

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y MOLECULAR DE *Candida* spp.
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ORIGEN BUCAL EN PACIENTES SANOS
Y DIABÉTICOS DE NUEVO LEÓN”**

POR

C.D. EMMANUEL GARZA ZARAGOZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

CIUDAD UNIVERSITARIA A DICIEMBRE DEL 2012

APROBACION DE TESIS DE MAESTRÍA POR COMITÉ DE TESIS
“CARACTERIZACION TAXONOMICA Y MOLECULAR DE *Candida* spp. EN
 AISLADOS CLINICOS DE ORIGEN BUCAL EN PACIENTES SANOS Y
 DIABETICOS DE NUEVO LEON”

DRA. ELVA TERESA ARÉCHIGA CARVAJAL
DIRECTOR

M.C. JUAN MANUEL ADAME RODRIGUEZ
SECRETARIO

DR. ROBERTO MERCADO HERNÁNDEZ
VOCAL 1

M.C. ARTURO ESPINOZA MATA
VOCAL 2

DRA. LAURA NORMA HEREDIA ROJAS
VOCAL 3

DRA. MARIANELA GARZA ENRÍQUEZ
ASESOR EXTERNO

DEDICATORIA

A Dios por permitirme tener salud y estar conmigo en todos momentos de difíciles, por darme fortaleza, y darme nuevas alas en los días de cansancio ayudarme, por mantenerme fuerte y sostenerme con su promesa. “Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”.

A mis papas Arnulfo Garza y María del Refugio Zaragoza por haberme brindado la oportunidad de estudiar, por todas sus enseñanzas, sacrificios y comprensión pero sobre todo por ese apoyo incondicional que siempre me brindaron.

A mis hermanos Arnulfo Garza y Jessica E. Garza, por estar a mi lado en todo momento y brindarme consejos cuando lo necesitaba

A toda mi familia en general tíos, primos, pero sobre todo a mis abuelos Heriberto Garza Cavazos, Bertha Rodríguez Martínez que a pesar de todos los obstáculos que se han presentado hemos logrado superarlos ya que gracias a ustedes aprendí el valor más importante que podemos tener “la familia”.

A Jesús I. Rodríguez Pulido por ser parte importante de mi vida y darme los consejos, y ánimos que siempre necesité pero sobre todos por brindarme tu amistad y apoyo incondicional en cualquier situación que se me presento, gracias por apoyarme chuyin.

A Omar E. Tovar Herrera, compadre, Ib y amigo, gracias por esas pláticas y consejos que me diste; pero sobretodo por tener ese don de la empatía para decir con exactitud las palabras o frases necesarias que me sirvieron en muchos momentos difíciles gracias a esto logré sacudirme el polvo y levantarme de nuevo para llegar a mi objetivo final; el termino de este proyecto.

A Mayra Treviño Garza gracias por ayudarme en todos los momentos, escucharme y apresurarme para concluir este proyecto, por alentarme a no dejar las cosas para mañana y presionarme además por terminar la tesis gracias a eso pude concluir este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Elva T. Aréchiga Carvajal** por el apoyo para realizar este posgrado, por brindarme la confianza y ayudarme a crecer como persona mediante sus experiencias y consejos, gracias por todo.

Al **M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez** por darme ese consejo aquel día que me ha ayudado a crecer profesionalmente y personalmente también por apoyarnos en el laboratorio y por brindarme la confianza.

A la **Dra. Marianela Garza Enríquez** por ser parte fundamental en mi vida, gracias a usted hoy día me encuentro pleno profesionalmente, ya que desde mi desarrollo profesional en licenciatura usted me ha apoyado incondicionalmente en cualquier proyecto o situación, gracias por creer en mi persona y darme una oportunidad de vida y apoyarme, con usted infinitamente agradecido.

Al **Dr. Roberto Mercado** por su ayuda y paciencia para la realización en los análisis estadísticos, por sus consejos y enseñanzas.

A todos mis amigos de la maestría que me ayudaron a culminar esta meta de vida y por estar en todos los aspectos de mi vida en ese lapso de tiempo tanto de desesperación, cansancio, alegrías etc. gracias a todos ustedes

A mis amigos del laboratorio Carmen, Diego, Alex, Lalo, Madory, Rolando, Jessy aguila de coco, Tere, Héctor, Alex Aragón, *Sil Tu Plais*, a todos ustedes gracias por todos esos momentos inolvidables

A **CONACYT** por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

A todos los que de una u otra manera colaboraron para llevar a cabo este trabajo..

TABLA DE CONTENIDO

SECCION	PAGINAS
1. RESUMEN	1
1.1 Abstract	2
2. INTRODUCCION	3
2.1 Candidiasis	3
2.1.1 Generalidades	3
2.2 Candidiasis como flora normal de la boca	3
2.3 Candidiasis como agente causal de Candidiasis oral	3
2.4 Epidemiologia de las especies de <i>Candida</i>	4
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. HIPOTESIS	7
5. OBJETIVOS	8
5.1 Objetivo general	8
5.2 Objetivos particulares	8
6. ANTECEDENTES	9
6.1 Hongos	9
6.1.1 El género <i>Candida</i>	9
6.2 Las especies de <i>Candida</i>	11
6.2.1 <i>Candida albicans</i>	11
6.2.2 <i>Candida glabrata</i>	11
6.2.3 <i>Candida tropicalis</i>	12
6.2.4 <i>Candida parapsilosis</i>	12
6.3 Candidiasis	15
6.4 <i>Candida</i> como agente causal de candidiasis oral	16
6.5 Epidemiologia de las especies de <i>Candida</i>	19
6.6 Métodos de identificación de especies de <i>Candida</i>	21
6.7 Métodos de identificación microbiológica	21

6.7.1 Observación microscópica	22
6.7.2 Métodos basados en cultivo	22
6.8 Métodos de identificación molecular	23
6.8.1 Técnicas basadas en hibridación de ADN	24
6.8.2 RFLP's	24
6.9 Técnicas basadas en PCR	25
6.9.1 PCR multiplex	25
6.10 Trastornos endócrinos relacionados con Diabetes <i>mellitus</i>	27
6.10.1 Diabetes <i>mellitus</i>	27
6.10.2 Clasificación de la diabetes	27
6.11 Criterios diagnósticos para la Diabetes <i>mellitus</i> según la ADA	29
6.11 Criterios diagnósticos para la Diabetes <i>mellitus</i> según la ADA	29
6.13 Frecuencia en el mundo	30
6.13.1 Frecuencia en México	30
6.14 Diabetes <i>mellitus</i> y manifestaciones clínicas orales	32
7. MATERIALES Y METODOS	35
7.1 Selección de la población y tamaño de muestra	35
7.2 Criterios de inclusión	35
7.2.1 Grupo control	35
7.2.2 Grupo experimental	35
7.2.3 Hallazgos clínicos dentro de los criterios de inclusión	36
7.3 Criterios de exclusión	36
7.4 Carta de consentimiento informado	36
7.5 Determinación de la concentración de la glucosa en sangre	37
7.6 Toma de muestra	39
7.7 Caracterización microbiológica	40
7.8 Cepas control y condiciones de cultivo	44
7.9 Caracterización del crecimiento de cada una de las especies en medio YPD utilizando diferentes métodos	44
7.10 Cámara de Neubauer	44

7.11 Espectrofotometría de <i>Candida</i> spp.	46
7.12 Diluciones para espectrofotometría de <i>Candida</i> spp.	46
7.13 Extracción de DNA genómico de levaduras	48
7.14 Cuantificación de DNA	51
7.15 Amplificación de muestras de DNA de levaduras de pacientes odontológicos sanos y diabéticos	52
7.16 Identificación molecular	53
7.17 Oligonucleotidos	53
7.18 Estandarización del método de PCR	54
7.18.1 Oligonucleotidos sometidos a gradiente de temperatura	54
7.19 PCR para cepas de referencia	55
7.19.1 Estandarización de PCR multiplex de cepas de referencia	56
7.20 Análisis estadístico	57
8. RESULTADOS	58
8.1 Caracterización del crecimiento de cada una de las especies de <i>Candida</i> spp utilizando diferentes métodos	58
8.2 Método para cuantificar células en la cámara de Neubauer	59
8.3 Espectrofotometría de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida glabrata</i>	60
8.4 Resultado de significancia en análisis de comparación de pacientes Odontológicos sanos y pacientes diabéticos	62
8.5 Frecuencia de hallazgos encontrados en cada especie de acuerdo al porcentaje total de pacientes odontológicos sanos y pacientes diabéticos	63
8.6 PCR multiplex de cepas aisladas de sujetos sanos	67
9. DISCUSION	74
10. CONCLUSION	79
11. ANEXOS	80
12. BIBLIOGRAFÍA	90

LISTA DE TABLAS

FIGURA	PÁGINAS
1. Porcentaje de Candidemias en países europeos probadas por especies de <i>Candida</i> en cada grupo de edades.	20
2. Kit One Touch Ultra 2 con tiras reagentes. Código 25 para sistema de diagnóstico de glucosa en sangre de cada paciente.	37
3. Método para toma de muestra de glucosa en sangre con glucómetro.	38
4. Procesamiento de las muestras tomadas de la cavidad oral para su óptimo crecimiento.	39
5. Coloración de cepas tipo ATCC para cada una de las especies en medio Chromoagar candida.	41
6. Material para realizar aislamiento de muestra.	42
7. Centrifugado de tubo fálcon.	42
8. Transferencia de células a tubo fálcon.	42
9. Placas con dilución de muestra en medio de cultivo YPD.	42
10. Chromagar candida.	42
11. Placas de Chromagar candida con crecimiento.	42
12. Diagrama de flujo de metodología para la caracterización microbiológica de las cepas.	42
13. Aislados clínicos de muestras en medio cromogénico incubadas a 48° C con la coloración característica de cada especie	43
14. Microscopio óptico para identificación de levaduras.	44
15. Cámara de Neubauer para conteo celular.	44
16. Conteo celular en cámara Neubauer para obtención de concentración final de células.	45
17. Esquema de dilución realizada al cultivo de cada muestra.	47
18. Espectrofotómetro para medición de densidad de levaduras.	47

19. Caja de dilución a 1×10^{12}	47
20. Conteo de UFC para las diluciones a 1×10^{10}	47
21. Procedimiento realizado para extracción de DNA geonómico de levaduras.	
22. Fases y metodología para amplificación de gel de agarosa al 1%.	50
23. Método para cuantificación de DNA en Nanodrop.	51
24. Amplificación de muestras de pacientes diabéticos.	52
25. Gradiente de temperatura.	55
26. Estandarización de PCR múltiplex.	56
27. Curva de crecimiento de <i>Candida</i> spp.	58
28. Curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida parapsilosis</i> en cuenta directa en cámara Neubauer.	59
29. Curva de crecimiento y viabilidad de colonias de <i>Candida albican</i> y <i>Candida glabrata</i> por espectofotometría.	60
30. Muestras de Chromoagar candida en curva de competencia en diferentes diluciones.	62
31. Porcentaje total de especies encontradas de pacientes odontológicos sanos y diabéticos.	63
32. Comparación y combinación de coexistencias de una o más especies entre pacientes odontológicos sanos y diabéticos	64
33. Porcentaje de prevalencia en cada especie según las concentraciones de glucosa a concentraciones de 110 a 150n mg/dl en pacientes diabéticos y pacientes.	65
34. Porcentaje de prevalencia en especies del genero <i>Candida</i> según los índices de glucosa en pacientes diabéticos.	66
35. Diferencias significativas en relación con el índice de apariciónde cada especie.	66
36. PCR multiplex de pacientes odontológicos sanos.	67
37. PCR multiplex de pacientes odontológicos sanos.	68
38. PCR multiplex de pacientes odontológicos sanos.	69

39. PCR multiplex de pacientes odontológicos diabéticos.	70
40. PCR multiplex de pacientes odontológicos diabéticos.	71
41. PCR multiplex de pacientes odontológicos diabéticos.	72
42. PCR multiplex de pacientes odontológicos diabéticos.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
ADN	Ácido Desoxiribonucléico
°C	Grados Celsius
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G	Glucosa
h	Hora
Kb	Kilobase
Mm	Milimolar
Min	Minuto
Mg	Miligramos
M	Maltosa
MgCl	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitro
RNA	Ácido ribonucleico
NaCl	Cloruro de sodio
rpm	Revoluciones por minuto
RFLPs	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción genómica
seg	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
S	Sacarosa
TE	Buffer Tris-EDTA
µg	Microgramo
µl	Microlitro
VIH	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
YPDA	Agar, Dextrosa, peptona, extracto de levadura

YPD

Yeast Peptone Dextrose

LISTA DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINAS
1. Carta de consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la UANL.	80
2. Base de datos de muestras obtenidas en pacientes odontológicos sanos donde se muestran diferentes especies encontradas para el análisis microbiológico.	81
3. Base de datos de muestras obtenidas en pacientes diabéticos donde se muestran diferentes especies encontradas para el análisis microbiológico.	83
4. Resultados de especies encontradas por PCR multiplex en pacientes odontológicos sanos.	84
5. Resultados de especies encontradas por PCR multiplex en pacientes diabéticos.	86
6. Concentraciones de glucosa en (ng/wl) de muestra de DNA de pacientes diabéticos	88

1. RESUMEN

Las candidiasis están consideradas como una de las principales agentes causales de micosis en el humano, se presenta como infección por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida* que producen manifestaciones agudas, subagudas o crónicas. Se han reportado *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* como especies patógenas de este género por citar algunas las cuales colonizan superficies mucosas de la cavidad oral, y en pacientes inmunosuprimidos. Se puede decir que un individuo es susceptible a infecciones por *Candida spp.* cuando tiene una enfermedad que disminuye la eficiencia de su sistema inmune o metabólico y una de las enfermedades más frecuente de este tipo es la Diabetes *mellitus* que es un conjunto de trastornos metabólicos que afectan diferentes órganos y tejidos, es incurable y se caracteriza por el aumento de los niveles de glucosa en sangre. Se ha reportado que los pacientes con Diabetes *mellitus* son más propensos a desarrollar lesiones comunes de los tejidos blandos de la boca causada por hongos (Candidiasis). En el presente estudio se realizó una caracterización de las especies de *Candida* mas en pacientes odontológicos sanos y pacientes con diabetes mellitus; además comparamos la eficiencia de un sistema de identificación de diferentes especies de candida por PCR multiplex para detectar las especies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* entre los sujetos sanos y los pacientes con DM, con respecto a un método microbiológico estandarizado. Encontramos que realizando una comparación para determinar la presencia de cada una de las especies en los dos grupos existe una mayor incidencia de aislamiento de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* en sujetos sanos ($p < 0.05$), en comparación con el grupo de pacientes diabéticos. Por otro lado se observo que la presencia de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* es dependiente ($p < 0.05$), de la concentración de glucosa en sangre en pacientes diabéticos cuando ésta se encuentran en un rango mayor de 150mg/dl. Al comparar los métodos de detección de *Candida spp.* no se encontró una correlación significativa entre el PCR multiplex y el método tradicional, esto debido a que se realizo el análisis con muestras mixtas y el método de PCR multiplex no logra diferenciar la especie de *C. parapsilosis* ya que no presenta una banda diferencial entre las demás especies de interés; pero es eficiente para la identificación de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, ya que gracias a su bajo costo en comparación con los métodos tradicionales, y su reducción en tiempos de trabajo nos ofrece resultados más rápidos y eficientes.

1.1 ABSTRACT

The candidiasis are considered one of the major causative agents of mycosis in humans, is presented as an endogenous and opportunistic yeast infection of the *Candida* species that produce acute, subacute or chronic manifestations. *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, have been reported as pathogenic species of this the genre, to name a few, which colonize mucosal surfaces of the oral cavity, and in immunosuppressed patients. One can say that an individual is susceptible to infection by *Candida* spp. when you have a disease that decreases the efficiency of your immune or metabolic system, and one of the most common of these diseases is diabetes *mellitus* which is a group of metabolic disorders that affect different organs and tissues, is incurable and is characterized by increased levels of glucose in blood. It has been reported that patients with diabetes mellitus are more likely to develop common injuries of soft tissues of the mouth caused by fungi (*Candida*). In the present study, we performed a characterization of *Candida* species plus in healthy dental patients and patients with diabetes *mellitus*, we also compared the efficiency of a system of identification of *Candida* species by PCR multiplex to detect the species *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* between healthy subjects and patients with DM, with respect to a standard microbiological method. We found that by performing a comparison to determine the presence of each of the species in both groups there is a higher incidence of isolation of *C. glabrata* and *C. parapsilosis* in healthy subjects ($p < 0.05$), compared to the diabetic group. On the other hand it was observed that the presence of *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* is dependent ($p < 0.05$) of blood glucose concentration in diabetic patients when it is in a range greater than 150mg/dl. By comparing the detection methods of *Candida* spp. we found no significant correlation between the multiplex PCR and the traditional method, because this analysis was performed with mixed samples and the multiplex PCR method fails to differentiate the species of *C. parapsilosis* since it does not have a differential band among the other species of interest, but is efficient for identification of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, and thanks to its low cost compared to traditional methods, and the reduction in working time, offers faster and more efficient results.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Candidiasis

2.1.1 Generalidades.

Las enfermedades infecciosas causadas por hongos son conocidas como micosis, y se nombran de acuerdo al microorganismo causal o al órgano o tejido que se está afectando. Existen algunas micosis de origen endógeno, que son producidas por hongos comensales en el hospedero hasta que ocurre un desequilibrio que permite al microorganismo volverse patógeno (ej. pacientes inmunocomprometidos).

Varias especies del género *Candida* están consideradas como las principales agentes causales de micosis en el humano, se presenta como infección por levaduras endógenas y oportunistas que producen manifestaciones agudas, subagudas o crónicas. Las manifestaciones pueden ser localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar tanto a la piel, como a las mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Éstas se clasifican en dos grupos, las candidiasis mucocutáneas y las sistémicas o profundas (Calvo, *et al.*, 2001).

2.2 Candidiasis como flora normal de la boca

La candidiasis es una infección producida por especies de levaduras pertenecientes al género *Cándida*. Estas especies colonizan superficies mucosas de la cavidad oral, mucosa vaginal y del tubo digestivo, además pueden causar una variedad de infecciones, dependiendo de la naturaleza del estado de supresión del hospedero (Molero *et al.*, 1998). *Candida* es una especie comúnmente encontrada colonizando en la cavidad oral pero existen otras especies patógenas como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*.

2.3 *Candida* como agente causal de candidiasis oral

Las especies de *Candida* son las responsables del 78% de las infecciones fúngicas nosocomiales. Además el sistema de vigilancia nacional en infecciones nosocomiales reporta que *Candida* es el cuarto microorganismo patógeno más común encontrado en sépsis nosocomiales y

emerge como el patógeno más importante que causa infecciones en el torrente sanguíneo. (Serhat M. *et al.*, 2009).

2.4 Epidemiología de especies de *Cándida*

La candidiasis es una enfermedad que afecta a la población mundial que afecta indiscriminadamente a individuos de cualquier raza, o posición económica, pero se observa una alta prevalencia en mujeres; este último debido a los cambios hormonales que se presentan en las mujeres embarazadas o con algún otro problema hormonal, los factores geográficos (clima, humedad, lluvia), juegan un papel muy importante en su aparición y en las especies que la producen (Colombo *et al.*; 2006).

C. albicans es el agente etiológico más importante de la candidiasis oral, se aísla en pacientes que reciben tratamiento paliativo en cáncer avanzado; esto debido a la inmunosupresión y la xerostomía presentes que hacen al paciente vulnerable a la invasión de estos microorganismos; se presenta en el 54.5% de personas en el noreste de este país (Edmond *et al.*; 1999). Es considerada la más patógena y prevalente ya que es capaz de invadir tejidos y evadir la fagocitosis; lo cual denota un arsenal amplio de factores de virulencia que se manifiestan en infecciones en tejidos profundos. Existe una fuerte correlación entre la presencia de diferentes enzimas y el potencial de patogenicidad de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*. Todas las levaduras patógenas de este género tienen características macro y microscópicas muy semejantes, por lo que se requiere de procedimientos de laboratorio especiales para su identificación. (Salas *et al.*, 2003).

La razón del cambio epidemiológico que está provocando esta emergencia no está clara, pero se ha sugerido que la reducida sensibilidad de estas especies a los antifúngicos utilizados comúnmente como el fluconazol puede haber llevado a su selección. (Bagg J. *et al.*; 2003).

En los últimos 10 años se ha demostrado un incremento en la incidencia de otras especies del género *Candida* entre las que destacan *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (Mendoza *et al.*, 1999, García *et al.*, 2006, Lobaina *et al.*, 2009). Además el interés que genera el aumento

en la incidencia de las infecciones causadas por estas levaduras poseen factores de patogenicidad y virulencia por lo cual es de gran interés para su investigación (Pfaller M, *et al.*, 2007)

Uno de los principales factores de virulencia de la mayoría de estas especies son la formación de biofilms el cual tiene como característica principal ocasionar una alta resistencia en contra de las drogas antimicrobianas; se ha reportado que en estudios *in vitro* todas estas especies poseen un bajo contenido de ergosterol en comparación con células encontradas en cultivo líquidos. Además estas células en los biofilms expresan genes que codifican un determinante flujo de drogas incluyendo CDR1 y CDR2. Todos estos factores podrían contribuir a los altos niveles de resistencia en la formación de biofilms ante los diferentes antifúngicos (Bruzual *et al.*; 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Existen especies de *Candida* que son invasivas y resistentes a ciertos antifúngicos tal es el caso de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, y hoy en día no existe a nuestro saber que especies de *Candida spp.* que se encuentran en la cavidad oral en personas del norte del país. El tipo de especie que se encuentre colonizando a un individuo puede predisponer a pacientes con estados metabólicos alterados como la diabetes *mellitus*, pacientes con VIH, cáncer y pacientes con trasplantes a desarrollar infecciones fúngicas debido a cambios fisiológicos a nivel oral ocurridos como la xerostomía y otros tipos de afecciones, comunes en pacientes inmunosuprimidos. Es importante conocer las especies de *Candida spp.* circulantes en la cavidad oral de sujetos sanos y pacientes diabéticos además de sus diferencias ya que al momento de que ocurren estos cambios metabólicos en este tipo de pacientes podemos predeterminar el grado de susceptibilidad y/o riesgo de otro tipo de infecciones bucales. Actualmente en México el 14.9% de las personas padecen de obesidad; por lo tanto correrán mayor riesgo de padecer diabetes *mellitus* por tal motivo la importancia de validar métodos rápidos de detección como el PCR multiplex de estas especies de una manera rápida y eficaz, con respecto a métodos microbiológicos permitirá al personal del área médica ofrecer a sus pacientes un mejor tratamiento medicamentoso para atacar eficazmente este tipo de infecciones y evitar así la pérdida prematura de las piezas dentales y desarrollo de complicaciones en diferentes tratamientos dentales como exodoncias, tratamientos periodontales, etc. Además de contribuir a mejorar el estado de salud en general del paciente.

4. HIPOTESIS

Los pacientes con diabetes *mellitus* presentan mayor diversidad y número de especies de *Candida* spp. como parte de su flora normal en cavidad oral que en sujetos sanos y ésta diversidad puede ser caracterizada mediante PCR multiplex.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la prevalencia de las especies de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*. en la cavidad oral de pacientes odontológicos no diabéticos y pacientes con diabetes *mellitus* (DM) en el área metropolitana de Monterrey Nuevo León.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificación mediante métodos microbiológicos (CHROMagar Candida) las especies de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, presentes en cavidad oral de pacientes odontológicos sanos y pacientes con DM.
- Identificación las especies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis* mediante PCR multiplex, presentes de la cavidad oral en sujetos sanos y pacientes con DM.
- Comparación del método de PCR multiplex mediante la comparación de los resultados de las especies de *Candida* spp. con los encontrados mediante crecimiento en CHROMAGAR candida.

6. ANTECEDENTES

6.1 Hongos

Los hongos tienen una distribución mundial y crecen en una gran variedad de hábitats, incluyendo los ambientes extremos. Se han descrito alrededor de 100,000 especies de hongos, pero la biodiversidad del reino fungi aún no se conoce totalmente (Muller, 2007). Los hongos son un grupo de microorganismos eucariotas que incluyen a las levaduras, los mohos, así como las setas (macromicetos) (Bial, *et al.*, 2002). Son productores de esporas, y su reproducción puede ser sexual y/o asexual. (López *et al.*; 2010).

Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme por lo general dan lugar a colonias lisas en medios de cultivo sólido, las cuales son agregados de células individuales a los que se les denomina levaduras (Bial *et al.*, 2002). Existen alrededor de 1,500 especies de levaduras descritas. La mayoría se reproduce asexualmente por gemación, sin embargo, algunas lo hacen por fisión binaria. Aunque son microorganismos unicelulares, algunas especies pueden ser multicelulares a través de la formación de pseudohifa. El tamaño de la levadura varía entre especies, típicamente miden entre 3 y 4 μm de diámetro, pero puede haber algunas especies que alcancen los 40 μm . (Larone *et al.*, 2002).

6.1.1 El género *Candida*

La clasificación taxonómica de *Candida* se muestra de la siguiente manera:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Saccharomycotina

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Candida*

Estas especies forman células levaduriformes por gemación, llamadas blastoconidias (3-6 μm de diámetro).

Actualmente se sabe que estos microorganismos colonizan la mucosa digestiva y pasan al torrente sanguíneo mediante un proceso de traslocación gastrointestinal o a través de catéteres vasculares contaminados, interaccionan con las defensas del organismo anfitrión y pueden abandonar el compartimento intravascular para invadir tejidos profundos de distintos órganos diana. Se cree que la capacidad de adhesión a distintos tejidos se lleva a cabo por la combinación de mecanismos específicos (interacción de un ligando con su receptor) e inespecíficos (fuerzas electrostáticas de van der Waals). Algunas especies de *Candida* secretan aspartil-proteinasas que hidrolizan proteínas pertenecientes a las defensas del organismo anfitrión frente a la infección (Murray *et al.*, 2006).

Este género comprende un grupo de levaduras sumamente ubicuas y con características muy diversas. Abarca más de 160 especies, de las cuales se considera que sólo 18 son patógenas, como fue determinado por un estudio de aislamientos a partir de pacientes clínicos provenientes del Servicio de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Rosario en Argentina, el potencial patógeno de las levaduras varía en forma considerable, dependiendo de la especie siendo el microorganismo más virulento *Candida albicans*, la cual es la especie del género capaz de generar con mayor frecuencia enfermedades que resultan mortales en seres humanos. *C. tropicalis* es la segunda levadura de importancia en cuanto a su patogenicidad. *C. parapsilosis* también aparece con cierto grado de virulencia, asociada a micosis oportunistas. Por otra parte, no todas las cepas de una misma especie presentan igual capacidad patogénica. Otras especies de *Candida* causan algunas infecciones, pero la debilidad del huésped debe ser muy marcada para permitir que estos microorganismos menos virulentos lo invadan. (López *et al.*, 2005).

En el sentido más estricto de la palabra, no existen levaduras patógenas por naturaleza; las que están relacionadas con enfermedad en el hombre o animales, son incapaces de producir infección en un individuo sano. Se deben presentar algunas alteraciones en las defensas celulares

del huésped, en la fisiología, o en la composición de la flora normal para que pueda producirse la colonización, infección y la enfermedad por levaduras.(López *et al.*,2005).

