



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Eje de Microbiología

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP

T E S I S

**"Efecto del pH salival de adultos diabéticos y su relación con la
formación de biopelículas por especies del género *Candida*"**

**Para obtener el título de:
Licenciatura en Biomedicina**

P R E S E N T A

Scarlett Guadalupe Aguilar Angeles

Directora de tesis:

Mtra. Silvia María del Carmen García García

Asesores: Ricardo Carreño López y María del Rocío Bustillos Cristales

JUNIO 2025

Coordinación de Biomedicina

Coordinación de Titulación y Eficiencia Terminal

AGRADECIMIENTOS

- A la Maestra Silvia García García por aceptarme en su laboratorio, por guiarme durante todos estos años de formación y por la tolerancia y compromiso para poder concluir este proyecto.
- A mis compañeros del Laboratorio Anita, Betzy, Moni e Isis quienes fueron un excelente equipo de trabajo y me mostraron lo valioso que es el trabajo en equipo y el apoyo incondicional.
- A la generación 2014 y en especial a los integrantes del eje de Microbiología quienes se convirtieron en mi segunda familia.
- A todas aquellas personas que ya no están conmigo, que perdí en los últimos 5 años y que por ustedes hoy quiero culminar esta etapa.
- A Marco por encontrar en ti un compañero de vida, por tu apoyo a lo largo de estos años y por alentarme a perseguir mis sueños.
- A cada una de las personas con las que cruce camino y que fueron un apoyo para superarme y nunca rendirme.
- A todos aquellos que pusieron un granito y me ayudaron a escribir, revisar y concluir esta tesis.

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico primeramente a Dios por darme la salud y las fuerzas necesarias para culminar con esta etapa.

A mi madre Guadalupe Angeles Cortes quien fue mi mayor fuente de inspiración y motivación durante este proceso que, aunque fue demasiado largo llego a su fin y quien será en mi vida un ejemplo de constancia, esfuerzo y superación. Gracias por darme todas las armas necesarias para salir siempre adelante.

Finalmente, a mí misma por perseverar y lograr descubrir la mejor versión de mí que sigue creciendo y aprendiendo y que gracias a la persona que fui hoy me lleva a donde estoy y que a pesar de todos los obstáculos puedo decir... ¡LO LOGRÉ!

ÍNDICE

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVOS	24
Objetivo general.....	24
Objetivos particulares:	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
Criterios de Inclusión.....	25
Criterios de exclusión	25
Recolección de la muestra	26
Pruebas de identificación para Levaduras de <i>Candida</i>	26
Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	27
Ensayo de la Formación de Biopelícula por el Método de Cristal Violeta	28
RESULTADOS	30
1.- Características generales de las cepas de estudio	30
2.- Características de los grupos de estudio	32
3.- Formación de biopelículas de <i>Candida</i> en presencia de saliva del paciente diabético.	34
4.- Formación de biopelículas de <i>Candida</i> a diferentes valores de pH en medio RPMI	36
5.- Formación de Biopelícula de especies de <i>Candida</i> en saliva de pacientes diabéticos y medio RPMI pH 7.....	39
6.-Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos	40
7.- Acción de AmB a diferentes concentraciones contra la Formación de biopelículas de <i>Candida</i> en Medio RPMI y Saliva.....	43
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES	54
LIMITACIONES	54
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA 1. Componentes de la saliva y sus funciones.
- TABLA 2. Coloración de colonias en Medio CHROMagar.
- TABLA 3. Distribución de la placa multipozo.
- TABLA 4. Pruebas de identificación de levaduras de *Candida*.
- TABLA 5. Número de aislados por especie.
- TABLA 6. Características de pacientes diabéticos de donde se aislaron las cepas de *Candida* utilizadas en este trabajo.
- TABLA 7. pH salival (Datos estimados en media +/- Desviación Estándar)
- TABLA 8. Producción de Biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de saliva como medio.
- TABLA 9. Producción de Biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de Medio RPMI.
- TABLA 10. Producción de Biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de medio RPMI y saliva de pacientes diabéticos como medio de cultivo.
- TABLA 11. Distribución de cepas de *Candida albicans* y *no albicans* resistentes a antifúngicos.
- TABLA 12. Acción de AmB en las cepas formadoras de biopelícula en medio RPMI.
- TABLA 13. Acción de AmB 100ug/ml y 200ug/ml en las cepas formadoras de biopelícula en presencia de saliva del paciente control.
- TABLA 14. Acción de AmB 100ug/ y 200ug/ml en las cepas formadoras de biopelícula en presencia de saliva del paciente diabético 1.
- TABLA 15. Acción de AmB 100ug/ml y 200ug/ml en las cepas formadoras de biopelícula en presencia de saliva del paciente diabético 2.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1. Porcentaje de aislados de especies de *Candida*.
- GRÁFICO 2. Comparación del pH salival en pacientes sanos y pacientes diabéticos.
- GRÁFICO 3. Formación de biopelícula en presencia de saliva control con su pH salival correspondiente.
- GRÁFICO 4. Formación de biopelícula en saliva como medio de cultivo del diabético 1 con su pH salival correspondiente.

