidosis bucal..... 7
1.3 Susceptibilidad antifúngica..... 10
1.3.1 Susceptibilidad antifúngica en diversas poblaciones de riesgo..... 12
1.4 Diabetes..... 13
1.4.1 Epidemiología mundial y nacional de DM-2..... 13
1.4.2 Fisiopatología de la DM-2..... 14
1.4.3 Factores de riesgo..... 15
1.4.4 Criterios diagnósticos..... 15
1.4.5 Signos y síntomas de DM-2..... 15
1.4.6 Tratamiento..... 16
1.4.7 Complicaciones generales de DM-2..... 16
1.4.8 Complicaciones y manifestaciones bucales de DM-2..... 17
1.4.9 Factores locales y sistémicos para candidosis en pacientes con DM-2..... 17
2. Planteamiento del problema..... 19
3. Justificación..... 20
4. Objetivos..... 21
4.1 Objetivo general..... 21
4.2 Objetivos específicos..... 21

5. Material y método..... 22
5.1 Diseño del estudio..... 22
5.2 Procedimientos clínicos..... 23
5.3 Procedimientos de laboratorio..... 24
5.4 Variables..... 27
5.5 Análisis estadístico..... 28
6. Resultados..... 29
7. Discusión..... 38
8. Referencias..... 44
Anexo 1. Descripción clínica de los tipos de candidosis..... 57
Anexo 2. Consentimiento informado..... 59
Anexo 3. Índice de higiene oral simplificado..... 61
Anexo 4. Ficha de recolección de datos..... 62
Anexo 5. Susceptibilidad de *Candida* spp. a fluconazol y miconazol en diferentes estudios..... 64
Anexo 6. Criterios de tamaño del halo de inhibición de acuerdo al CLSI, 2012..... 65
Anexo 7. Definición operacional de variables..... 66

ABREVIATURAS

ADA	American of Diabetes Association
ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
AHM	Agar harina de maíz
AMH	Agar Mueller Hinton
API	Analytical Profile Index
ATCC	American Type Culture Collection
CB	Candidosis bucal
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CPA	Células Presentadoras de Antígenos
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
DM	Diabetes mellitus
ENA	Encuesta Nacional para las Adicciones
FLZ	Fluconazol
FS	Flujo salival
IHOS	Índice de higiene oral simplificado
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LDC	Laboratorio de Diseño y Comprobación
MB	Mucosa bucal
MCZ	Miconazol
ml	Mililitros
mm	Milímetros
NIS	Nistatina
PAMP´s	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
PMN	Polimorfonucleares
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SSA	Secretaría de Salud
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana

UB	Unidades de bebida
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características socio-demográficas y clínicas, colonización e infección por *Candida* spp. en 134 individuos de los LDC de la UAM-X..... 32

Cuadro 2. Distribución de especies de *Candida* en aislamientos de individuos colonizados con DM-2 y sin DM-2 de los LDC de la UAM-X..... 33

Cuadro 3. Resultados de la susceptibilidad por antifúngico en 80 aislamientos de los 72 individuos colonizados..... 34

Cuadro 4. Susceptibilidad antifúngica en 80 aislamientos de individuos de los LDC de la UAM-X, divididos por presencia o ausencia de DM-2..... 35

Cuadro 5. Susceptibilidad antifúngica a fluconazol, miconazol y nistatina en especies *C. albicans y no albicans*..... 36

Cuadro 6. Resultado del modelo de regresión logística múltiple para colonización e infección bucal por *Candida* spp..... 37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presencia de hifas de *Candida* spp. sobre células epiteliales..... 24

Figura 2. Morfología de la levaduras en tinción de Gram..... 25

Figura 3. Prueba de susceptibilidad antifúngica en Agar Mueller-Hinton..... 27

RESUMEN

Introducción: *Candida* spp. es el hongo que con mayor frecuencia produce infecciones oportunistas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM-2). El paciente con DM-2 posee características bucales y sistémicas que lo predisponen a la colonización por *Candida* spp. y candidosis bucal (CB). El tratamiento de CB se basa principalmente en la administración de antifúngicos azólicos y polienos; se ha observado un aumento en la resistencia a estos antifúngicos debido a un uso indiscriminado, tratamientos empíricos y sin confirmación de la especie antes de prescribir el tratamiento.

Objetivo: Identificar las diferencias en la susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* en aislamientos obtenidos de la mucosa bucal de pacientes con y sin DM-2.

Materiales y métodos: Estudio transversal y comparativo, en el que se incluyeron pacientes adultos con y sin DM-2 que asistieron a los laboratorios de diseño y comprobación (LDC) de la licenciatura en Estomatología de la UAM-X. Previa firma de consentimiento de participación en el estudio, se examinó la mucosa bucal y se tomó una muestra para identificar la colonización y la especie de *Candida* en Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). La identificación de especies se realizó en CHROMagar® *Candida* y galerías API 20C Aux. La infección por *Candida* spp. se confirmó con signos clínicos y citológicos positivos a hifas y pseudohifas mediante un frotis teñido con ácido peryódico de Schiff (PAS). Se evaluó la susceptibilidad a fluconazol, miconazol y nistatina, a través del método de difusión en disco en Agar Mueller-Hinton suplementado con glucosa y azul de metileno (M44-A del CLSI). Se usó como control la cepa *C. albicans* ATCC 90028. Para el análisis estadístico se utilizaron pruebas de χ^2 o T de Student, razón de momios y modelos de regresión logística. Con valor de alfa ≤ 0.05.

Resultados: Se incluyeron 134 individuos (71.6% mujeres), con un promedio de edad de 55.7 (±13.7). Cincuenta (37.3%) tenían DM-2. Se observó colonización en 72 individuos (53.7 %). La frecuencia de CB en los DM-2 fue 14% *vs*. 3.6% sin DM-2 (p=0.029). *Candida albicans* se identificó en el 75% de los aislamientos. No hubo diferencia en la susceptibilidad antifúngica a los fármacos estudiados entre pacientes con y sin DM-2 (FLZ p=0.552, MCZ p=0.801 y NIS p=0-214). Las especies no *albicans*, presentaron mayor resistencia a los compuestos azólicos, fluconazol (p=0.007) y miconazol (p=0.018). Se identificó una asociación entre candidosis y DM-2 (p=0.029) y una asociación entre candidosis con mala higiene bucal (RM=11.10 p=0.015). Asimismo, la colonización se asoció con mala higiene bucal (RM=2.51 p=0.006) y el uso de prótesis (RM=4.42 p=0.006)

Conclusiones: La DM-2 no parece influir en la frecuencia de resistencia antifúngica de especies de *Candida* aisladas en cavidad bucal. Es posible que la resistencia esté más influenciada por las prácticas en la prescripción de los antifúngicos.

1. ANTECEDENTES

1.1 *Candida* spp.

El microorganismo es una levadura que se encuentra como organismo comensal en la cavidad bucal, tracto digestivo, piel y otras mucosas de personas sanas sin producir enfermedad, es decir, se encuentra colonizando.

1.1.1 Colonización por *Candida* spp.

La colonización se define como la adquisición y mantenimiento de una población estable de *Candida* spp., sin producir infección clínica (Cannon y Chaffin, 1999; Soll, 2002). *Candida albicans* es la especie que hasta en un 80% coloniza la mucosa bucal sola o en combinación con otras especies (Coronado y Jiménez, 2013; de la Rosa y cols, 2013), entre las que se encuentran: *C. tropicalis. C. parapsilosis, C. glabrata, C. krusei, C. kefyr, C. lusitanie, C. guilliermondi y C. dubliniensis*. (Suárez y cols. 2013; Coronado y Jiménez, 2013; García y cols, 2014).

La prevalencia de colonización por *Candida* spp. en la cavidad bucal varía dependiendo de los diversos grupos estudiados. En población general varía del 25% al 55% (Coronado y Jiménez, 2013; Pallavan y cols, 2014; Patel y cols, 2017), en individuos con VIH/SIDA de 58% a 75% (Sánchez y cols, 2005; Patton y cols, 2013, Mushi y cols, 2016), en pacientes que reciben radioterapia de 5% a 71.4% (Bulacio y cols, 2012; Jain y cols, 2016), con enfermedad renal crónica en diálisis de 53% a 75% (Godoy y cols, 2013; de la Rosa y cols, 2013, de la Rosa y cols 2013; Pieralisi y cols, 2015). En pacientes con diabetes mellitus tipo 2, varía de 18% a 87% (Suárez y cols, 2013; de la Rosa y cols, 2013; Premkumar y cols, 2014; Zomorodian y cols, 2016).

1.1.2 Factores de virulencia de especies de *Candida*

Las especies de *Candida* se reproducen asexualmente a través de un proceso de gemación en la que salientes protoplásmicas o brotes (blastoconidios) emergen de la célula madre y crecen hasta que finalmente se separan para formar una nueva célula. Las células nuevas en ocasiones no se separan y forman cadenas de células hijas llamadas pseudohifas, que pueden confundirse con las hifas. Estas últimas tienen un aspecto alargado con una pared

celular gruesa, que globalmente conforman el micelio (hifas septadas y ramificadas) (Silva y cols, 2014; Naglik y cols, 2014; Tang y cols, 2016).

El balance entre colonización y candidosis depende de la capacidad del hongo para modular los factores de virulencia en respuesta a los cambios ambientales, al igual que la competencia del sistema inmunológico del hospedero y a las terapias antifúngicas administradas (Mayer y cols 2013; Naglik y cols, 2014; Silva y cols, 2014). Las especies de *Candida* presentan diversos factores de virulencia, como la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, el dimorfismo, la formación de biopelículas, cambio fenotípico, la producción de enzimas hidrolíticas y la transición de levadura a hifa (Jacobsen y cols, 2012; Mayer y cols, 2013; Naglik y cols, 2014, Wilson y cols, 2014; Wilson y cols, 2016). *Candida albicans* posee la capacidad para adaptarse a las variaciones del pH, flexibilidad metabólica y una respuesta apropiada al estrés (McCullough y cols, 2011; Jacobsen y cols, 2012; Mayer y cols, 2013; Silva y cols, 2014).

Cuando *C. albicans* se encuentra en forma de levadura, es más tolerada y su crecimiento se encuentra controlado por diversos factores de la inmunidad innata y adaptativa; en contraste, cuando se encuentran en forma de hifas, presenta una mayor virulencia y mayor capacidad de adhesión a las células epiteliales a través de proteínas de adhesión (Naglick y cols, 2014). Estas estructuras filamentosas son más resistentes a la fagocitosis y tienen la capacidad de penetrar el epitelio a través de poros o soluciones de continuidad utilizando un mecanismo denominado tigmotropismo, el cual guía a través desde el contacto con el epitelio hasta encontrar un medio adecuado y penetrar el tejido (Cassone y Cauda, 2012; Tang y cols, 2016).

Uno de los principales mecanismos de virulencia de *C. albicans* es su capacidad de formar biopelículas a través de secreción de diversas adhesinas y la formación de filamentos, que le confieren mayor capacidad de adhesión a los tejidos, facilitando su colonización e infección (Hasan y cols, 2009; Naglik y cols, 2014: Wilson y cols, 2014).

C. albicans puede cambiar las características fenotípicas de sus colonias, fenómeno conocido como *switching* fenotípico, que consiste en modificar su color de brillante a opaco, su superficie de lisa a rugosa o cambiar de contornos precisos a irregulares. Esta modificación puede ser reversible, de acuerdo a las alteraciones del ambiente, permitiéndole su supervivencia a este microorganismo (Hasan y cols, 2009; Gow y cols 2011; Naglik y cols, 2014; Wilson y cols, 2014).

1.2 Candidosis bucal

La candidosis es la infección oportunista bucal más frecuente, se presenta en individuos que se encuentran colonizados por *Candida* spp. y que sufren una disfunción o reducción de su sistema inmunitario local (Aguirre y cols 2002; Farah y cols 2010; Flevari y cols 2013; Neppelenbroek y cols 2014). Se requieren diferentes factores sistémicos y locales del huésped para desarrollar la infección, entre los sistémicos se encuentran enfermedades crónicas, inmunosupresión, deficiencias nutricionales, neoplasias malignas y tratamiento antineoplásico; entre los locales, la disminución del flujo salival con la subsecuente disminución de los niveles de IgA, una dieta alta en azúcar o el uso de esteroides tópicos (Coronado y Jiménez, 2013; De la Rosa y cols, 2013; Hammad y cols, 2013; Mayer y cols, 2013; García y cols, 2014; Da Silva y cols, 2014; Pallavan y cols, 2014; Shenoy y cols, 2014; Zomorodian y cols, 2016; Patel y cols. 2017).

Los individuos con DM2 tienen riesgo de desarrollar candidosis, con una prevalencia que varía de 13.7% a 77 %. La presentación clínica predominante es la forma eritematosa y la especie más frcuente es *C. albicans* (Martínez y cols, 2013; De la Rosa y cols, 2013; Zomorodian y cols, 2016).

1.2.1 Respuesta inmune en candidosis bucal

En la respuesta inmune contra *Candida* spp. actúan elementos de la inmunidad innata y adquirida, como el epitelio bucal, algunas proteínas presentes en saliva, los neutrófilos y células presentadoras de antígeno que fagocitan al hongo. En la respuesta adquirida actúan células T, principalmente Th17 y citocinas (Williams y Lewis, 2011; Albuquerque y Casadevall, 2012; Mayer y cols, 2013). La respuesta inicia con la identificación del hongo

por parte de los neutrófilos, monocitos y células epiteliales a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's, por sus siglas en inglés), expresados por *Candida* spp. en diferentes estadios de su crecimiento. Estos son reconocidos por las células del sistema inmunológico mediante receptores tipo toll (TLR2 y TLR4) y de lectina tipo-C (Dectina 1 y 2, receptor de manosa, etc.) (Netea y cols, 2008; Gow y cols, 2011). Los queratinocitos participan en la producción de numerosos factores solubles que regulan la respuesta inmune (TNF-α, INF-ɣ, IL-1, IL-3, IL-6-8, IL-10, IL-12, IL15, IL-18 e IL-20) (Netea y cols, 2004; Lewis y cols, 2012). Adicionalmente, los queratinocitos expresan moléculas de adhesión como CD54, CD58 y el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de clase I y II, produciendo infiltración de linfocitos T, que actúan como células presentadoras de antígenos (CPA). El papel de la inmunidad adaptativa está relacionado con células de la inmunidad innata, principalmente células de Langerhans que participan como CPA de *Candida* a células CD4+ mediante el CPH clase II. Cuando estos linfocitos entran en contacto con el antígeno se activan y contribuyen en la producción de interleucinas (IL-12 e IFN-ɣ) por las CPA que inducen respuesta de células Th1 con la posterior diferenciación de CD8+ a linfocitos citotóxicos los cuales contienen enzimas citolíticas que actúan contra células de *Candida* controlando la infección (McCullough y cols, 2011). Se ha observado que hay un mayor reconocimiento por los receptores TLR4 cuando se encuentra en forma de levadura induciendo la producción de interleucinas tipo Th1 como IFN-ɣ (Lewis y cols, 2012). En contraste, cuando *Candida* se encuentra en forma de hifa activa receptores TLR2 e induce una respuesta débil de Th1 que promueve la expansión de células Th2 y células T reguladoras debido al incremento de IL-10 suprimiendo la respuesta contra *Candida* (Netea y cols, 2004; Lewis y cols, 2012).

Los mecanismos de discriminación entre levaduras colonizantes e hifas por parte de macrófagos y células dendríticas epiteliales no son del todo claros; sin embargo, se ha descrito la participación de células Th17 e inflamasomas (Albuquerque y Casadevall, 2012; Mayer y cols, 2013). Cuando los receptores de patógenos de estas células son activados por PAMP's de la pared celular de *Candida*, se induce la transcripción de pro-IL-1β que bajo condiciones colonizantes no es transformada a su forma activa por la limitada disponibilidad de caspasa-1. Cuando existe daño epitelial se activa el inflamasoma NLRP3,

permitiendo la activación de caspasa-1 y la transformación de pro-IL-1β a IL-1β activada, induciendo la respuesta de Th17 que incluye la producción de IL-17, IL-22 y el reclutamiento de neutrófilos asesinos de hifas, así como la optimización de la respuesta epitelial a través de la producción de defensinas (Cheng y cols, 2011; Lewis y cols, 2012).