6.2 Las especies de *Candida*

6.2.1 *Candida albicans*

Es el agente causal más común de candidiasis. Es una levadura de redonda a oval (3.5-7 X 4-8 μm) que forma pseudohifas e hifas verdaderas, además de clamidoconidias numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16 μm de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales ubicadas sobre blastoconidios ovalados con colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura y tubo germinativo. Las colonias son blancas cremosas con un crecimiento de aproximadamente 3 días en medio Sabouraud a 37°C. En medio agar Staib desarrolla colonias lisas y brillantes microscópicamente se observan blastoconidias e hifas. (Mesa *et al.*, 2004; López 2010). Por otro lado se pueden observar numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16 μm de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales ubicadas sobre blastoconidios ovalados con colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura. (Aristegui *et al.*, 2005).

6.2.2 *Candida glabrata*

En la última década ha sido considerada como un patógeno emergente tras aislarse de pacientes con vaginitis o con infecciones de otra localización, incluyendo orina, esputo y secreción traqueal, sangre y heridas. Además esta especie es menos sensible a los antifúngicos derivados de los azoles, siendo por ello más difícil de erradicar. Estas células ovals miden 2-3 X 4-5 μm y no se han observado pseudohifas. Las colonias son de color blanco a crema, pastosas y lisas con un crecimiento de 3 a 5 días en medio Sabouraud a 37°C.(Rivera *et al.*,2006; López *et al.*, 2010).

6.2.3 *Candida tropicalis*

Es causante de infecciones en pacientes inmunosuprimidos y particularmente más virulenta en pacientes con leucemia o enfermedades similares. Se adhiere pobremente a las células de la piel, no se considera invasor del estrato corneo pero se sabe que puede invadir tejidos más profundos de este. Son levaduras redondas de 3.5-7 X 5.5-10 μm , que pueden formar blastoconidias únicas o en pequeños grupos y pseudohifas largas. Raramente produce clamidosporas en forma de gota y las colonias son cremosas con bordes que pueden ser rugosos o tener una franja micelial ligera (López *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 1989).

6.2.4 *Candida parapsilosis*

Son levaduras ovales de 3 X 8 μm y forman colonias cremosas que en ocasiones desarrollan un aspecto rugoso. Afecta principalmente a enfermos neonatos en las unidades de cuidados intensivos ya que está relacionado directamente con válvulas protésicas del corazón y catéteres en diálisis peritoneales. Ha ocasionado brotes en hospitales en los mismos trabajadores de la salud ya que se ha aislado de manos y uñas, un factor crucial en la colonización y transmisión de este microorganismo incluye la secreción de proteinasa aspartática; además de la adhesión en el instrumental médico y su habilidad de formación de biofilms (Lasker *et al.*, 2006; Kuhn *et al.*, 2004., López *et al.*, 2010).

A pesar de que *C. albicans* es la especie del género *Candida* que se aísla con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas, en los últimos años se ha informado la emergencia de otras especies de *Candida* como agentes infecciosos. Aunque las razones de esta emergencia no están totalmente definidas, se ha sugerido que un factor importante podría ser la carencia relativa de sensibilidad a fluconazol y otros azoles, administrados corrientemente para el tratamiento de infecciones ocasionadas por estos microorganismos. Se ha observado que en muestras de sangre a nivel intrahospitalaria *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* pueden ser de 4 a 32 veces menos sensibles a fluconazol que *C. albicans* (López *et al.*, 2005, Price *et al.*, 1994).

Las infecciones fúngicas ocasionadas por levaduras son muy frecuentes en las últimas décadas y *Candida* spp. está en el cuarto lugar entre los microorganismos aislados de hemocultivos en Estados Unidos y el quinto en España; como agente etiológico de sépsis *C. albicans* causa el 50-60% de los candidemias seguida de *C. parapsilosis* (10-20%) y *C. tropicalis* (6-7%). En Argentina las fungémiás causadas por levaduras han sido predominantes entre un (33-76%), entre las infecciones sistémicas oportunistas y las formas invasoras presentan una elevada mortalidad constituyendo un grave problema de salud pública. (Davel *et al.*, 2007; Pfaller *et al.*, 1998; Alfonso *et al.*, 2010).

Existen otras levaduras que no pertenecen precisamente al género de *Candida* pero que se llegan a encontrar en cavidad oral tales como *Rhodotorula glutinis*, y *Saccharomyces cerevisiae* pero a la fecha no se conoce si cause infecciones orales. Todas las especies de *Candida* pueden provocar el mismo tipo de mucositis pero pueden tener diferencias en la invasividad y resistencia a antifúngicos. Las infecciones producidas por levaduras se han incrementado paralelamente con el aumento de patologías tales como Diabetes, Sida, trasplantes de medula ósea o de órganos sólidos, internaciones prolongadas en unidad de cuidados intensivos, cirugías abdominales, tratamientos con antibióticos, corticoides, quimioterapias u otras drogas. (Meurman *et al.*, 2007).

Las especies patógenas de *Candida* comparten varias características microscópicas y fenotípicas que las hacen similares entre sí, con lo que se puede llegar a una identificación presuntiva del género de la levadura. Sin embargo también presentan ciertas particularidades, principalmente a nivel molecular, que facilitan su identificación a nivel de especie. (Alfonso *et al.*, 2010).

Tabla 1. Principales características morfológicas, metabólicas y diferenciales entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*

Característica	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Blastoconidios (µm)	3-7 X 3-14	2.5-4.5 X 4-6	3.5-7 X 5.5-10	3-4 X 5-8
Pseudohifas	+	-	+	+
Clamidoconidias	+	-	+/-	+
Número de cromosomas	7-9, diploide	11, haploide	5-6, diploide	14, diploide
Asimilación de azúcares	G,S,M,T,GAL	G,T,A	M,T,GAL	M,T,GAL
Color en medios cromogénicos				
CHROMagar®	Verde	Lila-Purpura	Azul	Rosa pálido
Candida ID®	Azul	Blanco	Rosa	Blanco
Crecimiento en ciclohexamida 0.1%	+/-	-	-	-
Virulencia	+++	+	++	+
Experimental Resistencia a triazoles	+	+++	+	+

Se muestran con letras, G=glucosa, S=sacarosa, M=maltosa, T=trehalosa, GAL= galactosa, A= arabinosa; + positivo, - negativo, +/- ocasional. Modificado de Buitrón-García *et al.*, 2009.

6.3 Candidiasis

Candida forma parte de la flora normal en la mayoría de la gente; en el recién nacido por lo general ocurre la colonización de la madre por la flora vaginal al momento de pasar por el canal del parto o de otras fuentes exógenas. (Meurman *et al.*, 2007).

Las candidiasis están consideradas como uno de los principales agentes causales de micosis en el humano, se presenta como infección por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida* que producen manifestaciones agudas, subagudas o crónicas. Las manifestaciones pueden ser localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar tanto a la piel, como a las mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Estas se clasifican en dos grupos, las candidiasis mucocutáneas y las sistémicas o profundas (Calvo, *et al.*, 2001).

Frecuentemente se pueden encontrar las candidosis; estas son las infecciones micóticas orales más frecuentes y fue la afectación oral por *Candida* la primera forma clínica descrita históricamente. Actualmente su incidencia está en aumento en los países desarrollados debido a diferentes factores facilitadores como la generalización del uso de prótesis dentales, la xerostomía, las múltiples terapias con antibióticos, inmunosupresores, antineoplásicos, etc., e incluso la mayor supervivencia de los pacientes con inmunodeficiencias. De estar clásicamente asociada a la infancia y a la ancianidad, esta enfermedad ha pasado a ser una manifestación común en otros grupos de pacientes como los infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o los sometidos a terapias inmunomoduladoras o antineoplásicas. La candidiasis oral, fue descrita como enfermedad asociada en el primer caso de SIDA publicado, y constituye la infección fúngica más frecuente en los pacientes VIH (+). Se considera que hasta un 90% de los individuos infectados por VIH sufrirán al menos un episodio de candidiasis orofaríngea. De un modo general la candidiasis oral puede ser definida como "la enfermedad del paciente enfermo", ya que siempre va a precisar de uno o varios factores facilitadores para poder provocar patología en la boca. Las especies de *Candida* son ubicuas y dentro de ellas es *Candida albicans* la que más comúnmente produce las infecciones orales, aunque también se han descrito otras como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, etc. y recientemente *Candida*

dublinsiensis, específicamente en los pacientes infectados por VIH, y que es importante ya que está involucrada en los casos de resistencias a los antifúngicos.(Aguirre *et al.*, 2002).

6.4 *Candida* como agente causal de candidiasis oral

Candida vive en equilibrio con otros miembros de la microbiota oral, su transformación en patógeno depende tanto de la alteración de los mecanismos defensivos de la persona colonizada como el complejo potencial de factores de virulencia del hongo. Tabla 2. Entre los factores que facilitan la infección candidiásica destacan a) la cantidad y el tipo de saliva (ej., sequedad oral o gran humedad en las comisuras labiales), (b la dieta por ejemplo ferropenia o avitaminosis), c) el pH, d) la temperatura (36°C); e) la presencia de algunas bacterias o de prótesis dental, ya que el material acrílico de las prótesis extraíbles es un producto fácilmente colonizable; f) el tratamiento con antibiótico y g) los corticoesteroides y cualquier tipo de inmunodepresión primaria o adquirida (Liébana 2002). Estas especies son las responsables del 78% de las infecciones fúngicas nosocomiales, Además el sistema de vigilancia nacional en infecciones nosocomiales en USA reporta que *Candida* es el 4to microorganismo patógeno más común encontrado en sepsis nosocomiales, y emerge como el patógeno mas importante que causa infecciones en el torrente sanguíneo (Serhat M. *et al.*, 2009).

Estos microorganismos poseen un sistema de adhesión que le confieren la propiedad de permanecer en lugares expuestos a corrientes constantes; en el caso de la cavidad oral, la acción mecánica de la saliva es un potente mecanismo de defensa que arrastra las levaduras en un intento de impedir la colonización (Liébana 2002).

Factores predisponentes	Mecanismos	Moléculas
Alteraciones endócrinas: Diabetes mellitus, hiposuprarrenalismo, hipoparatiroidismo.	Especies de <i>Candida</i> y cepas involucradas	Hidrolasas extracelulares: proteasas y fosfolipasas
Inmunodeficiencias primarias	Adherencia/Pared celular	Toxinas asesinas
Alteraciones leucocitarias: Neutropenia/leucopenia, agranulocitosis, carencia de mieloperoxidasa	Dimorfismo/Formacion de hifas	Nitrosaminas
Inmunodeficiencias adquiridas (SIDA)	Variabilidad del fenotipo	Metabolitos ácidos
Estados nutricionales, carencias o alterados: malnutrición , malabsorción, carencia de hierro y folatos, dietas ricas en hidratos de carbono	Persorción	
Neoplasias: Leucemia, linfoma, timoma	Interferencia en la fagocitosis, complemento y respuesta inmunitaria	
Fármacos: Antibióticos de amplio espectro, corticosteroides (en aerosol), inmunodepresores, citostáticos, y antimetabolitos	Sinergia con bacterias otros microorganismos orales	
Alteraciones locales en la cavidad oral: Irritantes crónicos locales, prótesis mal ajustada, higiene oral inadecuada, xerostomía, displasia epitelial, tabaquismo, radioterapia de cabeza y cuello		

Tabla 2. Factores predisponentes de la candidiasis oral y posibles mecanismos de virulencia. Liébana J. 2002. Microbiología Oral 2da Edición.

Las candidiasis oral es una de las patologías que se observan con mayor frecuencia en la práctica diaria; es una enfermedad oportunista ya que algunos factores pueden alterar el equilibrio en el ecosistema microbiano de la cavidad oral. A pesar de que *Candida albicans* es el agente responsable de infecciones por levaduras; de igual manera otras especies de *Candida* no-*albicans* como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, se han observado y asociado con este tipo de infecciones y desordenes metabólicos tales como la Diabetes Mellitus (Liguori *et al.*, 2009).

Mecanismo	Adhesina (en <i>Candida</i>)	Receptor o ligando	Superficie
Hidrofobicidad	Proteínas de superficie	Superficies hidrófobas	Células epiteliales, materiales dentales
Proteína-proteína	Proteínas de superficie similares a integrinas	Complemento, polipéptidos con la secuencia Arg-Gly-Asp: fibronectina C3d, proteínas de la matriz extracelular: fibrinógeno, colágeno, laminina, fibronectina, entactina...	Células epiteliales, matriz extracelular, endotelios, sangre
Tipo lectina	Proteínas de superficie	Residuos de fucosa o N-acetilglucosamina en las glucoproteínas humanas	Células epiteliales
		Polisacáridos de los estreptococos orales	Células epiteliales colonizadas ¿placa dental?
	Manoproteínas fibrilares	Receptores glucoesfingolípidos	Células epiteliales
Por definir	Desconocidas	Glucoesfingolípidos	
	Manoproteínas de la pared celular	Desconocido	Macrófagos

Tabla 3. Mecanismos principales de adherencia de *Candida*.
Liebana J. 2002. Microbiología Oral 2da Edicion.

Los principales factores predisponentes asociados al incremento de infección por candidiasis en infecciones bucofaríngeas son: Edades extremas entre 50 y 70 años de edad, el uso de dentaduras postizas, Diabetes *mellitus*, uso de antibióticos, radioterapia para el cáncer de cabeza y cuello, esteroides inhalados y sistémicos, quimioterapia citotóxica, infección por VIH, neoplasias hematológicas, trasplante de progenitores hematopoyéticos u órganos sólido (Dignani *et al.*, 2003).

6.5 Epidemiología de especies de *Cándida*

Las especies del género *Candida* colonizan el ser humano por lo que se encuentran en las personas como en los ambientes naturales. El lugar primario de colonización es el tubo digestivo desde la cavidad bucal hasta el recto. También se desarrollan como comensales en la vagina y la uretra, la piel, y bajo las uñas del pie y la mano. Se estima que entre un 25% y un 50% de las personas sanas porta alguna especie de *Candida* en la microflora normal de la cavidad bucal; *C. albicans* representaría entre un 70% y un 80% de las cepas. Las tasas en los portadores son significativamente mayores en la población Diabética, sujetos infectados con VIH (Murray *et al.*, 2006).

Entre las distintas especies de *Candida* con capacidad de infectar al ser humano, (Tabla 3, Figura 1). *C. albicans* predomina en casi todos los tipos de infección. Esta especie suele estar implicada en casi todas las infecciones genitales, cutáneas y bucales. Aunque *Candida albicans* suele ser la especie predominante, la frecuencia de aislamiento de cada especie de *Candida* varía considerablemente en función de edad del paciente, y la situación local y global. Tabla 4.

Especie	% de cepas por año					
	1992 (235)	1995(332)	1997(413)	1999(320)	2001(2770)	2003(1715)
<i>C. albicans</i>	44.3	53.3	54	54.7	59.8	65.1
<i>C. glabrata</i>	16.6	20.5	15.3	15.3	16.4	14.2
<i>C. parapsilosis</i>	21.7	9	18.9	10.3	10.7	9.3
<i>C. tropicalis</i>	11.9	11.4	7	11.9	7.9	6.9
<i>C. krusei</i>	2.6	4.2	1.7	2.8	2.7	2.7
<i>C. lusitane</i>	2.1	0.6	0	2.2	1.3	0.4
<i>C. guilliermondii</i>	0.4	0.4	1.9	0.9	0.6	0.3

Tabla 4. Distribución por año y especies de cepas encontradas de *Candida* implicadas en infecciones septicémicas: datos procedentes del Global Antifungal Surveillance Program, 1992-2003. Pfaller MA *et al.*, 2004).

Mientras que *C. albicans* y *C. parapsilosis* son especies imperantes en lactantes y niños, en las personas de mayor edad se observa una disminución de las infecciones por ambas especies en paralelo a un notable incremento de la frecuencia de *C. glabrata*. (Figura 1).

De igual modo aunque *C. albicans* es la especie dominante en el pacífico asiático, su frecuencia es menor en Latinoamérica, en la que *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son más frecuentes. (Tabla 5. Pfaller MA *et al.*, 2002; Pfaller MA *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2006).

Region	Numero de hospitales	Numero de cepas	% de cepas por especie					
			C. a	C. g	C. p	C. t	C. k	Otras
Asia-Pacífico	17	441	73.5	10.2	8.4	3.9	3.2	0.8
Europa	40	775	57.6	12.9	14.1	7.5	3.4	4.5
Latinoamérica	18	560	46.6	7.5	17.1	21.3	3.6	3.3
Canadá	8	623	58.9	20.1	10.3	5.9	2.4	2.4
EE. UU.	167	3683	54.4	18.3	13.2	9.6	2.1	2.4
Total	250	6082	55.9	16.2	13.1	9.6	2.5	2.7

Tabla 5. Distribución por especies a nivel nosocomial: *C.a*= *C. albicans*, *C.g*= *C. glabrata*, *C.t*= *C. tropicalis*, *C.p*= *C. parapsilosis* y región geográfica de cepas de *Candida* causantes de infecciones septicémicas. (Adoptado de Pfaller MA *et al.*, 2004).

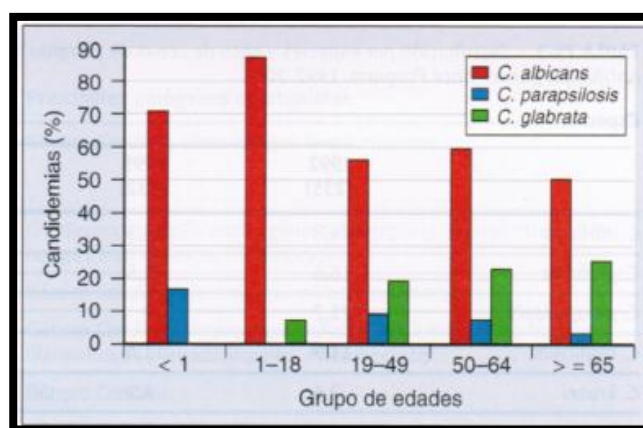


Figura 1. Porcentaje de candidemias en países europeos producidas por algunas especies de *Candida* en cada grupo de edades. (Pfaller MA *et al.*, 2002).

6.6 Métodos de identificación de especies de *Candida*.

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para identificar las especies de *Candida*, los cuales varían en cuanto a tiempo, especificidad, sensibilidad, y costos (Liébana; 2002, Arenas; 2008). De esta manera, cada laboratorio puede adoptar los más acordes a su capacidad y disponibilidad. Las técnicas de identificación más comúnmente utilizadas comprenden: 1. Estudio morfológico; 2. Pruebas rápidas; 3. Estudio fisiológico y bioquímico; 4. Métodos automatizados; 5. Medios diferenciales; 6. Métodos inmunológicos; 7. Biología molecular (Guilarte; 2009).

En epidemiología es muy importante en la identificación no solo del microorganismo en cuestión sino que muchas veces la identificación a nivel de cepas o razas ayuda a: 1.- Determinar el causante del brote infeccioso, 2.- Detectar la transmisión cruzada de patógenos, 3.- Determinar la fuente de infección, 4.-Reconocer cepas particularmente virulentas de organismos y 5.- Monitorear los programas de vacunación (Olive *et al*, 1999). En el área clínica y en la agricultura, la base para un tratamiento efectivo y cura de un paciente, animal o planta es el diagnóstico rápido de la enfermedad y su agente causal (Reischl, 1996).

6.7 Métodos de identificación microbiológica

El diagnóstico microbiológico es un paso esencial en el establecimiento de la etiología de las enfermedades infecciosas y aunque su característica fundamental es la identificación del agente etiológico, en la actualidad incluye también la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos y el uso de métodos de tipado que permitan la diferenciación intraespecífica de los aislamientos. Siempre que sea posible, la identificación de los aislamientos fúngicos debe de realizarse a nivel de especie, ya que esta información puede ser muy importante para orientar el tratamiento antifúngico hasta que se dispongan de los resultados de sensibilidad *in vitro* (Ponton *et al.*, 2002).

6.7.1 Observación microscópica

La observación microscópica directa de toda muestra remitida para su estudio micológico es una técnica sencilla y recomendable, ya que permite el diagnóstico presuntivo en muchas ocasiones. Se puede realizar en fresco, para facilitar la visión de las levaduras y pseudomicelios de *Candida*; también pueden emplearse tinciones histológicas como PAS o metenaminaplata para observar mejor la morfología fúngica en los tejidos obtenidos por biopsias (Liébana; 2002). El mayor tamaño de las células fúngicas permite, a diferencia de las bacterias, su observación a bajos aumentos en las muestras sin fijar, lo que permite un diagnóstico presuntivo del agente etiológico (Castro *et al.*, 2005).

Otro método microscópico para la identificación inicial, son las tinciones, como la de Gram, donde las levaduras aparecen como Gram positivas, con las cuales se puede visualizar más rápidamente algunas estructuras específicas de los hongos. Las ventajas que presentan las tinciones son que el procedimiento es rápido, fiable y de bajo costo y permite diferenciar algunos hongos por su morfología (López *et al.*, 2010).

6.7.2 Métodos basados en cultivo

El cultivo de la muestra clínica es el método más utilizado en el diagnóstico de las micosis, ya que una vez aislado el hongo puede realizarse la identificación a nivel de especie, los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y los estudios de caracterización intraespecífica. Como contrapartida a sus grandes ventajas, es el diagnóstico más lento, ya que, suele dar resultados después de 24 h, porque hay que sumar al tiempo necesario para que crezca el hongo el que se requiere para la identificación. El tiempo de crecimiento fúngico está genéticamente determinado y puede variar desde unas pocas horas a varios días.(Pontón *et al.*, 2002).

Gracias al estudio por medio de cultivo nos ayuda a establecer la etiología y efectuar pruebas complementarias para la identificación de la especie (sensibilidad a los antifúngicos, estudio de tipificación molecular, entre otros). La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivo usados rutinariamente en el

laboratorio de microbiología (agar sangre, agar chocolate, agar Cled, etc.). El agar glucosado de Sabouraud (SDA Sabouraud Dextrose Agar por sus siglas en inglés), con o sin antibióticos añadidos (cloranfenicol o gentamicina), es el medio de aislamiento utilizado principalmente para la identificación de levaduras. (López *et al.*, 2010)

Otros medios de cultivo son los cromogénicos, cuyo fundamento se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante hidrólisis específica de sustrato cromogénico en presencia de un indicador. Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos. Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación, después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales. El medio CHROMagar se utiliza para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida* permiten una directa y rápida identificación de *Candida albicans* y de otras especies de *Candida*. (Sayyada *et al.*, 2010). Este medio permite diferenciar colonias de *C. albicans* (lisas y de color verde esmeralda), *C. dublinensis* (colonia lisa, verde oscuro y no crece a 45°C), *C. tropicalis* (lisa, azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea), *C. krusei* (colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco), *C. glabrata* (colonias brillantes y cremosas de color violeta). (López *et al.*, 2010).

6.8 Métodos de identificación molecular

Dado que muchas de las especies de *Candida* clínicamente relevantes son anamorfos y carecen de características sexuales, que son las principales características morfológicas en que se basa la clasificación de hongos, la taxonomía de este grupo heterogéneo de levaduras en base a características morfológicas es subjetiva. Como en otros ámbitos de la microbiología, también en la micología se han establecido modernos métodos de diagnóstico por biología molecular. Un rápido ensayo para la identificación de especies de *Candida* se basa en la reacción de polimerización en cadena (PCR) (Bartie *et al.*, 2001). Para este género son estudiados diferentes genes blanco, teniendo en cuenta la especificidad y sensibilidad.

Existen métodos para la identificación de especies del género *Candida* basados en la variación genética. Estos métodos son: análisis de diferencias cariotípicas electroforéticas y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción genómica (RFLPs) usando electroforesis en gel e hibridación ADN-ADN, respectivamente. El análisis cariotípico-electroforético ha progresado con el desarrollo de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), que resuelve fragmentos de ADN de más de 50 kb sometiéndolos a un campo que alterna su dirección. Estas variaciones cariotípicas electroforéticas, tienen buen resultado para diferenciar muestras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei* (López *et al.*, 2005).

6.8.1 Técnicas basadas en hibridación de ADN

Las técnicas moleculares de hibridación, identificación de secuencias y amplificación de ácidos nucleicos se aplican a la detección y estudio de la resistencia. La estrategia básica consiste en detectar el gen de resistencia, en lugar de medir la expresión fenotípica de la resistencia. Las ventajas de estos métodos son la posibilidad de automatización y la rapidez de los resultados, pero como sucede con la mayoría de los métodos moleculares aun no son prácticos para su empleo habitual. Para su aplicación también se debe de considerar el hecho de que se limitan a los genes conocidos y que la expresión fenotípica es la última palabra (Ryan *et al.*, 2004).

Además estas técnicas se desarrollaron a partir del conocimiento de que dos cadenas sencillas de ácido nucléico que tengan secuencias complementarias se pueden unir o hibridar para formar una cadena doble. Las cadenas sencillas pueden ser de ADN o ARN, o bien una de ADN y otra de ARN. Dentro de las técnicas de hibridación más utilizadas esta los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's), (Ryan *et al.*, 2004).

6.8.2 RFLPs.

Esta técnica está basada en hibridación de ADN. Consiste en extraer ADN del cultivo puro de un microorganismo o bien de una muestra infectada y digerir el ADN con enzimas de

restricción (enzimas que cortan el ADN en sitios específicos), posteriormente estos fragmentos de ADN son separados en un gel de agarosa utilizando electroforesis.

Los métodos de tipificación basados en PCR huella digital de amplificación de secuencias repetitivas y no repetitivas, ofrecen la ventaja de una menor manipulación técnica respecto de las técnicas mencionadas anteriormente, sin embargo están relacionadas todavía con una falta de estandarización. En recientes años existen numerosos métodos basados en DNA por ejemplo, hibridación tipo Southern las cuales reportan el reconocimiento de especies de *Candida* en cultivos o en materiales de muestras clínicas. De igual manera estos métodos genotípicos resultan ser laboriosos y consumen demasiado tiempo además de requerir equipo y entrenamiento especializado. (Liguori *et al.*, 2009; López *et al.*, 2005).

6.9 Técnicas basadas en PCR

Esta es la técnica más utilizada para la detección de microorganismos, se basa principalmente en generar millones de copias de un segmento de ADN específico de un microorganismo. En esta técnica la cadena doble de ADN es separada en dos cadenas sencillas sometiéndola a temperaturas mayores a 92 grados centígrados después se hibridan en pequeños segmentos de ADN complementarios uno a una cadena y el otro a la otra (Herrera *et al.*, 2009). La precisión y reproducibilidad de los ensayos de PCR depende de la experiencia técnica del analista. La especificidad de la prueba puede ser afectada por la contaminación de la muestra durante su procesamiento. Si los iniciadores no son específicos o si las condiciones de la PCR no son óptimas, se pueden amplificar productos no específicos (Louie *et al.*, 2000).

6.9.1 PCR multiplex

Esta técnica permite la detección de diferentes microorganismos de interés en una sola reacción; presenta retos como el de diseñar todos los iniciadores que se deseen agregar a la reacción con similar temperatura de alineamiento, y la limitante de que no debe presentar homología entre ellos, además de amplificar fragmentos de diferentes longitudes. La sensibilidad de una PCR múltiple es del orden de 10^2 células o de 2.9 pg de ADN de interés. Sin

embargo esta sensibilidad puede ser afectada por el diseño ineficiente de los iniciadores (Rodríguez *et al.*, 2003).