- GRÁFICO 5. Formación de biopelícula en saliva como medio de cultivo del diabético 2 con su pH salival correspondiente.
- GRÁFICO 6. Crecimiento de biopelícula de diferentes especies de *Candida* aisladas de cavidad bucal a diferentes pH.
- GRÁFICO 7. Formación de biopelícula de *Candida albicans* y no *albicans* en medio RPMI a diferentes concentraciones de pH (6.2, 7 y 7.2)
- GRÁFICO 8. Producción de Biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de medio RPMI y saliva de pacientes diabéticos como medio de cultivo.
- GRÁFICO 9. Porcentaje de sensibilidad de las cepas del género *Candida*.
- GRÁFICO 10. Distribución del número de cepas resistentes a cada uno de los anti fúngicos probados.
- GRÁFICO 11. Distribución de cepas de *Candida albicans* y no *albicans* resistentes a antifúngicos.
- GRÁFICO 12. Producción de Biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de Medio RPMI y su inhibición con AmB 200ug/ml.
- GRÁFICO 13. Producción de Biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de saliva de paciente control como medio y su inhibición con AmB 100ug/ml y 200ug/ml.
- GRÁFICO 14. Producción de Biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de saliva de paciente diabético 1 como medio y su inhibición con AmB 100ug/ml y 200ug/ml.
- GRÁFICO 15. Producción de biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de saliva de paciente diabético 2 como medio y su inhibición con AmB 100ug/ml y 200ug/ml.

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1: Representación esquemática del desarrollo de la biopelícula de *Candida albicans*.
- FIGURA 2: Método de esterilización por filtración.
- FIGURA 3. Placa inoculada con saliva y medio RPMI
- FIGURA 4. Morfología colonial de las distintas cepas de *Candida* presentes en este estudio.
- FIGURA 5. Detección de especies de *Candida* en CHROMagar.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
DMT1	Diabetes Mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
AmB	Anfotericina B
DM	Diabetes Mellitus
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
mg/dl	miligramos sobre decilitro
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
ml	mililitros
ADS	Agar Dextrosa Sabouroud
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
YPD	Extracto de Levadura Peptona y Dextrosa
rpm	revoluciones por minuto
D.O.	Densidad óptica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
DMSO	Dimetilsufóxido
μl	microlitro
nm	nanómetros
μg	microgramo

RESUMEN

Candida forma parte del microbioma humano, se aísla de zonas como piel y mucosas, siendo la cavidad oral el lugar donde se encuentra con mayor frecuencia debido a componentes y propiedades de la saliva como el pH el cual mantiene un hábitat favorable para su crecimiento. Anomalías metabólicas como la diabetes predisponen al individuo a tener un mayor número de infecciones debido a la alteración de su sistema inmune provocando que *Candida* pueda pasar de su forma comensal a patógena favoreciendo la formación de biopelículas, capacidad que podría ser afectada por variaciones en el pH salival, condición que está presente en los pacientes diabéticos. Evaluar la formación de la biopelícula a diferentes pH y la resistencia a diferentes antifúngicos ayudará a conocer su comportamiento y promover un mejor tratamiento.