1.2.2 Características clínicas de candidosis bucal

La candidosis bucal se presenta clínicamente como candidosis pseudomembranosa, candidosis eritematosa, candidosis hiperplásica crónica, estomatitis subprotésica y queilitis angular. La presentación eritematosa es la más frecuente en diversas series (Farah y cols, 2010; William and Lewis, 2011; Coronado y Jiménez, 2013; Tooyama y cols, 2015). La candidosis pseudomembranosa generalmente se observa en individuos inmunocomprometidos en forma severa, personas de edad avanzada, lactantes y pacientes con hiposalivación como diabéticos (Farah C y cols 2013). Se manifiesta en forma de placas blanquecinas-amarillentas de una consistencia blanda, que al raspado se desprenden dejando una zona eritematosa. Las lesiones aparecen generalmente mucosa yugal, dorso de lengua y bordes laterales de lengua (Coronado L y cols, 2013; Fara C y cols 2013). La candidosis eritematosa es la forma más común, se caracteriza por regiones eritematosas y atróficas ubicadas en cualquier zona dentro de la cavidad bucal, pero particularmente en lengua y paladar. Las papilas filiformes desaparecen, y la superficie dorsal de la lengua aparece lisa. La condición suele ser asintomática o estar acompañada de un leve ardor y sensación de picor (Coronado Ly cols, 2013; Farah C y cols 2013). La candidosis hiperplásica crónica puede presentarse en forma nodular o placas blanquecinas que no pueden ser atribuidas a cualquier otro trastorno, no se desprenden al raspado, y por lo general se encuentran en lengua, mucosa yugal y zonas retrocomisurales (Coronado L y cols, 2013). La candidosis asociada a prótesis se observa como una zona eritematosa relacionada con la base de prótesis dentales. La queilitis angular suele aparecer en pacientes con pérdida de la dimensión vertical, la consecuencia es la formación de fisuras o grietas en las comisuras de los labios, con la acumulación de saliva que favorece un ambiente húmedo y la colonización por especies de *Candida.* Con el tiempo, las fisuras y erosiones pueden producir costras y dolor. Estos pacientes típicamente presentan infecciones mixtas, con la presencia de bacterias como Staphylococcus aureus (Coronado L y cols, 2013)

1.2.3 Diagnóstico de candidosis bucal

El diagnóstico es esencialmente clínico, se basa en el reconocimiento de las características clínicas y se debe confirmar a través del análisis microscópico o mediante cultivos (Byadarahally y Rajappa, 2011; Williams y Lewis, 2011; Singh y cols, 2014). Cabe mencionar que si un cultivo resulta positivo para *Candida*, significa que se encuentra colonizado, es decir, no significa que el paciente tenga candidosis ya que este microorganismo es un comensal común de la microbiota bucal, es por ello que se tiene que realizar la correlación con las características clínicas y la confirmación microscópica de invasión tisular (Farah y cols, 2010; Coronado y Jiménez, 2013).

La confirmación del diagnóstico de candidosis bucal también puede ser a través de la observación microscópica de levaduras o hifas de *Candida* en frotis citológicos (criterios microscópicos morfológicos) y el aislamiento en cultivo (criterios macroscópicos morfológicos). La observación microscópica puede ser hecha con muestras frescas usando hidróxido de potasio al 10% (KOH) o hidróxido de Sodio al 15-30% (NAOH) los cuales disuelven las células epiteliales y dejan a las células de *Candida* intactas. También se pueden preparar frotis o improntas seguidas por tinción de Giemsa, ácido peryódico de Schiff (PAS) o tinción de Gram. El estudio microbiológico se requiere cuando existen dudas diagnósticas, cuando no hay respuesta al tratamiento y para la identificación de la especie de *Candida* con el fin de establecer un tratamiento más eficaz. (Byadarahally y Rajappa, 2011; Coronado y Jiménez, 2013; Flevari y cols, 2013). En el caso de candidosis hiperplásica crónica siempre es necesaria la toma de una biopsia para descartar displasia epitelial, se utilizará tinción PAS y se observarán en el epitelio la presencia de levaduras, micelios y pseudomicelios de *Candida* teñidas de color violeta. (Byadarahally y Rajappa, 2011; Coronado y Jiménez, 2013; Flevari y cols, 2013).

La observación macroscópica se realiza en placas de cultivo, el principal medio de cultivo utilizado es el Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), que permite el crecimiento selectivo de hongos, al contener cloranfenicol o gentamicina con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano. La identificación de especies y géneros de *Candida* se suele llevar a cabo a través de la prueba de filamentación temprana o la prueba de germinación en sueros

humano o bovino y albumina. Para la identificación de especies *Candida* no albicans se pueden utilizar técnicas enzimáticas como son los medios cromogénicos que detectan la actividad de ciertas enzimas de la levadura a través de hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador enzimático, (Coronado y Jiménez, 2013) uno de los más utilizados es CHROMagar® *Candida* (Estrada y cols, 2011; Byadarahally y Rajappa 2011; Cuenca y cols, 2012; Coronado y Jiménez, 2013).

Otras técnicas de diagnóstico son las pruebas de asimilación de nutrientes, en ellas evalúa la capacidad fúngica de utilizar diferentes azúcares como única fuente de carbono, los medios usados contienen todos los nutrientes necesarios para su crecimiento excepto una fuente de carbono. Un azúcar es agregado posteriormente al medio y la capacidad del hongo para asimilar el azúcar se evalúa por su crecimiento en el medio de cultivo; a esta técnica también se le conoce como auxonograma. Dentro de los métodos más usados se encuentran API 20 C AUX y el API ID 32 C AUX (Estrada y cols, 2011; Coronado y Jiménez, 2013). Se pueden utilizar técnicas como la reacción en cadena polimerasa (PCR), estas pruebas poseen alta especificidad y sensibilidad, sin embargo tampoco discriminan entre colonización e infección (Estrada y cols, 2011; Byadarahally y Rajappa, 2011)

1.2.4 Tratamiento de candidosis bucal

El tratamiento de la candidosis bucal se basa en cuatro fundamentos: hacer un diagnóstico precoz y preciso de la infección, la corrección de los factores que predisponen o enfermedades subyacentes, la evaluación del tipo de *Candida* que provoca la infección y el uso apropiado de medicamentos antifúngicos, evaluando la relación eficacia / toxicidad en cada caso (Farah y cols, 2010; García y cols, 2014). La higiene bucal y dental regular evitará en la mayoría de los casos el desarrollo de candidosis bucal, por lo que es necesario enfatizar sobre medidas de higiene bucal al paciente (García y cols, 2014).

En cuanto al tratamiento farmacológico para la candidosis, se recomienda el uso de medicamentos tópicos que se aplican en la zona afectada y medicamentos sistémicos que se prescriben cuando la infección es más severa y no se resolvió con la terapia tópica (Farah y cols, 2010; García y cols, 2014; Cuesta y cols, 2014; Lyu y cols, 2016). Existen diferentes

antifúngicos tópicos y sistémicos, entre los que se encuentran; los polienos como nistatina y anfotericina B; azoles como miconazol, clotrimazol, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol y posoconazol; inhibidores de la síntesis de pirimidina como la flucitosina y recientemente otros antifúngicos han surgido como las equinocandinas dentro de las cuales se encuentra el micafungín, el caspofungin y el anidulafungin (Farah y cols, 2010; Flevari y cols 2013; García y cols, 2014).

Polienos: el mecanismo de acción de estos antifúngicos se debe a la unión al ergosterol, el componente lipídico principal de la membrana celular de los hongos que resulta en la producción de poros acuosos. En consecuencia, la permeabilidad celular es alterada y conduce a la fuga de componentes citosólicos y por lo tanto, la muerte del microorganismo (Pappas y cols, 2009; Spampinato y cols, 2013).

Azoles: el mecanismo de acción de los azoles es interrumpir la membrana celular mediante la inhibición de la actividad del lanosterol 14-alfa desmetilasa, enzima implicada en la biosíntesis de ergosterol. El ergosterol, de forma análoga a la del colesterol en las células animales, es el componente esterólico más importante de la membrana celular de los hongos. La familia de los azoles incluye imidazoles (miconazol, econazol, clotrimazol y ketoconazol) y triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol) (Pappas y cols, 2009; Spampinato y cols, 2013).

Equinocandinas: Las equinocandinas caspofugina, micafungina y anidulafungina son lipopéptidos que inhiben el crecimiento del hongo al unirse a la β-(1,3) d glucano sintetasa, enzima esencial para la síntesis en la pared celular de hongos como *Candida* spp. Estos fármacos no se utilizan para infecciones bucales causadas por *Candida* spp. Solo están disponibles para su aplicación parenteral (Pappas y cols, 2009; García y cols, 2014).

El tratamiento de candidosis bucal generalmente consiste en un medicamento tópico. La solución oral de nistatina (100.000 UI/ml) ha sido el fármaco de elección tradicional, se utiliza como enjuague bucal 5 ml, cuatro veces al día durante aproximadamente 2 minutos. La duración del tratamiento varía entre 7-14 días, pero se debe continuar el tratamiento al

menos por 2-3 días después de que los últimos signos y síntomas hayan desaparecido (Gümrü, 2011; García y cols, 2014). El problema principal de la nistatina es la falta de adherencia a la mucosa bucal y por lo tanto la ingestión rápida de la suspensión, dando como resultado una menor eficacia (García y cols, 2014; Lyu y cols, 2016).
Otro antifúngico tópico utilizado es el miconazol, que se encuentra en forma de gel al 2%, aplicándolo directamente sobre la zona afectada, a dosis de 200-500 mg por día, divididos en 4 veces durante 14 a 21 días. El gel debe ser aplicado en la zona de interés y se puede aplicar a la superficie de la prótesis antes del uso de la misma en candidosis asociadas a prótesis (Farah y cols, 2010). A pesar de sus buenas propiedades tiene el inconveniente de la posible interacción con otros medicamentos, como la warfarina, ya que puede potenciar sus efectos (Farah y cols, 2010; García y cols, 2014).

La falta de respuesta clínica a la terapia tópica puede ser el primer signo de inmunosupresión subyacente derivada de enfermedades sistémicas no diagnosticadas como la DM-2, infección por VIH/SIDA, en este caso, el uso de antifúngicos sistémicos está justificado (Gümrü, 2011). El fluconazol puede ser una excelente opción terapéutica con pocos efectos secundarios e interacciones con otras drogas. Los efectos del fluconazol en la cavidad bucal son los deseados, ya que se secreta en saliva en niveles equivalentes alcanzados en plasma. En el curso del tratamiento sistémico, el tratamiento antifúngico tópico se puede continuar, ya que reduce la dosis y la duración del tratamiento sistémico (Goins y cols, 2002; Pappas y cols; 2009; Gümrü, 2011). Las dosis de fluconazol oral son de 100-200 mg (3 mg/Kg) al día durante 7-14 días (Pappas y cols; 2009). Suspensión oral de fluconazol se administra en una dosis de suspensión acuosa 10 mg/ml mediante la administración de 5 ml al día durante 7 o 14 días (García y cols, 2014). Sin embargo, la cura de la infección ha sido más difícil de alcanzar debido a la resistencia innata o adquirida de las especies de *Candida* que colonizan al hospedero; el uso de este fármaco se ha limitado gracias al aumento en la prevalencia de infecciones resistentes por *Candida* spp (Pappas y cols 2009; Niimi y cols, 2010; Bulacio y cols; 2012; Flevari y cols, 2013).

1.3 Susceptibilidad antifúngica

Se entiende por susceptibilidad antifúngica a la inhibición del crecimiento del hongo por una mínima concentración del agente antifúngico (Rodero y cols, 2006). La frecuencia de candidosis bucal y sistémica en pacientes diabéticos ha aumentado significativamente (Sánchez y cols 2005; Torres y cols, 2009; Benito y cols 2016), quizás por el uso indiscriminado de antibacterianos de amplio espectro, el uso de catéteres vasculares y nutrición parenteral. De esta situación surgió la necesidad de utilizar antifúngicos como nistatina y azoles como miconazol y fluconazol, para terapia antifúngica o como terapia empírica. Sin embargo, estas prácticas terapéuticas han generado cambios epidemiológicos entre los que destacan la aparición de cepas que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies susceptibles por otras con resistencia intrínseca (Rodero y cols, 2006; de Resende y cols 2006; Torres y cols, 2009; Benito y cols, 2016).

La resistencia se define como el fracaso para erradicar una infección fúngica a pesar de la administración de un antifúngico con actividad *in vitro* en contra de ese organismo (Kanafani y Perfect, 2008) o como un cambio de sensibilidad o susceptibilidad al antimicótico que puede medirse in vitro por métodos de laboratorio apropiados (Gutiérrez y cols, 2012). La resistencia puede ser primaria (intrínseca) o secundaria (adquirida). La resistencia primaria se encuentra naturalmente entre ciertos hongos sin exposición previa a la droga y hace hincapié en la importancia de la identificación de especies de hogos a partir de muestras clínicas. La resistencia secundaria se desarrolla entre las cepas previamente susceptibles después de la exposición al agente antifúngico y por lo general depende de la expresión de genes alterados (Kanafani y Perfect, 2008; Gutiérrez y cols, 2012; Spampinato y cols, 2013; Rodrigues y cols, 2014).

La resistencia puede ser estable si la cepa mantiene un fenotipo resistente cuando crece sin antimicótico y es genéticamente estable. También puede ser reversible o transitoria cuando la cepa pierde su fenotipo al crecer sin el antimicótico; es decir, es una cepa fenotípicamente resistente pero genotípicamente susceptible (Gutiérrez y cols, 2012). A nivel de cultivo se ha descrito también la resistencia heterogénea y la homogénea. La

heterogénea es aquella en la que en una misma cepa puede haber colonias resistentes y sensibles a un mismo antifúngico, y la homogénea es aquella cuando todas las colonias de una cepa son por completo sensibles o resistentes a un mismo antimicótico (Mondon y cols, 1999). Otra causa de resistencia es la exposición continua de especies de *Candida* a antifúngicos, así como su uso indiscriminado, que altera la susceptibilidad de las cepas, lo que ha llevado al aumento de su resistencia al tratamiento (Kuriyama y cols, 2005; Manfredi y cols, 2006; Lyon y cols, 2008). La proporción de las especies no *albicans* entre las especies de *Candida* ha aumentado y su susceptibilidad a los antifúngicos varía significativamente en contraste con *C. albicans* (Torres y cols, 2009; Zapata y Cardona, 2012). Algunas especies no *albicans* como *C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei, C. dubliniensis* son inherentemente menos sensibles al tratamiento y pueden influir en el desarrollo de la resistencia. Estas últimas especies tienden a ser menos susceptibles a los antifúngicos comúnmente usados (Kuriyama y cols, 2005; Gallè y cols, 2011; Zapata y Cardona, 2012; Premkumar y cols, 2014).

En las especies de *Candida* resistentes a polienos se han encontrado defectos en el gen ERG3, que es un gen implicado en la biosíntesis del ergosterol, lo que lleva a la acumulación de otros esteroles en la membrana del hongo, en consecuencia las cepas resistentes a los polienos tienen un contenido relativamente bajo de ergosterol, evitando la formación de poros en su membrana e impidiendo su permeabilidad.

Mecanismo de resistencia a azoles. Existen cuatro principales mecanismos descritos en especies de *Candida*, más de un mecanismo puede funcionar en cualquier cepa (Kanafani y Perfect, 2008; Sanguinetti y cols, 2015). La disminución de la concentración del fármaco con el desarrollo de bombas de eflujo: las bombas de salida están codificada por 2 familias de genes transportadoras, los genes *CDR* (resistencia de *Candida* a fármacos por sus siglas en inglés) de la familia de unión a ATP, y los genes *MDR*. Los principales son CDR1, CDR2 y MDR1, reducen la acumulación intracelular del fármaco (Premkumar y cols, 2014; Xu y cols, 2015; Golabek y cols, 2015; Kolaczkowska y cols, 2016). Otro mecanismo es la alteración del sitio diana, se ha demostrado que las mutaciones en ERG11, previene la

unión de los azoles en su sitio de acción (Kanafani y Perfect, 2008; Spampinato y cols, 2013; Xu y cols, 2015; Sanguinetti y cols, 2015; Kolaczkowska y cols, 2016).