En el caso de la identificación de las diferentes especies de *Candida* esta técnica ha emergido como una tecnología prometedora debido a su simplicidad, especificidad y sensibilidad, así como su capacidad para identificar todas las posibles especies de *Candida* en muestras biológicas. El método se basa en la variabilidad del tamaño de la región ITS1 en diferentes especies y en la amplificación de fragmentos específicos de ADN de la región ITS2 de *C. albicans*.

Con respecto a la detección de hongos como agentes causales de infección en distintas muestras clínicas, los blancos más estudiados son el gen que codifica el 18S rRNA y el ITS espaciador transcrito interno (Internal transcribed sequence por sus siglas en inglés), secuencias incluidas en el operón RNA ribosomal. Este operón tiene regiones altamente conservadas, que identifica a los hongos a nivel género y también incluye regiones hipervariables, lo que ayuda a realizar una identificación a nivel especie. (López *et al.*, 2010)

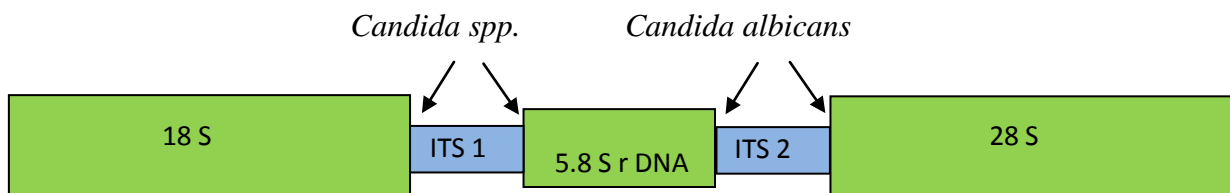


Diagrama de los sitios de hibridación de los primers ITS 1 e ITS2 Liguori 2009.

Además del cultivo, las técnicas actuales para el diagnóstico de la candidiasis invasiva incluyen los métodos inmunológicos (serología) y la detección de componentes no antigénicos estructurales o metabólicos como el ADN, el (1-3)- β -D-glucano y el D-arabinitol. Sin embargo, todas las técnicas empleadas poseen limitaciones y ninguna se puede utilizar con fiabilidad de forma habitual en los laboratorios de microbiología clínica (Moragues *et al.*, 2004).

6.10 Trastornos endocrinos relacionados con Diabetes *mellitus*.

El paciente diabético requiere tomar precauciones especiales antes de iniciar cualquier tipo de terapéutica; durante la última década el tratamiento médico de la diabetes ha cambiado de manera notoria gracias al esfuerzo por reducir al mínimo las complicaciones relacionadas con esta enfermedad. En el ámbito odontológico los signos intrabucales de diabetes no diagnosticada o mal controlada que se presentan son la polidipsia (sed excesiva), poliuria (exceso de orina), y polifagia (hambre voraz, a menudo con pérdida de peso inexplicable), (Liébana *et al*; 2007).

6.10.1 Diabetes *Mellitus*

La diabetes *mellitus* comprende un grupo de trastornos metabólicos con características clínicas diarias y genéticas heterogéneas que se manifiesta por una glucemia anormalmente elevada. La hiperglucemia es una consecuencia de la ausencia de secreción de insulina, debido a un mal funcionamiento de las células B pancreáticas, de la resistencia al efecto de la insulina en el hígado y la musculatura; o a una combinación de ambas circunstancias. Resulta frecuente que este trastorno metabólico se asocie a alteraciones en el metabolismo de los adipocitos (Bran *et al*; 2006). La diabetes puede considerarse como uno de los principales problemas de salud mundial, entre otras razones por su elevada prevalencia, su elevado costo económico y el número de muertes prematuras que provoca (Ruiz *et al*; 2006), resulta de defectos en la secreción y/o en acción de la insulina es decir es un síndrome, y en la actualidad se sabe que la hiperglucemia crónica termina por afectar a los distintos órganos como el corazón, los ojos, los riñones, los nervios y el sistema vascular. La clasificación actual de la diabetes se fundamenta en procesos fisiopatológicos de cada uno de los tipos de la enfermedad (Aschner *et al*; 2000; Bran *et al*; 2006).

6.10.2 Clasificación de la Diabetes

The National Diabetes Data Group, propone en 1979, una clasificación de la Diabetes *mellitus*, bajo el nombre de "Clasificación y Diagnóstico de la Diabetes *Mellitus* y Otras Categorías de Intolerancia a la Glucosa" (Rajesh *et al*; 2004). Basándose primariamente en el

tipo de tratamiento farmacológico usado para el manejo de la enfermedad. Los niveles de glucosa requeridos para establecer el diagnóstico de diabetes, no eran uniformes. Y el valor de diagnóstico en ayuno, era igual o mayor de 110mg/dl.

The American Association Expert Committee de la American Diabetes Association, en 1997 y 1998 revisaron los criterios diagnósticos para diabetes basándose principalmente en la etiología de la enfermedad (Rajesh *et al*; 2001), e implementaron cambios en la clasificación de 1979 tal como sigue: (Pfaller MA *et al.*, 2004).

- Uso de los términos de diabetes tipo 1 y tipo 2 en vez de insulino dependiente y no insulino dependiente para referirse a los dos mayores tipos de diabetes mellitus.
- El uso de dos determinaciones de glucosa plasmática en ayunas (GPA).
- Un nivel de corte mas bajo para GPA (126 mg/dL) para diagnosticar diabetes (este nivel de GPA es equivalente a 200mg/dL, valor en la prueba de tolerancia a la glucosa).

La nueva clasificación surge debido a la ambigüedad de la clasificación de 1979, e incluye 4 entidades, considerando como base a la etiología de la afección.

Estos grupos son los siguientes: el primero corresponde a la diabetes tipo 1, en el cual existe destrucción de las células β del páncreas, generalmente con la deficiencia absoluta de insulina, el grupo II incluye a la diabetes tipo 2, en la que predomina la incapacidad para incorporar glucosa a las células musculares y al tejido adiposo (resistencia a la insulina), aunado a una relativa deficiencia de la secreción o acción de la insulina, en el grupo III se presentan varios tipos específicos de diabetes relacionados con defectos genéticos que alteran la función de las células β del páncreas, los receptores para insulina, en la acción de la insulina misma, en la acción de hormonas, por infecciones que destruyen las células β del páncreas, por fármacos que afectan la acción o secreción de insulina, por problemas de autoinmunidad que antagonizan con la insulina, y finalmente está el grupo IV, en el que se encuentra la diabetes gestacional debido a cambios metabólicos de origen hormonal (Ugalde 2008).

6.11 Criterios diagnósticos para la Diabetes *mellitus* según la ADA (Asociación Dental Americana).

- Síntomas de diabetes mas glucosa plasmática aleatoria (sin ayuno) ≥ 200 mg/dl. La glucosa aleatoria puede obtenerse en cualquier momento del día desde la ultima comida.
- Glucosa plasmática en ayuno ≥ 126 mg/dl. El ayuno se define como la ausencia de ingestión calórica por almenos durante las últimas ocho horas. (La glucosa normal en ayuno es de 70-100mg/dl.).
- Glucosa posprandial de dos horas ≥ 200 mg/dl. Durante una prueba de tolerancia de la glucosa oral. La prueba se realiza con una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75g de glucosa anhidra disuelta en agua. (La glucosa posprandial de dos horas normal es de < 140 mg/dl.).

6.12 Incidencia y prevalencia de la diabetes

Actualmente la diabetes se considera una pandemia con tendencia ascendente. Guzmán *et al.*, 2003). En 1997 (Ship 2003), se estimó que 124 millones de personas en el mundo padecían diabetes, y que para el 2001, la estimación ascendió a 143 millones. En el año 2010, la cifra de personas con este padecimiento se piensa que alcanzará 152 millones para algunos autores (Ibáñez, *et al* 2002), y 221 millones para otros mas (Ship, 2003), pudiendo alcanzar la cifra de 286 millones para el año 2030.

La estimación de la Organización Mundial de la Salud en referencia a la prevalencia de la Diabetes *mellitus* en el inicio del siglo XXI la sitúa en el 2.1% de la población mundial, es decir, unos 125 millones de personas, de las que el 4% corresponden a la DM tipo I y el 96% a la DM tipo II (Ship 2003).

Guzmán Juárez y Madrigal Bujaidar en el 2003, citan que alrededor de 8.2% de la población mundial entre 20 y 69 años padece diabetes y cerca del 30% de los individuos afectados desconoce que la padece. Según estos mismos autores el tipo de diabetes mas frecuente en la población mundial es la tipo 2, que varia entre 80 y 90%, al tipo 1 le corresponde entre el 5

– 10%, 5 – 10% corresponde a la MODY y otro 5 – 10% se produce por diversos desórdenes genéticos.

6.13 Frecuencia en el mundo

En 1955 existían 135 millones de pacientes diabéticos, se esperan alrededor de 300 millones para el año 2025. Entre 1995 y 2025 se ha estimado un incremento de 35% en la prevalencia. Predomina el sexo femenino y es más frecuente en el grupo de edad de 45 a 64 años. La prevalencia es mayor en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo y así continuará; sin embargo, el incremento proporcional será mayor en países en vías de desarrollo. En los países desarrollados es más frecuente en la mujer, en los países en vías de desarrollo es casi igual en ambos sexos. De entre los 27 países con economía consolidada 14 tienen prevalencias mayores de 5.6%, las prevalencias más altas se encuentran en Suecia (9.3%), Noruega (8.6%) Dinamarca (8.3%) y Finlandia (7.9%) Tabla 6 (Moreno 2001). Tabla 6

País	Prevalencia %	
	1995	2025
Global	5.6	7.1
Suecia	9.3	11.2
Dinamarca	8.3	10.8
Finlandia	7.9	11.1
Grecia	7.6	9.6
Sn. Marino	7.6	7.6
Italia	7.5	10.0
EUA	7.4	8.9
Canadá	7.2	7.9
España	7.2	9.5
Portugal	7.1	8.8
Andorra	7.1	7.0
Islandia	7.0	9.3
Japón	6.5	8.7

Tabla 6. Países con economía consolidada. Prevalencia mayor al 7% con diabetes *mellitus*

6.13.1 Frecuencia en México

En México en 1922 el 11.8% de las defunciones fueron provocadas por enfermedades crónico degenerativas, en 1992 llegaron al 55%. Es en la década de los años 70 cuando este incremento se hace más notable. La mayor proporción de muertes por enfermedades crónico-degenerativas en 1998 se observó en el área metropolitana de la ciudad de México (63.3%), seguida de la región Norte del país (60.3%), posteriormente la región Centro (47%) y la región

Sur (43.7%). Entre las enfermedades crónico degenerativas la diabetes *mellitus* (DM) muestra el ascenso más importante en los últimos años; en 1922 se registraron 368 defunciones por esta causa, en 1992, se observaron más de 29,000 fallecimientos y ocupó el 4º lugar de mortalidad (Fanghanel *et al*; 1997).

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC, 1993), alrededor de tres millones de personas (6.7%) entre 20 y 69 años padecen DM. La mayor parte de ellas mueren antes de los 60 años o presentan alguna discapacidad antes de esa edad. Por muertes prematuras se pierden 264 mil años de vida saludable (AVISA), después los 45 años y por discapacidad se pierden 171 mil. Los pacientes diabéticos en México viven 20 años en promedio con la enfermedad; este padecimiento se presenta entre los 35 y 40 años. Anualmente se registran 210 mil personas diabéticas y fallecen 30 mil aproximadamente. Por cada diabético que muere se detectan siete nuevos casos de enfermedad. La mortalidad por diabetes mellitus es mayor en los estados del Norte que en los del Sur, los del Centro tienen un comportamiento intermedio y el D.F. se comporta como los Estados del Norte, es más frecuente en los grupos sociales con estilo de vida urbano Tabla 7 (Moreno 2001).

Estado	Lugar	Tasa
Distrito Federal	3er.	63.2
Morelos	3er.	59.3
Coahuila	3er.	51.6
Chihuahua	4o.	44.6
Tlaxcala	3er.	44.5
Jalisco	3er.	44.0
Colima	4o.	43.9
Tamaulipas	3er.	43.8
Guanajuato	3er.	41.5
Sonora	4o.	40.7
Durango	4o.	39.9
Michoacán	4o.	39.0
Aguascalientes	4o.	37.8
Baja California	4o.	36.3
México	3er.	35.5
Nuevo León	3er.	35.4
Veracruz	3er.	34.1
Nayarit	4o.	33.8
Querétaro	4o.	33.6
Hidalgo	5o.	33.6
Yucatán	5o.	33.6
Sinaloa	4o.	32.1
Zacatecas	5o.	30.1
San Luis Potosí	4o.	29.9
Tabasco	4o.	28.7
Oaxaca	8o.	25.7
Guerrero	5o.	23.8
Puebla	5o.	21.8
Chiapas	7o.	19.8
Quintana Roo	6o.	17.4

Tabla 7. Tasas de mortalidad por diabetes *mellitus* en la República Mexicana y lugar que ocupa.

Actualmente las enfermedades crónicas se han convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes debido a los altos costos de su tratamiento y de la falta de prevención de las complicaciones. Los cambios en el comportamiento humano y los estilos de

vida en el último siglo han provocado un gran incremento de la incidencia mundial de diabetes, sobre todo de tipo 2 asociado a obesidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2002 existían en el mundo por cada 100.000 habitantes unas 3.000 personas con DM(Ruiz *et al.*, 2006, Olaiz *et al.*, 2000)

En comparación con otros países tradicionalmente la población europea ha sido considerada relativamente como de bajo riesgo para diabetes porque, en base a diversos estudios epidemiológicos realizados en EEUU, Canadá y Australia, se observó que la población de origen europeo mostraba prevalencias menores de la enfermedad. En España (y en general en toda Europa) los estudios epidemiológicos sobre diabetes han sido escasos y aislados, con metodología muy dispar y sin seguimiento sistemático.(Botas *et al* 2002).

6.14 Diabetes *mellitus* y manifestaciones clínicas orales.

Las candidiasis mucocutaneas; abarcan candidiasis cutáneas y candidiasis en mucosas; dentro de las candidiasis mucocutaneas se encuentran las foliculitis, onicomycosis, candidiasis oral y esofagitis (García H *et al.*, 2006; Calvo M, *et al* 2001). Se ha reportado que en pacientes con diabetes *mellitus* existe un incremento en invasión por *Candida albicans*.

Los hallazgos intraorales citados en la literatura incluyen, enfermedad periodontal, la cual puede ser mas severa y con una prevalencia mas alta que la vista en los pacientes no diabéticos, halitosis intensa (mal aliento), y en ocasiones con olor cetónico; la xerostomía con las complicaciones asociadas puede estar presente; se han reportado alteraciones en la cicatrización un incremento en la propensión a las infecciones bacteriana, virales y micológicas, sobretodo a la candidiasis; pueden presentarse molestias a la masticación y deglución; caries, con lesiones pulpares frecuentes; perdida dentaria; habilidad disminuida para el uso de prótesis dentales; existen reportes de mayor prevalencia de liquen plano, estomatitis aftosa recurrente; y sangrado postquirúrgico aumentado. Algunas de estas complicaciones pueden estar directamente relacionadas a la pérdida incrementada de fluidos asociada a la poliuria en diabéticos no controlados, mientras algunas otras manifestaciones, especialmente la xerostomía, podrían estar

influenciada o directamente dependiente del tipo de medicamentos que toman los pacientes (Vernillo2003; Loe *et al*; 1995).

La xerostomía consecuente con la disminución del flujo salival, puede llevar al síndrome de la boca ardiente (Vernillo, 2003) y a la caries, también puede facilitar el desarrollo de la candidiasis (Zárate, 1999). Algunos estudios han mostrado una prevalencia incrementada de caries en diabéticos mientras otros estudios demuestran lo contrario (Loe *et al*; 1995). El desarrollo de la caries puede estar influenciado por niveles incrementados de glucosa en la secreción salival, especialmente en los diabéticos no controlados, mientras en los diabéticos bien controlados podría estar disminuida debido a la baja presencia de carbohidratos en la dieta y en la saliva.

Varios procesos patológicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes, le confieren un carácter autoinmune, característico de la DM tipo 1, hereditario y resistencia del cuerpo a la acción de la insulina, como ocurre en la DM tipo 2. Aunque las manifestaciones orales en el paciente diabético no son específicas o patognomónicas, existen cuadros de localización oral cuyo hallazgo es más frecuente en las personas con diabetes y pueden seguir una peor evolución debido a los niveles elevados de glucosa en sangre, lo que hace más propensas a las personas a desarrollar enfermedades bucales. Las complicaciones orales de la diabetes están relacionadas con la capacidad de una persona de controlar sus niveles de azúcar en sangre (control glucémico) y su salud en general (Brett *et al.*, 2005).

Entre las lesiones comunes de los tejidos blandos de la boca en pacientes diabéticos se encuentran las infecciones por hongos (Candidiasis), las úlceras, la estomatitis y los cambios en la lengua (como fisuras linguales, lengua seburral, alteraciones del sentido del gusto, lengua ardiente, depapilación lingual, sensación de ardor). El desarrollo de estas afecciones se debe a la sequedad de boca, a la lenta cicatrización de las heridas y a la alteración de las respuestas inmune e inflamatoria, característicos en pacientes diabéticos. Se puede desencadenar además diferentes afecciones bucales tales como: Caries dental, enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis), aftas o fuegos, xerostomía, alteraciones en el gusto, estomatopirosis, mucormicosis

o fomicosis, glositis romboidal media, agrandamiento de las glándulas salivales, liquen plano bucal y reacciones liquenoides y candidiasis bucal. (Carranza, F. *et al.*, 2008)

7. Materiales y métodos

7.1 Selección de la población y tamaño de muestra.

La población general del estudio estuvo conformada por 200 pacientes; de los cuales estuvieron en un rango de edad de entre 20 y 70 años de edad; de estos 100 fueron clasificados como grupo control y 100 mas como grupo experimental, en aquellos que acudieron a consulta odontología entre enero 2010 a Marzo del 2012 en la Facultad de Odontología de la U.A.N.L., provenientes de diferentes puntos del Estado de Nuevo León.

7.2 Criterios de inclusión.

Los criterios de inclusión en la selección del grupo control y del grupo experimental fueron los siguientes:

7.2.1 Grupo control.

- Buen estado de salud general
- Edad entre 20 y 70 años.
- Género masculino y femenino.
- Pacientes que aceptaran participar en el estudio con previa firma de consentimiento informado

7.2.2 Grupo experimental.

- Edad entre 20 y 70 años.
- Que acudieran a consulta odontología con diagnóstico médico establecido de diabetes *mellitus* tipo 1 o tipo 2
- Género masculino y femenino.
 - Pacientes que aceptaron participar en el estudio con previa firma de consentimiento informado.

7.2.3 Hallazgos clínicos dentro de los criterios de inclusión.

Piezas vitales o no vitales.

Presencia o ausencia de prótesis, restauraciones y/o con caries.

Presencia o ausencia de manifestaciones clínicas orales características de desordenes metabólicos.

7.3 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión en la selección del grupo control y el grupo experimental fueron los siguientes:

Pacientes embarazadas

Pacientes que estuviesen bajo tratamiento antifúngico

Pacientes con infecciones ya diagnosticadas de candidiasis

Pacientes con tratamiento hormonal

Pacientes que no aceptaran participar en el proyecto

7.4 Carta de consentimiento informado.

A las personas que acudieron a consulta odontología se les entregó una carta de consentimiento informado la cual previamente fue revisada y aprobada por el comité de bioética de la Facultad de Odontología de la UANL en la cual se explicó los procedimientos y los métodos del estudio a desarrollar, todas aquellas personas que aceptaron participar se les pidió firmar el consentimiento y pasaron a una segunda fase la cual consistió en realizar una historia clínica general en la cual se tomaran datos tales como edad, sexo, antecedentes heredo familiares, enfermedades, tratamientos medicamentosos. (Anexo 1). Finalmente se concluyó con la realización de la toma de muestra del enjuague bucal y recolección de datos del índice de glucosa en sangre con ayuda del Kit One Touch Ultra 2.

7.5 Determinación de la concentración de glucosa en sangre.

Según la ADA (Asociación Dental Americana) establece que las tomas de muestra de glucosa en sangre se deben tomar con mínimo 2 hrs de ayuno; en este estudio todos los pacientes estuvieron bajo las condiciones de ayuno como mínimo de dos horas y se realizaron en un horario en el cual no está en relación con la ingesta de alimentos. En la actualidad, muchos pacientes diabéticos usan mediadores de glucosa para realizar autoexamen inmediato de nivel de glucosa en sangre: estos aparatos utilizan la sangre capilar obtenida del dedo para exhibir registros del nivel de glucosa en cuestión de segundos a minutos. Dado que los aparatos suministran una evaluación instantánea del nivel de glucosa en sangre son muy prácticos en el ámbito del consultorio dental (Liébana *et al*; 2002), (Figura 2, Figura 3).



Figura 2. Kit One Touch Ultra 2 con tiras reactivas reagentes Código 25 para sistema de diagnóstico de glucosa en sangre de cada paciente

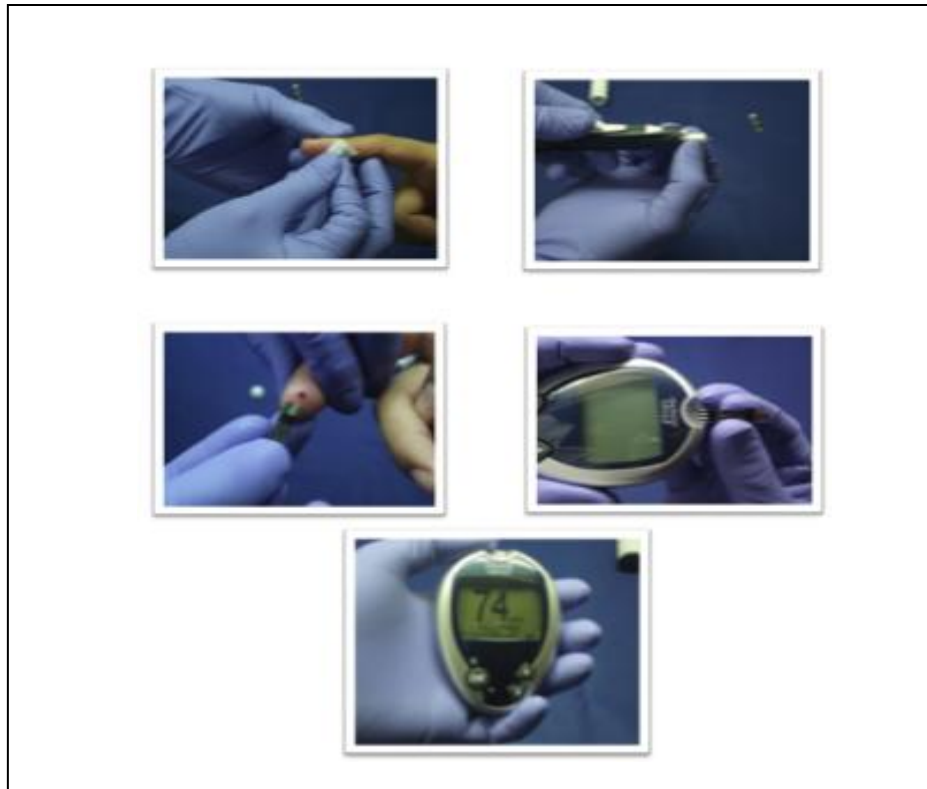


Figura 3. Método para toma de muestra de glucosa en sangre donde se realiza una punción con la ayuda de una lanceta y posteriormente el análisis de los resultados donde se muestra la cantidad de glucosa en sangre del paciente

7.6 Toma de muestra.

Después de la selección del paciente y tomando en cuenta todos los procedimientos de asepsia se les entregó un tubo fálcon de 10mL con suero y se les pidió que realizaran un enjuague bucal durante 1 minuto para nuevamente depositar el suero dentro del tubo.

Una vez obtenida la muestra se mantuvo en hielo y se llevó a procesar de inmediato al laboratorio para designarle su registro de fecha y numero de muestra correspondiente; posteriormente se realizó una centrifugación al tubo a 14000rpm a una temperatura de 5 °C durante 10min, esto nos sirvió para enviar toda la carga células al fondo del tubo, así aseguramos que la mayor parte de las células se depositaran en esa área y evitar perder células; una vez realizado esto se decantó el sobrenadante y se depositó 15mL de medio de cultivo YPD y se adiciono antibiótico 100µg/mL de medio (Dextrosa, Peptona, Extracto de Levadura), posteriormente se incubó a 30°C en agitación orbital a 100rpm. Durante 24h (Figura 4). Para el mantenimiento y almacenamiento de la muestras se glicerinaron las muestras a una concentración (1:1) glicerol - muestra, y se les designaron claves a cada muestra A1 a J10 con un total de 100 muestras para los sujetos sanos y EG1 a EG100, para las muestras de pacientes diabéticos.



Figura 4. Procesamiento de las muestras tomadas de cavidad oral donde se aplica 1µl/mL de antibiótico en cada una de estas para eliminar el crecimiento de bacterias y obtener el crecimiento puro de levaduras

A partir de esto se realizaron los siguientes procedimientos:

7.7 Caracterización microbiológica

La identificación microbiológica se comenzó realizando diluciones del preinoculo de 1×10^6 de la muestra, esto para que al momento de sembrar en las placas con agar YPD (Dextrosa, Peptona, Extracto de Levadura) nos mostraran colonias aisladas; estas se dejaron incubar durante 24 horas, en agitación constante y a una temperatura de 37°C , para simular las condiciones en las que se encuentra este microorganismo en la boca.

Una vez obteniendos las colonias se tomaron 5 al azar que se sembraron por estría en placas con CHROMagar candida ya que según estudios previos (Ruiz *et al*; 2003) se puede aislar e identificar presuntivamente las levaduras de una muestra con flora polifúngica, siempre que cada una de las distintas especies posea una actividad enzimática característica que ofrezca distintas tonalidades de color al actuar sobre los sustratos cromogénicos del medio. Además ha mostrado ser uno de los mejores medios de cultivo para identificación de especies de *Candida* y uno de los medios más utilizados para identificación de levaduras de interés medico, estas fueron divididas en 5 partes, y se dejaron incubando a 37°C durante 48 horas, tiempo mínimo para que las colonias empiecen a diferenciarse unas de otras. Posterior a esto se logró aislar especies de *C. albicans* (color verde), *C. glabrata*, (color morado), *C. tropicalis* (color azul), *C. parapsilosis* (color rosadofucsia), una vez realizado esto se logró reportar que tipo de *Candida spp.* se encontraba presente en cada paciente por este método (Odds *et al.*, 1994).

7.8 Cepas control y condiciones de cultivo

Fenotipo y coloración obtenida por cada una de las cepas *C. albicans* ATCC SC5314, *C. glabrata* ATCC 20C1, *C. tropicalis* ATCC MVA3464, *C. parapsilosis* ATCC 46/43, cultivadas en CHROMagar candida a 37°C durante 48h. Estas muestras fueron proporcionadas por la Dra. Rosa Mouriño, Jefa del departamento de Microbiología del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.