En este trabajo encontramos que a menor pH salival hay una mayor formación de biopelícula, los resultados sugieren que el pH influye en la formación de biopelículas de *Candida*; especies *no albicans* presentaron menor formación de biopelícula comparadas con las especies *albicans* a los diferentes pH probados. La mayor formación de biopelícula en medio RPMI fue a un pH de 7. En especies de *Candida no-albicans* se observó una mayor formación de biopelícula utilizando la saliva de los pacientes diabéticos como medio, mientras que *Candida albicans* tuvo parámetros similares en medio RPMI como en saliva. En cuanto a las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos Anfotericina B y Nistatina, todas las cepas probadas presentaron sensibilidad. En el grupo de los azoles (Econazol, Ketoconazol y Miconazol) se presentó inhibición del crecimiento en algunas cepas de *Candida*. La Anfotericina B presentó una inhibición parcial a las biopelículas de *Candida*.

Palabras clave: *Candida*, resistencia, diabetes, pH salival, biopelículas.

INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano presenta una extensa superficie cutánea y mucosa a través de la cual se mantiene en contacto con el medio ambiente. En la amplia superficie corporal se pueden observar diversas zonas con diferentes características, en la que residen microorganismos como virus, bacterias, parásitos y hongos, la llamada microbiota.

Entre la diversidad de hongos, el género *Candida* comprende un grupo de levaduras ubicuas con características diversas, son microorganismos unicelulares, eucariotas, Gram positivos y se reproducen de forma asexual. Una característica particular de esta especie es su dimorfismo (Pardi y Cardoso, 2002), capacidad que permite el cambio de una célula levaduriforme a la forma de hifa según las condiciones ambientales, por ejemplo, a un pH bajo (<6), las células de *Candida albicans* crecen predominantemente en forma de levadura, mientras que a un pH alto (> 7) se induce el crecimiento de hifas (Mayer et. al., 2013), además la versatilidad y la habilidad de adaptarse a distintos rangos de pH que le permite colonizar distintos sitios anatómicos, o le permite pasar a su estado infeccioso. Cabe destacar que tanto la forma de levadura y la de hifa son importantes para la patogenicidad, si bien la forma de la hifa es más invasiva, la forma de levadura contribuye principalmente en la diseminación.

De las más de 150 especies conocidas solo algunas han sido consideradas como patógenas para los humanos, entre ellas:

- *C. parapsilosis*
- *C. krusei*
- *C. glabrata*
- *C. tropicalis*
- *C. guilliermondii*
- *C. pseudotropicalis*
- *C. lusitaniae*
- *C. dubliniensis*
- *C. albicans* (Pardi y Cardoso, 2002).

Siendo esta última la especie aislada con mayor frecuencia y causante de infecciones invasoras. En pacientes con diabetes el aislamiento de especies de *Candida* de la cavidad oral es frecuente y esto dependerá de algunos factores como el tipo de alimentación, la edad del paciente, su estilo de vida, hábitos de higiene, el tipo de prótesis dental que utilizan, ubicación geográfica, si padecen alguna enfermedad y el tiempo que tienen de padecerla, el grado de control glucémico, disminución del flujo salival y el uso indiscriminado de antimicrobianos (Mosquera- Cárdenas, 2022).

Este género forma parte de la microbiota normal de nuestro cuerpo, se encuentra en zonas como la piel y mucosas, y coloniza sitios como el tracto gastrointestinal, tracto reproductivo, vías respiratorias altas y la cavidad oral, siendo este último el lugar donde se aísla con mayor frecuencia a *Candida spp.*, ya que se encuentra presente hasta en un 75% de la población (Mantilla-Florez, et. al., 2021).