Sobre la regulación de enzima diana, en algunas cepas de *Candida* con susceptibilidad reducida a los azoles tienen mayores concentraciones intracelulares de Erg11p que lo hacen susceptible a los azoles cepas. El agente antifúngico es, por lo tanto, efectivo, y las concentraciones terapéuticas de rutina puede inhibir efectivamente la síntesis de ergosterol (Kanafani y Perfect, 2008; Xu y cols, 2015).

Desarrollo de las vías de derivación: la exposición a compuestos azólicos da como resultado el agotamiento de ergosterol de la membrana fúngica y la acumulación del producto tóxico 14α-metil-3,6-diol. La mutación del gen *ERG3* previene la formación de 14α-metil-3,6-diol de 14α-metilfecosterol. La sustitución de ergosterol con el último producto conduce a membranas funcionales y previene la acción de los azoles en la vía de biosíntesis de ergosterol. Las cepas de *Candida* spp. con mutación *ERG3* también son resistentes a polienos, porque sus membranas celulares están desprovistos de ergosterol (Kanafani y Perfect, 2008; Rodrigues y cols, 2014; Sanguinetti y cols, 2015).

1.3.1 Susceptibilidad antifúngica en diversas poblaciones de riesgo

Existe una variabilidad de la susceptibilidad y resistencia a los antifúngicos dependiendo del grupo estudiado. Un estudio realizado por Sánchez y cols en 2005 encontró que el 10.8% de las cepas de *Candida* aisladas de pacientes con infección por VIH fueron resistentes al menos a uno o más antifúngicos azólicos. En pacientes con DM la prevalencia de resistencia de especies de *Candida* aisladas de la mucosa bucal a antifúngicoses es del 7 al 23% (Manfredi y cols, 2006; Bremenkamp y cols, 2011; Premkumar y cols, 2015). El Anexo 5. Muestra la prevalencia de resistencia de especies de *Candida* a fluconazol y miconazol en diferentes grupos de estudio.

Se ha observado que las especies de *Candida* aisladas de la mucosa bucal de pacientes con DM-2 son menos susceptibles a los antifúngicos debido a un tratamiento previo que las permitió mutar (Rex y cols, 1995; Spampinato y cols, 2013; Patel y cols, 2017); de igual

manera los pacientes con DM-2 se encuentran colonizados por una mayor diversidad de especies de *Candida* que son menos susceptibles al tratamiento, como por ejemplo: *C. krusei* (Al-Attas y cols, 2010; Premkumar y cols 2014) El problema se ha visto agravado por la aparición de especies de *Candida* distintas de *C. albicans* como *C. glabrata y C. krusei* que tienen resistencia inherente a los azoles tales como fluconazol y otros agentes antifúngicos, lo que hace persistente a la infección y difícil de tratar (Williams y cols, 2011; De la Rosa y cols, 2013; Premkumar y cols, 2014; Benito y cols, 2016; Patel y cols, 2017)

1.4 Diabetes

La diabetes se define como una enfermedad sistémica, crónica degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, que se caracteriza por hiperglucemia crónica, debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas (Nolan y cols, 2011; American Diabetes Association, 2016; Atlas de Diabetes de la FID, 2015; Organización Mundial de la Salud, 2016).

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, para la Prevención y Control de la Diabetes, establece la siguiente clasificación:

I- Diabetes Mellitus Tipo 1 (A: diabetes inmunomediada y B: diabetes idiopática)

II- Diabetes Mellitus Tipo 2

III- Otros tipos

IV- Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)

1.4.1 Epidemiología mundial y nacional de DM-2

La Organización Mundial de la Salud y la Federación Internacional de Diabetes estimaron que entre 2014 y 2015 existían de 415 a 422 millones de adultos con diabetes en el mundo, de los cuales 193 millones no conocían su estado. A nivel mundial, en 2015 cinco millones de muertes fueron atribuidas a la diabetes, y se calcula que para 2040 existirán 642 millones de personas con diabetes. Asimismo, cerca de tres cuartas partes de las personas con

diabetes son de países de bajo a mediano ingreso (Nolan y cols, 2011; Smith-Spangler y cols 2012; Seuring y cols 2015; Atlas de Diabetes de la FID, 2015; OMS, 2016). Existen otros 318 millones de habitantes en el mundo con tolerancia a la glucosa alterada, lo que les coloca en alto riesgo de desarrollar la enfermedad (Ramachandran y cols 2010; Atlas de Diabetes de la FID, 2015).

Se ha documentado ampliamente que la DM-2 es una de las principales causas de enfermedad, de discapacidad y muerte en México y en el mundo (Aguilar y cols, 2003; Nolan y cols, 2011). En México, la DM-2 tiene un crecimiento acelerado, en los últimos años ha mostrado el incremento más significativo entre las enfermedades crónico degenerativas (Arredondo y De Icaza, 2011; Moreno y cols, 2014; Arredondo, 2014; Seuring y cols 2015). A partir del 2003, se han registrado alrededor de 400 mil nuevos casos de diabetes anualmente. Se ha reportado una prevalencia de 14.4% de casos en la población mexicana (Villalpando y cols, 2010; Arredondo y De Icaza, 2011). De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, existían 8.7 millones de casos de diabetes en 2013 en México, y la prevalencia en personas de 20-79 años era del 11.77 %. La enfermedad se presenta en todos los grupos de edad pero ha sido más frecuente entre los individuos de 25-59 años y cada vez se observa en individuos más jóvenes (Arredondo y Barcelo, 2007; Arredondo y de Icaza, 2011). Es importante subrayar que frecuentemente el diagnóstico de la enfermedad se realiza cuando esta lleva entre 7-10 años de evolución (Moreno y cols, 2014).

1.4.2 Fisiopatología de la DM-2

Se ha demostrado que en la presentación de la DM-2 existen dos factores involucrados:
1) disfunción de las células beta con falta de respuesta secretoria al estímulo de la glucosa sanguínea y 2) una resistencia periférica a los efectos biológicos de la insulina, tanto por disminución del número de los receptores insulínicos de la membrana celular, como de los receptores postmembrana, todo lo cual conduce a una excesiva producción de glucosa por el hígado y dificultades en la captación de ésta por el músculo y por los adipocitos. En otras palabras la resistencia insulínica puede ocurrir a cualquier nivel de la acción biológica de la insulina, desde su unión inicial a los receptores de la superficie celular, hasta su

participación en la cascada de fosforilación de la glucosa. Se ha constatado también el aumento en la secreción de glucagón y un defecto primario que radica en la célula beta del páncreas, con deterioro en la secreción de insulina (Ramachandran y cols 2010; Nolan y cols, 2011; American Diabetes Association, 2016).

1.4.3 Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo son edad mayor o igual a los 45 años, sobrepeso, historia familiar de diabetes, inactividad física o sedentarismo, raza, intolerancia a la glucosa, historia de diabetes mellitus gestacional o peso del producto mayor a 4 kilogramos, hipertensión, colesterol HDL menor o igual a los 35 mg/dl y/o niveles de triglicéridos mayor o igual a 250 mg/dl, síndrome de ovario poliquístico, historia de enfermedad vascular (Aguilar y cols, 2003; Vazquez y cols, 2007; Whincup y cols, 2008; Bellamy y cols, 2009; Ramachandran y cols, 2010; Malik y cols, 2010; Ezzati y Riboli, 2013; Ley y cols, 2014; Johnsson y cols, 2015; Atlas de Diabetes de la FID, 2015; American Diabetes Association, 2016; Organización Mundial de la Salud, 2016).

1.4.4 Criterios diagnósticos de DM-2

De acuerdo a los actuales criterios, se diagnostica como DM los casos que presenten:

1. Síntomas de diabetes como poliuria, polidipsia, pérdida de peso sin causa aparente, más glucemia plasmática casual mayor o igual a 200 mg/dl.
2. Glucemia plasmática en ayuno mayor o igual a 126 mg/dl.
3. Glucemia plasmática a las 2 horas del test de tolerancia oral a la glucosa mayor o igual a 200 mg/dl.

Se considera como glucemias normales en ayunas a las menores de 110 mg/dl, los valores intermedios, entre 110 y 125 mg/dl, constituyen el estado de intolerancia a la glucosa de ayuno (American Diabetes Association, 2018).

1.4.5 Signos y síntomas de DM-2

Los pacientes pueden experimentar diferentes signos y síntomas, y en ocasiones puede no haber signos. Algunos de los síntomas experimentados comúnmente son: micción frecuente, sed excesiva, aumento de apetito, pérdida de peso, cansancio, falta de

concentración, sensación de hormigueo o entumecimiento de manos o pies, visión borrosa, cicatrización lenta de heridas, vómitos y dolor de estómago (Aguilar y cols, 2003; Bellamy y cols, 2009).

1.4.6 Tratamiento

La Asociación Americana de Diabetes recomienda dieta y ejercicio como primera línea en pacientes con DM-2, si en un lapso de tres meses no se logra un control glicémico, se recomienda el uso de fármacos para el control de la misma. El tratamiento de la DM comprende estrategias nutricionales como la pérdida de peso, adecuación de hábitos dietéticos y ejercicio físico; medicamentos orales como sulfonilureas que su principal mecanismo de acción es reforzar la secreción de insulina y pueden reducir la resistencia periférica de la misma, biguanidas que incrementan la sensibilidad a la insulina, inhibidores de la α-glucosidasa que reducen la hiperglucemia postprandial y tiazolindindionas que mejoran el síndrome de resistencia a la insulina y diferentes preparados de insulina humana, así como el análogo lispro (Nolan y cols, 2011; Ley y cols 2014; American Diabetes Association, 2016).

1.4.7 Complicaciones generales de la Diabetes Mellitus

La DM-2 tiene una amplia gama de signos y síntomas y se manifiesta de manera diferente en diferentes órganos (Al-Maskari y cols, 2011; Bajaj y cols, 2012). Las personas que padecen DM-2 tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades graves, los niveles altos de glucosa en sangre pueden conducir a enfermedades que afectan al corazón y vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios, así como un mayor riesgo de desarrollar infecciones (Aguilar y cols, 2003; Bellamy y cols, 2009; Nolan y cols, 2011; Moreno y cols, 2014). En la mayoría de los países, la DM es la principal causa de enfermedades cardiovasculares, ceguera, insuficiencia renal y amputación de mienbros inferiores (Moreno y cols, 2014; Atlas de Diabetes de la FID, 2015). Las enfermedades cardiovasculares afectan al corazón y vasos sanguíneos, lo que puede conducir a un ataque cardíaco y accidente cerebrovascular (Moreno y cols, 2014; Fox y cols, 2015; Chen y cols, 2015). La enfermedad cardiovascular es la causa más común de muerte en personas con diabetes (Atlas de Diabetes de la FID, 2015; Fox y cols, 2015). Enfermedad renal o nefropatía diabética es causada por el daño a

los pequeños vasos sanguíneos de los riñones, lo que lleva a los riñones a ser cada vez menos eficientes o fallar por completo. La enfermedad renal es mucho más común en las personas con diabetes que en aquellos sin diabetes (Atlas de Diabetes de la FID, 2015; Haneda y cols, 2015; Al-Rubeaan y cols, 2014). La neuropatía diabética causa daño a los nervios de todo el cuerpo cuando la glucosa en sangre y la presión arterial son demasiado altas. Las zonas más comúnmente afectadas son las extremidades, en particular, los pies. El daño a los nervios puede dar lugar a dolor, hormigueo y pérdida de sensibilidad. La pérdida de sensibilidad es particularmente importante porque puede permitir que las lesiones pasen desapercibidos, lo que conduce a infecciones graves y posibles amputaciones (Atlas de Diabetes de la FID, 2015). La mayoría de las personas con diabetes desarrollarán algún tipo de enfermedad en los ojos que causa visión reducida o ceguera, debido a alteraciones microvasculares, que a su vez producen isquemia (Atlas de Diabetes de la FID, 2015; Al-Rubeaan y cols, 2015; Frank, 2015).

1.4.8 Complicaciones y manifestaciones bucales de DM-2

Las lesiones bucales en los pacientes diabéticos son de gran importancia ya que en muchas ocasiones pueden ser el primer indicio de algún desorden sistémico y también revelan las condiciones generales en las que se encuentran los pacientes (de la Rosa y cols 2006; González y cols, 2008; Bajaj y cols, 2012). Entre las manifestaciones bucales de DM-2 incluyen hiposalivación con sensación de boca seca, ardor en la lengua, enfermedad periodontal, mayor susceptibilidad a caries, pérdida ósea, abscesos dentales, infecciones fúngicas y bacterianas, retraso en la cicatrización de las heridas y cambios en las concentraciones de IgA en la saliva (González, 2004; de la Rosa y Cols 2006; Lotfi-Kamran y cols, 2009; Khosravi y cols, 2008; Silva y cols, 2015; Al-Maskari y cols, 2011; Bajaj y cols, 2012; Kakoei y cols, 2015).

1.4.9 Factores de riesgo locales y sistémicos para candidosis en pacientes con DM-2.

Los principales factores locales y sistémicos son los extremos en la edad, inmunosupresión, deficiencias de hierro y vitaminas, uso de prótesis dentales removibles, el uso constante de antibióticos, medicamentos que causan hiposalivación como captopril, enalapril, diazepam,

etc. (Belazi y cols, 2005; Al Attas y Amro, 2010; Bremenkamp y cols, 2011; Williams y cols, 2011; Shenoy y cols, 2014; Cruz y cols, 2016).

Los pacientes con DM-2, tienen un marcado riesgo de presentar una mayor densidad de crecimiento por especies de *Candida* en la cavidad bucal que con frecuencia se asocian con niveles altos de glucosa en la saliva, larga duración de la enfermedad y el uso de prótesis bucales removibles que promueven la formación de biofilm resultando en candidosis bucal y tiempo de duración de la DM (Lotfi-Kamran y cols, 2009; Volpato y cols, 2011; De la Rosa y cols, 2013; Shenoy y cols, 2014; Premkumar y cols, 2014). La disminución del flujo salival, la reducción de pH salival y las altas concentraciones de glucosa en saliva de estos pacientes, pueden proporcionar un sustrato potencial al hongo para su crecimiento y adherencia a las células epiteliales de la mucosa bucal (Belazi y cols, 2005; Sashikumar y Kannan, 2010; Bremenkamp y cols, 2011; Premkumar y cols, 2014; Balan y cols 2015; Cruz y cols, 2016). Asimismo es un hecho que la DM-2 afecta la secreción de las glándulas salivales tanto cuantitativa como cualitativamente, la saliva posee inmunoglobulina A, que inhibe la adhesión a las celulas epiteliales, por lo tanto, es probable que la disminución en el flujo salival favorezca la colonización por *Candida* spp (Shenoy y cols, 2014).

Debido a los factores antes mencionados, frecuentemente se aíslan diferentes especies de *Candida* en la mucosa de la cavidad bucal de los pacientes con DM, las más fecuentes son: *C albicans*, *C glabrata*, *C tropicalis*, *C dubliniensis*, *C krusei*, *C colliculosa*, *C fomata*, *C parapsilosis*, *C guillermondii* y *C rugosa* (de la Rosa y cols 2008; Al Attas y Amro, 2010; Al Mubarak y cols, 2013; Premkumar y cols, 2014). Aunque *Candida albicans* es la especie más frecuente que causa candidosis bucal, la incidencia de candidosis causada por otras especies también ha aumentado (Premkumar y cols, 2014; de la Rosa y cols, 2013).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La candidosis bucal es una infección oportunista que se presenta con mayor frecuencia en en pacientes inmunocomprometidos, como los que padecen DM-2, infección por VIH, los tratados con agentes inmunosupresores o los que padecen insuficiencia renal crónica. Los pacientes con DM-2 poseen características bucales y sistémicas que lo predisponen a la colonización por especies de *Candida* y por tanto a padecer candidosis bucal; por ello se incrementa el riesgo de desarrollar infecciones persistentes y ocasionalmente diseminadas. Adicionalmente el uso prolongado o inadecuado de antifúngicos y la exposición frecuente de *Candida* spp., ha elevado la resistencia de las diversas especies de *Candida*. En los últimos años se ha observado un marcado aumento de especies resistentes a los fármacos comúnmente usados en el tratamiento de candidosis bucal.