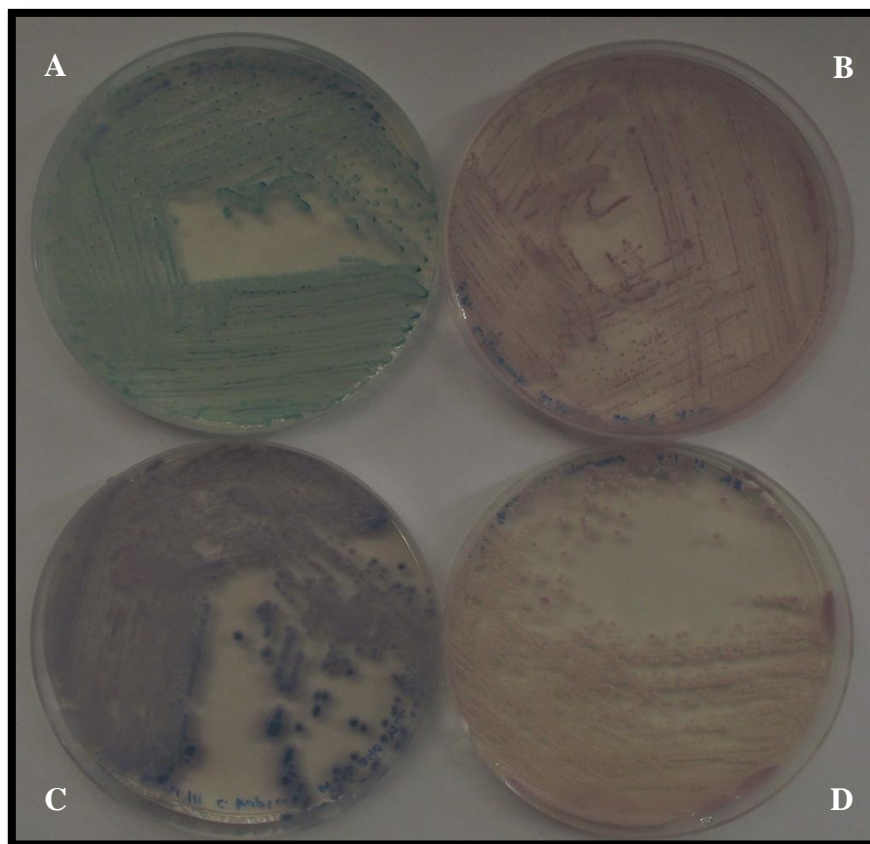


Figura 5. Coloración obtenida en cepas tipo ATCC, en CHROMagar candida, para cada una de las especies mostrando su coloración característica A= *C. albicans*, B= *C. glabrata*, C= *C. tropicalis*, D= *C. parapsilosis*



Figura 6. Material para realizar el aislamiento de las muestras antes de su procesamiento

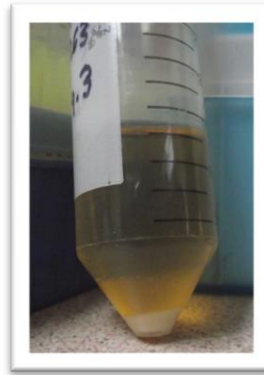


Figura 7. Centrifugado del tubo falcon a 3000rpm en medio de cultivo YPD



Figura 8. Transferencia de células en tubo falcon de 2mL para retiro de exceso de medio de cultivo

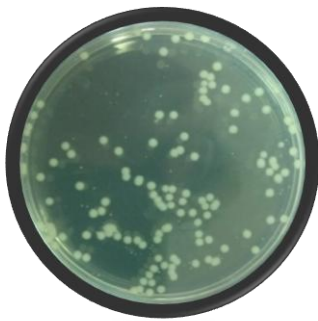


Figura 9. Placas con Dilución de las muestras en medio de cultivo YPD a aisladas en 24hrs de incubación a 37°C



Figura 10. CHROMagar candida

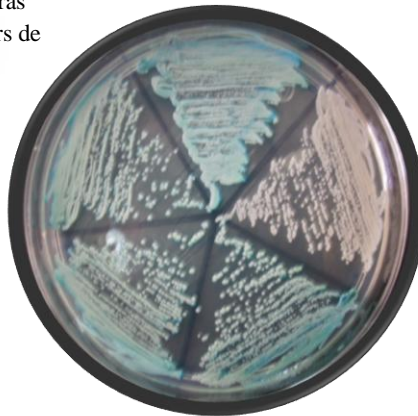


Figura 11. Placas de CHROMagar candida donde se muestra el crecimiento de las 5 colonias aisladas tomadas de la dilución incubado durante 48hrs de incubación a 37°C

Figura 12. Diagrama de flujo de la metodología para la caracterización microbiológica de las cepas



Figura 13. Aislados clínicos de muestras en medio cromogénico incubadas a 37°C durante 48hrs de muestras de sujetos sanos y diabéticos, el número de cepa es correspondiente a la coloración característica para cada especie. (Anexo 2,3).

7.9 Caracterización del crecimiento de cada una de las especies mediante cultivo en medio YPD utilizando diferentes métodos.

Se realizaron curvas de crecimiento por separado, de *Candida albicans* ATCC SC5314, *Candida glabrata* ATCC 20C1, *Candida tropicalis* ATCC MVA3464, y *Candida parapsilosis* ATCC 46/43, con el fin de comparar su crecimiento al cabo de 48 horas se determinó la absorbancia 260/280 del medio de cultivo con ayuda del espectrofotómetro en periodos de 6 horas, este estudio se realizó por duplicado

Este proceso comenzó activando las cepas tipo ATCC antes mencionadas en medio de cultivo YPD (dextrosa, peptona, extracto de levadura); se llevaron a incubar durante 24 horas, en condiciones de agitación continua y temperatura de 37°C en tubos falcón adicionados con antibiótico a 100µg/mL de ahí se tomó 1µl de por cada mililitro de medio de cultivo, esto para evitar contaminación con otros microorganismos.

7.10 Cámara de Neubauer

Una vez transcurrido este tiempo se utilizó la cámara de Neubauer el cual es un método utilizado para recuento celular en medio liquido ya que se pretendía que cada cepa comenzara desde un mismo punto, con igual número de células.

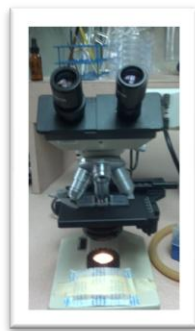


Figura 14. Microscopio óptico para identificación de levaduras

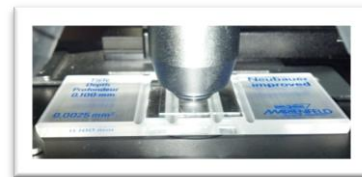


Figura 15. Cámara de Neubauer para conteo celular



Figura 16. A, B, muestran el conteo celular en cámara de Neubauer para obtener una concentración final de células de 100cel/μl para cada una de las cepas de referencia vista en microscopio óptico 40X.

Una vez transcurrido este tiempo de inoculación de cada cepa se utilizo la cámara de Neubauer el cual es un método utilizado para recuento celular en medio liquido ya que se pretendía que cada cepa comenzara desde un mismo punto, es decir con un número igual de células. El conteo se realiza de la siguiente manera:

Una vez logrando enfocar el microscopio óptico, se pueden apreciar cuatro cuadrantes en los cuales podemos ver todas las células guiándonos por cada cuadrante; el procedimiento se debe realizar en forma de zig-zag esto nos sirve para guiarnos y tener un orden

La fórmula que se utilizó para determinar la concentración de la solución inicial y obtener nuestras 100 cel/μl es:

$$\text{Partículas por } \mu\text{l} = \frac{(\text{partículas contadas}) (\text{V solvente})}{(4\text{mm}^2)(0.1\text{mm})(\text{V soluto})}$$

Donde:

- El valor de 4mm² (superficie contada) y 0.1mm (profundidad de la cámara) son constantes, y son las dimensiones que tiene la cámara que se utilizo.
- Las “partículas contadas” son el número de células que se cuantificaron de la solución inicial.
- El “V solvente” es el volumen que se utilizo del medio (agua) en la dilución (90ul).
- El “V soluto” es el volumen de la muestra del microorganismo (10ul).

Ya que se pretendía comenzar con un inóculo inicial de 100 cels/ μ l contenidos en 50mL de medio de cultivo YPD, se utilizó la siguiente fórmula a partir de los resultados para hacer una dilución:

$$(C1) (V1) = (C2) (V2)$$

Donde:

- C1 es la concentración inicial y C2 es la concentración final (100cel/ μ l).
- V1 es el volumen inicial (x) y V2 es el volumen final (50ml).

Finalmente se hace una conversión, de mililitros a microlitros para obtener el volumen en microlitros.

Nota: Para realizar las curvas de competencia se ajustó la concentración final a 100cel/ μ l, pero dividida entre las cepas involucradas, es decir, 50 cel/ μ l de *C. albicans* y 50 cel's/ μ l de *C. glabrata*, se dejaron incubando a 37°C y se tomaron las cuantificaciones en intervalos de 6 h hasta cumplir con 48h.

7.11 Espectrofotometría de *Candida* spp.

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada una de las especies y se inocularon en matraces con 50ml de caldo YPD (Dextrosa, Peptona, Extracto de Levadura) con antibiótico a una concentración de 100 μ g/mL aplicando 1ul/mL y se dejó incubando con agitación continua a 37°C, el registro del crecimiento se realizó cada 6 hrs, hasta las 48 hrs, mediante la determinación de absorbancia 260/280 al espectrofotómetro, en donde se utilizó como blanco el medio YPD (Dextrosa, Peptona, Extracto de Levadura) estéril, para continuar con cada medición se realizó una limpieza a cada celdilla del espectrofotómetro por cada muestra.

7.12 Diluciones para espectrofotometría de *Candida* spp.

Se realizaron diluciones de las muestras dependiendo de las horas transcurridas, 6 hrs, 12hrs, 18hrs, 24hrs, 30hrs, 36hrs, 42hrs, 48 hrs para que al momento de sembrar en placa en medio de cultivo YPD (dextrosa, peptona, extracto de levadura) se lograran apreciar colonias aisladas y poder obtener las UFC de cada dilución.



Figura.17. Esquema de diluciones realizadas al cultivo de cada muestra

Las UFC representan cada colonia contada y su número total representa el número de células viables en la muestra. Se realizó el recuento de células una vez transcurrido el tiempo de incubación; finalmente este resultado se multiplica por el factor de dilución.

NOTA: En el ensayo del crecimiento en competencia las diluciones se sembraron en Chromagar para poder contar las colonias con las diferentes coloraciones y distinguir unas de otras.



Figura 18 Espectrofotómetro utilizado para medición de absorbancia 260/280 y densidad de levaduras

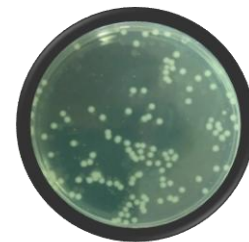
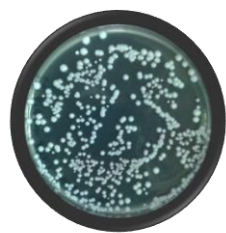
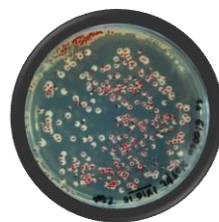


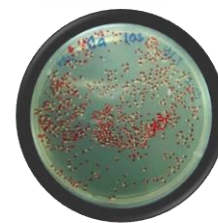
Figura 19. Caja con dilución a las 24hrs de incubación donde se muestra la dilución deseada 1×10^{12}



1×10^{10}



1×10^{10}



1×10^{10}

Figura 20. Conteo de las unidades formadoras de colonias de cada una de las diluciones a 1×10^{10} estos ensayos se realizaron por duplicado

7.13 Extracción de DNA genómico de levaduras.

La extracción de DNA se realizó de acuerdo con el protocolo modificado de Sambrook y Russel 2001, descrito a continuación. Se incubaron tubos fálcon con 10ml de YPD mas el inóculo del aislamiento secundario a 37°C en agitación continua durante 24hrs o hasta obtener turbidez. Se centrifugaron a 3000rpm durante 10 min a temperatura ambiente posteriormente a esto se tomaron todas las células en el fondo del tubo y se depositaron en tubos ependorf de 2.0mL y se procedió a centrifugar a 12000rpm durante 3 min a temperatura ambiente esto para retirar el exceso de medio de cultivo que pudiese estar presente; se resuspendió el pellet en 500µl de buffer STES(10mM Tris-HCL, 10mM EDTA, 50mM NaCl, 2% SDS) y se agregó un 1 volumen equivalente al paquete celular de perlas de vidrio con 200µl de TE 1X (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA) pH 7.6 a cada tubo. Se aplicó Vortex durante 1 min, se aplicaron 600µl de fenól-cloroformo (1:1), esto para desnaturalizar las proteínas contaminantes de la muestra, se mezcló por inversión durante 1 min. Se centrifugó nuevamente a 14000rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se colectó el DNA por medio de una precipitación estándar con isopropanól al 100% durante 20 min a -20°C . Se recuperó el DNA mediante una precipitación centrifugando a una velocidad de 14000rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet de DNA aplicando 200µl con etanol al 70%, nuevamente se centrifugó durante 1 min a 14000rpm a una temperatura de 4°C. finalmente se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet de DNA a temperatura ambiente durante 15 min. Se resuspendió el DNA en 40µl de TE 1X y se agregaron 5µl de RNA'sa A (Invitrogen). Y se almacenaron las muestras a 4°C hasta su uso.

La concentración y calidad del DNA se analizó realizando una electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio a 0.1µg /ml, y se utilizó un transiluminador para observar la presencia de las bandas.



a)



b)



c)



d)



d)



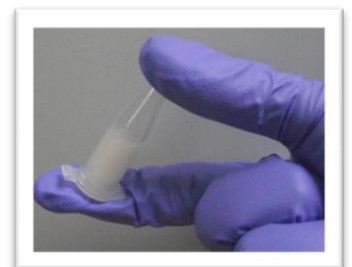
d)



d)



e)



e)

Figura 21. Procedimiento realizado para extracción de DNA genómico de levaduras; a). preparación de las muestras, b) Centrifugación a 3000rpm durante 10 min, c) células sometidas a centrifugación, d) aplicación de perlas de vidrio con solución de buffer TE1X, e) Extracción con Fenol-cloroformo.

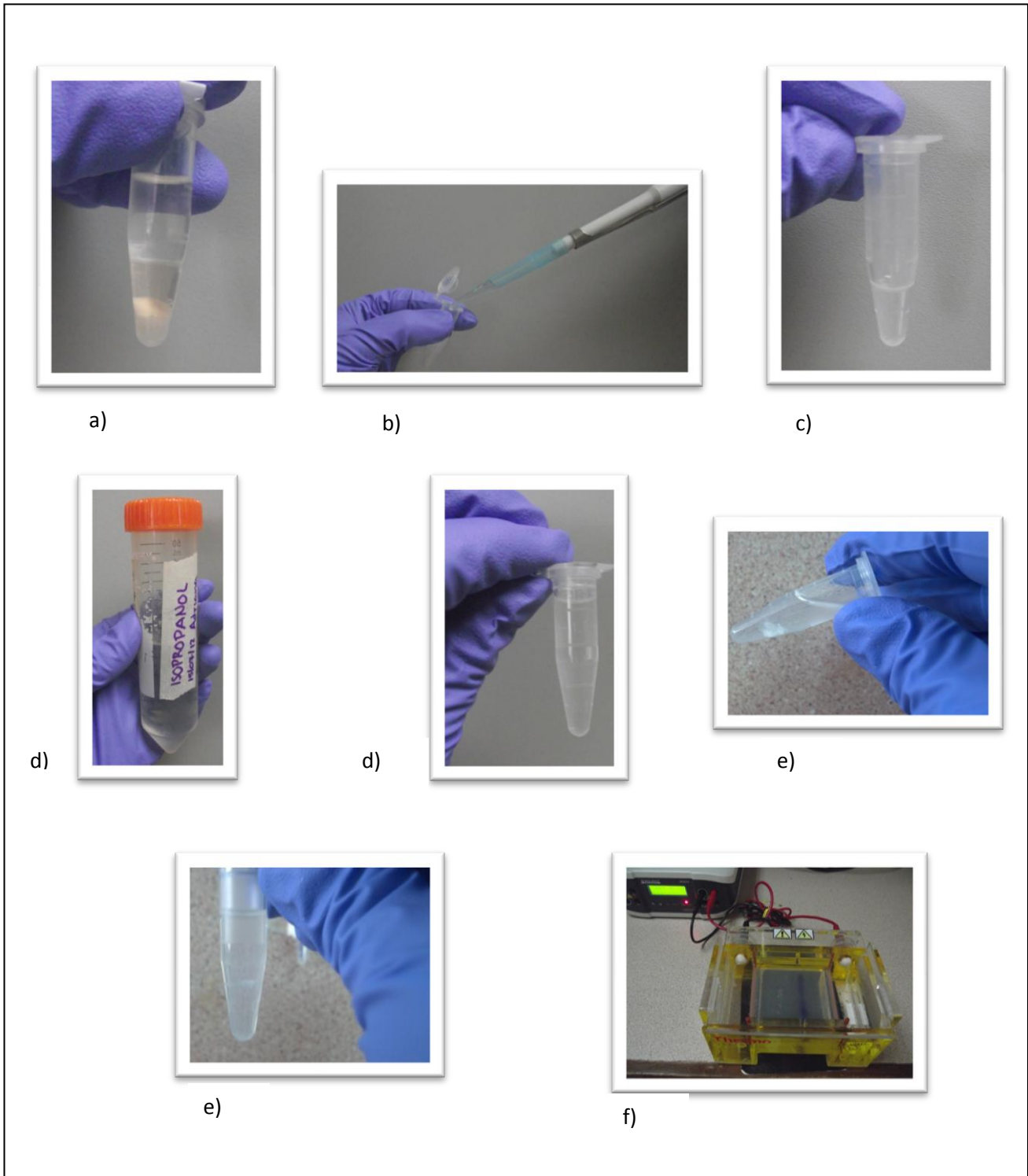


Figura 22. a) Fases formadas una vez centrifugada la muestra, b) toma de la fase acuosa, c) traspaso de la fase acuosa a un nuevo tubo ependorf 5mL, d) aplicación de isopropanol para la precipitación e) formación de pastilla de DNA f) amplificación de DNA por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%

7.14 Cuantificación de DNA

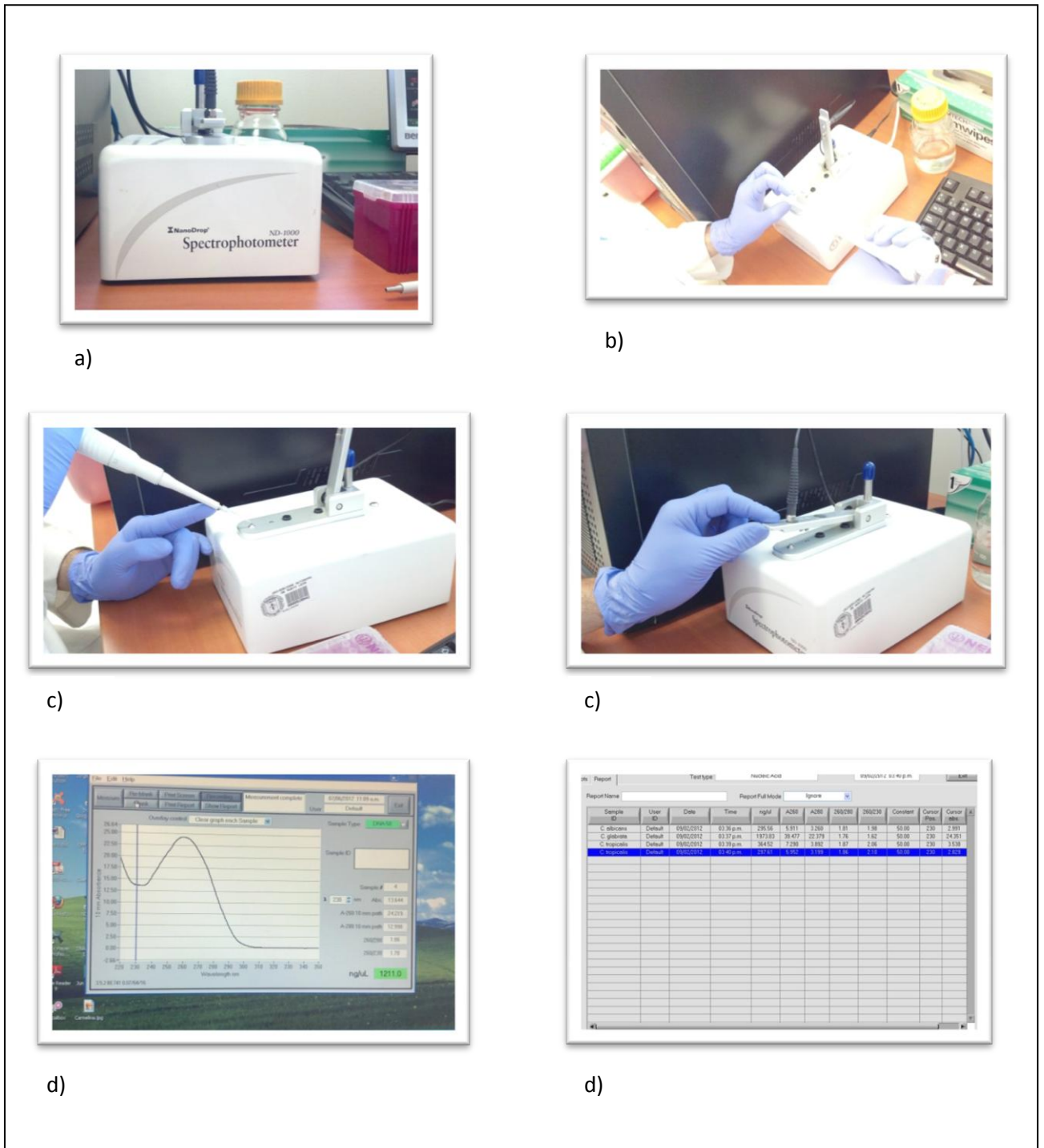


Figura 23. a) programación de Nanodrop b) aplicación de blanco para la cuantificación, c) aplicación de muestra de DNA para su cuantificación d) resultado final donde se muestra la calidad y cantidad del DNA

7.15 Amplificación de muestras de DNA de Levaduras de pacientes odontológicos sanos y pacientes diabéticos en gel de agarosa al 1%

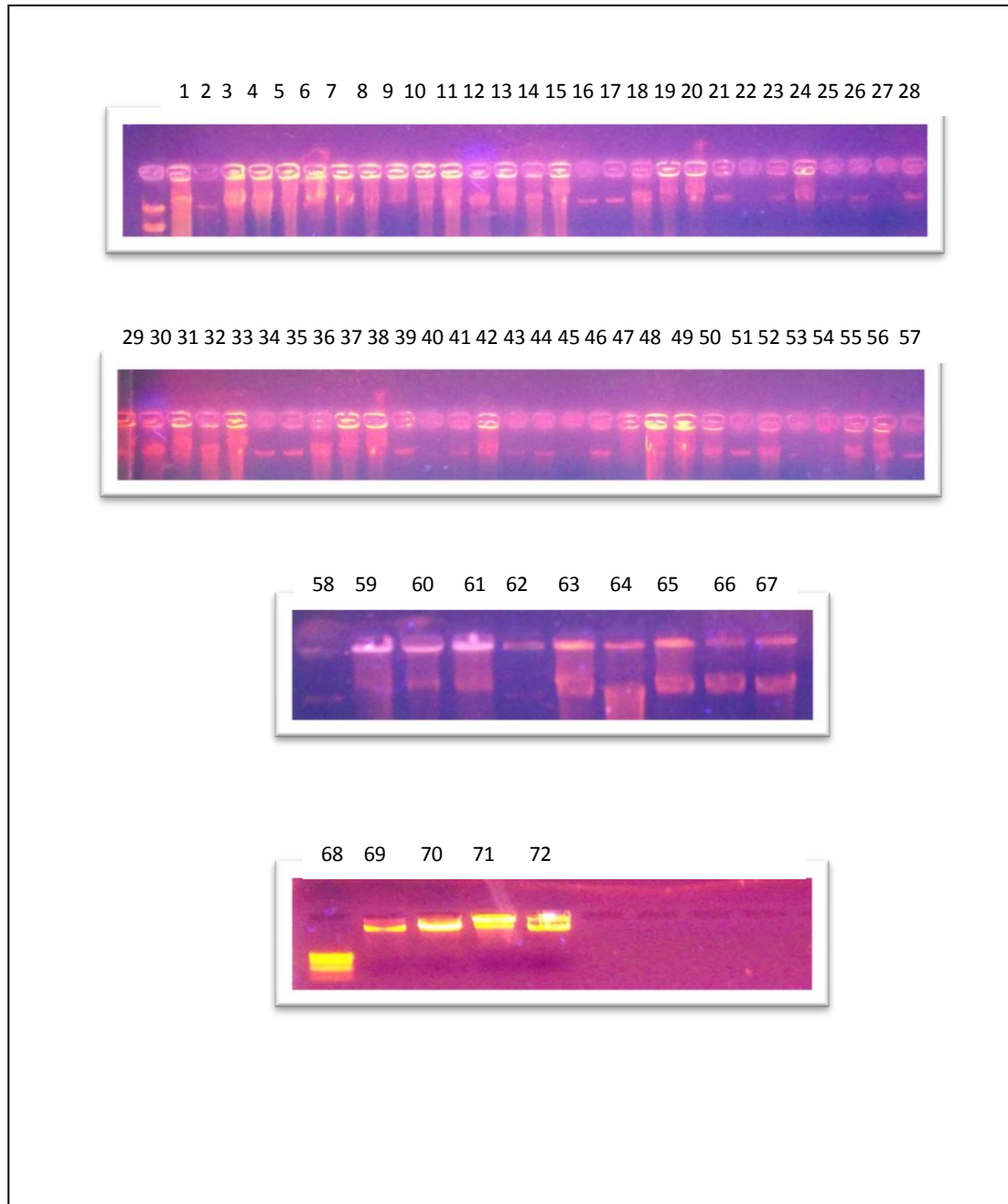


Figura24. Amplificación de muestras de pacientes diabéticos donde se muestra la calidad; la concentración concentración de cada una de estas se puede apreciar en el **Anexo 3**.

7.16 Identificación molecular

En primer lugar se buscaron los oligonucleótidos candidatos para realizar la identificación, cada uno de ellos fue probado con cepas tipo *Candida albicans* ATCC SC5314, *Candida glabrata* ATCC 20C1, *Candida tropicalis* ATCC MVA3464, *Candida parapsilosis* ATCC 46/43, con una PCR con gradiente de temperatura para establecer las condiciones idóneas de cada reacción. Posteriormente se corroboró con cepas control, que las bandas tanto generales como específicas aparecieran exclusivamente en la especie determinada y finalmente se llevó a cabo la prueba con la mezcla de oligonucleótidos, realizando también una PCR con gradiente de temperatura y buscando las condiciones idóneas (Imagen 21).