Cavidad oral - saliva

La cavidad oral alberga una microbiota abundante y diversa, posee un ambiente húmedo, un pH casi neutro y una temperatura relativamente constante entre 35 y 36°C que le permite actuar como una importante incubadora siendo un hábitat favorable para el crecimiento de diversos microorganismos tales como las levaduras de *Candida* que interactúan entre sí y con diversas especies bacterianas, formando comunidades de biopelículas (Rebolledo, 2018).

De acuerdo con la literatura, la saliva es una fuente muy importante que brinda información sobre los microorganismos presentes en la boca. Si bien la cantidad de saliva es importante, también lo es la calidad de esta, ya que cada uno de sus componentes cumple con funciones específicas (Tabla 1).

La secreción diaria de saliva oscila entre 500 y 700 ml, el 99% de ésta es agua mientras que el 1% restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas. Al ser un líquido, posee diversas propiedades que benefician a la cavidad bucal entre las cuales podemos encontrar las físicas, ejemplo de ello es su viscosidad, cohesión y adhesión; en cuanto a las bioquímicas podemos mencionar la

participación de glucoproteínas y enzimas que ayudan en el proceso de digestión y finalmente las químicas dentro de las cuales se encuentra el pH, el cual oscila entre 6.7 a 7.4 en reposo y puede llegar hasta 8 si la saliva es estimulada. En la saliva tenemos un mecanismo buffer que intenta mantener neutro el pH, lo que le permite tener la capacidad de neutralizar ácidos y amortiguar las variaciones de acidez permitiendo que el pH bucal se mantenga constante, de esta forma todas las enzimas, proteínas salivales y microorganismos puedan ejercer sus funciones de manera óptima, sin embargo, este mecanismo en determinadas circunstancias no lo consigue, pues cualquier alteración en el pH proporciona un sustrato potencial para el crecimiento de hongos, ejemplo de ello el pH reducido por la hiperglucemia, pues se han notificado infecciones orales por hongos y bacterias en pacientes con diabetes debido a los cambios en la composición de la saliva (Llena-Puy , 2006; Zaragoza y Velasco, 2018).

Tabla 1. Componentes de la saliva y sus funciones.

FUNCIONES	COMPONENTES
Lubricación	Mucina, glicoproteínas ricas en prolina y agua.
Antimicrobiana	Lisozima, lactoferrina, mucina, histatina, inmunoglobulinas (A), lactoperoxidasa
Mantenimiento de la integridad de las mucosas	Mucina, electrolitos, agua.
Limpieza	Agua.
Capacidad tampón y remineralización	Bicarbonato, fosfato, calcio, flúor y proteínas aniónicas ricas en prolina.
Preparación de alimentos para deglución.	Agua, mucinas
Digestión	Amilasa, lipasa, ribonucleasa, proteasa, mucina y agua.
Sabor y fonación	Mucina, agua y gustatina.

Tomado de (Junior, 1996).

Se sabe que los pacientes diabéticos son candidatos potenciales para desarrollar infecciones fúngicas que frecuentemente se asocian a los niveles altos de glucosa.

Diabetes

La diabetes, un problema importante de salud pública; de acuerdo con la OMS, alrededor de 422 millones de personas en el mundo padecen esta enfermedad.

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF), México ocupa el 7° lugar a nivel mundial en casos de diabetes, siendo la segunda causa de muerte en la población mexicana (INEGI, 2024). El sistema de vigilancia epidemiológica hospitalaria de diabetes mellitus tipo 2 hasta el segundo trimestre de 2024 reportó que Puebla ocupa el 4° lugar con mayor número de casos reportados.

La diabetes es una enfermedad crónica que se origina cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. Hay tres clases principales de diabetes.