La susceptibilidad a los antifúngicos varía significativamente entre las especies de *Candida*, algunas son más resistentes y pueden conducir a la aparición de infecciones recurrentes o pueden causar infecciones diseminadas en pacientes susceptibles. Por lo tanto, la resistencia emergente a los fármacos es un reto importante para el manejo terapéutico de candidosis.

Por lo cual en el presente estudio se propuso identificar la susceptibilidad de las especies de *Candida* a los antifúngicos poliénicos y azólicos más usados en la práctica clínica en aislamientos de la mucosa bucal de pacientes con y sin diabetes mellitus tipo 2 que asisten a consulta a las clínicas Estomatológicas de la UAM-Xochimilco.

3. JUSTIFICACIÓN

La información sobre este aspecto en el paciente diabético en grupos de la ciudad de México es limitada, por lo que es importante evaluar la susceptibilidad a los antifúngicos de las especies de *Candida* aisladas de la mucosa bucal de estos pacientes.

Los resultados de esta investigación proporcionarán información sobre la frecuencia de especies de *Candida* resistentes a los antifúngicos de uso más frecuente en esta población. Esta información puede ser útil en el manejo de infecciones fúngicas, reduciendo complicaciones como la aparición de formas diseminadas y el posible deterioro en el estado de salud general del paciente.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia de susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* de aislamientos obtenidos de la mucosa bucal, y su posible asociación con la DM-2.

4.2 Objetivos específicos

Identificar la frecuencia de colonización e infección de *Candida* spp. aisladas de la mucosa bucal de pacientes con y sin diabetes mellitus tipo 2.

Identificar las especies de *Candida* que colonizan la mucosa bucal de pacientes con y sin diabetes mellitus tipo 2.

Evaluar la posible asociación entre la diabetes mellitus tipo 2 y la colonización o infección por especies de *Candida* en la mucosa bucal.

Identificar *in vitro* la frecuencia de susceptibilidad antifúngica a nistatina, miconazol y fluconazol de las especies de *Candida* aisladas.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Diseño del estudio

Estudio transversal y analítico que se llevó a cabo en el periodo comprendido de marzo de 2016 a julio de 2016 en individuos que asistieron a los Laboratorios de Diseño y Comprobación "Dr. Rafael Lozano Orozco", "San Lorenzo" y "Tláhuac" de la licenciatura en Estomatología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X).

Criterios de inclusión

Individuos adultos (≥ 18 años) diagnosticados con DM-2 y no DM-2 que aceptaron participar en el estudio y que firmaron el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Individuos que recibieron tratamiento antimicótico en el último mes.
Individuos que hubieran recibido profilaxis dental.

Criterios de eliminación

Muestras inespecíficas y dudosas

Consideraciones éticas

A los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión se les invitó a participar en el estudio. Se les proporcionó información clara y comprensible sobre los objetivos del estudio, los procesos que se llevaron a cabo, así como las metas del estudio. Se elaboró una carta de consentimiento informado de acuerdo a la Ley General de Salud, en su título quinto, capítulo único: investigación para la salud (Artículos 100 y 103). Y a la norma oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.

A cada individuo se le solicitó leer y en su caso firmar la carta de consentimiento de participación en el estudio, que contiene también las firmas del responsable encargado del estudio y de un testigo. En los casos de pacientes que no sabían leer y escribir o se encontraban físicamente incapacitados para escribir, los puntos del consentimiento

informado fueron explicados de manera verbal y se colocó una rúbrica en el lugar de la firma (Anexo 1).

5.2 Procedimientos clínicos

A través de interrogatorio directo se llenó la ficha de recolección de datos (Anexo 2) que contenía: datos demográficos (edad, sexo, estado civil, fecha de nacimiento, escolaridad, lugar de residencia y ocupación), consumo de tabaco y alcohol (Los criterios de medición para el consumo de tabaco y alcohol se describen en el Anexo 3), uso de prótesis bucal removible. En los individuos con DM-2 se recolectaron datos relacionados con su enfermedad (tiempo de evolución, tratamiento, niveles de glucosa capilar). Se obtuvo el índice de higiene oral simplificado (IHOS, óptimo, regular y malo), y los resultados de las pruebas microbiológicas de colonización, identificación de especies y susceptibilidad antifúngica. Los criterios para el IHOS se describen en el Anexo 4.

El examen bucal se realizó empleando barreras de protección universal (bata, cubrebocas, guantes), bajo adecuada iluminación y utilizando un abatelenguas como auxiliar para desplazar y extender los tejidos siguiendo un orden sistemático (Road-Petersen 1969). Al reconocer clínicamente una lesión sugestiva de candidosis, se tomó citología exfoliativa realizando un raspado de la zona afectada con un abatelenguas de madera, el cual se extendió en un portaobjetos previamente rotulado con los datos del paciente y que fue fijada con spray citológico, posteriormente se llevó al laboratorio de Histopatología de la UAM-Xochimilco para su análisis microscópico. La confirmación de candidosis bucal se realizó en un frotis mediante la búsqueda de hifas y pseudohifas de *Candida* spp. en proliferación sobre las células epiteliales teñidas con ácido peryódico de Schiff (PAS) (Figura 1). En los casos que fueron positivos se prescribió tratamiento antimicótico. De igual manera se registró el IHOS de acuerdo a Greene y Vermillion en 1960 .

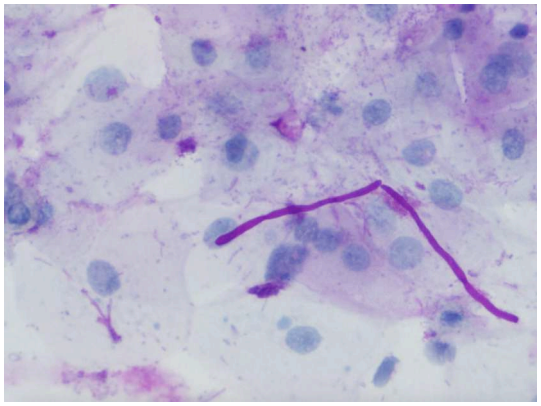

Figura 1. Imagen citológica que muestra la presencia de hifas de *Candida* spp. sobre células epiteliales (40x). Frotis realizado a un paciente con signos clínicos de candidosis bucal, tinción de PAS.

En todos los participantes se tomó una muestra de glucosa capilar casual con glucómetro (ACCU-CHEK Performa), se seleccionó el dedo de punción, se frotó la zona para facilitar el aporte de sangre, se desinfectó la zona a puncionar con alcohol al 70º y se dejó secar para realizar la punción en un ángulo de 45º con la lanceta. Una vez que estuvo expuesta la gota de sangre, se acercó la tira de glucemia para observar el valor de glucosa en sangre, la cual se registró en la ficha de recolección de datos.

La toma de la muestra de la mucosa bucal para cultivo se realizó mediante hisopado de la mucosa bucal, el cual consistió en girar un hisopo estéril 10 veces en sentido contrario de las manecillas del reloj sobre dorso de lengua, mucosa yugal y paladar duro. El hisopo se sumergió en un medio de transporte (medio de Stuart) para mantener la viabilidad de *Candida* spp., se identificó con el folio correspondiente y fecha, para posteriormente trasladarlo al laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la UAM-Xochimilco..

5.3 Procedimientos de laboratorio

Para la siembra de la muestra se rotularon los medios de cultivo con un código progresivo para cada uno. El código contiene el número asignado a las fichas de recolección de datos y a los tubos que contienen la muestra correspondiente a cada paciente.

Cultivo de la muestra: Previo a la siembra se encendió un mechero y se tomó como campo estéril de trabajo un diámetro de 15 a 20 cm alrededor de él. A continuación las muestras recolectadas con el hisopo se agitaron utilizando un agitador tipo vórtex durante 10 segundos, posteriormente se retiraron del medio de Stuart y se sembraron con técnica de estría cruzada en medio de cultivo de agar dextrosa Sabouraud (ADS) con cloranfenicol, Los medios se incubaron de 24-48 horas a 36 ± 1.5 °C y se registraron los cultivos positivos, así como las características macroscópicas (color, tamaño, consistencia, bordes, superficie) de las colonias.

Para descartar los cultivos como negativos, las colonias fueron incubadas por un periodo adicional de siete días a una temperatura de 30 ± 1ºC. Se consideró colonización cuando hubo crecimiento de colonias características de *Candida* en el medio de cultivo de ADS y su confirmación por crecimiento de colonias de cualquier color en el cultivo de CHROMagar® *Candida*, acorde a la definición de "*adquisición y mantenimiento de una población estable de levaduras de especies de Candida que no desarrolla enfermedad clínica"* (Cannon y Chaffin, 1999; Soll, 2002).

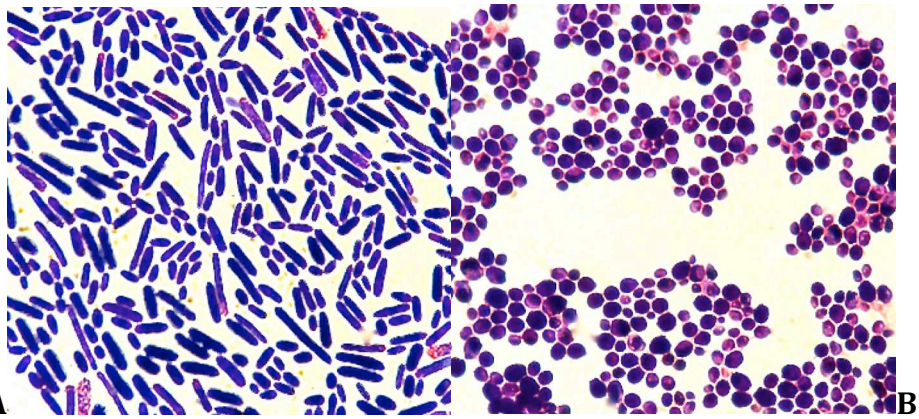

Figura 2. Morfología de las levaduras en tinción de Gram. A levaduras alargadas, ovoides color azul *Candida krusei*. B, levaduras redondas, pequeñas, color violeta *Candida glabrata*.

Se realizó tinción de Gram en todas las colonias que presentaron características de *Candida* spp., evaluando la morfología de la levadura en el microscopio óptico (figura 2). Para la

tinción de Gram se colocó una gota pequeña de agua destilada con una pipeta sobre un portaobjetos, posteriormente la gota se mezcló con una colonia de *Candida* spp. y se llevó al mechero para secar la muestra. El primer reactivo que se empleó para llevar a cabo la tinción fue cristal violeta (1 minuto) seguido de lugol (1 minuto), alcohol cetona (30 segundos) y finalmente safranina (1 minuto). Antes de colocar el siguiente reactivo la muestra se enjuagó con agua destilada y al finalizar todo el procedimiento se dejó secar para su observación.

Aislamiento y tipificación: para la identificación de la especie, las colonias obtenidas se resembraron en placas de CHROMagar® *Candida* (CHROMagar®, Paris, France); que es selectivo para diferenciar especies de *Candida*. De aquellos cultivos positivos en ADS, con un asa estéril se tomó una porción de cada colonia en diferentes puntos en una misma intención; el inoculo anterior se sembró con el mechero encendido y dentro del área de trabajo en placas de CHROMagar® *Candida* por la técnica de cultivo en estriado y fueron incubados a 36 °C ± 1.5 durante 36-48 horas. De acuerdo a las características cromógenas que indica el fabricante para cada especie: verde claro, *C albicans*; verde intenso u oscuro, *C dubliniensis*; azul, *C tropicalis*; blanca, rosa lisa brillante, *C. glabrata*; rosa rugosa opaca, *C krusei*. Se realizó la identificación presuntiva de la especie, además, el uso de este medio, permitió separar dos o más cepas juntas de diferente especie en una misma muestra clínica. Cuando existieron dudas para la identificación de las especies de *Candida no albicans* se corroboró mediante el sistema de asimilación de carbohidratos API 20C Aux. Para conservar las cepas los cultivos positivos a una o más especies se resembraron y purificaron en placas de CHROMagar®, hasta separar las colonias diferentes y purificarlas. Las colonias aisladas se resembraron en ADS adicionado con cloranfenicol, incubándolas a 36 °C ± 1 por dos días. Posteriormente, se realizó una resiembra adicional en tubos de caldo glucosado de Sabouraud adicionado con glicerol y se congeló a -20 ºC.

Susceptibilidad antifúngica: se utilizó el método M44-A3 descrito por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI [antes NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory standards] por sus siglas en inglés) para la evaluación de la sensibilidad al fluconazol (FCZ), miconazol (MCZ) y nistatina (NIS). Se realizó la prueba de difusión en

disco sobre placas con 25 ml de Agar Mueller-Hinton suplementado con 2% de glucosa y azul de metileno (0.5 µg/ml); la adición de la glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición. La superficie del agar fue inoculada en tres direcciones usando un hisopo estéril embebido en una suspensión de levaduras ajustada visualmente a una turbidez estandarizada de 0.5 McFarland; esta solución tiene una concentración aproximada de $1x10^6$ - $5x10^6$ UFC/ml. Se dejó secar la solución y se colocaron los discos de difusión de FCZ (25 µg), MCZ (50 µg) y NIS (100 UI) (BIO-RAD ®, France) dispuestos en tres cuadrantes (Figura 3).

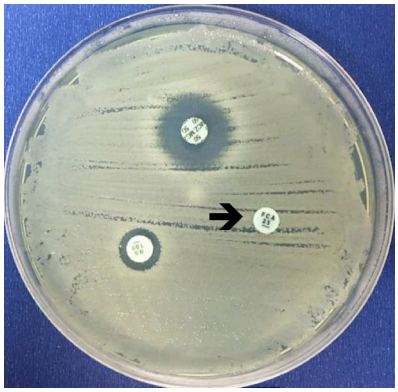

Figura 3. Prueba de susceptibilidad en medio Agar Mueller-Hinton. Halos de inhibición de los diferentes antifúngicos empleados. La flecha indica una colonia resistente a fluconazol en la que no se aprecia halo de inhibición.

Las levaduras fueron incubadas a 37 ºC y las lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas midiendo el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de colonias, de acuerdo a los criterios M44-A3 establecidos de acuerdo al CLSI, (Anexo 6).

Los ensayos se validaron probando la cepa de control de calidad *C. albicans* ATCC 90028, recomendada por el CLSI. La zona de inhibición en milímetros para fluconazol es de 28 a 39, para miconazol de 22 a 29 y de 20 a 26 para nistatina.

5.4 Variables

Dependientes: Susceptibilidad de especies de *Candida* a antifúngicos, colonización y candidosis bucal.

Independientes: Especie de *Candida*, DM-2, glucosa capilar casual, edad, consumo de tabaco y alcohol, sexo, uso de prótesis removible, IHOS.