7.17 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron los siguientes:

OLIGONUCLEOTIDO	5' - 3'	REFERENCIA
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Mirhendi <i>et al.</i> ; 2007
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT CG	Liguori <i>et al.</i> ; 2007
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	Mirhendi <i>et al.</i> ; 2007
CTR1	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	Luo y Mitchell., 2002
CTR2	TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T	Luo y Mitchell., 2002
Ralb1	CGG TAG TGG TAA GGC GGG	López <i>et al.</i> ; 2010
Ralb2	ATACGT GGT AGA CGT TAC C	López <i>et al.</i> ; 2010

Tabla 8. Serie de oligonucleótidos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa multiplex de muestras

7.18 Estandarización del método de PCR

Se realizaron un gradiente de temperatura para estandarizar la TM en el termociclador, con las cepas de referencia *C. albicans* ATCC SC5314, *C. glabrata* ATCC 20C1, *C. tropicalis* ATCC MVA3464, *C. parapsilosis* ATCC 46/43 para los oligonucleótidos ITS1-ITS2; la prueba consistió en realizar la PCR a las temperaturas de alineamiento de 50.0, 52.3, 54.4, 55.5, y 57.4°C. La mezcla utilizada fue de 8.25 µl de agua mili Q, 5 µl green color buffer 5x (Promega®), 6 µl de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl dNTPs 1 mM, 0.5 µl de cada oligonucleótido 10 µM, 0.25 µl de Taq polimerasa Go taq (Promega®) y 2 µl de DNA para llevar la reacción a un volumen final de 25 µl. Las condiciones del programa de PCR se muestran en la Tabla 9.

Condiciones de la PCR	
Desnaturalización	94°C/ 5 min
Alineamiento	94 °C/ 30 seg , 55 °C durante 1 min
Extensión	72 °C/ 1 min – 35 ciclos
Extensión final	72° C/ 10 min, terminando con 4°C

Tabla 9. Condiciones para la PCR (López. R. *et al*; 2010).

7.18.1 Oligonucleotidos sometidos a gradiente de temperatura.

Se sometieron las muestras de PCR para *C. albicans* ATCC SC5314 a diferentes gradientes de temperaturas: 50°, 52.3°, 54.4°, 55.5°, 57.4° con el par de oligonucleótidos ITS 1- ITS 4 ya que el resto de las especies, *C. glabrata* ATCC 20C1, *C. tropicalis* ATCC MVA3464, *C. parapsilosis* ATCC 46/43 comparten un mismo patrón de amplificación de 500pb. Imagen 21.

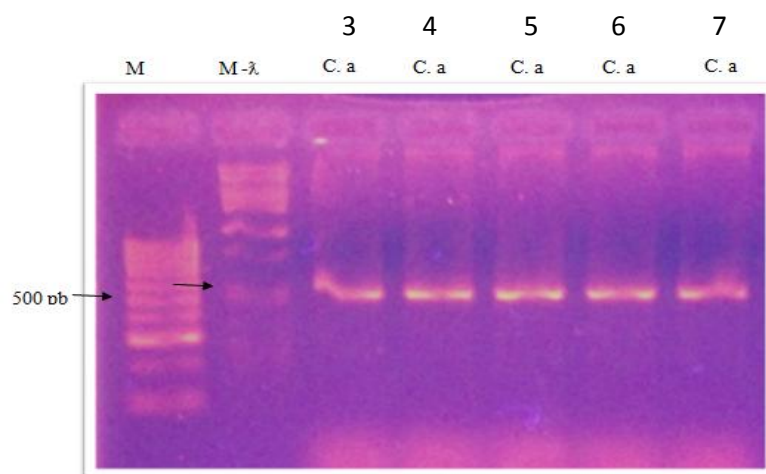


Figura 25. Gradiente de temperatura de izquierda a derecha M= marcador de peso molecular, M-λ= marcador Lambda pst, Carril 3, 4, 5, 6, 7, gradientes 50, 52.3, 54.4, 55.5, 57.4.

7.19 PCR para cepas de referencia

Para corroborar que los tamaños de amplificación esperados para cada especie correspondieran a la literatura, se utilizaron 4 cepas tipo ATCC estas fueron proporcionadas por el Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada CICESE estas fueron: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*. Tomando en cuenta las temperaturas ideales resultado de la prueba de gradiente, se procedió a realizar una PCR con las cepas antes mencionadas y se mezclaron: 3.35 µl de agua mili Q, 5 µl green color buffer (Promega®), 2.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl dNTPs 1 mM, 0.5 µl de cada oligonucleótido(ITS1, ITS2, ITS4, CTR1, CTR2, RALB1, RALB2), 10 µM, 0.25 µl de Taq polimerasa Go taq (Promega®) y .40 µl de DNA y se llevó a un volumen final de 25µl. Las condiciones del programa de PCR se muestran en la Tabla 10.

Par de oligonucleotidos	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
ITS1-ITS2	250pb	800pb	250pb	250pb
ITS1-ITS4	500pb	500pb	500pb	500pb
CTR1-CTR2			300pb	
Ralb1-Ralb2	84pb			

Tabla 10. Productos de PCR esperados por cada par de oligonucleótidos específico para cada especie

Los productos obtenidos de las amplificaciones con los oligonucleótidos se les realizó una electroforésis en geles de agarosa al 1% más bromuro de etidio a 0.1µg ml, utilizando un marcador de peso molecular de 1kb para corroborar los tamaños para cada especie que se muestra en la Tabla 9. Los geles se observaron bajo luz en un transiluminador Marca UVP, a una longitud de onda de .365 y la captura de imágenes se realizó por medio de una cámara fotográfica.

7.19.1 Estandarización de PCR multiplex de cepas de referencia

Se realizó la estandarización de PCR con cepas de referencia utilizando los de oligonucleótidos ITS 1, ITS 2, ITS 4, CTR 1, CTR 2, Ralb 1, Ralb 2, que se menciona en la Tabla 7, mostrando las bandas específicas para cada una de las especies.

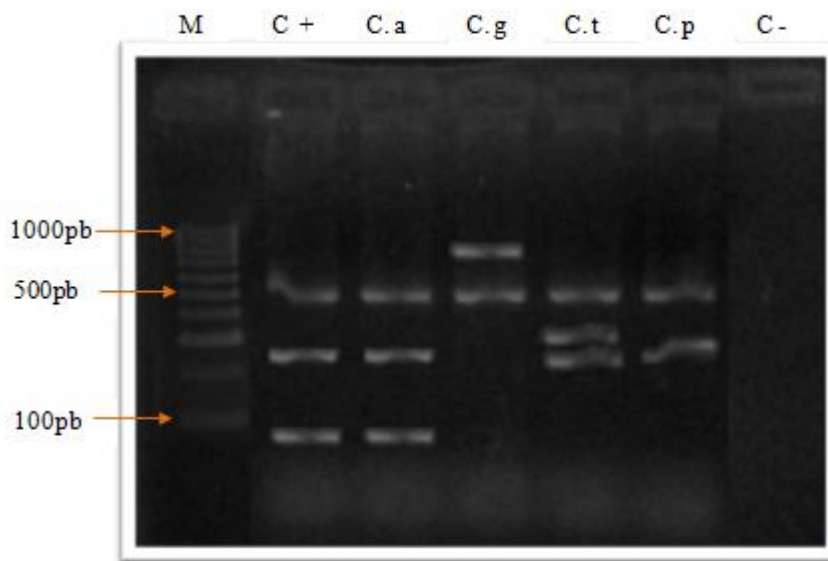


Figura 26. Estandarización prueba PCR de izquierda a derecha se muestra **M**= marcador de peso molecular, **C+** = Control positivo *C. albicans*, **C.a**= *Candida albicans*, **C.g** = *C. glabrata*. **C.t** = *Candida tropicalis*, **C.p** = *Candida parapsilosis*, **C-** = Control negativo.

7.20 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 17.0; se realizó una prueba estadística Mann-Whitney (también llamada Mann-Whitney-Wilcoxon) la cual es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes; así como también se realizaron tablas cruzadas para poder determinar si existe una relación o dependencia entre dos variables en este caso la concentración de glucosa con la presencia de las especies.

8. Resultados

8.1 Caracterización del crecimiento de cada una de las especies de *Candida* spp. utilizando diferentes métodos.

Se realizaron curvas de crecimiento por separado para cada una de las especies a diferentes tiempos para determinar mediante mediciones en diferentes tiempos el crecimiento que presentaban en relación al número de células. Encontramos que la especie de *C. parapsilosis* presenta un mayor crecimiento en tiempos en comparación de las otras especies.

Tiempo	Periodos	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
0 horas	0	0.387	0.031	0.063	0.071
6 horas	1	0.413	0.232	0.606	0.399
12 horas	2	2.036	1.964	1.988	1.987
18 horas	3	2.333	2.279	2.377	2.438
24 horas	4	2.387	2.362	2.444	2.504
30 horas	5	2.429	2.41	2.51	2.598
36 horas	6	2.476	2.504	2.517	2.551
42 horas	7	2.496	2.488	2.478	2.59
48 horas	8	2.499	2.514	2.528	2.695

Tabla 11. Registro de datos de de las especies de *Candida* diagnosticadas en este estudio.

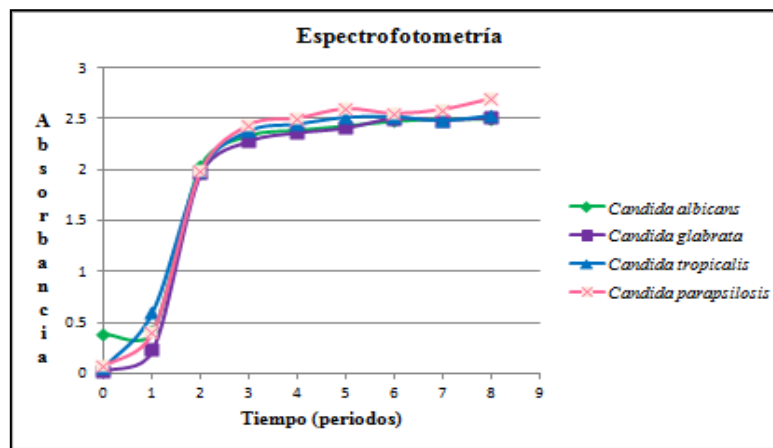


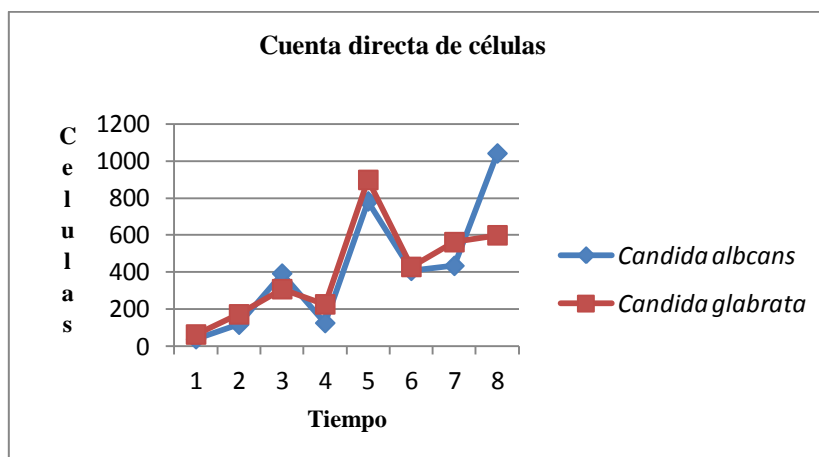
Figura. Curva de crecimiento de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* en donde se observa claramente que *Candida parapsilosis* tiene un mayor crecimiento y viabilidad.

Ya que en los resultados de la identificación microbiológica se observó una gran frecuencia de presencia de *C. glabrata* después de *C. albicans* se decidió realizar un ensayo para determinar si el crecimiento de alguna de estas era mayor que otra especie lo cual podría interferir en el diagnóstico molecular; únicamente se tomaron estas dos especies por separado.

8.2 Método para cuantificar células en la cámara de Neubauer

TIEMPO	HORA	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>
0	12:00pm		
6	06:00pm	38	63
12	12:00am	116	172
18	06:00am	392	308
24	12:00pm	125	226
30	06:00pm	782	898
36	12:00am	407	428
42	06:00am	434	562
48	12:00pm	1,041	599

Tabla 11. Registro del número de células cuantificadas en la Cámara de Neubauer de *Candida albicans* y *Candida glabrata*



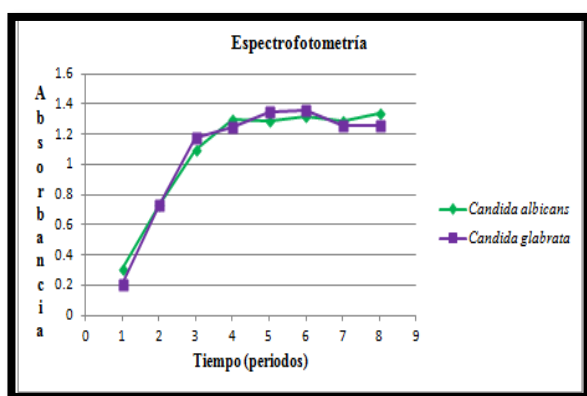
Grafica 28. Curva de crecimiento de *Candida albicans* y *Candida glabrata* mediante cuenta directa en la cámara de Neubauer.

8.3 Espectrofotometría de *Candida albicans* y *Candida glabrata*.

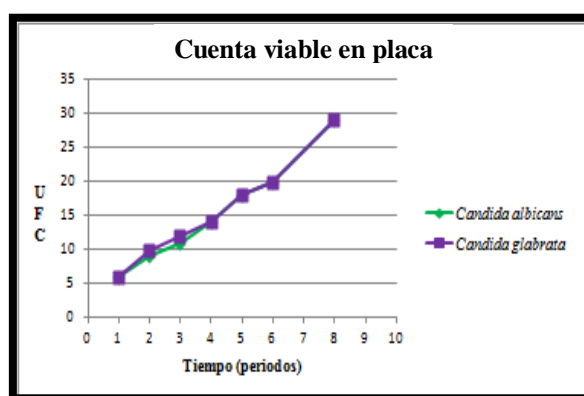
Se realizó un ensayo de curva de crecimiento para las especies *C. albicans* y *C. glabrata* para poder identificar su comportamiento por separado midiendo la absorbancia 260/280 mediante espectrofotometría en donde se encontró, que ambas tuvieron un crecimiento similar, a pesar de esto se encontró que al realizar la cuenta viable en placa para estas mismas cepas, la especie de *C. glabrata* presentó un mayor crecimiento al cabo de 8 h, por el contrario *C. albicans* disminuyó su crecimiento al paso de 6h, mostrando así la competencia existente de *C. glabrata* en contra de *C. albicans* (Figura 29).

TIEMPO	HORA	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>
0	12:00pm	0	0		
6	6:00pm	0.304	0.204	4×10^6	5.5×10^6
12	12:00am	0.733	0.727	19×10^9	4×10^{10}
18	6:00am	1.094	1.178	34×10^{11}	5.5×10^{12}
24	12:00pm	1.295	1.251	5.5×10^{14}	4.5×10^{14}
30	6:00pm	1.287	1.347	3×10^{18}	5.5×10^{18}
36	12:00am	1.323	1.362	4×10^{20}	3×10^{20}
42	6:00am	1.284	1.258	----	----
48	12:00pm	1.338	1.26	2×10^{29}	2×10^{29}

Tabla 12. Absorbancia determinada por el espectrofotómetro de células de *Candida albicans* y *Candida glabrata* y valores de UFC de estas mismas especies no compitiendo entre ellas.



A)



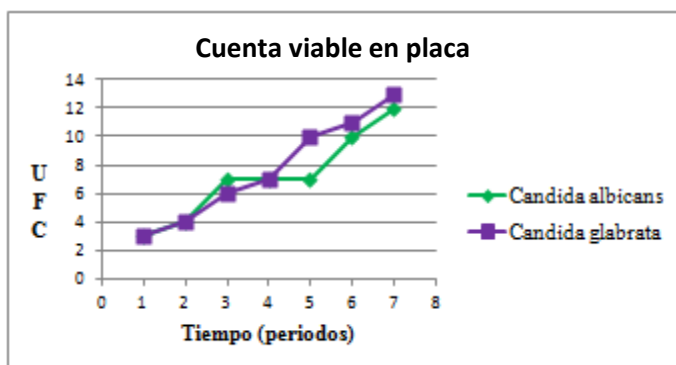
B)

Figura 29. **A)** Curva de crecimiento de *Candida albicans* y *Candida glabrata* juntas midiendo la absorbancia mediante espectrofotometría en el medio YPD. **B)** Viabilidad de las colonias de *C. albicans* y *C. glabrata* por separado por medio de UFC.

Una vez determinado el comportamiento de *C. glabrata* y *C. albicans* se decidió realizar un cocultivo de estas especies para poder determinar si estas especie varían en su tasa de crecimiento cuando crecen juntas en contra de las demás para esto se incubaron estas especies en medio de cultivo YPD durante 24hrs.a 37°C; ambas especies fueron inoculadas en 50mL de medio de cultivo YPD con una concentración inicial de 100cel/μl.

Tiempo	Periodo	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>
0	0		
3	1	3×10^3	3×10^3
6	2	3×10^4	3×10^4
9	3	3.5×10^7	11×10^6
12	4	14×10^7	38×10^7
18	5	5×10^7	7×10^{10}
21	6	1×10^{10}	2.7×10^{11}
24	7	1.05×10^{12}	5.755×10^{13}

A)



B)

Tabla 13. **A)** Tabla de registro de datos de curva de crecimiento de cocultivo de *C. albicans* y *C. glabrata* caracterizada mediante cuenta viable en placa. **B)** Crecimiento de *C. albicans* y *C. glabrata* en cocultivo caracterizado mediante cuenta viable en placa en Chromagar Candida.

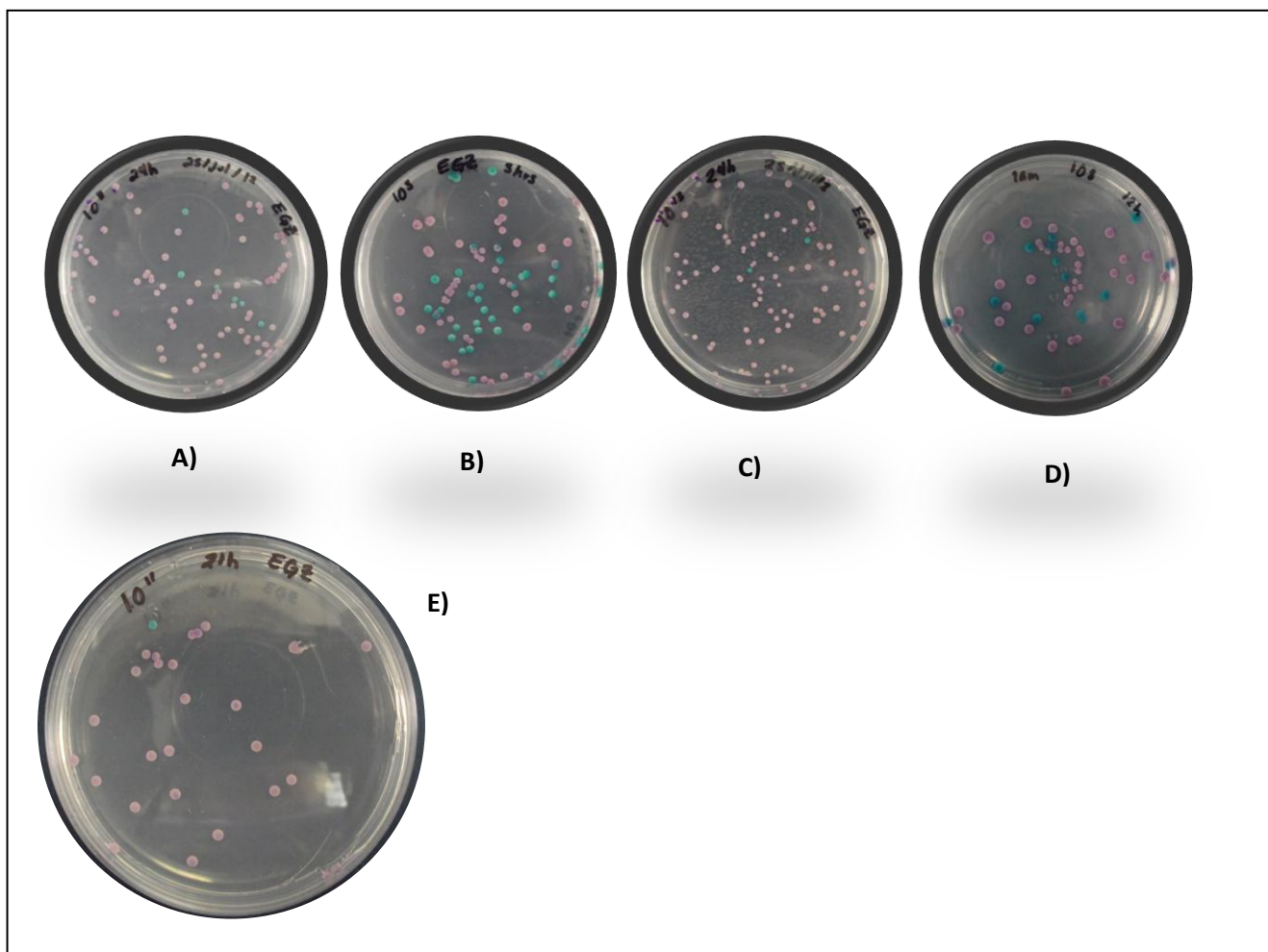


Figura 30. Placa de Chromagar con *Candida albicans* (verde) contra *Candida glabrata* (morado), **A)** muestra de sujeto sano a una dilución de 1×10^{11} , **B)** Muestra sujeto sano de 3 hrs de incubación a una dilución de 1×10^3 **C)** Muestra de paciente con Diabetes mellitus a una dilución a 1×10^{13} , 24 hrs después de incubación, **D)** Muestra de paciente diabético a una dilución de 1×10^8 al cabo de 12 hrs de incubación, **E)** Muestra de la Dilución a 1×10^{11} en paciente diabético en un periodo de 21 horas transcurridas. Se observa claramente la dominancia de *C. glabrata*.

8.4 Resultados de significancia en el análisis de comparación entre pacientes sanos y diabéticos para cada microorganismo determinado

	Especies			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Significancia	0.167	0.12	0.488	0

Tabla 14. Resultado estadístico de significancia en *Candida* spp. en la comparación de especies entre sujetos sanos y pacientes diabéticos de cada microorganismo.

8.5 Frecuencia de hallazgos encontrados de cada especie de acuerdo al porcentaje total de pacientes odontológicos sanos y pacientes diabéticos

Según el porcentaje total de especies encontradas en sujetos sanos, *C. albicans* representa los niveles más altos en un 80% en comparación del resto de estas a diferencia de las muestras obtenidas en pacientes diabéticos en el cual *C. albicans* se presentó en el 100% de las muestras y en segundo lugar la presencia de *C. parapsilosis* en un 95%.

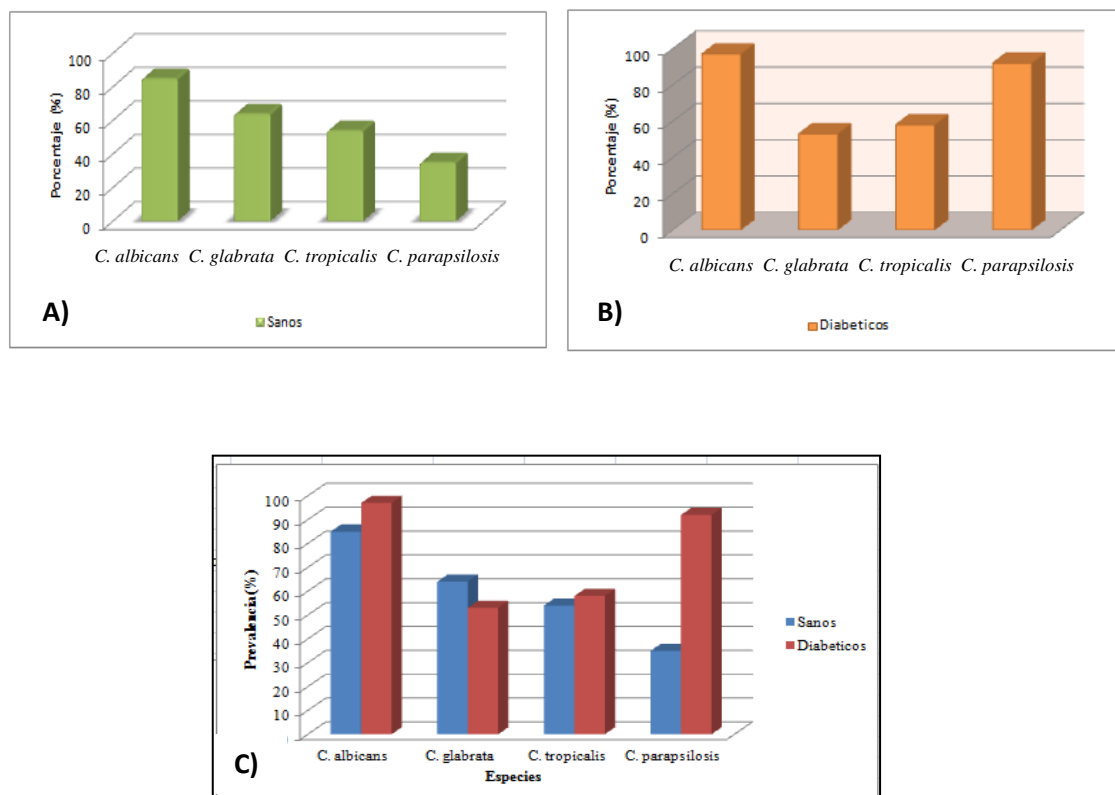


Figura 31. Porcentaje total de especies encontradas en pacientes odontológicos sanos y diabéticos donde se muestra: **A)** la diferencia significativa entre la presencia de *C. glabrata* en sujetos sanos, **B)** la diferencia significativa de *C. parapsilosis* en pacientes diabéticos y **C)** La comparativa entre ambos tipos de muestras donde claramente se observa que *C. parapsilosis* y *C. albicans* son las especies con mayor porcentaje en pacientes diabéticos en comparación con los sujetos sanos donde *C. albicans* fue la especie con mayor porcentaje encontrada.

Con el fin de determinar la frecuencia en la que se encontraban las combinaciones de dos o más especies de *Candida* entre ambos grupos se realizó un análisis molecular para determinar y comparar cuales son las especies que interactúan entre si; encontramos en primer lugar que las interacciones de las especies de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* son las más frecuentes encontradas y en segundo lugar la interacción de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* entre el grupo de sujetos sanos y pacientes diabéticos (Tabla 15).