- La DMT1 (anteriormente diabetes insulino dependiente o juvenil) se caracteriza por la ausencia de síntesis de insulina, ya que las células beta del páncreas dejan de producirla debido a que el sistema inmunitario las ha atacado y destruido.
- La DMT2 (anteriormente diabetes no insulino dependiente o del adulto) comienza generalmente con la resistencia a la insulina, afección que hace que las células de grasa, musculares y del hígado no utilicen la insulina adecuadamente. Al principio, el páncreas le hace frente al aumento de la demanda produciendo más insulina, pero con el tiempo pierde la capacidad de secretar suficiente insulina como consecuencia del exceso de peso o la inactividad física.
- La diabetes gestacional que se presenta durante las últimas etapas del embarazo corresponde a una hiperglicemia que es causada por las hormonas del embarazo o por la escasez de insulina (OMS, 2023).

Personas con diabetes están predispuestos a tener un mayor número de infecciones debido a la alteración de su sistema inmune pues cuando se altera el equilibrio entre el huésped y los microorganismos, se alteran sus defensas celulares, su fisiología

y composición de la microbiota normal, lo que conlleva a una sobre colonización , infección y enfermedad; se ha descrito que entre 30 y 50% de los adultos sanos son portadores de diabetes sin presentar signos ni síntomas de enfermedad (Pérez, 2015). Sin embargo, alteraciones en el equilibrio de la microbiota como: variaciones en el entorno local (cambios de pH o cambios nutricionales) y el uso de antibióticos o alteraciones en el sistema inmunitario (causadas por una infección o terapia inmunosupresora), pueden ocasionar que *Candida* prolifere rápidamente y cause infecciones, que van desde infecciones superficiales a sistémicas, esta predisposición hace que *Candida spp.*, pueda pasar de su forma comensal a patógena (Alburquenque y Tapia, 2013).

De las especies reportadas solo algunas han emergido como patógenos importantes con relación al aumento en la mortalidad, a sus factores de virulencia, a su adaptación y la resistencia a los antifúngicos.

El potencial patógeno de las levaduras varía en forma considerable, dependiendo de la especie. Cabe aclarar que no todas las cepas de una misma especie presentan la misma 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 (Garza, 2012).

La producción de factores de virulencia por parte de especies de *Candida* varía de acuerdo al lugar y el grado de invasión, así como la naturaleza de la respuesta del hospedero (Guilarte y Pardi, 2009) y los factores que pueden modificar el microambiente, lo que le proporciona a *Candida spp.* la capacidad de causar infección lo cual está respaldado por una amplia gama de factores de virulencia como: el switch fenotípico (la transición morfológica entre levaduras y formas hifales que se asocian principalmente con la formación de biopelículas resistentes a los antifúngicos), la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, la secreción de enzimas hidrolíticas, el uso de antibióticos o alteraciones en el sistema inmunitario, así como su flexibilidad metabólica, mecanismos de respuesta al estrés, una rápida adaptación a las fluctuaciones del pH ambiental y la formación de biopelículas (Pérez, 2015).

Biopelícula

Comunidad de células microbianas que se adhieren a superficies bióticas o abióticas y están rodeadas por una matriz extracelular. Su formación es un proceso secuencial que comprende cuatro etapas: la adherencia de células de levadura al sustrato (1-3 horas), la cual puede variar significativamente entre individuos (hombres o mujeres) e incluso en una misma persona de un día a otro. Estas variaciones reflejan el efecto de factores ambientales, como la dieta y componentes nutricionales de los fluidos corporales, que provocan diferencias en la expresión de receptores para *Candida spp.*, en distintos individuos o, en el mismo individuo, en diferentes días; la proliferación (11-14 horas) para formar una capa basal de células de anclaje, la formación de células hifales (20-48 horas) principalmente en la parte superior de la biopelícula, y la dispersión lenta de células (después de 24 horas) en forma de levadura para colonizar nuevos sitios (Fernández, 2017).