5.5 Análisis estadístico

Para las variables cuantitativas se presentaron los resultados a través de medias, medianas y desviación estándar. Para variables cualitativas se utilizaron distribuciones de frecuencia y porcentajes. Se utilizaron pruebas de χ^2 para la comparación de variables nominales o pruebas exactas de Fisher en los casos necesarios, considerando el tamaño y la distribución de la muestra. Se calcularon medidas de asociación (razones de momios) para estudiar el comportamiento de la susceptibilidad antifúngica y la presencia de DM-2. Se generaron modelos de regresión logística mutinomial (3 categorías) múltiple para estudiar la asociación entre la susceptibilidad antifúngica y la presencia de DM, controlando por edad, sexo y el uso de prótesis. Los coeficientes de regresión logística fueron exponenciados para estimar la razón de momios (RM) de cada variable independiente del modelo; por lo tanto, éste puede ser definido como el cociente entre la probabilidad de que ocurra el evento (infección) y la probabilidad de que no ocurra (colonización) teniendo en cuenta otros eventos (Berea y cols., 2014). Los resultados de las pruebas de hipótesis se consideraron significativos para $p \leq 0.05$. El análisis se efectuó con el paquete JMP V9

6. RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron 134 individuos, 38 (28.4%) hombres y 96 (71.6%) mujeres, con un promedio de edad de 55.7 (±13.7) años. Cincuenta (37.3%) presentaban DM-2. Veinte (14.9%) fumaban y 23 (17.2%) bebían alcohol regularmente. El Cuadro 1 muestra las características socio-demográficas y uso de prótesis e higiene bucal de los individuos con y sin DM-2. La media de glucosa capilar casual fue significativamente mayor en los individuos con DM-2 que en no DM (184.8 *vs.* 101.8 mg/dl, p=0.001). No se identificaron diferencias en la edad (p=0.060), el sexo (p=0.263), o el consumo de tabaco (p=0.815) o alcohol (p=0.110) y la presencia de DM-2.

Características bucales

Treinta y cinco individuos (26.1%) usaban prótesis dental removible, sin diferencias entre individuos con y sin DM-2 (p=0.432). De acuerdo al IHOS, un poco más de la mitad de los individuos examinados (54.5%) presentaron un índice adecuado de higiene bucal, sin diferencias significativas entre los diabéticos y no diabéticos (p=0.191) (Cuadro 1).

Colonización fúngica y candidosis bucal

El Cuadro 1 muestra que un poco más de la mitad de los individuos (53.7%) estaban colonizados por *Candida* spp., sin diferencias significativas entre el grupo de diabéticos y los no diabéticos (58 *vs*. 51.2%, p=0.443). Una mayor proporción de mujeres estaban colonizadas (58, 60.4%) en comparación al 36.8% encontrado en los hombres (p=0.013). De acuerdo a las características clínicas y a los frotis teñidos con PAS se detectó candidosis en 10 individuos (7.5%). La proporción de candidosis fue significativamente más alta en los individuos diabéticos 7/50 (14%) vs. no diabéticos 3/84 (3.6%) (p=0.029), en todos los casos el tipo de candidosis identificada fue eritematosa.

Identificación y distribución de especies de Candida

Se identificaron un total de 7 especies diferentes en 72 individuos colonizados. En ambos grupos (DM-2 y no DM-2) la frecuencia de *Candida albicans* fue mayor al 60%. Sesenta y cinco individuos (90.3%) estuvieron colonizados por una sola especie, 6/72 (8.3%) por dos especies y uno (1.4%) por tres especies. La combinación más frecuente en el grupo de

especies múltiples fue de *C. albicans* con *C. tropicalis* en 3/72 (4.2%) individuos (Cuadro 2).

De los 72 individuos colonizados se obtuvieron un total de 80 aislamientos bucales de especies de *Candida albicans* y no *albicans*. La especie más aislada fue *C. albicans* en en el 75% de aislamientos, seguida por *C. tropicalis* (8.7%), *C. krusei* (6.2%), *C. glabrata* (3.7%), *C. parapsilosis* (3.7%), *C. lusitaniae* (1.2%) y un caso de *C. guilliermondii* (1.2%), sin diferencia entre los dos grupos (Cuadro 2).

Susceptibilidad antifúngica

Se identificó que el 25% de los ailamientos fueron resistentes al fluconazol, 13.7% fueron resistentes a nistatina y únicamente el 6.2% fue resistente al miconazol. Se observó que en la categoría Sensible Dosis Dependiente el miconazol y la nistatina mostraron un porcentaje importante (51.2% y 56.3%) respectivamente (Cuadro3).

El análisis entre la freccuencia de la susceptibilidad, sensibilidad dosis dependientes o resistencia a fluconazol y miconazol no mostró diferencia entre individuos DM-2 y no DM-2 (p=0.552, p=0.801, respectivamente). Asimismo, la proporción de resistencia a nistatina en el grupo de DM-2 fue ligeramente mayor, sin diferencia estadística (p=0.214) (Cuadro 4).

El Cuadro 5, muestra la susceptibilidad de las especies *C. albicans* y no *albicans* a los diferentes antifúngicos. Se observó una mayor resistencia en las especies *no albicans* tanto al fluconazol (p=0.007) como al miconazol (p=0.018).

Análisis de los factores predisponentes a la colonización y a la presencia de candidosis bucal

El Cuadro 6, muestra los resultados del modelo de regresión logística múltiple construido para analizar la asociación entre colonización por *Candida* spp, con posibles factores de riesgo, el modelo mostró que el uso de prótesis removible (RM=4.42; p=0.006) y la mala higiene bucal (RM= 2.51; p=0.006) fueron significativos, pero no así la presencia de DM-2

(RM=1.37, *p*=0.501) ni el hábito tabáquico (RM=0.81, *p*=0.728). Al analizar la variable dependiente candidosis, con los mismos factores de riesgo, se observó una mayor probabilidad de presentar la infección en los individuos con DM-2 (RM=4.39; p<050) comparados con aquellos sin esta enfermedad sistémica. Asimismo, la mala higiene bucal se asoció a la presencia de esta infección fúngica (RM=11.10, *p*=0.015) (Cuadro 6).

Cuadro 1. Características socio-demográficas y clínicas, colonización e infección por *Candida* spp. en 134 individuos de los LDC de la UAM-X

Características	Diabéticos (n = 50)		No Diabéticos (n = 84)		*p*
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Hombres	17	(34.0)	21	(25.0)	0.263[a]
Mujeres	33	(66.0)	63	(75.0)	
Media de edad (±DE)	60.1	(±12.3)	53.1	(±13.8)	0.060[b]
Media de glucosa capilar (±DE)	184.8	(±86.1)	101.8	(±12.3)	0.001[b]
Características bucales					
Portador de prótesis removible	15	(30.0)	20	(23.8)	0.432[a]
No portador de prótesis removible	35	(70.0)	64	(76.2)	
IHOS					
Óptimo	23	(46.0)	50	(59.5)	0.191[a]
Regular, Malo y muy malo	9	(18.0)	16	(19.1)	
Colonización					
No	21	(42.0)	41	(48.8)	0.443[a]
Si	29	(58.0)	43	(51.2)	
Candidosis					
No	43	(86.0)	81	(96.4)	0.029[a]
Si*	7	(14.0)	3	(3.6)	

[a] X^2; [b] t de Student. * En individuos con DM-2 la infección por *Candida* spp. fue eritematosa en seis y asociada a prótesis en uno. En individuos sin DM-2 se presentó como candidosis eritematosa en todos ellos.

Cuadro 2. Distribución de especies de *Candida* en aislamientos de individuos colonizados con DM-2 y sin DM-2 de los LDC de la UAM-X.

	Diabéticos (n=29)		No Diabéticos (n=43)		Total (n=72)		p*
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
C. albicans	24	(82.8)	30	(69.8)	54	(75.0)	
C. tropicalis	1	(3.4)	2	(4.6)	3	(4.2)	
C. parapsilosis	---	---	3	(7.0)	3	(4.2)	
C. glabrata	1	(3.4)	1	(2.3)	2	(2.8)	
C. krusei	---	---	2	(4.6)	2	(2.8)	
C. lusitaniae	1	(3.4)	---	---	1	(1.4)	0.194
C. albicans y tropicalis	1	(3.4)	2	(4.6)	3	(4.2)	
C. albicans y krusei	---	---	2	(4.6)	2	(2.8)	
C. krusei y glabrata	---	---	1	(2.3)	1	(1.4)	
C. albicans, tropicalis y guilliermondii	1	(3.4)	---	---	1	(1.4)	

*X^2

Cuadro 3. Resultados de la susceptibilidad por antifúngico en 80 aislamientos de los 72 individuos colonizados.

	Sensible		SDD*		Resistente	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Fluconazol	56	(70.0)	4	(5.0)	20	(25.0)
Miconazol	34	(42.5)	41	(51.2)	5	(6.2)
Nistatina	24	(30.0)	45	(56.3)	11	(13.7)

*SDD: Sensible Dosis Dependiente

Cuadro 4. Susceptibilidad antifúngica en 80 aislamientos de individuos de los LDC de la UAM-X por presencia o ausencia de DM-2

	Sensible		SDD*		Resistente		*p*
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Diabéticos **(n = 32)**							
Fluconazol	24	(75.0)	2	(6.3)	6	(18.8)	0.552[a]
Miconazol	15	(46.9)	15	(46.9)	2	(6.2)	0.801[a]
Nistatina	8	(25.0)	17	(53.1)	7	(21.9)	0.214[a]
No diabéticos **(n = 48)**							
Fluconazol	32	(66.7)	2	(4.2)	14	(29.2)	0.552[a]
Miconazol	19	(39.6)	26	(54.2)	3	(6.2)	0.801[a]
Nistatina	16	(33.3)	28	(58.3)	4	(8.3)	0.214[a]

*SDD: Sensible Dosis Dependiente, [a] X^2

Cuadro 5. Susceptibilidad antifúngica a fluconazol, miconazol y nistatina en especies *C. albicans y no albicans.*

	Susceptible (%)		Resistente (%)		*p*
	n	(%)	n	(%)	
Fluconazol					
C. albicans	48	(80.0)	12	(20.0)	0.007[a]
No *albicans*	8	(40.0)	12	(60.0)	
Miconazol					
C. albicans	30	(50.0)	30	(50.0)	0.018[a]
No *albicans*	4	(20.0)	16	(80.0)	
Nistatina					
C. albicans	19	(31.7)	41	(68.3)	0.573[a]
No *albicans*	5	(25.0)	15	(75.0)	

*X^2

Cuadro 6. Resultado del modelo de regresión logística múltiple para colonización e infección bucal por *Candida* spp.

	RM	(IC 95%)	*p*
Colonización			
DM-2	1.37	(0.54 - 3.53)	0.501
Uso de prótesis	4.42	(1.49 - 15.38)	0.006
IHOS	2.51	(1.27 - 5.47)	0.006
Tabaquismo	0.81	(0.25- 2.57)	0.728
Candidosis			
DM-2	4.39	(1.08 - 17.86)	0.050
Uso de prótesis	0.52	(0.07 - 4.37)	0.518
IHOS	11.10	(1.45 - 181.26)	0.015
Tabaquismo	0.81	(0.07 - 8.92)	0.865

RM: Razón de momios, IC: intervalos de confianza, DM-2: Diabetes Mellitus tipo 2, IHOS: Índice de higiene oral simplificado

7. Discusión

En el presente estudio se observó una baja prevalencia de candidosis bucal (7.5%), sin embargo se obtuvo una alta frecuencia de cultivos positivos a *Candida* spp. (53.7%), siendo ligeramente mayor en los pacientes con DM-2 (58% *vs*. 51.2%). Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en la susceptibilidad a los antifúngicos estudiados entre los pacientes DM-2 y no diabéticos. Por otra parte, entre las especies *albicans* y *no albicans* hubo una diferencia significativa en la susceptibilidad a los fármacos azólicos (fluconazol p=0.007 y miconazol p= 0.018).

En México y otros países del mundo, se ha observado una mayor incidencia de DM-2 en personas entre 40-60 años de edad (Barquera y cols, 2013; Hernández y cols, 2013; Meza y cols, 2015; Juárez y cols, 2015), lo cual es consistente con lo observado en este estudio en el que se obtuvo una media de edad de 60 años. Los resultados del estudio mostraron que aproximadamente una tercera parte de los pacientes con DM-2 (38%) no tenía un adecuado control glucémico, lo cual es frecuente hasta en 50% de los pacientes (Acosta, 2007), esto posiblemente se debe a la educación deficiente de los pacientes y a los determinantes sociales propios de la urbanización y globalización que han propiciado cambios en la forma de vida, en particular en la alimentación y en la actividad física, lo que lleva a sedentarismo y sobreingestion de alimentos y bebidas industrializadas de alta densidad energética (Montonen y cols, 2005; Moreno y cols, 2014). Se ha descrito que un inadecuado control de la DM, dietético y nutricional, así como el abandono de tratamiento y algunos desórdenes endocrinológicos son causa de la alteración en la glucemia de estos pacientes. (Acosta, 2007; International Diabetes Federation, 2015).

Los individuos con DM-2 tiene mayor riesgo de ser colonizado por *Candida* spp. que los pacientes sin esta enfermedad (Kumar B y cols, 2005; Mishra y cols 2008; Premkumar y cols, 2015). Algunos autores han encontrado una mayor proporción de colonización y diversidad de especies de *Candida* en la mucosa bucal de pacientes con DM-2, comparados con individuos sanos (Yarahmadi y cols, 2002; Belazi y cols, 2005; Kumar y cols, 2005; Khosravi y cols, 2008; Shenoy y cols, 2014). Lo anterior puede atribuirse a la mayor adherencia de las levaduras a las células epiteliales, facilitada por el aumento de glucosa en

saliva (Darwazeh y cols, 1991; Sashikumar y Kannan, 2010), Sin embargo en este trabajo esta diferencia no fue estadísticamente significativa, lo que podría demostrar que no es la DM-2 la principal causa de colonización por especies de *Candida* en la boca, sino que también intervienen otros factores como disminución de flujo y pH salival, el uso de prótesis removibles, así como higiene bucal deficiente (Belazi y cols, 2005).

Candida albicans es la especie identificada con mayor frecuencia tanto en pacientes con DM-2 o sin esta enfermedad, en porcentajes que van desde 68.7% (Zomorodian y cols, 2016) a un 82.7% (Martínez y cols, 2013). Lo que es similar a lo observado en este estudio, en el que se obtuvo 75% de aislamientos de *C. albicans*. La alta frecuencia de *C. albicans* se puede deber a que este microorganismo posee características propias que facilitan una mayor capacidad de formación de biopelícula, una mayor adherencia y penetración del hongo a las células epiteliales y adquiriendo características para que pueda eludir la respuesta inmune del huésped, protegiéndolo ante la fagocitosis de macrófagos y neutrófilos (Blankenship y Mitchel, 2006; Herwald y Kumamoto, 2014; Johnson y cols, 2016).

En el presente estudio, *C. tropicalis* fue la segunda especie más aislada (8.7%) con mayor frecuencia después de *C. albicans*; lo que coincide con diferentes estudios en los que se ha encontrado *C. tropicalis* como la segunda especie más identificada (Manfredi y cols, 2006; Lotfi y cols, 2009; Marcos y cols, 2009; y Rajakumari y Kumari en 2016). Sin embrago, otros autores han reportado que *C. glabrata* es la levadura más común después de *C. albicans* (de la Rosa y cols, 2013; Martínez y cols, 2013; Zomorodian y cols, 2016). Esta variabilidad de las especies pudiera deberse al lugar en donde se elaboró el estudio, a la presencia de enfermedades sistémicas y edad, especialmente la senectud (Benito y cols, 2016; Patel y cols, 2017).

Los pacientes colonizados por *Candida* spp. pueden desarrollar candidosis bucal, ya que cualquier alteración en el sistema inmunológico facilita la infección (Soysa y cols, 2006; Cornistein y cols, 2013; Rajakumari y cols, 2016). En el presente estudio la prevalencia de candidosis bucal fue mayor en los pacientes con DM-2 (14%) *vs*. sin DM-2 (3.6%)

(*p*=0.029), Los pacientes con DM-2 mostraron una razón de momios de 4.39 de padecer candidosis bucal comparados con los pacientes sin este problema metabólico. Resultados similares se han reportado en estudios con otros grupos de pacientes con DM (de la Rosa y cols, 2006; Martínez y cols, 2013; Pallavan y cols, 2014). Esto puede atribuirse a la supresión de la actividad quimiotáctica, fagocitaria y bactericida de polimorfonucleares asociada a concentraciones altas de glucosa en sangre (Ueta y cols, 1993; McMahon y cols, 1995), a un promedio mayor de glucosa en saliva, así como hiposalivación (Darwazeh y cols, 1991; Khosravi y cols 2008) con la disminución de la producción y la secreción de enzimas antimicrobianas (Tanida y cols, 2003) y la disminución de IgA en saliva (al-Maskari y cols 2011); lo que proporciona un medio ideal para el desarrollo de candidosis bucal. Asimismo, se ha identificado que la presencia de CB está relacionada con otros factores no asociados directamente con DM-2 como son el uso de prótesis bucal, higiene bucal deficiente y uso de corticosteroides tópicos (Sánchez y cols, 2005; Soysa y cols, 2006).