Frecuencia de Combinaciones de Especies de Candida	Número de Pacientes con Especies Combinadas	
	Controles	Diabéticos
<i>Candida albicans</i>	14	0
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida glabrata</i>	11	3
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida glabrata</i> + <i>Candida parapsilosis</i>	9	4
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida glabrata</i> + <i>Candida tropicalis</i>	21	27
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida glabrata</i> + <i>Candida parapsilosis</i> + <i>Candida tropicalis</i>	8	17
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida parapsilosis</i>	1	1
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida parapsilosis</i> + <i>Candida tropicalis</i>	11	34
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida tropicalis</i>	10	11
<i>Candida glabrata</i>	8	0
<i>Candida glabrata</i> + <i>Candida parapsilosis</i>	3	0
<i>Candida glabrata</i> + <i>Candida parapsilosis</i> + <i>Candida tropicalis</i>	4	1
<i>Candida glabrata</i> + <i>Candida tropicalis</i>	0	1
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0
<i>Candida parapsilosis</i> + <i>Candida tropicalis</i>	0	1
<i>Candida tropicalis</i>	0	0

Tabla 15. Frecuencia de coexistencia de diferentes especies en pacientes odontológicos diabéticos y sujetos sanos en el estado de Nuevo León

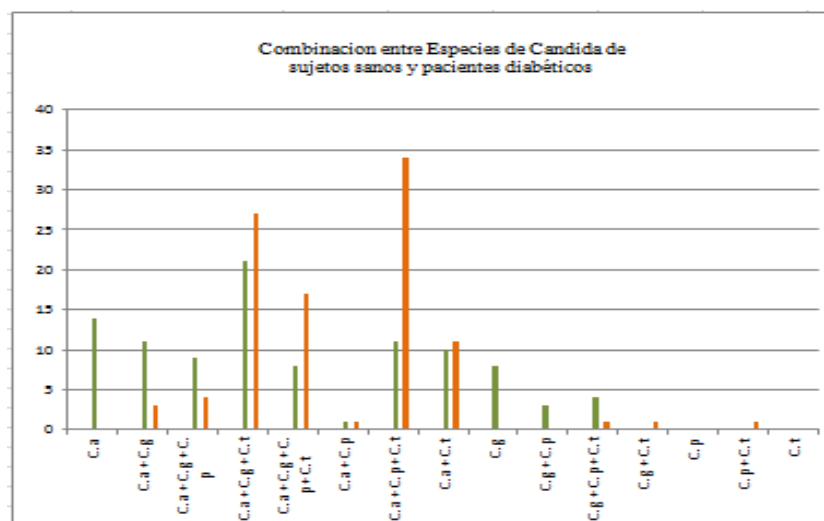


Figura 32. Comparación y combinación de coexistencias de uno dos o más especies entre los grupos de sujetos sanos contra pacientes diabéticos.

Al realizar una comparación de la frecuencia de aparición de las especies por separado encontramos que entre entre las especies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*). no existía diferencia significativa entre ambos grupos (sanos y diabéticos), en los casos de *C. albicans*, *C. tropicalis* ($p > 0.05$), Sin embargo si existe una diferencia significativa para la especie de *C. glabrata* ($p < 0.05$), es decir existen más de estas especies en pacientes diabéticos que en sujetos sanos donde es menos frecuente que en pacientes diabéticos, al igual que *C. parapsilosis* el cual mostro ser significativamente más frecuente en diabeticos que en pacientes odontológicos sanos ($p < 0.05$). (Tabla 16), (Figura 31).

PACIENTES ODONTOLOGICOS				
NIVELES DE GLUCOSA mg/dl	<i>C. albicans</i> (%)	<i>C. glabrata</i> (%)	<i>C. tropicalis</i> (%)	<i>C. parapsilosis</i> (%)
60-70	24.7	20.3	29.6	22.9
71-80	22.4	23.4	16.7	17.1
81-90	16.5	18.8	20.4	22.9
91-100	16.5	18.8	13	22.9
101-110	20	18.8	20.4	14.3
110-120	13.4	13.2	19	10.9
121-130	7.2	7.5	6.9	6.5
131-140	12.4	13.2	6.9	13
141-150	6.2	5.7	6.9	4.3
151-más	60.8	60.4	60.3	65.2

Tabla 16. Porcentaje de cada una de las especies en base al total de casos positivos dependiendo de la concentración de glucosa en sangre de pacientes odontológicos sanos y diabéticos en rangos de 60-151mg/dl, en relación con el índice de aparición.

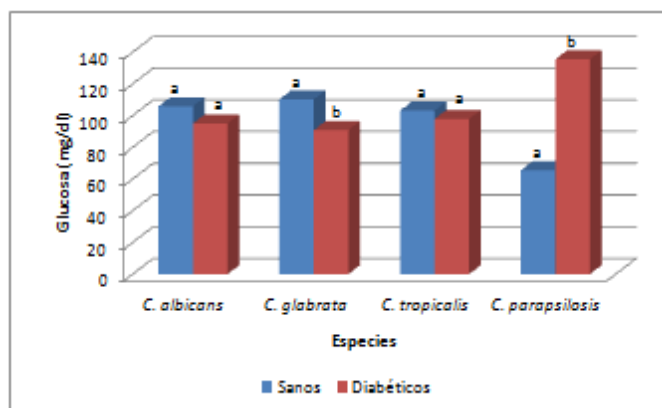


Figura 33. Se muestran con a), y b) las diferencias significativas en relación con el índice de aparición de cada una de las especies y niveles de glucosa en sangre en pacientes odontológicos sanos y diabéticos

En la Figura 34 se muestra el porcentaje de prevalencia de cada una de las 4 especies de *Candida* según su concentración de glucosa de 110 a 150mg/dl en las 100 muestras tomadas de pacientes diabéticos en donde no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$). Sin embargo cuando se presenta un incremento en los rangos de glucosa (151mg/dl o más) se observa una mayor frecuencia de hallazgo de cualquier especie de *Candida*. En la Figura 35 se muestra el porcentaje de prevalencia de estas mismas especies según su concentración de glucosa de 60 a 110mg/dl donde se observa que el mayor índice de aparición es en primer lugar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* en condiciones normales de entre 60 y 70mg/dl.

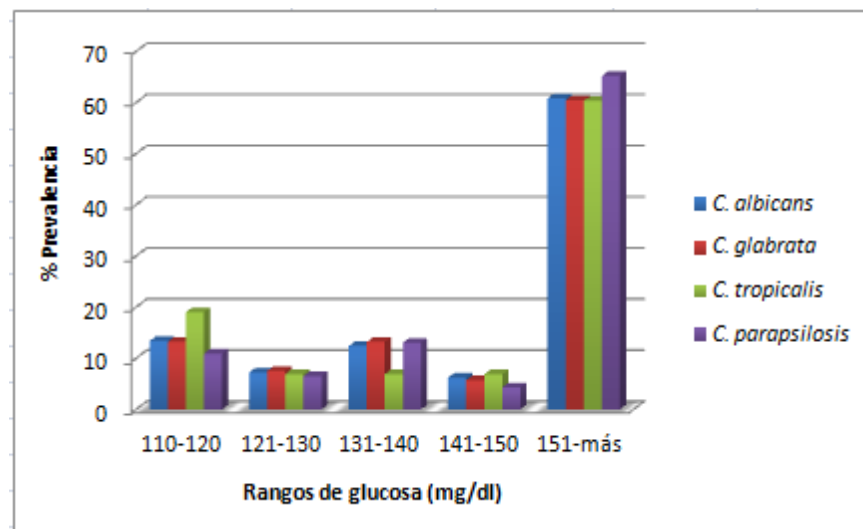


Figura 34. Porcentaje de prevalencia en especies del genero *Candida* según los índices de glucosa en pacientes Diabéticos.

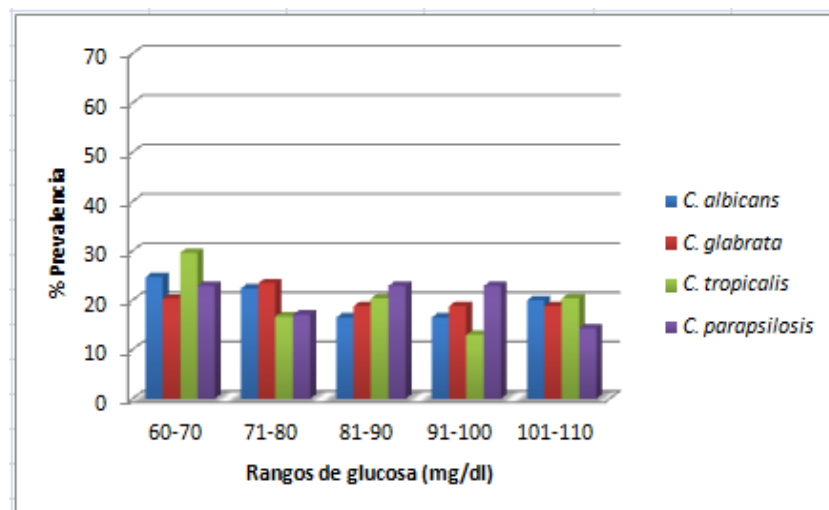


Figura 35. Se muestran con a), y b) las diferencias significativas en relación con el índice de aparición de cada una de las especies y niveles de glucosa en sangre en pacientes odontológicos sanos

8.5.2 Comparación entre método de PCR multiplex y método microbiológicos tradicional

Se realizó un análisis estadístico de correlación canónica para determinar la asociación que existe entre los dos métodos de detección (microbiológico y PCR multiplex) encontramos que no existe una correlación significativa entre los dos métodos de detección $p > 0.05$, es decir ambos métodos son efectivos pero a pesar de esto se encontró que para las especies de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, si existe una correlación mediante los métodos microbiológicos; este resultado coincide con las bandas diagnosticadas en el ensayo de PCR multiplex.

El problema surge por el hecho de que la especie de *C. parapsilosis* no se presenta en ninguno de los individuos como única especie aislada, por el contrario, como se muestra en la Tabla 15, se aísla de pacientes que también poseen *C. albicans* y *C. glabrata* en la mayoría de los casos excepto en uno, es por eso que al no poseer el PCR multiplex la capacidad de generar una banda diferencial para esta especie (*C. parapsilosis*), no se puede distinguir su presencia.

Además encontramos que en algunas de las diferentes muestras tanto de pacientes odontológicos sanos como en pacientes con diabetes *mellitus*, existen patrones de bandas que no corresponden a las establecidas para la identificación de las especies de interés en este estudio. Estas bandas que se pueden apreciar en las muestras 8, 11, 21, 25, 26, 32, 35, 48, 56, 61, 71 en pacientes odontológicos sanos (Figura 31); y en las muestras 7, 8, 20, 45, 46, 54, 59, 64, 65, 87 correspondientes de pacientes diabéticos (Figura 39); ya que estas presentan un peso molecular aproximado de 1000pb – 1200pb.

8.6 PCR multiplex de pacientes odontológicos

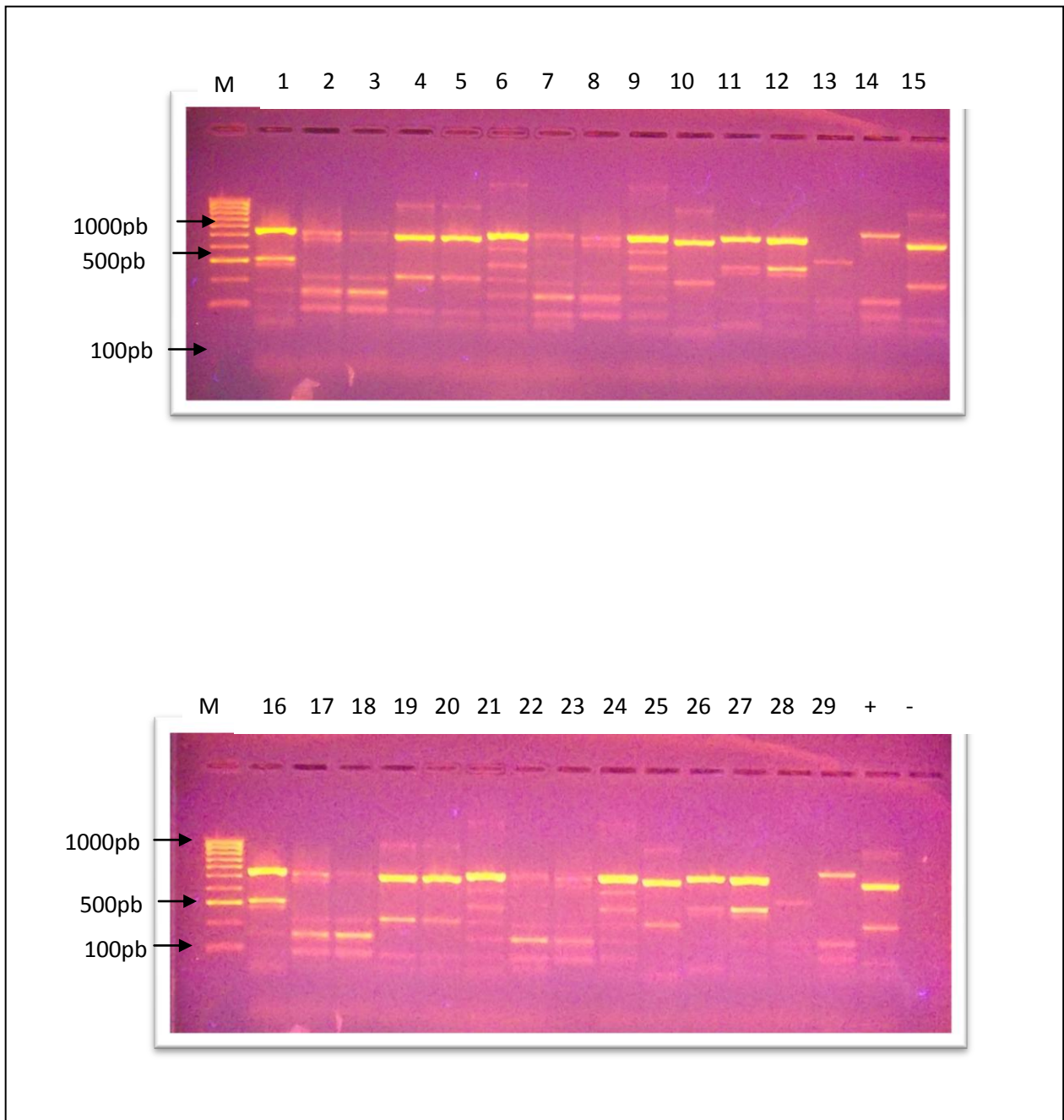


Figura 31. PCR multiplex de sujetos sanos en el cual se muestra con números la muestra de cada paciente M= es marcador de peso molecular de 100 a 1000pb

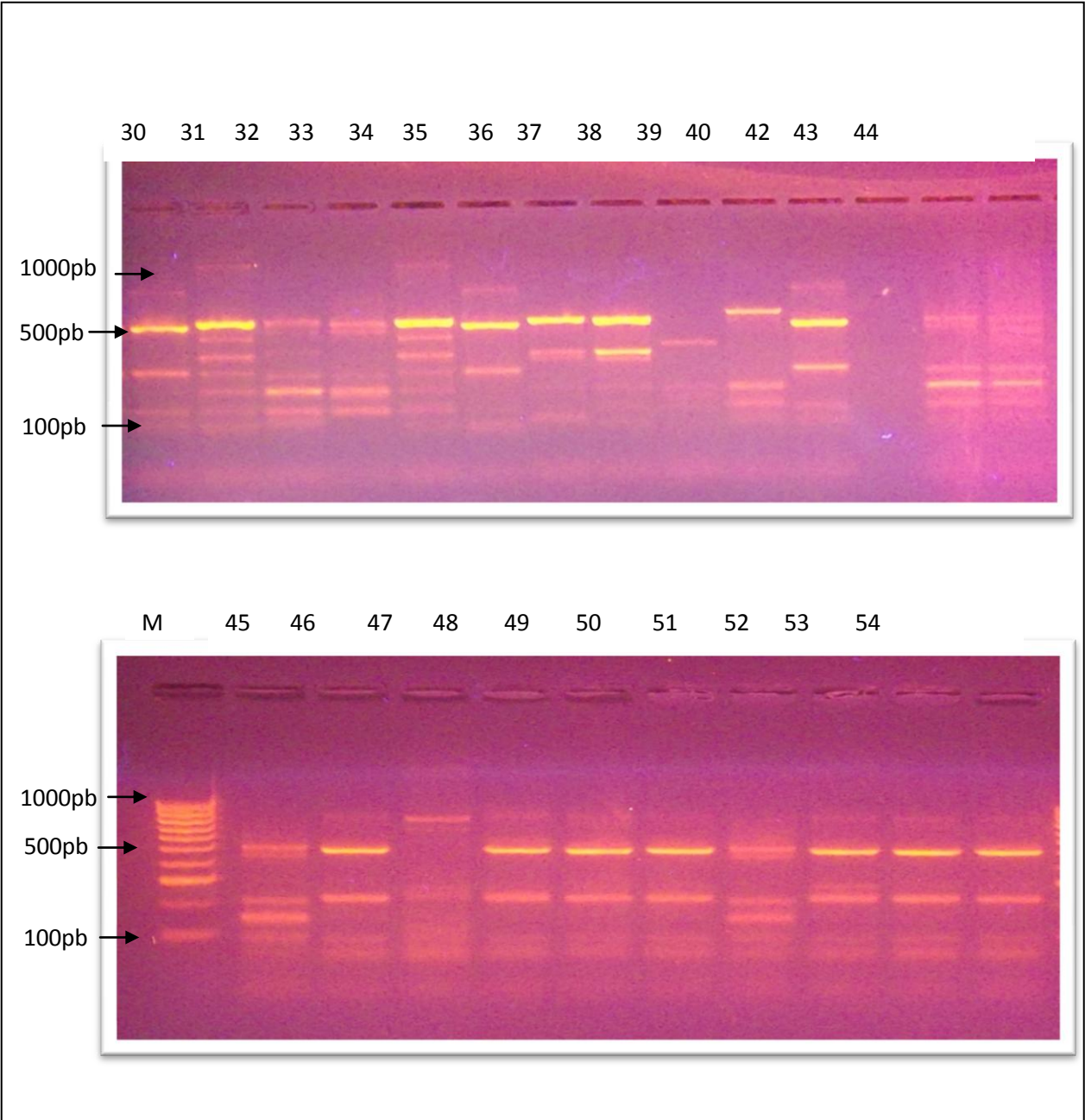


Figura 37. PCR multiplex de sujetos sanos en el cual se muestra con números la muestra de cada paciente M= es marcador de peso molecular de 100 a 1000pb

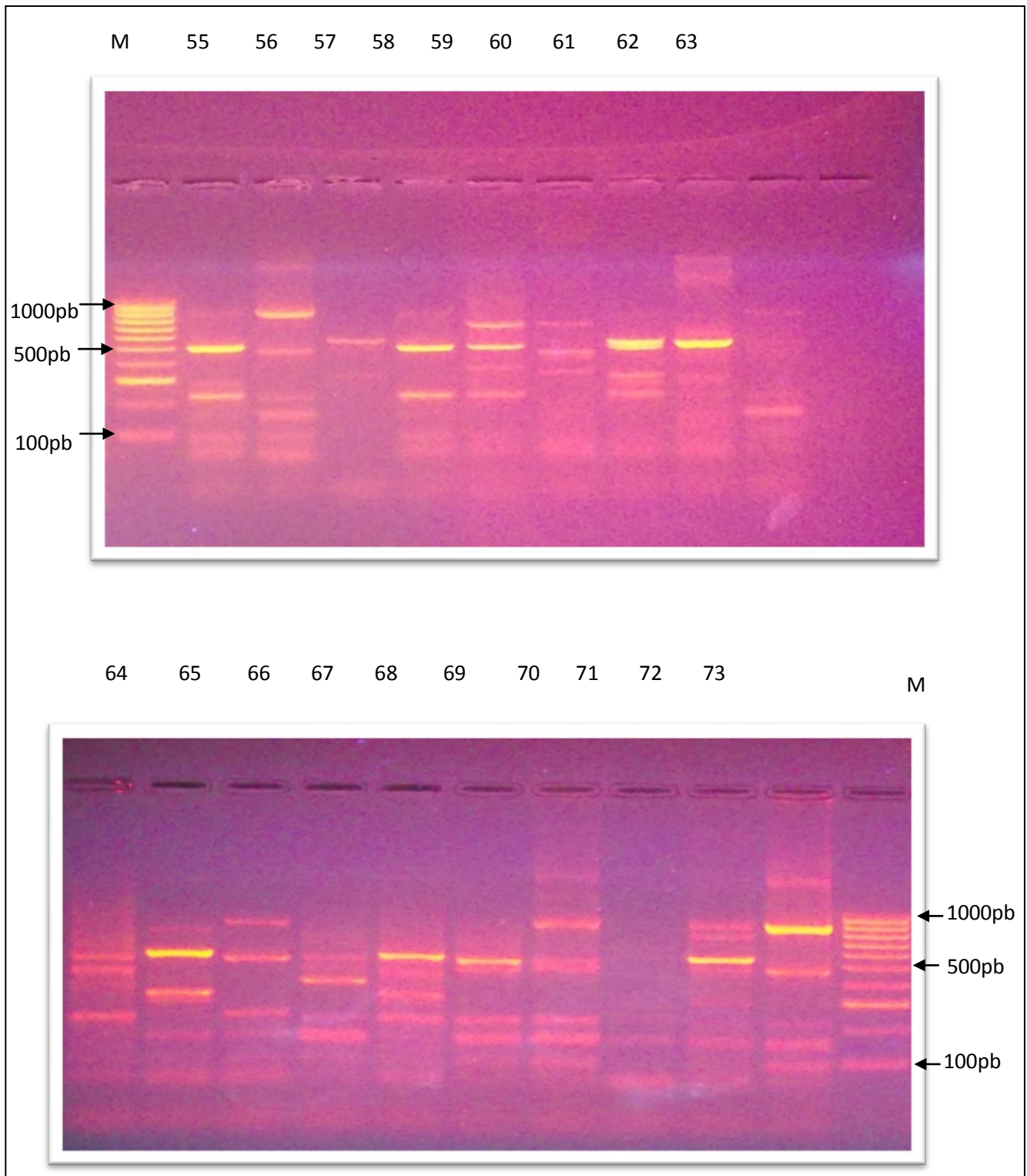


Figura 38. PCR multiplex de sujetos sanos en el cual se muestra con números la muestra de cada paciente M= es marcador de peso molecular de 100 a 1000pb

8.15 PCR. Multiplex de pacientes diabéticos

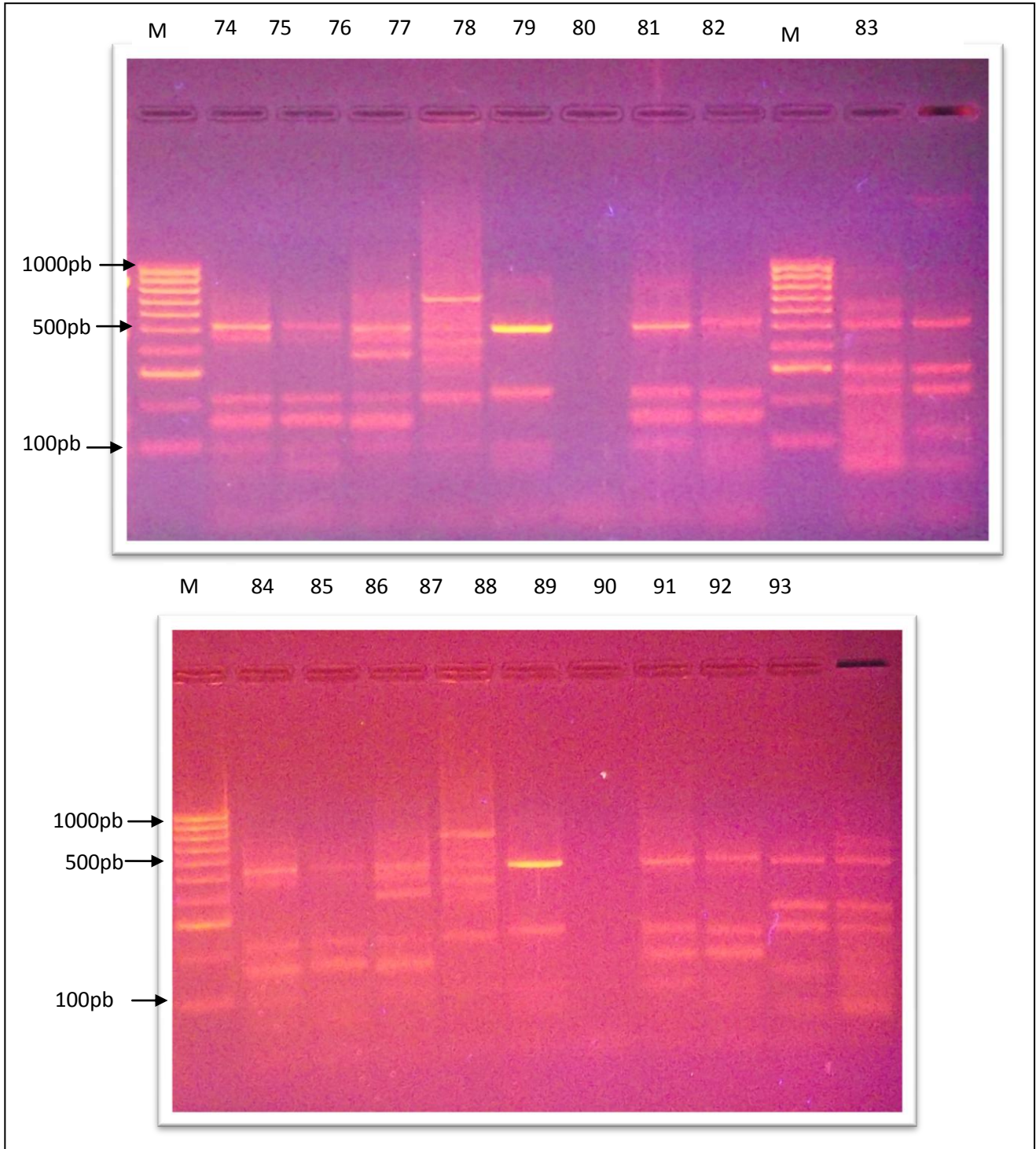


Figura 39. PCR multiplex de pacientes diabéticos en el cual se muestra con números la muestra de cada paciente M= es marcador de peso molecular de 100 a 1000pb

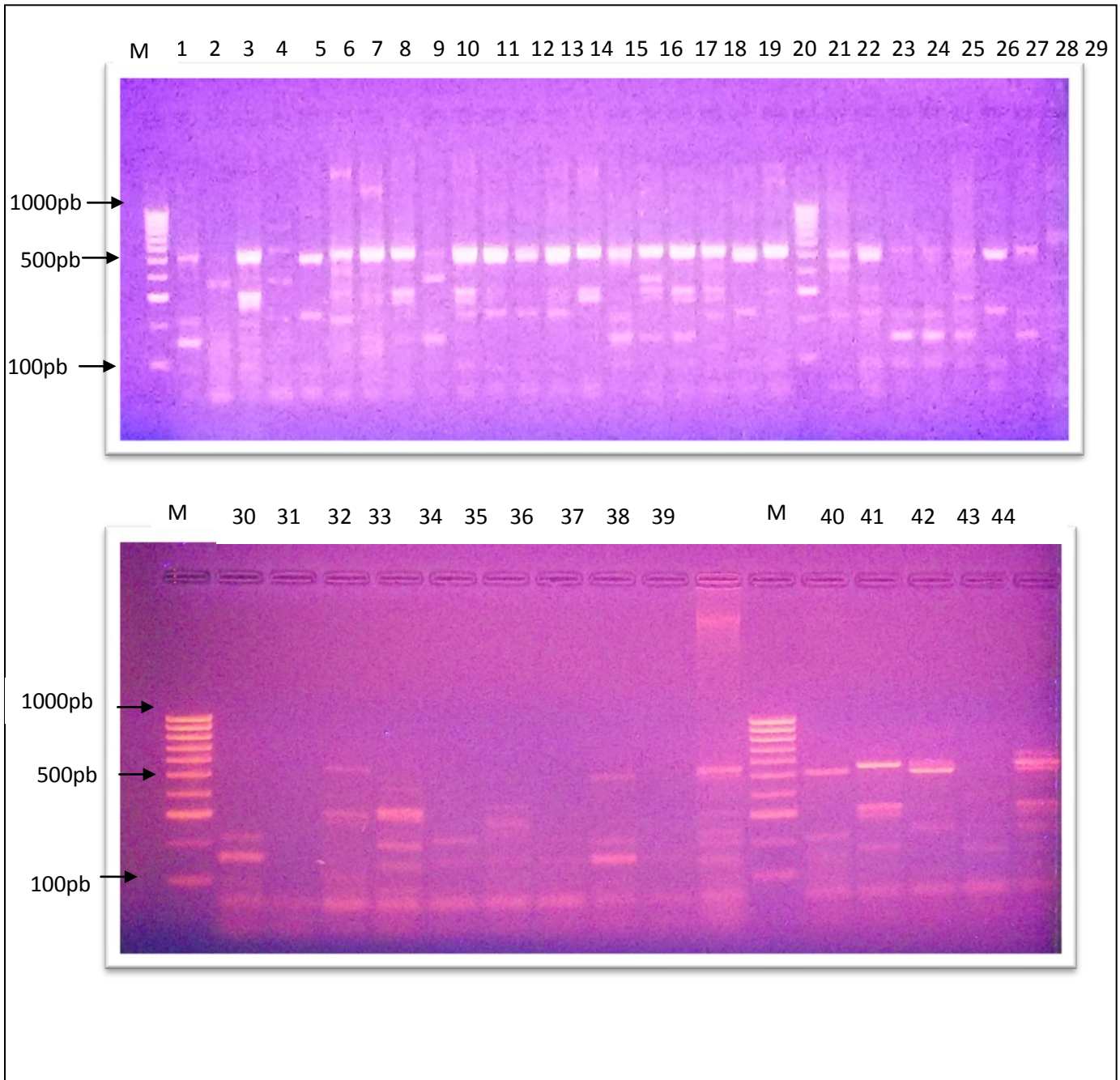


Figura 40. PCR multiplex de pacientes diabéticos en el cual se muestra con números la muestra de cada paciente M= es marcador de peso molecular de 100 a 1000pb