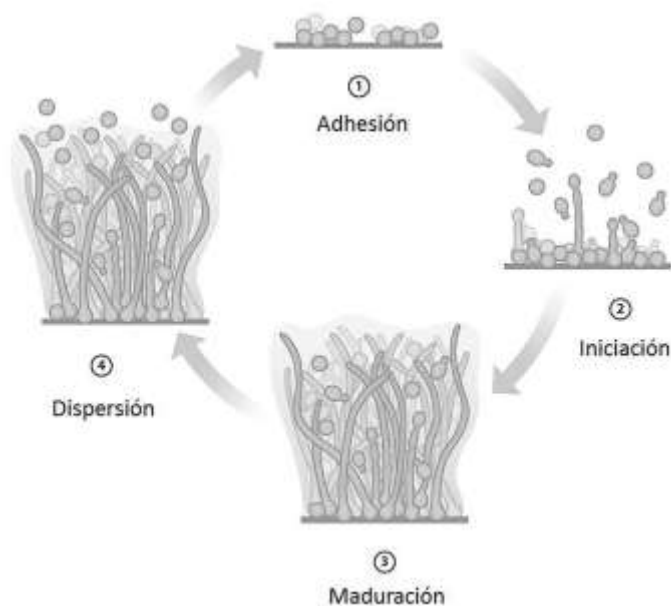


FIGURA 1. Representación esquemática del desarrollo de la biopelícula de *Candida albicans*.

Tomado de (Fernández, 2017).

Cada especie de *Candida* presenta diferencias en términos de formación de biopelículas, es decir, a nivel de su morfología, características de la matriz extracelular y la capacidad de conferir resistencia antifúngica, lo cual aumenta el desafío de encontrar una solución efectiva para enfrentar las amenazas de las biopelículas de *Candida* como un problema único (Del Pozo y Cantón,

2016). De hecho, debido a la aparición de estas infecciones fúngicas, existe una necesidad urgente de encontrar enfoques terapéuticos adecuados que puedan tratar a los pacientes de manera más eficiente, por lo que para encontrar estas terapias es necesario el estudio de las diferentes características patogénicas de estas especies, como la formación de biopelículas.

Resistencia a antifúngicos

Los fármacos antifúngicos más comunes en el uso clínico actual para el tratamiento de la candidiasis oral son los polienos (Anfotericina B (AmB) y Nistatina) y los azoles (Miconazol, Fluconazol, Ketoconazol e Itraconazol), utilizados principalmente por vía tópica (Araiza, et. al., 2023). En los últimos años la resistencia antifúngica crece y evoluciona de manera rápida, aún con la aparición de nuevos fármacos, por lo que el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en el mundo, esto se atribuye al uso masivo e indiscriminado de antifúngicos tanto en forma preventiva como terapéutica ,a deficienciasx en la función inmunológica ,a la baja biodisponibilidad de los antifúngicos, a alteraciones en el metabolismo de estos, y a su resistencia primaria o secundaria según sea el caso, lo cual ha generado el desplazamiento de cepas sensibles por otras más resistentes (Al-Attas y Amro, 2010).

El fenómeno de resistencia es complejo y multifactorial, sus mecanismos son variables y pueden deberse principalmente a diversas situaciones, como: inactivación directa de la molécula, alteración de la sensibilidad del cuerpo al cambiar su blanco de acción, reducción de la concentración del fármaco para alcanzar su blanco sin cambiar su estructura química, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos, ciertas interacciones medicamentosas, surgimiento de levaduras resistentes, aparición de nuevas especies patógenas, prescripción irracional de antifúngicos como profilaxis, aumento de las dosis terapéuticas o la resistencia primaria (donde la levadura es naturalmente resistente) y secundaria (donde cepas susceptibles se transforman en organismos resistentes debido al contacto previo con el antifúngico) que pueden presentar y aunque el fármaco, la levadura y el pH del ambiente se encuentran influenciados, los factores

del paciente son con frecuencia los más relevantes para definir su resistencia (Rivera et. al., 2013).