En este estudio se confirmó que la mala higiene bucal es un factor de riesgo para colonización e infección por *Candida* spp., esta asociación puede ser el resultado de la presencia de una mayor cantidad de levaduras y de otros microorganismos que forman biopelículas y su acumulación es más elevada en los pacientes con mala higiene bucal, la biopelícula confiere a este microorganismo una barrera protectora que utiliza el hongo para evadir la fagocitosis de los neutrófilos facilitando la colonización o la infección (Tournu H y Van Dijck, 2012; Johnson y cols, 2016). Asimismo, se detectó en este estudio que el uso de prótesis removible es un factor asociado a la colonización (RM=4.42). El uso de prótesis puede disminuir el pH salival e impedir la limpieza mecánica de las superficies de los tejidos blandos por la lengua. Además, la falta de cuidados higiénicos de la prótesis y la capacidad de adherencia del hongo a los polímeros que conforman las prótesis, como las resinas acrílicas, convierte a estos aditamentos en reservorios para la acumulación de biopelícula, favoreciendo la colonización (Sanitá y cols. 2011; de la Rosa y cols, 2013).

En relación con la susceptibilidad antifúngica, en el presente estudio se observaron frecuencias de 25% para fluconazol, 6.2% para miconazol y 13.7% para nistatina. La

resistencia al fluconazol es similar a lo reportado por Premkumar y cols. en pacientes diabéticos la cual fue de 23% y menor a la reportada en pacientes con cáncer por Yamashita y cols. (82%). Estas diferencias, pudieran ser explicadas por la variabilidad de los distintos métodos empleados para la evaluación de la susceptibilidad, las características bucales de los pacientes, los medicamentos empleados para tratar las diferentes enfermedades y el posible uso previo de antifúngicos que conduce a la aparición de aislamientos resistentes (Spampinato y cols, 2013; Sanguinetti y cols, 2015; Kołaczkowska y Kołaczkowski, 2016).

Entre los antifúngicos evaluados, el miconazol fue el que obtuvo menor susceptibilidad en especies no *albicans*, pues el 80% de las cepas evaluadas fueron resistentes a este fármaco, seguido por nistatina que mostró resistencia en tres cuartas partes de los aislamientos y una resistencia del 60% al fluconazol en especies no *albicans*. En contraste, *C. albicans* mostró ser altamente susceptible a fluconazol y medianamente a miconazol. Lo que coincide con estudios en donde evaluaron la resistencia en especies diferentes a *C. albicans* que reportan disminución en la susceptibilidad a los antifúngicos evaluados (Manfredi y cols 2006; da Costa y cols 2009; Mondal y cols, 2013). En este sentido las especies no *albicans* son naturalmente más resistentes a los compuestos azólicos y a otros antifúngicos, por la expresión de genes como CDR y MDR involucrados en el desarrollo de bombas de flujo y alteraciones en el sitio diana, con lo que se reduce la acumulación intracelular del fármaco (Johnson, 2008; Niimi y cols, 2010; Xu y cols, 2015).

Al comparar la frecuencia de resistencia a nistatina entre pacientes DM-2 y no DM2, se observó una mayor resistencia en los pacientes con DM-2 (21.9%) en comparación con los no diabéticos (8.3%) (p=0.214), lo cual podría deberse a que los pacientes con DM-2 han recibido atención médica constantemente y el uso de nistatina es común en los centros de atención a la salud (Hertel y cols, 2016), por lo que existe la posibilidad de que los pacientes hayan recibido previamente este antimicótico. Sin embargo la exposición a fármacos antifúngicos fue una variable que no fue posible considerar en este estudio, debido a las dificultades que tienen los pacientes en recordar los medicamentos que se les han prescrito previamente, esto es una limitación del presente estudio.

Por otro lado, un factor que puede influir en la resistencia a los antifúngicos es la colonización por multi-especies (Lyon y cols, 2008; Niimi y cols, 2010; Sharma y cols, 2013), considerando que en el 8.3% de casos de este trabajo existían múltiples especies. La transferencia de la información genética de manera horizontal ocasiona resistencia cruzada entre especies y debido a su diversidad se generan respuestas como la sobreexpresión del blanco terapéutico (ergosterol) y mutaciones en el blanco terapéutico, lo que determinan la resistencia a los fármacos (Sun y cols, 2009).

Dentro de las limitaciones de este trabajo esta su diseño de corte transversal que no permite establecer la secuencia temporal de los eventos. Otra limitación del trabajo fue la falta de información sobre los valores de hemoglobina glicosilada, que es un mejor indicador de la concentración de glucosa que la evaluación de la glucosa en sangre capilar. No obstante, la glucosa en sangre capilar es un indicador utilizado para evaluar el estado del paciente a nivel tamizaje y este valor fue obtenido en cada uno de los pacientes que participaron en el estudio lo cual permitió identificar pacientes que desconocían si tenían diabetes. Además, el tamaño de la muestra fue pequeño lo que puede limitar el identificar diferencias entre los grupos que se comparan. Asimismo, la selección de pacientes de los LDC limita la validez externa de los resultados. No obstante, fue posible identificar una asociación entre la presencia de DM-2 y candidiasis y las asociación con una mala higiene bucal.

Conclusiones:

La DM-2 no parece influir en la frecuencia de la resistencia antifúngica de especies de *Candida* aisladas en cavidad bucal. Es posible que la resistencia esté más influenciada por las prácticas en la prescripción de los antifúngicos.

La baja resistencia a miconazol y nistatina los hace una adecuada opción terapéutica en los casos de candidosis bucal, sin embargo, los altos porcentajes de levaduras SDD hace hincapié en el correcto empleo de los antifúngicos.

Es importante identificar las especie que esté produciendo la infección, ya que las especies de *Candida* difieren en su susceptibilidad a los agentes antifúngicos

Perspectivas:

Incluir mejoras en la metodología respecto a la obtención de los datos como la hemoglobina glicosilada, tiempo de evolución de la DM-2 y un análisis detallado del uso de tratamientos previos.

Obtener una muestra más representativa

Evaluar la susceptibilidad de *Candida* spp. a otros antifúngicos que pudieran ser una alternativa confiable en el tratamiento de Candidosis.

8. Referencias

1. Acosta D. Dificultades en el control glucémico del paciente diabético. Endocrinol Nutr. 2007; 54: 8-16.

2. Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi-a review. Med Mycol. 2012; 50: 337-345.

3. Aguilar CA, Velázquez O, Gómez FJ, González A, Esqueda AL, Molina V, Rull R, Tapia R. Characteristics of patients with type 2 diabetes in México: Results from a large population-based nationwide survey. Diabetes Care. 2003; 26: 2021-2026

4. Aguirre Urizar JM. Candidiasis orales. Rev iberoam Micol. 2002; 19: 17-21.

5. Al-Attas SA, Amro SO. Candidal colonization, strain diversity, and antifungal susceptibility among adult diabetic patients. Ann Saudi Med. 2010; 30: 101-108.

6. Al-Maskari AY, Al-Maskari MY, Al-Sudairy S. Oral manifestations and complications of Diabetes Mellitus: A review. Sultan Qaboos Univ Med J. 2011; 11: 179-186.

7. Al Mubarak S, Robert AA, Baskaradoss JK, Al-Zoman K, Al Sohail A, Alsuwyed A, Ciancio S. The prevalence of oral *Candida* infections in periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus. J Infect Public Health. 2013; 6: 296-301.

8. Al-Rubeaan K, Abu El-Asrar AM, Youssef AM, Subhani SN, Ahmad NA, Al-Sharqawi AH, Alguwaihes A, Alotaibi MS, Al-Ghamdi A, Ibrahim HM. Diabetic retinopathy and its risk factors in a society with a type 2 diabetes epidemic: a Saudi National Diabetes Registry-based study. Acta Ophthalmol. 2015; 93: 140-147.

9. Al-Rubeaan K, Youssef AM, Subhani SN. Diabetic Nephropathy and its risk factors in a society with a type 2 diabetes epidemic: A Saudi National Diabetes Registry-Based Study. PLoS ONE. 2014; 9: e88956.

10. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. Diabetes Care. 2016; 39: 13-22.

11. Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. Dan Med J. 2013; 60: 1-32

12. Arredondo A. Type 2 diabetes and health care costs in Latin America: exploring the need for greater preventive medicine. BMC Medicine. 2014; 12: 136-141.

13. Arredondo A, Barcelo A. The economic burden of out-of-pocket medical expenditures for patients seeking diabetes care in Mexico. Diabetologia. 2007; 50: 2408-2409.

14. Arredondo A, De Icaza E. Costs of diabetes in Latin America: evidences from the Mexican case. Value Health. 2011; 14: 85-88.

15. Atlas de Diabetes de la FID. International Diabetes Federation. Séptima edición.2015

16. Bajaj S, Prasad S, Gupta A, Singh VB. Oral manifestations in type-2 diabetes and related complications. Indian J Endocrinol Metab. 2012; 16: 777-779.

17. Balan P, B Gogineni S, Kumari N S. *Candida* carriage rate and growth characteristics of saliva in diabetes mellitus patients: a case-control Study. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2015; 9: 274-279.

18. Barquera S, Campos I, Aguilar C, Lopez R, Arredondo A, Rivera J. Diabetes in Mexico: cost and management of diabetes and its complications and challenges for health policy. Global Health. 2013; 9: 3.

19. Belazi M, Velegraki A. Fleva A, Gidarakou I, Papanaum L, Baka D, Daniilidou N, Karamitsos D. *Candida* overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. Mycoses. 2005; 48: 192-196.

20. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. Lancet. 2009; 373: 1773-1779.

21. Benito B, Aranda S, Lópes FJ, De la Rosa E, Rosas R, Sánchez LO. Oral *Candida* isolates and fluconazole susceptibility patterns in older mexican women. Arch Gerontol Geriatr. 2016; 65: 204-210.

22. Berea R, Rivas R, Pérez M, Palacios L, Moreno J, Talavera J. Del juicio clínico a la regresión logística múltiple. Rev Med Inst Mex Seg Soc. 2014; 52: 192-197.

23. Blankenship JR, Mitchell A. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opinion Microbiol. 2006; 9: 588-594.

24. Bulacio L, Paz M, Ramadán S, Ramos L, Pairoba C, Sortino M, Escovich L, López C. Oral infections caused by yeasts in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. Identification of the yeasts and evaluation of their antifungal susceptibility. J Mycol Med. 2012; 22: 348-353.

25. Bremenkamp RM, Caris AR, Back GN. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. Arch Oral Biol. 2011; 6: 549-555.

26. Byadarahally R, Rajappa S. Isolation and identification of *Candida* from the Oral Cavity. ISRN Dent. 2011; 2011: 487921.

27. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. Crit Rev Oral Biol Med. 1999; 10: 359-383.

28. Carvalhinho S, Costa AM, Coelho AC, Martins E, Sampaio A. Susceptibilities of *Candida albicans* mouth isolates to antifungal agents, essentials oils and mouth rinses. Mycopathol. 2012; 174: 69-79.

29. Cassone A, Cauda R. Candida and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. AIDS 2012; 26: 1457-1472.

30. Cerqueira DF, Portela MB, Pomarico L, de Araújo Soares RM, de Souza IP, Castro GF. Oral *Candida* colonization and its relation with predisposing factors in HIV-infected children and their uninfected siblings in Brazil: the era of highly active antiretroviral therapy. J Oral Pathol Med. 2010; 39: 188-194.

31. Chen Y-Y, Lin Y-J, Chong E. The impact of Diabetes Mellitus and corresponding HbA1c levels on the future risks of cardiovascular disease and mortality: A Representative Cohort Study in Taiwan. PLoS One. 2015; 10: e0123116.

32. Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003; 22: 470-474.

33. Coronado L, Jiménez Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. J Clin Exp Dent. 2013; 5: 279-286.

34. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Caparelli F, Castillo M. Candida: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31: 380-384.

35. Cuenca EM, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, Jensen HE, Lass-Flörl C, Richardson MD, Akova M, Bassetti M, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Garbino J, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Petrikkos G, Roilides E, Viscoli C, Ullmann AJ. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. Clin Microbiol Infect. 2012; 18: 9-18.

36. Cuesta C, Sarrion MG, Bagán JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. J Clin Exp Dent. 2014; 6: 576-582.

37. Da Costa KR, Ferreira JC, Komesu MC, Candido RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. Mycopathol. 2009; 167: 73-79.

38. Darwazeh A, MacFarlane T, McCuish A, Lamey P. Mixed salivary glucose levels and candidal carriage in patients with diabetes mellitus. J Oral Pathol Med. 1991; 20: 280-283.

39. De Azevedo AC, Semprebom AM, Baboni FB, Rosa RT, Machado MA, Samaranayake LP, Rosa EA. Low virulent oral *Candida albicans* strains isolated from smokers. Arch Oral Biol. 2012; 57: 148-513.

40. De la Rosa E, Miramontes M, Bustos J, Mondragón A. Especies de *Candida* en candidosis bucal en pacientes diabéticos con y sin insuficiencia renal crónica. Revista ADM. 2013; 70: 302-308

41. De la Rosa E, Miramontes M, Sánchez LO, Mondragón A. Colonización e infección bucal por *Candida sp.* en pacientes diabéticos y no diabéticos con enfermedad renal crónica en diálisis. Nefrología. 2013; 33: 764-770

42. De la Rosa E, Mondragón A, Irigoyen M, Bustamante A. Oral lesions in a group of kidney transplant patients. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005; 10: 196-204.

43. Demitto F, Ribeiro A, Perugini B, Guilhermetti E, Estivalet S, Baeza L. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. in vitro among patients from Regional University Hospital of Maringá-PR. J Bras Patol Med Lab. 2012; 48: 315-322.

44. De Resende M, de Sousa L, de Oliveira R, Koga-Ito C, Lyon J. Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals. Mycopathol. 2006; 162: 39-44.

45. Estrada D, Dávalos A, Padilla L, Mendoza R, Sánchez L. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. Rev Iberoam Micol. 2011; 28: 36-42

46. Ezzati M, Riboli E. Behavioral and dietary risk factors for noncommunicable diseases. N Engl J Med. 2013; 369: 954-964

47. Farah C, Lynch N, McCullough M. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. Aust Dent J. 2010; 55: 48-54.

48. Ferreira A, Prado C, Carvalho R, Dias K, Dias A. *Candida albicans* and non- *C. albicans Candida* Species: comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections. Mycopathol. 2013; 175: 265-272.

49. Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A, Dimopoulos, G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. Clin Interv Aging. 2013; 8: 1199-1208.

50. Fox CS, Golden SH, Anderson C, Bray GA, Burke LE, de Boer IH. Update on Prevention of Cardiovascular Disease in Adults With Type 2 Diabetes Mellitus in light of recent evidence: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. Circulation. 2015; 132: 691-718.

51. Frank RN. Diabetic retinopathy and systemic factors. Middle East Afr J Ophthalmol. 2015; 22: 151-156.

52. Gaitán-Cepeda LA, Sánchez-Vargas O, Castillo N. Prevalence of oral candidiasis in HIV/AIDS children in highly active antiretroviral therapy-era. A literature analysis. AIDS 2014; 26: 625-632.

53. Garcia C, Sarrion MG, Bagán JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. J Clin Exp Dent: 2014; 6: 576-582.