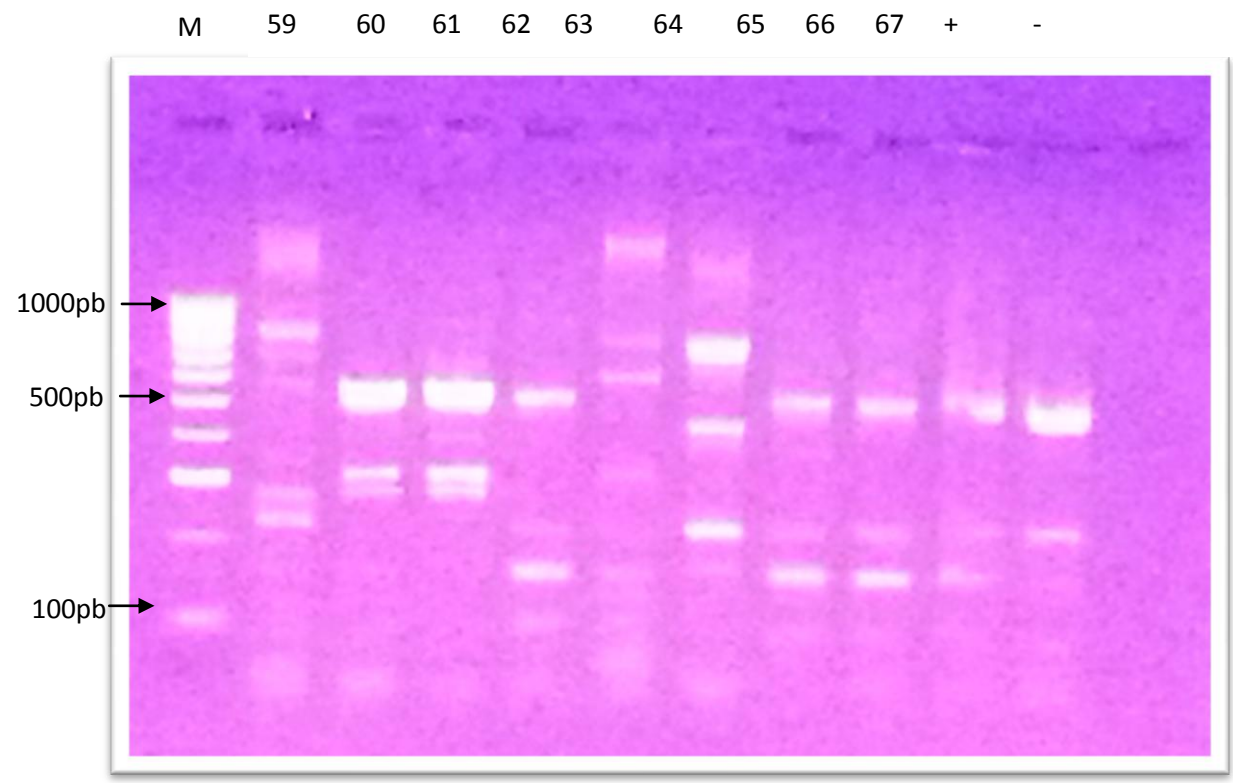
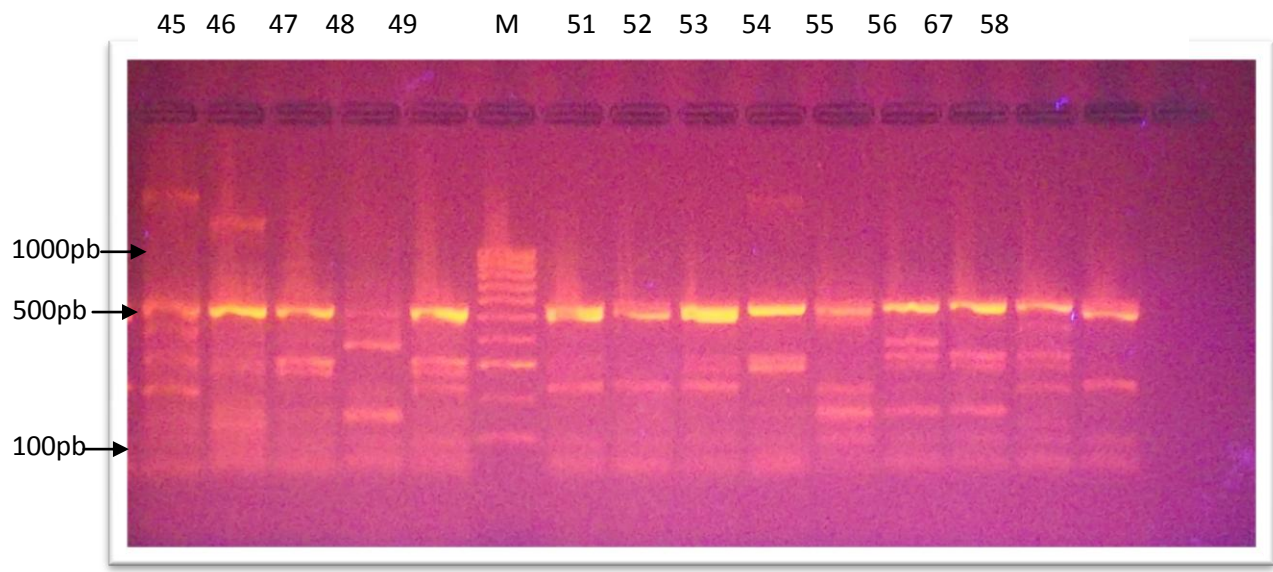


Figura 41. PCR multiplex de pacientes diabéticos en el cual se muestra con números la muestra de cada paciente M= es marcador de peso molecular de 100 a 1000pb

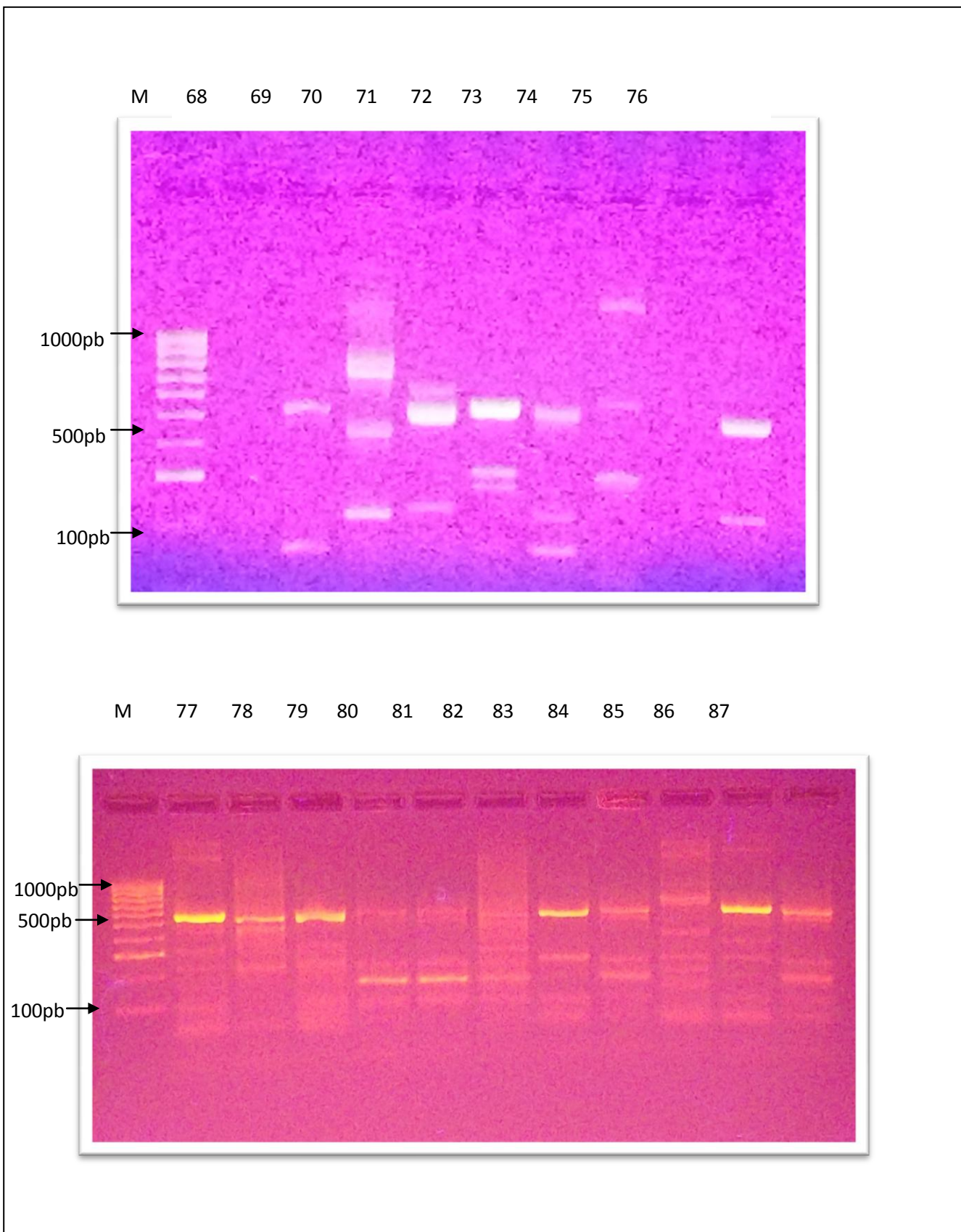


Figura 42. PCR multiplex de pacientes diabéticos en el cual se muestra con números la muestra de cada paciente M= es marcador de peso molecular de 100 a 1000pb

9. Discusión

Analizamos un total de 200 muestras de sujetos que acudieron a consulta odontológica a la Facultad de Odontología de la U.A.N.L. Los grupos estudiados fueron sujetos sanos y pacientes con enfermedad periodontal. En particular se conoce que los pacientes diabéticos son candidatos potenciales a desarrollar infecciones fúngicas; que frecuentemente se asocian a los niveles altos de glucosa; encontramos que todas las especies se encontraban presentes en ambos grupos pero en general en sujetos sanos se presenta *C. albicans* (85%), seguida de *C. glabrata* (64%), *C. tropicalis* (54%), *C. parapsilosis* (35%) y *C. parapsilosis* en pacientes diabéticos se presenta casi en el 100 % de los casos esto debido a el alto índice de concentración de glucosa en sangre que presentan estos pacientes.

Casadevall y Pirofski establecen que el estado de estos microorganismos como comensal generalmente ocurre temprano en la vida y lo definen como un estado de infección que no resulta de lesión o daño clínico aparente, permitiendo la persistencia del microorganismo.

Cannon y colaboradores en el año de 1999 mencionan que la incidencia de estas especies en neonatos es de 45%, 65% en niños sanos, 30%-40% en adultos saludables, 65%-88% de aquellos pacientes que tienen terapias con larga duración. Estos datos nos pueden sugerir que el estado de salud del individuo es un factor predisponente para la colonización de la *Candida*.

Los reportes sobre portadores sanos de especies de *Candida* varían del 20% al 70% siendo *C. albicans* la especie más prevalente en un 53%-65% siguiendo diferentes especies como *C. glabrata* y *C. tropicalis* con el 7% dependiendo de la población. La salud y la sensibilidad de la técnica, los resultados en estudios comparativos de la presencia de estos microorganismos aislados en sujetos sanos y pacientes diabéticos algunas veces son contradictorios (Akanan *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2006).

La especie de *Candida* más prevalente en boca de individuos sanos sistémicamente citada en la literatura es la *C. albicans* con porcentajes que varían del 53% al 65% mientras que en la

cavidad oral de pacientes diabéticos varía entre 60% y 89%, lo cual concuerda con nuestros resultados donde se indica que *C. albicans* se encuentra en un 85% en sujetos sanos y en el 100% de las muestras obtenidas en pacientes diabéticos. (Negroni 1999., Freydiere *et al.*, 1997. Pereira *et al.*, 2004). Las especies *Candida*-no albicans como *C. tropicalis* se presenta en un 6.2% y *C. glabrata* en un 1.81% en pacientes diabéticos, mientras que en los sujetos sanos ambas especies presentan una prevalencia del 7%. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que en el grupo control concuerdan en el caso de *C. albicans* (85%), seguida de *C. glabrata* (64%), *C. tropicalis* (54%), *C. parapsilosis* (35%). Por otra parte en el grupo de pacientes diabéticos resulta contrastante la diferencia ya que el microorganismo que más prevalece en primer lugar es *C. albicans* (97%), posteriormente *C. parapsilosis* (92%), *C. tropicalis* (58%), *C. glabrata* (53%). Tal vez esto se deba a que las muestras antes mencionadas analizadas por Negroni 1999. y Freydiere *et al.*, 1997 fueron obtenidas de pacientes europeos y en el presente estudio fueron colectadas en Latinoamérica y según P.faller y colaboradores en el 2004 en un estudio el cual determinó los tipos de especies encontradas con mayor frecuencia en cada país encontró que los porcentajes de las especies en Latinoamérica corresponden a *C. albicans* 46.5%, *C. parapsilosis* 17.1%, *C. tropicalis* 21.3%, y *C. glabrata* 7.5%; en último lo cual coincide al menos en orden en cada una de estas especies con nuestros resultados.

Con respecto al tipo de muestras, encontramos en ambos grupos la presencia de todas las especies de interés (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) pero que existe una mayor incidencia de la presencia de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. ($p < 0.05$) en sujetos sanos; estos datos difieren de los reportados por Daniluk *et al.*, 2006 quienes encontraron que *Candida albicans* se encontraba presente en un 66.7% de muestras tomadas de sujetos sanos y un 43.8% en pacientes diabéticos. Palencia *et al.*, publicaron en el 2011 que en muestras orales tomadas en 43 pacientes del grupo control, *C. albicans* se encontraba presente en un 26.2% y solo en pacientes con DM se encontraba presente en un 25%; en el presente estudio la especie *C. albicans* se encontró en sujetos sanos en un 85% y en pacientes diabéticos en un 60%, esto tal vez se deba a que en ese estudio la muestra fue obtenida de prótesis dentales de pacientes totalmente desdentados y en el presente estudio la muestra fue obtenida directamente de la cavidad oral estando presente un número considerable de piezas dentales la cual gracias a su morfología,

malposición y pH presente pueden propiciar al acumulo y desarrollo de más variedades de especies.

Se tiene coincidencia con Mata de Henning *et al.*, 2001, los cuales encontraron en un estudio realizado a 20 pacientes diabéticos por medio de hisopado de la prótesis en la zona que contacta con la mucosa palatina que el 65% de los pacientes presentaban el género *Candida*. Pero en nuestro estudio encontramos que el 75% de las muestras positivas en pacientes Diabéticos estaban en relación con presencia de estas especies de *Candida* lo cual representa una diferencia significativa de ($p < 0.05$).

En un estudio realizado por Daniluk y Tokajuk 2006, determinó que en el 43.8% de los pacientes diabéticos había presencia de *Candida albicans* y en un estudio realizado por Palencia *et al.*, 2011 refiere que solo un 25% de pacientes presentaban un resultado positivo para esta misma especie. En nuestro estudio encontramos porcentajes altos de especies de *Candida* que con respecto a las muestras positivas en pacientes diabéticos por ejemplo, *C. albicans* se encontró en un 97%, *C. glabrata* en 53%. *C. tropicalis* en 58%, y *C. parapsilosis* en un 92%; este aumento en el porcentaje de especies tal vez se deba a la Diabetes es la enfermedad más frecuente en la región del norte del país en donde se reporta en un 8.4% y en el área metropolitana de la Ciudad de México en un 8.1% según lo menciona Olaiz *et al.*, 2000.

Debido a que observamos un aumento en la frecuencia de la especie de *C. parapsilosis* en pacientes diabéticos determinamos las frecuencias de las diferentes especies en base a la concentración de glucosa en sangre. Hasta la fecha se conoce que los niveles de glucosa son determinantes en el desarrollo de coinfecciones por estos tipos de microorganismos; además es la primera vez a nuestro conocimiento que se asocia a los niveles de glucosa en sangre con la presencia de especies, ya que encontramos que cuando los pacientes diabéticos se encuentran en un rango de glucosa de 151mg/dl o más la especie de *Candida* que predomina es *C. albicans*. Además que existe una dependencia significativa con respecto a las concentraciones de glucosa en sangre de este mismo rango en los pacientes diabéticos para las especies de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

En el 2011 Gordillo *et al.* reportan una prevalencia de *Candida* en la población sana del 38.3%, en el presente estudio se encontró un valor del 59.5% valor que se encuentra dentro de los porcentajes reportados por otros autores en población sana, que varía del 17.5% al 75%.

El mecanismo por el cual la diabetes predispone a la alta tasa de acarreadores en cavidad oral no está establecido; sin embargo existen factores reconocidos que pueden estar implicados en la colonización y mantenimiento de una población de especies de *Candida* en la cavidad oral.

En México, Gaitan *et al.*, 1998 realizaron un estudio en el cual determinaron la prevalencia de las especies de *Candida* en una población adulta, dando como resultado un 17.55% para estas especies, lo cual no concuerda con los resultados del presente estudio ya que según el promedio de las especies de *Candida* se encuentran en un 59.5% esto tal vez se deba a que en condiciones de salud, los queratinocitos bucales son capaces de secretar varias citoquinas proinflamatorias. Estas citoquinas juegan un papel crítico en el desarrollo de la inmunidad protectora en contra de patógenos intracelulares. El contacto con los microorganismos guía a las células epiteliales a producir proteínas antimicrobianas; que incluyen las defensinas, así la mucosa bucal cumple una doble función inmunológica y bioquímica además del de barrera física. Las alteraciones tisulares relacionadas con la diabetes *mellitus*, alteran las capacidades de defensa de las mucosas y las predisponen a la colonización microbiana, a la infección e invasión tisular (Rouabhia 2002).

Se conoce que *Candida albicans* y *C. glabrata* se presenta como importante agente causal en infecciones de las mucosas hematógenas, y *C. glabrata* se ha considerado como un saprófito no patogénico de la flora normal en individuos sanos. Sin embargo en las últimas décadas ha existido un aumento en las infecciones provocadas por esta especie debido tal vez al uso de drogas, además de esto esta especie produce proteínas y posee una superficie celular similar a la de *C. albicans* lo cual asegura su capacidad de adherencia a la células del huésped lo que trae como consecuencia una rápida diseminación en las infecciones en enfermos inmunosuprimidos lo cual eleva una alta tasa de mortalidad (Fidel., Sobel 1999).

Estos resultados, ponen en evidencia al igual que en la mayoría de los estudios que las especies de *Candida* requieren de las condiciones del huésped como la diabetes *mellitus* son el factor desencadenante entre otros factores; para la colonización de estos microorganismos como patógenos causantes de procesos infecciosos en cavidad oral.

La identificación precisa de las levaduras es un objetivo fundamental de los laboratorios de microbiología, principalmente en los hospitales y en los pacientes inmunosuprimidos (Chen *et al*, 2002;. Erjavec y Verweij, 2002). En la última década varias técnicas han sido desarrolladas para mejorar esta práctica y la mayoría de estas se basan principalmente en los métodos moleculares para la identificación fenotípica de estas especies. Recientemente se han introducido al mercado diferentes pruebas para la identificación de estas levaduras; tal es el caso de los medios cromogénicos, pruebas enzimáticas, pruebas bioquímicas, y métodos inmunológicos. En el caso de los medios cromogénicos son utilizados ya que sus principales limitaciones son que se encuentran bajo un poder de discriminación en base a un gradiente cromático, y no es fácil de interpretar en todas las ocasiones (Liguori *et al*; 2009). Por tal motivo se sugiere su uso para cultivos primarios, para la detección, o para las pruebas preliminares.

Liguori *et al* 2009 realizaron un estudio en el cual se trato de identificar aislados clínicos de origen bucal mediante diferentes técnicas para evaluar los tiempos de trabajo y costos en sus resultados obtuvieron que en el método de PCR multiplex se logro la identificación del 74% de las muestras positivas en comparación con el sistema API 20C AUX el cual mostro ser preciso en relación a la identificación de la especie, además de fácil manejo y económico en comparación con otras pruebas . Sin embargo, se requiere una precisión al momento de la siembra correcta y de una interpretación correcta en los resultado por lo cual se requieren requiere de habilidad, además de los tiempos de lectura suelen ser de hasta 72 h.

En este trabajo al comparar los métodos de detección de *Candida* spp. por el método de PCR multiplex y el método tradicional, encontramos que con el método de PCR multiplex es posible la identificación de las especies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, ya que todas estas especies poseen un patrón de banda específico que permite diferenciar una especie de otra a pesar de esto no se encontró una correlación significativa entre ambos métodos, probablemente

porque al tratar de identificar la especie de *Candida parapsilosis* por PCR múltiplex no se encontró una banda que ayude a diferenciar ésta de las otras especies. En el caso de realizar un análisis de *Candida parapsilosis* de muestras puras se puede detectar la presencia del microorganismo, sin embargo, al realizar el análisis con muestras mixtas (que tengan las diferentes especies de *Candida*) existe un traslape entre las bandas de las otras especies (250pb, 500pb), lo cual enmascara el diagnóstico de ésta (Figura 24). Lo cual indica, que esta metodología permite diferenciar a cada una de las especies analizadas en este estudio, con excepción de *Candida parapsilosis*, ya que con los oligonucleótidos utilizados (Tabla 7) no se logra amplificar una banda característica de este microorganismo cuando se trabaja con muestras mixtas. Sin embargo la metodología propuesta puede ser utilizada como una prueba confirmatoria de muestras con aislados individuales de este microorganismo. Se recomienda realizar un nuevo diseño de oligonucleótidos específicos que logren diferenciar a *Candida parapsilosis* de las otras especies (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*). Lo cual concuerda con el análisis realizado por (Chang *et al*; 2001) en el cual identificó diferentes muestras de *Candida* spp. a partir de cultivo de sangre de pacientes sero positivos, con el método de PCR multiplex logro identificar especies de *Candida* en un lapso de 8 horas; en este estudio se lograron obtener resultados similares en relación con los tiempos de trabajo sin embargo es importante mencionar que estos tiempos dependen de el procesamiento de las muestras y de la facilidad de obtención de las mismas.

En resumen la ventaja de detección por PCR multiplex es que se puede lograr la identificación de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. en menor tiempo y a un menor costo que el Chromagar. Ya que en este último los tiempos de incubación son de 48 hrs para lograr diferenciar los microorganismos, además se requieren medios de cultivo cromogénicos de alto costo.

10. CONCLUSIONES

De la comparación de los dos grupos (Control y Experimental) encontramos que existen diferencias significativas para las especies de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* ($p < 0.05$) ya que en sujetos sanos se encuentra con mayor frecuencia. A nuestro saber el el medio de cultivo CHROMagar candida fue de gran utilidad ya que por sus cualidades como medio de cultivo diferencia nos permitió identificar específicamente la identificación de las especies *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* en un 99% , pero no logra diferenciar con fidelidad las especies de *C. parapsilosis*. Existe una dependencia significativa con la presencia de las concentraciones de glucosa en sangre para las especies de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ($p < 0.05$) en rangos superiores de 150mg/dL. Además *C. glabrata* y *C. parapsilosis* se encuentran con mayor frecuencia en la cavidad oral de pacientes odontológicos sanos.

En pacientes diabéticos se encontró con un alto índice en cuanto a la frecuencia de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Finalmente con el método de PCR multiplex efectivamente se puede lograr la identificación de algunas especies de interés medico como *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. en menor tiempo y a un menor costo que con métodos microbiológicos ya que reduce significativamente costos y proporciona resultados mas rápidos reduciendo los tiempos de trabajo.

11. ANEXOS

Anexo 1. Carta de Consentimiento informada aprobada por el comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
CARTA DE CONSENTIMIENTO



Si usted desea participar voluntariamente en este estudio de investigación científica. Por favor lea este formulario con cuidado y haga cualquier pregunta que tenga. Su participación es voluntaria.

PROPOSITO DEL ESTUDIO.

Dicho estudio consiste en obtener datos generales mediante una historia clínica breve, en la cual se manifiesta su historial médico actual; posterior a esto se realizara la recolección de muestras de origen bucal, el procedimiento prácticamente se basa en entregarle un tubo contenedor para que usted realice un enjuague bucal con agua estéril durante un minuto para posteriormente depositar el contenido del enjuague en un tubo falcón de 10mL, finalmente usted podrá continuar con su tratamiento normal para poder resolver su motivo de consulta.

RIESGOS.

En este estudio no se usaran procedimientos peligrosos, ni medicamentos peligrosos.

CONSIDERACIONES FINANCIERAS.

No se le cobrara por este estudio. Por favor informe sobre cualquier preocupación o duda que usted tenga sobre este estudio.

Entiendo que la información obtenida de la investigación será manejada con forma **confidencial** y que en ningún momento se violara mi privacidad.

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado: “ Caracterización Taxonómica y molecular de *Candida spp.* en aislados clínicos de origen bucal en pacientes sanos y diabéticos de Nuevo León ”.

Registrado ante el Departamento de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio.

El investigador responsable me ha dado seguridades de que no se me identificara en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial.