En pacientes con Diabetes Mellitus (DM), el flujo salival y el pH contribuyen a la colonización por levaduras (Ugalde, 2008), lo que conduce a un aumento en la tasa de portadores de *Candida* (Vijayalakshmi, et.al., 2020). Aún existe controversia con respecto al papel de *Candida* en la cavidad oral de sujetos diabéticos debido a que en la literatura se han reportado discrepancias que se atribuyen a la metodología utilizada en el laboratorio, el número y características de los sujetos y las técnicas de muestreo utilizadas (Araiza et. al., 2023).

ANTECEDENTES

Específicos

A la fecha, no existe suficiente evidencia que correlacione pH salival, crecimiento de biopelículas de especies de *Candida* y su resistencia a anti fúngicos en saliva de pacientes con DM, por lo que es importante establecer la relación que existe entre el pH salival y el comportamiento de estas variables

- Parámetros salivales como el pH se ven afectados por anomalías metabólicas como la diabetes, nutricionales y por la ingesta de fármacos como son los diuréticos y los antihipertensivos (KM et. al., 2013).
- Durante los episodios de hiperglucemia, la alteración ambiental en la cavidad oral aumenta la producción de glucosa y pH ácido salival, lo que favoreció la transición de *Candida spp.* de comensal a patógeno (Balan et. al., 2015).
- El grupo de colaboradores de Mohamadi reportaron que un grupo de diabéticos presentaron valores de pH salival disminuido comparado con el grupo control, además demostraron que existe mayor cantidad de colonias de *Candida* a pH bajo (Mohamadi et. al., 2016).
- En trabajos más recientes Bhuyan y su grupo de estudio mostraron patrones de sensibilidad variable a los antifúngicos probados. Mencionan también que factores predisponentes como la nutrición, la disminución de la función salival, el cambio en el pH de la saliva y el alto nivel de glucosa salival ayudan al crecimiento excesivo de *Candida* en el microambiente oral, por lo que identificar la especie es de gran importancia para conocer su resistencia específica a los antifúngicos ya que al ser estos utilizados en exceso dificulta su erradicación (Bhuyan et. al., 2018).
- En una recopilación de "Causas que influyen la mayor cantidad de incidencias de candidiasis oral en diabéticos" se reportó que el crecimiento de *Candida* en la saliva se acompaña de una rápida disminución del pH, lo que favorece su crecimiento y desencadena la fosfolipasa extracelular y las

proteasas ácidas, aumentando la adhesión de la levadura a las superficies de la mucosa oral (Rodrigues et. al., 2019).

- La colonización oral por *Candida* se ha asociado significativamente con el control glucémico, el tipo de diabetes y el pH de la saliva (Vijayalakshmi et. al., 2020).
- En un estudio previo realizado en nuestro grupo de trabajo se observó que el pH salival en los individuos diabéticos tiende a decrecer en comparación con el grupo control (6.29+-0.46 vs 6.8+-0.35 respectivamente) (López, 2018).
- El grupo de El-Azizi al estudiar la actividad antifúngica de AmB contra biopelículas de *Candida albicans* encontró que hay una disminución significativa en la dispersión de células de *C. albicans* de la biopelícula (El-Azizi et. al., 2015).
- Pacientes descompensados con DM tipo 2 presentaron niveles de acidificación salival y una mayor diversidad y cantidad de levaduras del género *Candida*. Así mismo en el estudio de susceptibilidad hacia Nistatina a diferente pH se observó mayor inhibición a un pH de 6.5 a 7 (Aitken-Saavedra, et. al., 2018).
- En una recopilación de datos del trabajo “*Candida spp.* Infecciones en pacientes con diabetes mellitus” del grupo de Rodrigues, muestran datos sobre la resistencia antifúngica de especies de *Candida* aisladas de pacientes diabéticos donde hay una excelente efectividad a Nistatina y AmB, seguida de Ketoconazol (Rodrigues, 2018).
- En México Manzano-Gayosso y colaboradores concluyeron que de los 40 aislamientos de *Candida spp.*, 11 mostraron resistencia (27.5 %): siete a ketoconazol e itraconazol; tres sólo a itraconazol y uno a ketoconazol. Un aislamiento de *C. glabrata* fue resistente a los cuatro azoles y ninguna de las levaduras mostró resistencia a Anfotericina B (Manzano-Gayosso, et. al., 2007).
- Al describir la susceptibilidad antifúngica en una Universidad en Chile, Porte y colaboradores demostraron que del total de las cepas de *Candida*