54. Godoy JS, de Souza Bonfim-Mendonça P, Nakamura SS, Yamada SS, Shinobu-Mesquita C, Pieralisi N y cols. Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. J Oral Pathol Med. 2013; 42: 229-234.

55. Goldani Lz, Mário PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. J Infect. 2003; 46: 155-160.

56. Goins RA, Ascher D, Waecker N, Arnold J, Moorefield E. Comparison of fluconazole and nystatin oral suspensions for treatment of oral candidiasis in infants. Pediatr Infect Dis J. 2002; 21: 1165-1167.

57. González MB, Linarea C, Rodríguez LE. Prevalencia de trastornos bucales en población con diabetes mellitus tipo 2. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2008; 46: 237-145.

58. Gow Na, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nat Rev Microbiol. 2011; 10: 112-122.

59. Gutiérrez MJ, Araiza J, Hernández MA, Chávez J, Rodríguez OM, Bonifaz A. Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del hospital general de México OD. Dermatol Rev Mex. 2012; 56: 93-101

60. Gümrü B. Oral candidosis: aetiology, clinical manifestations, diagnosis and management. MÜSBED. 2011; 1: 140-148.

61. Hammad MM, Darwazeh Am, Idrees MM. The effect of glycemic control on candida colonization of the tongue and the subgingival plaque in patients with type II diabetes and periodontitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013; 116 :321-326.

62. Haneda M, Utsunomiya K, Koya D. A new classification of diabetic nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. J Diabetes Investig. 2015; 6: 242-246.

63. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. Microbes & Infect 2009; 11: 753-761.

64. Hernández M, Gutiérrez J, Reynoso N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. Salud Pública Mex. 2013; 55: 129-136.

65. Hertel M, Schmidt-Westhausen AM, Strietzel FP. Local, systemic, demographic, and health-related factors influencing pathogenic yeast spectrum and antifungal drug administration frequency in oral candidiasis: a retrospective study. Clin Oral Investig. 2016; 20: 1477-1486.

66. Herwald SE, Kumamoto CA. *Candida albicans* niche specialization: features that distinguish biofilm cells from comensal cells. Curr Fungal Infect Rep. 2014; 8: 179-184.

67. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Exp Rev Anti Infect Ther. 2012; 10: 85-93.

68. Jeddy N, Ranganathan K, Devi U, Joshua E. A study of antifungal drug sensitivity of *Candida* isolated from human immunodeficiency virus infected patients in Chennai, South India. J Oral Maxillofac Pathol. 2011; 15: 182-186.

69. Johnson CJ, Cabezas J, Kernien JF, Wang SX, Beebe DJ, Huttenlocher A. The extracelular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracelular traps. PLoS Pathog. 2016; 12: e1005884.

70. Johnsson IW, Haglund B, Ahlsson F, Gustafsson J. A high birth weight is associated with increased risk of type 2 diabetes and obesity. Pediatr Obes. 2015; 10: 77-83.

71. Jain M, Shah R, Chandolia B, Mathur A, Chauhan Y, Chawda J, Mosby S, Bhagalia S. The oral carriage of *Candida* in oral cancer patients of indian origin undergoing radiotherapy and/or chemotherapy. J Clin Diagn Res. 2016; 10: 17-20.

72. Johnson CJ, Cabezas-Olcoz J, Kernien JF, Wang SX, Beebe DJ, Huttenlocher A y cols. The extracelular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracelular traps. PLoS Pathog. 2016; 12: e1005884.

73. Johnson ME. Issuesin antifungal susceptibility testing. J Antimicrob Chem. 2008; 61: 13-18.

74. Juárez C, Théodore F, Villalobos A, Villalobos A, Jiménez A, Lerin S, NIgenda G, Lewis S. Social support of patients with type 2 Diabetes in marginalized contexts in Mexico and its relation to compliance with treatment: A sociocultural spproach. PLoS ONE. 2015; 10: e0141766.

75. Kadir T, Pisiriciler R, Akyüz S, Yarat A, Emekli N, Ipbüker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. J Oral Rehabil. 2002; 29: 452-457.

76. Kakoei S, Hosseini B, Haghdoost A-A, Sanjari M, Gholamhosseinian A, Afshar VF. Evaluation of salivary secretory immunoglobulin A levels in diabetic patients and association with oral and dental manifestations. Sultan Qaboos Univ Med J. 2015; 15: 507-511.

77. Kanafani Z, Perfect J. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin Infect Dis. 2008; 46: 120-128.

78. Khosravi A, Yarahmadi S, Baiat M, Shokri H, Pourkabireh M. Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus. J Med Mycol. 2008; 18: 83-88.

79. Kirkpatrick WR, Revankar SG, Mcatee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI. detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar candida screening and susceptibility testing of isolates. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3003-3012.

80. Kołaczkowska A, Kołaczkowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. J Antimicrob Chemother. 2016; 71: 1438-1450.

81. Kumar B, Padshetty N, Bai K, Rao M. Prevalence of *Candida* in the oral cavity of diabetic subjects. J Assoc Physicians India. 2005; 53: 599-602.

82. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 349-353.

83. Ley SH, Hamdy O, Mohan V, Hu FB. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. Lancet. 2014; 383: 1999-2007.

84. Lewis RE, Viale P, Kontoyiannis DP. The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. Virulence. 2012; 3: 368-376.

85. Lotfi MH, Jafari AA, Falah A, Tavakoli E, Falahzadeh MH. *Candida* colonization on the denture of diabetic and non-diabetic patients. Dent Res J. 2009; 6: 23-27.

86. Lyon JP, Moreira LM, Cardoso MAG, Saade J, Resende MA. Antifungal suscepitibility profile of *Candida* spp. oral isolates obtained from denture wearers. Braz J Microbiol. 2008; 39: 668-672.

87. Lyu X, Zhao C, Yan Z, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. Drug Des Devel Ther. 2016; 10: 1161-1171.

88. Manfredi M, McCullough MJ, Polonelli L, Conti S, Al-Karaawi ZM, Vescovi P, Porter S. *In vitro* antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. Oral Microbiol Immunol. 2006; 21: 177-182.

89. Manfredi M, Polonelli L, Aguirre-Urizar JM, Carrozzo M, McCullough MJ. Urban legends series: oral candidosis. Oral Dis. 2013;19: 245-261

90. Marcos C, Vicente J, Sahand I, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, Aguirre JM, Eraso E, Quindós G. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. Arch Oral Biol. 2009; 54: 127-131.

91. Martinez RF, Jaimes A, Hernández F, Arenas R, Miguel GF-S. Oral *Candida spp* carriers: its prevalence in patients with type 2 Diabetes Mellitus. An Bras Dermatol. 2013; 88: 222-225.

92. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms.Virulence. 2013; 4: 119-128.

93. McCullough M, Patton LL, Coogan M, Fidel PL, Domesu M, Ghannoum M, y cols. *Candida* and oral mycotic infections: workshop 2A. Adv Dent Res 2011; 23: 152-158.

94. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després JP, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. Diabetes Care. 2010; 33: 2477-2483.

95. Meza R, Barrientos T, Rojas R, et al. Burden of Type 2 Diabetes in Mexico: Past, Current and Future Prevalence and Incidence Rates. Prev med. 2015; 81: 445-450

96. Mishra N, Prasad T, Sharma N, Gupta D. Membrane fluidity and lipid composition of fluconazole resistant and susceptible strains of *Candida* albicans isolated from diabetic patients. Braz J Microbiol. 2008; 39: 219-225.

97. Mondal S, Mondal A, Pal N, Banerjee P, Kumar S, Bhargava D. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of *Candida*. J Inst Med. 2013; 35: 45-49.

98. Mondon P, Petter R, Amalfitano G, Luzzati R. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in Cryptococcus neoformans. Antimicrob Agents Chemoter 1999; 43: 1856-1861.

99. Montonen J, Knekt P, Härkänen. Dietary patterns and the incidence of type 2 diabetes. Am J Epidemiol. 2005; 161: 219-227.

100. Moreno L, García JJ, Soto G, Capraro S, Limón D. Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. Rev Med Hosp Gen Mex. 2014; 77: 114-123

101. Moreno L, Silberman M, Hernández D, Capraro S, Soto G, García JJ, Sandoval E. Diabetes tipo 2 y patrones de alimentación de 1961 a 2009: algunos de sus determinantes sociales en México. Gac Med Mex.2015; 151: 354-368.

102. Muadcheingka T, Tantivitayakul P. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. Arch Oral Biol. 2015; 60: 894-901.

103. Mushi MF, Mtemisika CI, Bader O, Bii C, Mirambo MM, Grob U, Mshana SE. High oral carriage of non-albicans Candida spp. among HIV-infected individuals. Int J Infect Dis. 2016; 49: 185-188.

104. Naglik JR, Richardson JP, Moyes DL. Candida albicans pathogenicity an epithelial immunity. PloS Pathog. 2014; 10: e10042567.

105. Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques.Oral Diseases 2014; 20: 329-344.

106. Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 672-676.

107. Netea MG, Van de Veerdonk F, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. FEMS Immunol Med Microbiol 2008; 52: 118-123.

108. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. Odontology. 2010; 98: 15-25.

109. Nolan C, Damm P, Prentki Ml. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. Lancet. 2011; 378: 169-181.

110. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, para la Prevención y Control de la Diabetes.

111. Pallavan B, Ramesh V, Dhanasekaran BP, Oza N, indu S, Govindarajan V. Comparison and correlation of candidal colonization in diabetic patients and normal individuals. J Diabetes Metab Disord. 2014; 13: 66.

112. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009; 48: 503-535.

113. Patel PK, Erlandsen JE, Kirkpatrick WR, Berg DK, Wetbrook SD, Louden C, y cols. The changing epidemiology of oropharyngeal candidiasis in patients with HIV/AIDS in the era of antiretroviral therapy. AIDS Res & Ter. 2012; 2012: 1-5.

114. Patton LL, Ramirez-Amador V, Anaya-Saavedra G, Nittayananta W, Carrozzo M, Ranganathan K. Urban legends series: Oral manifestations of HIV infection. Oral Dis. 2013; 19: 533-550.

115. Pieralisi N, Godoy J, Yamada S, Santana R, Svidzinski T. Oral lesions and colonization by yeasts in hemodialysis patients. J Oral Pathol Med. 2015; 44: 585-590.

116. Premkumar J, Ramani P, Chandrasekar T, Natesan A, Premkumar P. Detection of species diversity in oral *candida* colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients. J Nat Sci Biol Med. 2014; 5: 148-154.

117. Prieto LM, Díaz LA, Illnait MT, Perurena MR, Cantelar N, Fernández CM, Martínez G. Susceptibilidad a la nistatina de aislamientos bucales de *Candida* y su correlación con la respuesta al tratamiento. Rev Cubana Med Trop. 2010; 62: 237-244.

118. Rajakumari M, Kumari S. Prevalence of *Candida* species in the buccal cavity of diabetic and non-diabetic individuals in and around Pondicherry. J Mycol Med. 2016; 26: 359-367.

119. Ramachandran A, Ma RC, Snehalatha C. Diabetes in Asia. Lancet. 2010; 375: 408-418.

120. Ramos A, Romero Y, Sánchez-Romero I, Fortún J, Paño JR, Pemán J, Gurguí Rodríguez-Baño J, Padilla B. Risk factors, clinical presentation and prognosis of mixed candidaemia: a population-based surveillance in Spain. Mycoses. 2016; 59: 636-643.

121. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39: 1-8.

122. Rodero L, Córdoba S, Vivot W, Campo M, Corfield P, Olguín C y cols. Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. Rev argent microbiol. 2006; 38: 155-163.

123. Rodrigues C, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; 33: 673-688.

124. Roed-Petersen B, Renstrup G. A topographical classification of the oral mucosa suitable for electronic data processing. Its application to 560 leukoplakias. Acta Odontol Scand 1969; 27: 681-695.

125. Sashikumar R, Kannan R. Salivary glucose levels and oral candidal carriage in type II diabetics. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109: 706-711

126. Sánchez LO, Ortiz LN, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat CM y cols. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexicans HIV/AIDS patients and healthy persons. Rev Iberoam Micol. 2005; 22: 83-92.

127. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses. 2015; 58: 2-13.

128. Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, Vergani CE. *Candida spp.* prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 111: 726-733.

129. Serrano R, Gimeno A, Plumed L, Pemán J, Álvarez B, Plazas J. Perfil epidemiológico y patrón de sensibilidad de aislamientos causantes de infección fúngica invasora frente a aislamientos fúngicos de colonización en pacientes críticos no neutropénicos. Rev Iberoam Mic. 2013; 30:14-20.

130. Seuring T, Archangelidi O, Suhrcke M. The economic costs of type 2 diabetes: A global systematic review. PharmacoEconomics. 2015; 33: 811-831.

131. Sharma P, More S, Raut S, Rathod V. in vitro antifungal susceptibility pattern of oropharyngeal and oesophageal *Candida* species in HIV infected patients. Int J Health Sci Res. 2013; 3: 1-6.

132. Shenoy MP, Puranik RS, Vanaki SS, Puranik SR, Shetty P, Shenoy R. A comparative study of oral candidal species carriage in patients with type1 and type2 diabetes mellitus. J Oral Maxillofac Pathol. 2014; 18: 60-65.

133. Silva MF, Barbosa K, Pereira J, Bento P, Godoy G, Gomes D. Prevalence of oral mucosal lesions among patients with diabetes mellitus types 1 and 2. An Bras Dermatol. 2015; 90: 49-53.

134. Silva NC, Nery JM, Dias AL. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. Mycoses. 2014; 57: 1-11.

135. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: an overview. J Oral Maxillofac Pathol. 2014; 18: 81-85.

136. Smith-Spangler CM, Bhattacharya J, Goldhaber-Fiebert JD. Diabetes, its treatment, and catastrophic medical spending in 35 developing countries. Diabetes Care. 2012; 35: 319-326.

137. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phemotypic plasticity. Acta Trop. 2002; 81: 101-110.

138. Soysa N, Samaranayake L, Ellepola A. Diabetes Mellitus as a contributory factor in oral candidosis. Diabet Med. 2006; 23: 455-459.

139. Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. Biomed Res Int. 2013; 2013: 204237.

140. Srivastava B, Bhatia HP, Chaudhary V, Aggarwal A, Kumar Singh A, Gupta N. Comparative evaluation of oral *Candida albicans* carriage in children with and without dental caries: A microbiological in vivo study. Int J Clin Pediatr Dent 2012; 5: 108-112.

141. Suárez BL, Álvarez MI, de Bernal M, Collazos A. *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia. Colomb Med. 2013; 44: 26-30.

142. Sun J, Qi C, Lafleur M, Qi Q. Fluconazole susceptibility and genotypic heterogeity of oral *Candida albicans* colonies from the patients with cancer receiving chemotherapy in China. Int J Oral Sci. 2009; 1; 156-162.

143. Tang SX, Moyes DL, Richardson JP, Blagojevic M, Naglik JR. Epithelial discrimination of commensal and pathogenic *Candida* albicans. Oral Dis. 2016; 22: 114-119.

144. Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E, Osaki T. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. J Oral Pathol Med. 2003; 32: 586-594.

145. Tooyama H, Matsumoto T, Hayashi K, Kurashina K, Kurita H, Uchida M. *Candida* concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs. BMC Oral Health. 2015; 15: 1-8.

146. Tournu H, Van Dijck P. *Candida* Biofilms and the host: models and new concepts for eradication. Int J Microbiol. 2012; 2012: 1-17.

147. Torres NA, Álvarez CA, Rondón MA. Evaluación mediante tres técnicas de susceptibilidad a fluconazol en especies de *Candida* aisladas en pacientes con infecciones invasoras: Bogotá-Colombia. Rev chil infectol. 2009; 26: 135-143.

148. Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T. Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. J Oral Pathol Med. 1993; 22: 168-174.

149. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR, Silventoinen K. Comparison of body mass index, waist circumference and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. Epidemiol Rev. 2007; 29: 115-128.

150. Villalpando S, De la Cruz V, Rojas R, Shamah-Levy T, Avila MA, Gaona B, Rebollar R, Hernández L. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in mexican adult population: a probabilistic survey. Salud Pública Mex. 2010; 52:19-26.

151. Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, Huxley R, Cook DG, Anazawa S y cols. Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review. JAMA. 2008; 300: 2886-2897.

152. Wiebusch L, Lonchiati D, Rodrigues L, Dantas C, Almeida A, Oliveira K. Profile susceptibility to fluconazole and voriconazole antifungals by species of *Candida albicans* isolated from urine culture. BMC Proc. 2014; 8: 34.

153. Wilson D, Mayer FL, Miramón P. Distinct roles of *Candida albicans*-specific genes in host-pathogen interactions. Eukaryot Cell. 2014; 13: 977-989.

154. Wilson D, Naglik JR, Hube B. The missing link between *Candida albicans* hyphal morphogenesis and host cell damage. PloS Pathog. 2016; 12: e1005867

155. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol 2011; 3: 1-11.

156. Xu Y, Sheng F, Zhao J, Chen L, Li C. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. Arch Microbiol. 2015; 197: 1087-1093.

157. Yamashita K, Ohara M, Kojima T, Nishimura R, Ogawa T, Hino T. Prevalence of drug-resistance opportunistic microorganisms in oral cavity after treatment for oral cancer. J Oral Sci. 2013; 2: 145-155.

158. Yarahmadi S, Khosravi A, Larijani B, Maiat M, Mahmoudi M, Baradarjalili R. Assessment of the fungal flora and the prevalence of fungal infections in the mouth of diabetics. Im J Endocrinol Metab. 2002; 4: 105-109.

159. Zapata F, Cardona N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. Rev CES Med. 2012; 26: 71-83.

160. Zarei Mahmoudabadi A, Zarrin M, Beheshti F. Antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from candidura. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6: 24-28.

161. Zomorodian K, Kavoosi F, Pishdad G.R., Mehriar P, Ebrahimi H, Bandegani A, Pakshir K. Prevalence of oral *Candida* colonization in patients with diabetes mellitus. J Mycol Med. 2016. 26; 103-110.

ANEXOS
Anexo 1. Consentimiento informado

Casa abierta al tiempo

Fecha: ____ /____ /____ Folio: _____

Identificación de especies de *Candida* aisladas de la mucosa bucal y su susceptibilidad antifúngica en pacientes con y sin diabetes mellitus tipo 2

Consentimiento de participación en el estudio:

Con fundamento en la Ley General de Salud. Título quinto. Capítulo único: Investigación para la salud. Artículos 100 y 103. Norma oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012. Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.

He sido informado(a) que el C.D. Manuel Arturo Romero De La Vega está llevando a cabo un proyecto de investigación en colaboración con los Laboratorios de Comprobación y Diseño "San Lorenzo" y "Tláhuac" de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Están realizando un estudio para la identificación de la Susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* aisladas de la mucosa bucal de pacientes con y sin diabetes mellitus tipo 2

Se me ha comentado que *Candida* spp. es un hongo que normalmente está presente en la boca de la mayoría de los individuos sin producir enfermedad, pero que en ocasiones, debido a la combinación de varios factores, este microorganismo se vuelve patógeno y causa infección. De la misma manera se me informó que en pacientes con diabetes mellitus existen factores que permiten un mayor riesgo de desarrollar candidiasis que los pacientes sanos y que se ha observado un aumento en la resistencia al tratamiento de Candidiasis.

Se me ha dado a conocer que el estudio se llevará a cabo mediante procedimientos no doloroso ni invasivos, que no afectarán a mi estado de salud y no me producirán ninguna molestia ni complicación. Y consistirán en un raspado de la lengua o algún otro sitio de la mucosa bucal con un hisopo estéril, el cual se transportará en un tubo que contiene un líquido conservador para que posteriormente, pueda ser trasladado al laboratorio.

Es de mi conocimiento que, en caso de que se encuentre una lesión sugestiva de candidosis bucal, se realizará la toma de una citología exfoliativa de la zona afectada para confirmar el diagnóstico, en caso de resultar positiva se me brindará el tratamiento que corresponda.

Se me ha explicado que la información obtenida en el estudio es confidencial y que en caso de ser necesario, los resultados le serán dados a mi médico tratante. También comprendo que mi participación en el mismo no es obligatoria y que no tiene ningún costo o algún tipo de remuneración.

Cualquier pregunta o duda que tenga puede realizarla con total libertad y en el momento que lo desee.

He leído la información proporcionada o se me ha leído y decido libremente formar parte de este estudio y sé que puedo negarme a participar o suspender mi participación en cualquier momento si es que lo decido. En caso de que lo haga, la atención que recibo como paciente de esta institución, no se verá afectada.

Nombre y firma del paciente: _____

Nombre y firma del testigo: _____

Nombre y firma del investigador: _____

Anexo 2. Ficha de recolección de datos

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Identificación de especies de *Candida* aisladas de la mucosa bucal y su susceptibilidad antifúngica en pacientes con y sin diabetes mellitus tipo 2

DATOS DE IDENTIFICACIÓN

Nombre: _____ No. Expediente: _____ Fecha: ___/___/___ **Folio: _____**

Sexo: ( ) Edad: _____años Fecha de nacimiento: ___/___/___ Peso: _____ Talla: _____

DATOS DEMOGRÁFICOS

Escolaridad: ( ) Años de estudio: _____ Ocupación: ( ) Estado Civil: ( ) Lugar de nacimiento: _____ Lugar de residencia: _____

DIABETES

El paciente es diabético ( )

Fecha de diagnóstico DM: ___/___/___ Tiempo de evolución DM: _____años _____meses

Último reporte de glucemia: Fecha___/___/___ Valor _____mg/dl

Hemoglobina glicosilada: Fecha ___/___/___ Valor_____%

Glucosa capilar: _____ Hora: _____ En ayuno: ( ) Última hora de alimento: _____

TRATAMIENTO

Inicio de tratamiento: _____ Tipo de medicamento: ( )

1-Sulfonilureas (Glibenclamida): Dosis/día _____ Tiempo de inicio _____

2-Biguanidas (Metformina): Dosis/día _____ Tiempo de inicio _____

3-Combinación (Metformina/Glibenclamida): Dosis/día _____ Tiempo de inicio _____

4-Insulina: Dosis/día _____ Tiempo de inicio _____

Antihipertensivos: ( ) Cuál _____ Dosis/día _____

Antibióticos: ( ) Cuál _____ Dosis/día _____

Otros medicamentos: ( ) Cuál _____ Dosis/día _____ Sin tratamiento ( )

EXAMEN BUCAL

¿El paciente es portador de prótesis? ( ) Tiempo de uso: _____años _____ meses

¿Duerme con ella? ( )

Higiene bucal: ( )

IHOS:

O.D	CPDB	SARRO
16		
11		
26		
36		
31		
46		

IHOS

0-No hay depósitos ni pigmentaciones
1-Existen depósitos en no más de 1/3, o hay pigmentaciones
2-Existen depósitos que cubren más de 1/3, pero menos de 2/3
3-Los depósitos cubren más de 2/3 de la superficie dentaria

NIVELES DE IHOS
0-1 Óptimo 1.1-2 Regular 2.1-3 Malo + de 3 Muy malo

Candidosis ( )

Tipo de Candidosis: ( ) ( ) ( )

(1) C. eritematosa (2) C. pseudomembranosa (3) C. asociada a prótesis (4) otra: _____

Localización: ( ) ( ) ( )

(1) Dorso de lengua (2) Paladar duro (3) Mucosa yugal (4) Otra: _____

Toma de citología exfoliativa: Localización ( ) No. Frotis _____ Resultado ( )

Toma de citología exfoliativa: Localización ( ) No. Frotis _____ Resultado ( )

Síntomas: ( ) Cuál: _____

Signos clínicos compatibles: sin signos ( ) quemazón ( ) escozor ( ) otro ( )

DATOS DE LABORATORIO/MICROBIOLOGÍA

Siembra Agar Dextrosa Sabouraud: _____

Aspecto de colonia:

_____

_____

CHROmagar *Candida*: ( ) Especie de *Candida*:

_____

_____

API:

_____

_____

_____

Agar Mueller Hinton:

_____

_____

_____

Halo de inhibición: Nistatina ____mm Miconazol _____mm Fluconazol _____mm Itraconazol____mm

Anexo 3. Criterios de mediciones de consumo de tabaco y alcohol

Consumo de tabaco:

Se interrogaron a los fumadores y ex fumadores sobre la edad de inicio y de término del hábito tabáquico, y la cantidad de cigarros consumidos por día. La cantidad acumulativa de tabaco se calculó en paquetes-año (no. cigarros por día x 365.25 / 20 x años de consumo). La variable consumo acumulativo de tabaco fue categorizada en tres categorías: 0, <25, y >25 paquetes-año (Encuesta Nacional para las Adicciones 2011).

1. Fumador activo: persona que declaró haber fumado durante el último año.
2. Ex fumador: persona que contestó haber fumado alguna vez en la vida y haber dejado de fumar hace más de un año.
3. Nunca ha fumado: persona que respondió no haber fumado en la vida.

Consumo de alcohol:

Se calculó la cantidad acumulativa de UB en UB-año (Unidad de bebida semanal x 52 x años de consumo). (Encuesta Nacional para las Adicciones 2003, 2011).

Se calcula en unidades de bebida (UB) de acuerdo al tipo de bebida consumida y tomando en cuenta el contenido de etanol de cada una de ellas:

Vino 125ml Ron 30 ml Licor 30 ml Brandy 30 ml Cerveza y pulque 330 ml
Whisky 30 ml Mezcal 30 ml Vodka 30 ml Tequila 30 ml

Se definieron como:

1. Bebedor activo: Persona que declaró haber ingerido al menos 1 UB por semana el año previo a su inclusión en el estudio.
2. Ex bebedor: Persona que contesto haber ingerido bebidas alcohólicas alguna vez en su vida y haber dejado de consumir bebidas alcohólicas hace más de un año.
3. No bebedor: Menos de 1 UB por semana.

Anexo 4. Índice de higiene oral simplificado

Es una modificación que se realizó en 1964 al índice de higiene oral (IHO) (Greene y Vermillion 1960). Este índice mide la presencia de placa dentobacteriana y cálculo sobre la superficie de 6 dientes, los dientes y superficies examinadas son el 11, 16, 26 por la cara vestibular y el 31, 36 y 46 por la cara lingual.

Cada superficie dental es dividida horizontalmente en tercios gingival, medio e incisal y la exploración se realiza con ayuda de un espejo bucal y una sonda de la OMS la cual se coloca en el tercio incisal del órgano dentario y se desplaza hacia el tercio gingival y se le asigna un valor de 0-3 de acuerdo a los siguientes criterios:

Códigos y criterios para placa dentobacteriana	
Código	Criterios
0	No hay placas ni manchas
1	Residuos blandos que cubren menos de un tercio de la superficie del diente
2	Residuos blandos que cubren más de un tercio pero menos de dos tercios de la superficie del diente
3	Residuos blandos que cubren más de dos tercios de la superficie del diente

Códigos y criterio para cálculo dental	
Código	Criterios
0	No hay presencia de cálculo supragingival ni subgingival
1	Cálculo supragingival que cubre menos de un tercio de la superficie del diente y no hay cálculo subgingival
2	Cálculo supragingival que cubre menos de un tercio pero menos de dos tercios de la superficie del diente y/o depósitos únicos o aislados de cálculo subgingival
3	Cálculo supragingival que cubre más de dos tercios de la superficie dental expuesta y/o una banda gruesa continúa de cálculo subgingival alrededor de la parte cervical del diente, o ambos

La calificación de placa se obtiene por persona totalizando la puntuación de los desechos por superficie dental y dividiendo el resultado entre la cantidad de superficies examinadas.

Se realiza el mismo procedimiento con el cálculo dental y se suman las dos calificaciones para obtener un promedio de acuerdo a la siguiente escala:

Valor	Criterio
0-1	Óptimo
1.1-2	Regular
2.1-3	Malo
3.1 o más	Muy malo

Anexo 5. Susceptibilidad de *Candida* spp. a fluconazol y miconazol en diferentes estudios

Autor/es	Año	País	Población de estudio	Resistencia	
				Antifúngico	(%)
Lyonn y cols[86]	2008	Brasil	Pacientes sin DM-2	Fluconazol	(10.0)
Serrano y cols[129]	2013	España	Pacientes sin DM-2	Fluconazol	(2.0)
Benito y cols[21]	2016	México	Pacientes sin DM-2	Fluconazol	(18.0)
Manfredi y cols[88]	2006	Italia	Pacientes con DM	Fluconazol Miconazol	(4.0) (0)
Bremenkamp y cols[25]	2011	Brasil	Pacientes con DM	Fluconazol	(0.0)
Premkumar y cols[116]	2015	India	Pacientes con DM	Fluconazol	(23.0)
Sánchez y cols[126]	2005	México	Pacientes infectados con VIH	Miconazol Fluconazol	(2.7) (3.2)
Bulacio y cols[24]	2012	Argentina	Pacientes con cáncer	Miconazol Fluconazol	(0.0) (3.0)
Yamashita y cols[157]	2013	Japón	Pacientes con cáncer	Fluconazol	(82.0)

Anexo 6. Criterio de tamaño del halo de inhibición de acuerdo al CLSI, 2012*

Antifúngico	Resistente	RDD	Sensible
Nistatina	≤10 mm	11-14 mm	≥15 mm
Miconazol	≤13 mm	14-22 mm	≥23 mm
Fluconazol	≤14 mm	15-18 mm	≥19 mm

***M44-A3 descrito por el Clinical and Laboratory Standard Institute**

Anexo 7. Definición operacional de variables

Variable	Tipo	Categorías/unidades	Descripción
Susceptibilidad de especies de *Candida* a antifúngicos	Nominal	R=Resistente RDD=Resistente dosis dependiente S=Sensible	Crecimiento del hongo inhibido por una concentración del agente antifúngico. (Rodero L y cols, 2006).
Colonización	Nominal	0=No colonizado 1=Colonizado	Sin signos clínicos de candidosis bucal, cultivo en Agar Dextrosa Sabouraud positivo. (Gümrü, 2011; Gow y Hube, 2013)
Candidosis bucal	Nominal	0=No infectado 1=Infectado	Signos clínicos de candidosis bucal, confirmado con frotis citológico teñido con PAS y cultivo de Agar Dextrosa Sabouraud positivo (Gow y Hube cols 2013)
Especie de *Candida*	Nominal	0=*C. albicans* 1=No *C. albicans*	Identificar la especie de acuerdo a los resultados obtenidos en el cultivo de CHROMagar® y confirmación con prueba bioquímica (API 20C AUX).
DM-2	Nominal	0=No Diabético 1=Diabético	Enfermedad sistémica, crónica degenerativa, que se caracteriza por hiperglucemia crónica, debido a la deficiencia en la producción o acción

Anexo 7. Definición operacional de variables (continuación)

Variable	Tipo	Categorías/unidades	Descripción
			de la insulina (Nolan y cols, 2011; ADA, 2016; FID, 2015; OMS, 2016).
Glucosa capilar casual	Continua	Mg/dl	Medición de glucosa en sangre a cualquier hora del día sin relación con el tiempo transcurrido desde la última comida
Sexo	Nominal	0=Femenino 1=Masculino	Según lo expresado en el expediente clínico
Edad	Continua	Años	Tiempo de vida del individuo
Uso de prótesis removible	Nominal	0=No 1=Si	Uso de prótesis removible total o parcial.
Índice de higiene oral simplificado IHOS [a]	Nominal	0=óptimo 1=Regular 2=Malo 3=Muy malo	Mide la presencia de placa dentobacteriana y cálculo sobre la superficie de los dientes.
Exposición a tabaco [b]	Nominal	0=No fumador 1=Fumador 2=Ex fumador	Consumo actual o pasado de tabaco.
Exposición a alcohol [b]	Nominal	0= No bebedor 1=Bebedor 3=Ex bebedor	Consumo actual o pasado de bebidas alcohólicas.

[a] criterios en anexo 4, [b] criterios en anexo 3.