Nombre y Firma del Paciente

Nombre y firma del Investigador

Anexo 2. Base de datos de muestras obtenidas en pacientes odontológicos sanos donde se muestran las diferentes especies encontradas para el análisis microbiológico

MUESTRA	IDENTIFICACION MICROBIOLÓGICA					mmHg
	1	2	3	4	5	
A1	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	98
A2	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	67
A3	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	88
A4	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	96
A5	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	78
A6	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	99
A7	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	97
A8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	68
A9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	110
A10	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	50
B1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	77
B2	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	76
B3	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	88
B4	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	86
B5	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	79
B6	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	75
B7	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	94
B8	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	88
B9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	94
B10	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	77
C1	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	78
C2	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95
C3	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	110
C4	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	77
C5	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	88
C6	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	76
C7	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	89
C8	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	59
C9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	113
C10	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	123
D1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	91
D2	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	67
D3	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	95
D4	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	110
D5	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	101
D6	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	74
D7	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	108
D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	70
D9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	86
D10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	107
E1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	111
E2	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	85
E3	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	88
E4	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	72
E5	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	78
E6	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	70
E7	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	66
E8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	86
E9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	67
E10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	59

IDENTIFICACION MICROBIOLÓGICA						SANOS
MUESTRA	1	2	3	4	5	mmHg
F1	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	93
F2	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	85
F3	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	117
F4	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	101
F5	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	105
F6	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	116
F7	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	69
F8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	69
F9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	98
F10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	113
G1	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100
G2	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	105
G3	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	89
G4	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	76
G5	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	102
G6	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	117
G7	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	60
G8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	113
G9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	98
G10	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	38
H1	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	63
H2	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	94
H3	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	49
H4	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	84
H5	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	45
H6	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	73
H7	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	61
H8	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	53
H9	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	82
H10	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	64
I1	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	72
I2	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	84
I3	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	79
I4	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	76
I5	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	69
I6	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	80
I7	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	76
I8	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	99
I9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	87
I10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	78
J1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	75
J2	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	60
J3	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	95
J4	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	99
J5	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	86
J6	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	68
J7	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	55
J8	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	67
J9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	76
J10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	89

Anexo 3. Base de datos de muestras obtenidas en pacientes diabéticos donde se muestran las diferentes especies encontradas para el análisis microbiológico

EG1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	300
EG2	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	220
EG3	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	200
EG4	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	180
EG5	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	176
EG6	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	543
EG7	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	334
EG8	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	454
EG9	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	444
EG10	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	144
EG11	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	187
EG12	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	332
EG13	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	333
EG14	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	333
EG15	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	323
EG16	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	223
EG17	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	423
EG18	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	534
EG19	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	354
EG20	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	253
EG21	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	113
EG22	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	534
EG23	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	222
EG24	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	323
EG25	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	123
EG26	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	222
EG27	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	125
EG28	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	122
EG29	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	232
EG30	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	332
EG31	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	442
EG32	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	232
EG33	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	222
EG34	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	221
EG35	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	122
EG36	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	231
EG37	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	287
EG38	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	233
EG39	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	280
EG40	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	180
EG41	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	186
EG42	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	176
EG43	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	155
EG44	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	188
EG45	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	198
EG46	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	176
EG47	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	189
EG48	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	198
EG49	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	119
EG50	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	120

Anexo 4 Resultados de las muestra 1 a la 100 de pacientes odontológicos sanos en la cual se identifico por PCR multiplex de acuerdo al número de paciente , clave de la muestra y especie identificada molecularmente con 1= presencia de la especie y 0= ausencia de la especie

CARRIL	MUESTRA	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
1	A1	1	1	0	0
2	A2	1	0	0	0
3	A3	1	0	0	0
4	A4	1	1	0	0
5	A5	1	1	0	0
6	A6	1	0	1	0
7	A7	1	0	1	0
8	A8	1	0	1	0
9	A9	1	1	1	0
10	A10	1	1	0	0
11	B1	1	0	0	1
12	B2	1	0	0	0
13	B3	0	1	0	0
14	B4	1	0	0	0
15	B5	1	1	0	0
16	B6	1	0	0	0
17	B7	1	0	0	0
18	B8	0	1	0	0
19	B9	1	1	0	0
20	B10	1	1	0	0
21	C1	1	1	0	0
22	C2	1	0	0	0
23	C3	1	1	0	0
24	C4	1	1	0	0
25	C5	1	1	0	0
26	C6	1	1	1	0
27	C7	1	1	0	0
28	C8	0	0	1	0
29	C9	1	1	0	0
30	C10	1	1	1	0
31	D1	0	1	1	0
32	D2	1	0	1	0
33	D3	0	0	1	0
34	D4	1	1	0	0
35	D5	1	0	0	0
36	D6	1	1	0	0
37	D7	1	1	0	0
38	D8	1	1	0	0
39	D9	1	1	0	0
40	D10	1	1	0	0
41	E1	1	0	0	0
42	E2	1	1	1	0
43	E3	1	1	0	0
44	E4	1	1	0	0
45	E5	1	1	1	0
46	E6	1	1	0	0
47	E7	0	0	1	0
48	E8	1	1	0	0
49	E9	1	1	1	0
50	E10	0	1	1	0

CARRIL	MUESTRA	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
51	F1	0	0	1	0
52	F2	1	0	0	0
53	F3	0	0	1	0
54	F4	1	1	1	0
55	F5	1	1	0	0
56	F6	1	0	1	0
57	F7	1	0	1	0
58	F8	0	0	1	0
59	F9	1	1	1	0
60	F10	1	0	0	0
61	G1	1	1	1	0
62	G2	1	0	0	0
63	G3	1	0	0	0
64	G4	1	0	1	0
65	G5	1	1	0	0
66	G6	0	0	0	0
67	G7	1	1	0	0
68	G8	1	0	0	0
69	G9	1	0	1	0
70	G10	1	1	0	0
71	H1	1	0	0	0
72	H2	1	1	0	0
73	H3	1	1	1	0
74	H4	0	1	1	0
75	H5	1	0	1	0
76	H6	0	0	1	0
77	H7	1	0	0	0
78	H8	1	0	0	0
79	H9	1	0	1	0
80	H10	1	1	0	0
81	I1	1	0	0	0
82	I2	1	0	1	0
83	I3	1	0	1	0
84	I4	1	0	0	0
85	I5	1	1	0	0
86	I6	1	0	1	0
87	I7	1	1	0	0
88	I8	0	0	1	0
89	I9	1	0	0	0
90	I10	1	1	0	0
91	J1	0	1	0	0
92	J2	1	1	0	0
93	J3	1	0	0	0
94	J4	1	0	0	0
95	J5	1	0	0	0
96	J6	1	1	0	0
97	J7	0	0	1	0
98	J8	0	0	1	0
99	J9	1	0	1	0
100	J10	1	0	1	0

CARRIL	MUESTRA	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
1	EG1	1	0	0	0
2	EG2	0	0	1	0
3	EG3	0	0	1	0
4	EG4	1	1	1	0
5	EG5	1	0	0	0
6	EG6	1	0	1	0
7	EG7	1	0	0	0
8	EG8	1	0	1	0
9	EG9	1	0	1	0
10	EG10	1	0	1	0
11	EG11	1	0	0	0
12	EG12	1	0	0	0
13	EG13	1	0	0	0
14	EG14	1	0	1	0
15	EG15	1	0	0	0
16	EG16	1	0	1	0
17	EG17	1	0	1	0
18	EG18	1	0	1	0
19	EG19	1	0	0	0
20	EG20	1	0	0	0
21	EG21	1	0	0	0
22	EG22	1	0	1	0
23	EG23	1	0	0	0
24	EG24	0	0	0	0
25	EG25	1	0	1	0
26	EG26	1	0	0	0
27	EG27	1	0	1	0
28	EG28	1	0	1	0
29	EG29	1	1	1	0
30	EG30	1	0	0	0
31	EG31	1	0	0	0
32	EG32	0	0	1	0
33	EG33	0	0	1	0
34	EG34	1	1	1	0
35	EG35	1	0	0	0
36	EG36	1	0	1	0
37	EG37	1	0	0	0
38	EG38	1	0	1	0
39	EG39	1	0	1	0
40	EG40	1	0	1	0
41	EG41	1	0	1	0
42	EG42	1	0	1	0
43	EG43	1	0	0	0
44	EG44	1	0	1	0
45	EG45	1	0	1	0
46	EG46	1	0	1	0
47	EG47	1	0	0	0
48	EG48	1	0	0	0
49	EG49	1	0	1	0
50	EG50	1	0	0	0

Anexo 5. Resultados de la muestra 1 a la muestra 100 de pacientes diabeticos en la cual se identifica la PCR multiplex de acuerdo al numero de paciente , clave de la muestra y especie identificada molecularmente con 1= presencia de la especie y 0= ausencia de la especie

CARRIL	MUESTRA	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
51	EG51	1	0	0	0
52	EG52	1	0	1	0
53	EG53	0	0	0	0
54	EG54	1	1	0	0
55	EG55	1	0	1	0
56	EG56	1	0	1	0
57	EG57	1	0	0	0
58	EG58	1	1	0	0
59	EG59	1	1	0	0
60	EG60	1	0	0	0
61	EG61	1	0	0	0
62	EG62	1	0	0	0
63	EG63	0	0	0	0
64	EG64	1	0	0	0
65	EG65	1	1	0	0
66	EG66	1	0	0	0
67	EG67	0	0	1	0
68	EG68	1	0	0	0
69	EG69	1	0	1	0
70	EG70	1	0	0	0
71	EG71	0	0	1	0
72	EG72	1	0	1	0
73	EG73	1	1	1	0
74	EG74	1	0	0	0
75	EG75	1	0	1	0
76	EG76	1	0	0	0
77	EG77	0	0	1	0
78	EG78	1	0	1	0
79	EG79	1	0	1	0
80	EG80	1	0	1	0
81	EG81	1	1	0	0
82	EG82	1	0	1	0
83	EG83	0	0	1	0
84	EG84	0	0	1	0
85	EG85	1	1	1	0
86	EG86	1	0	0	0
87	EG87	0	0	0	1
88	EG88	1	1	1	0
89	EG89	1	0	1	0
90	EG90	1	0	0	0
91	EG91	0	0	0	0
92	EG92	0	0	0	0
93	EG93	1	0	1	0
94	EG94	0	0	1	0
95	EG95	0	0	0	0
96	EG96	0	0	0	0
97	EG97	0	0	0	0
98	EG98	0	0	0	0
99	EG99	1	0	0	0
100	EG100	1	0	1	0

CARRIL	MUESTRA	Concentracion ng/ μ l
1	EG1	1622.01
2	EG2	1731.2
3	EG3	1423.1
4	EG4	833.01
5	EG5	20.84
6	EG6	20.7891
7	EG7	20.7313
8	EG8	19.615
9	EG9	20.674
10	EG10	0.1731
11	EG11	0.2886
12	EG12	3.082
13	EG13	1102.2
14	EG14	1415.4
15	EG15	1413.7
16	EG16	1120.4
17	EG17	4250.7
18	EG18	1211
19	EG19	5293.9
20	EG20	691.3
21	EG21	4667.5
22	EG22	3551.4
23	EG23	191.5
24	EG24	21187.5
25	EG25	4068.2
26	EG26	2550.5
27	EG27	3720.2
28	EG28	711.1
29	EG29	161.3
30	EG30	3614.3
31	EG31	507.6
32	EG32	4767.4
33	EG33	2471.2
34	EG34	1714.7
35	EG35	2094.2
36	EG36	193.7
37	EG37	4945.7
38	EG38	3184.9
39	EG39	463.4
40	EG40	79.2
41	EG41	1917.2
42	EG42	242.5
43	EG43	1313.3
44	EG44	701.8
45	EG45	4898.6
46	EG46	4413.3
47	EG47	2123.6
48	EG48	5836.4
49	EG49	1002.9
50	EG50	249.1

Anexo 6. Muestras de 1-100 donde se presenta la concentración (ng/ μ l) de muestras de DNA de 90 pacientes diabéticos según su numero de clave

CARRIL	MUESTRA	Concentracion ng/ μ l
51	EG51	1149.2
52	EG52	1687.8
53	EG53	2137.7
54	EG54	5541.5
55	EG55	1315.4
56	EG56	1237.5
57	EG57	1905.6
58	EG58	1485.4
59	EG59	2711.9
60	EG60	2811.1
61	EG61	165.9
62	EG62	2259.2
63	EG63	4077.3
64	EG64	3459.9
65	EG65	4758.9
66	EG66	5931.5
67	EG67	1.834
68	EG68	1234.2
69	EG69	8932.45
70	EG70	5419.1
71	EG71	701.8
72	EG72	4898.6
73	EG73	4413.3
74	EG74	2123.6
75	EG75	5836.4
76	EG76	1002.9
77	EG77	9837.4
78	EG78	4376.3
79	EG79	1113.9
80	EG80	4365.2
81	EG81	7656.1
82	EG82	1905.6
83	EG83	1485.4
84	EG84	2711.9
85	EG85	2811.1
86	EG86	691.3
87	EG87	4667.5
88	EG88	3551.4
89	EG89	191.5
90	EG90	21187.5
91	EG91	4068.2
92	EG92	2550.5
93	EG93	3720.2
94	EG94	711.1
95	EG95	161.3
96	EG96	2328.4
97	EG97	6523.87
98	EG98	2123.2
99	EG99	4578.23
100	EG100	9845.76

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre U. J. 2002. Candidiasis orales; Rev. Iberoam Micol, 19: 17-21.
2. Adaptado de Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie Ej: Candida In Annaissie EJ, Mc Ginnis MR, P Faller MA editors Clinical mycology, New York, 2003, Churchill Livingstone.
3. Aguirre J. M. 2002. Candidiasis orales. Rev. Iberoam Micol 19: 17-21
4. Alfonso C, López M, Arechavala A., Perrone M, Guelfand L., Bianch M. 2010; Identificación presuntiva de *Candida* spp y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* agar. Rev. Iberoam Micol; 27(2):90-93
5. Arenas S, R. Micología Médica Ilustrada. 3era Edición. 2008. Mac Graw Hill. Interamericana. España.
6. Akapan A. Morgan R. 2002. Oral candidiasis; Postgrad Med J; 78:45-458.
7. Bagg J, MP Sweeney, MAO Lewis, MS Jackson, D Coleman, A Al Mosaid, S McEndrick, S McHugh. 2003. High prevalence of *Candida* non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral oral of patients with advanced cancer. *Palliative Medicine*; 17: 477-481.
8. Back-Brito GN, Mota AJ, Vasconcellos T. C, Querido S. M, Jorge A. O, Reis A. S, *et al.* 2009. Frequency of *Candida* spp. in the oral cavity of Brazilian HIV-positive patients and correlation with CD4 cell counts and viral load. *Mycopathologia* ;167 (2):81-7

9. Baillie, G. 1998. Effect of Growth rate in resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Institute of biomedical and life sciences, University of Glasgow. Vol. 42 No. 8.
10. Bartie L. K., Williams W. D., Wilson J. M., Potts. C. J., Michael A., Lewis. O. 2001. PCR fingerprinting of *Candida albicans* Associated with Chronic Hyperplastic Candidiasis and Other Oral Conditions. Journal of Clinical Microbiology. 39(11) 4066-4075.
11. Bial A. El reino de los hongos. Revista Iberoamericana 2022, 19:1-4.
12. Botas P, Delgado E, Castaño G, Diaz C, Prieto J, Diaz F. 2002. Prevalencia de diabetes mellitus e intolerancia a la glucosa en población entre 30 y 75 años en Asturias, España. Rev. Clin Esp; 202 (8): 421-7.
13. Bharathi M. 2012. A comparative Study of Carrier State of Candida and its Speciation in oral flora – among healthy individuals, persons with DM and HIV sero positive individuals. 3(2): 102-106
14. Bremenkamp, R. M. 2011. Prevalence and antifungal resistance profile of Candida spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. ELSEVIER.. Vol. 56: 549-555.
15. Brian L, Mealey G. L., Ocampo. Diabetes *mellitus* y enfermedad periodontal 2006. Periodontology. (19).-86-104. Revisado: [13/Agosto/12] Disponible [es.escribd.com/doc/72475114Diabetes-Mellitus-y-Enfermedad-Periodontal].
16. Chang-Chang H, S. Ning Leaw, A. Huey Huang, T. Lan Wu y T. Chang Chang. 2001. Rapid identification of yeast in positive blood cultures by a multiplex PCR method. Journal of Clinical Microbiology. 39(10):3466-3471.

17. Castro C, Martín E. 2005. Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida: Candida dubliniensis*. Control Calidad SEIMC, p. 2-10.
18. Chang H, Ning S, Huey A, Lan T, Chain T. 2001. Rapid Identification of yeast in positive blood cultures by a multiplex PCR method. Vol. 39, No. 10. P. 3466-3471.
19. Chen S.C., Halliday C.L., Meyerw. 2002. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med. Mycol.* 40 (4), 333-357.
20. Colombo A. Nucci M, Park B, Nóver S, Matta D. 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in eleven medical centers. *Journal of clinical Microbiology.* p. 2816-2823 Vol. 44, No. 8
21. Consenso para la prevención de las complicaciones crónicas de la diabetes *mellitus* tipo 2; 2004. Complicaciones microvasculares en la diabetes *mellitus* tipo 2; *Rev. Endocrin y Nut* Abril-Junio. Capitulo # 4. 12(2): Supl 1:531-544
22. Daniluk T. 2006. Ocurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. *Universidad Medica de Bialystok.* 51 Suppl 1:77-80.
23. Davel G., Contreras E. C. 2007. Situación de las micosis en la Republica Argentina. *Revista Argentina de Microbiología.* 39: 28-33
24. De Lima C, 2006. Oral manifestations of diabetes mellitus in complete denture wearers. *Journal of Prosthetic Dentistry.* Sao Jose dos Campos Dental School, Sao Paulo State University. 60-65.

25. Edmond M, Wallace S, Mc Clish D, Pfaller M, Jones R, Wenzel R. 1999. Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: A three- year analysis. *Clinical Infectious Disease*. 29:239-4.
26. Erjavec Z., Verweij P.E. 2002. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug. Resist. Updat.* **5** (1), 3-10.
27. Fanghanel-Salmon, Sánchez, R. L., Arellano, M., S., Valdés, L, E., Chavira L, J., Rascón, P, R. A. 1997. Tratado de micología da edición. *Salud pública de México* (39)(5): 427-432.
28. Fidel J. R. 1999. Host against oropharyngeal and vaginal candidiasis: Site- specific differences; *Rev Iberoam Micol*; 16:8-15.
29. Freydiere A. M. Guinet R. 1997. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeast; *Rev Iberoam Micol* 1997; 85-89.
30. García Heredia, M., S. D. García, E. F. Copolillo, M. Cora Eliseth, A. D. Barata, C. A. Vay, A. de Torres, N. Tiroboschi y A. M. R. Famiglietti. 2006. Prevalencia de canddiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifungicos. *Revista Argentina de Microbiología*. 38:9-12.
31. Gaitán-Cepeda LA, Borges-Yañes AS, Franco-Marrnez F, Espinosa-Carbajal AV, Rodríguez-Zavala B. 1998. Prevalencia de portadores de *Candida* spp. en orofaringe, en una población de adultos mexicanos. *Rev ADM*; LV(4):181-5.
32. García P. P. 2011. Prevalencia en pacientes Diabéticos con prótesis total y/o parcial. Tesis licenciatura U.A.N.L.

33. Guilarte, C. Pardi, G. 2009. Pruebas para identificar Especies de *Candida* en Cavidad Bucal. 47 N° 3 p. 2-7.
34. Gordillo R, Hernández E, Ordoñez W, Villamil L, Godoy C. 2011. Portadores de *Candida* oral atendidos en una clínica dental de Tabasco México. Vol 3; Num 2, pp. 45-48.
35. Guzmán J. N., Madrigal B. E. 2003. Revisión de las Características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes *mellitus*. Bioquímica, 28(2):14-23.
36. Ibañez V., Marinel. LO. J, Eni J. Marinel. LO Roura, JL. Blanes MOMPÓ. JR. Escudero Rodríguez, V. Ibañez Esquembre, J. Rodríguez Olay; 2002. Tratado de pie diabético. Prevalencia de la diabetes. Barcelona. Capítulo I Epidemiología 11-17. Revisado: [8/Marzo/12], Disponible: [www.esteve.es/EsteveArchivos/1_8/Ar_1_8_42_APR_16.PDF]
37. Jabra-Rizk, M. A., William A. Falkler, Meiller T. 2004. Fungal Biofilms and Drug Resistance. Emerging Infectious Diseases. 2004. Vol. 10, No. 1: 14-19
38. Jaimes- Aveldañez, A. Hernández -Pérez, F. Martínez- Herrera E. Rodríguez -Carreón, A ,A. Arenas -Guzmán, R. 2008. Portadores de *Candida* en la mucosa oral: tipificación de 35 cepas con CHROMagar Candida. Med In Mex. Vol 24: 262-6.
39. Khun M. D., Pranab K. M., Thomas A., Claude P., Jyotsna C., Rana A. H., Warnock D. W., David R. S., Mahmoud A. G. 2004. *Candida parapsilosis* Characterization in outbreak setting. Emerging infectious diseases. Vol. 10 No. 6.
40. Lasker B. A., Butler G., Lott T. J., 2006. Molecular Genotyping of *Candida parapsilosis* Group Clinical Isolates by Analysis of Polymorphism Microsatellite Markers. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 44 No. 3. P 750-759.
41. Liébana J. Microbiología Oral 2da. Edición. Mc GRAW-HIL INTERAMERICANA.

42. Liguori G., Lucariello A., Colella G., Luca A., Marinelli P. 2007. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR, ;60:1035–1039.
43. Loe H., Genco R. H. 1995. Oral complications in diabetes, Ch. No. 23; En Diabetes in America, 2nd. Edition; National Diabetes Data group; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; NIH Publicator. No. 95-1486,. 501-506.
44. López C, Girol L, Ramos L, Ramadan S, Bulacio L. 2005. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. Revista Argentina de Microbiología 37: 16-21.
45. López; R., Mouriño; R. comparación de dos métodos moleculares para la identificación rápida de especies del género *Candida* en muestras vaginales. 2010
46. Mancillas A. L. G., Gómez P. F. J., Rull R. J. A. 2002. Diagnóstico y clasificación de la Diabetes *mellitus* conceptos actuales. Revista de Endocrinología y Nutrición (10): (2) p. 63-68.
47. Marol S. 2007. Molecular epidemiology of *Candida* species isoated from clinical specimens of intensive care unit patients. Journal compilation. 40-49.
48. Martins M, Henriques M, Ribeiro AP, Fernandes R, Goncalves V, Seabra A. 2010. Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. Rev Iberoam Micol; 27(3):119 24.
49. Mata de Henning, Perrone, M., 2000. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Cándida albicans* en cavidad bucal. Revisado: [10/Octubre/2011]
Disponible en: [www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0001-63652001000200010.]

50. Mealey B. L., Diabetes mellitus. Ini L. F., Genco R. J., Mealey B. L. 2007. Periodontal medicine. Toronto, B. C. Decker Inc.
51. Meurman J. H., Siikala E, Richardson M, Rautemaa R. 2007. Non - *Candida albicans* Candida yeast of the oral cavity. Clinical Microbiology p. 719 – 730.
52. Mila L., Arcaya N., Cañas O., Machado Y., Calus B. 2004. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferencias *Candida albicans* de *Candida dublinesns*. Rev. Iberoam Micol; 135-138.
53. Moreno L. 2001. Epidemiología y Diabetes. Rev. Fac. Med. (44) (1): 35-37.
54. Molero G, Diez R, Navarro F, Monteoliva L, Pla J, Concha G, Sánchez M, Nombela C. 1998. *Candida albicans*: genetics dimorphism and pathogenicity. Internati Microbiol (1:95-106.
55. Murray P. R., Rosenthal A. S., Pfaller M. A. 2006. Microbiología Médica 5ta. Edicion. Elseiver Mosby.
56. Negroni M. 1999. Microbiología estomatológica, Fundamentos y guía práctica; Editorial Panamericana; Cap 8:57-69.
57. Odds F. C., Bernaerts R., 1994. Chromagar Candida, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important Candida Species. Journal of Clinical Microbiology (32):8 1923-1929.
58. Olive D, Bean P. 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms.J. Clin. Microbiol. 37(6): 1661.

59. Pereira C. M. Pres F. R. Correa M. E. 2004. Candida in saliva of Brazilian hemophilic patients; J App Oral Sci; 12(4): 301-306.
60. Perea S. López J, Brian L. Wickes William R. Stefano P. 2002. Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 2002, Vol. 46, No. 6: p. 1695–1703.
61. Pfaller M. A., Diekema D. J. 2002. The Emerging Infections and the Epidemiology of load Organisms Survey, a Clin Microbiol 40: 3551-3557.
62. Pfaller M. A., Jones R. N., Doern G. V., Sader S. H., Hollis R. J., Meseri S. A., 1998. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to Candida Species. Frequency of occurrence and Antifungal Susceptibilities of Isolates Collected in 1997 in United States, Canada and South America for the SENTRY Program. Journal of Clinical Microbiology Vol. 36 No. 7 p. 1886-1889.
63. Position Paper; Diabetes and Periodontal Diseases; Academy Reports. J. Periodontal 200; 71: 664-678. Revisado: [13/Julio/2011] Disponible en [\[www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.1999.70.8.935\]](http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.1999.70.8.935)
64. Price M. F., LA ROCCO. M. T., Gentry L. O. 1994. Fluconazol Susceptibilities of Candida Species and Distribution Of Species Recovered from Blood Cultures over a 5 year Period. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 38, No. 6 p. 1422-1424.
65. RaJesh V. Lalla, B. D. S., D'ambrosio J. 2001. Dental management Considerations for the patient with diabetes mellitus. American Dental Association (132) 1425-1432.

66. Ray T., Payne C. 1990. Comparative Production and Rapid purification of Candida Acid Proteinase from Protein. Supplemented Cultors. Infection and Immunity. Vol 58 No. p. 508-514.
67. Rivera S. R., Flores R., Arriaga M. 2006. Identificador de especies de Candida Causantes de vaginitis en la población mexicana. 24(10): 634-6
68. Rouabhia M. 2002. Interactions between host and oral comensal microorganisms are key events in health and disease status; Can J Infect Dis 13(1): 47-51.
69. Rueda-Gordillo F. 2011. Portadores de *Candida* oral en pacientes atendidos en una clínica dental de Tabasco, México. Vol. 3 Núm. 2 pp 45-48.
70. Ruiz A. J., García M. P., Puerto L. J., Marín P., Saldarreaga A., Maya P., 2003. Evaluación de un nuevo medio chrom agar candida para la identificación presuntiva de levaduras. 2003. Revista de Diagnóstico Biológico (52):1
71. Ryan M. E. Carnu O. Karmer A; 2003. The influence of diabetes on the periodontal tissues; JADA; 1134-34s-40s.
72. Sayyada G, Tabassum S, Uroj S. 2010. Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource- limited settings. Lyban J Med. 5: 2144 – DOI: 1034 v. 5.
73. Ship J. A., Diabetes and oral Health an overview: JADA October 2003; 134:4s.10s

74. Soriano C, Suárez , Trigo F. 2006. Microbial pathogenesis: Basic concepts in the host-microorganism interaction. *Vet. Mex*, 37 (4).
75. Steren M. P., Braxton D. M., 1995. Diabetes in Hispanic Americans: Ch No. 32 “Diabetes in America” 2nd edition, National Diabetes Data Group: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease NIH Publication No. 95-1468. 631-660.
76. U. S. Preventive Services Task Forces Screcning for Type 2. Diabetes Mellitus in Adults: Recommendations and Rationde, *Ann Intein Med*. 2003; 138:212-214.
77. Vernillo A. T., 2003. Dental Considerations for the treatment of Patients with diabetes mellitus; *JADA* October; 24s-33s.
78. Zárate G. O. 1999. Actualidades en el manejo dental del paciente diabético. *Rev. ADM* Enero-Febrero LVI (1): 18-26.