estudiadas hubo 100% de susceptibilidad/sensibilidad a AmB tanto *C. albicans* como *Candida no albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*) (Porte, et. al., 2012).

- El estudio de la resistencia a antifúngicos de *Candida spp.* en el estado de Baja California reporta que los fenotipos de resistencia a polienos por parte de especies *Candida albicans* y *no-albicans* son relativamente bajos (Clarck Ordoñez et. al., 2017).
- Las especies *no albicans* son naturalmente más resistentes a los azoles en pacientes diabéticos ya que han tenido contacto con terapias antifúngicas con azoles y pueden ya no ser tan eficaces para sus tratamientos (Navarro, 2019).
- Avellaneda en 2021, observó que el pH de las personas diabéticas es más ácido comparado al pH de las personas sanas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones causadas por hongos del género *Candida* en pacientes diabéticos se ha incrementado en los últimos años. Está demostrado que *Candida* tiene una gran capacidad de formar biopelículas y colonizar superficies mucosas como la cavidad oral de estos pacientes, los cuales, al estar en un estado de inmunosupresión se vuelven susceptibles. Diversos factores facilitan la entrada de *Candida* a la cavidad oral, como es la alteración el pH salival entre otros, condición que facilita su colonización y con ello su resistencia hacia los antifúngicos.

JUSTIFICACIÓN

La cavidad oral representa uno de los sitios anatómicos que refleja el estado de salud sistémica y es susceptible a infecciones generadas por microorganismos oportunistas, tales como los del género *Candida*. Un aumento en el número de estas levaduras facilitaría la formación de biopelículas, lo cual juega un papel importante en su ciclo y subsistencia, esta capacidad puede verse afectada por diversos factores, como las variaciones en el pH salival, ya que una disminución de este facilita la proliferación de hongos de este género, influyendo en su sobrecolonización en individuos con un estado metabólico alterado, como es el caso de la diabetes.

La diabetes mellitus (DM) sigue en aumento considerable, y nuestro estado ocupa uno de los 10 primeros lugares a nivel nacional en prevalencia. Por lo tanto, es fundamental conocer las especies de *Candida*, presentes en la cavidad oral de pacientes diabéticos, su relación con el pH de la saliva y la formación de biopelículas, las cuales, debido a su complejidad, adquieren mayor resistencia a los antifúngicos, dificultando su tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar la relación entre el pH salival de adultos diabéticos y la formación de biopelículas de cepas del género *Candida* aisladas de estos pacientes.

Objetivos particulares:

- Confirmar mediante pruebas bioquímicas las especies de las cepas de *Candida*.
- Determinar la sensibilidad a 5 antifúngicos (Nistatina, Econazol, Miconazol, Ketoconazol y Anfotericina B) de las cepas de *Candida* en estudio.
- Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de *Candida* en presencia de saliva del paciente diabético.
- Analizar la formación de biopelículas de *Candida* bajo diferentes condiciones de pH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en el laboratorio de Micología Médica II.

Las personas que participaron en este estudio, previamente dieron su autorización a través de una carta de consentimiento informado que firmaron para trabajar con sus datos y las muestras que nos brindaron.

❖ **Los criterios de selección de la población de estudio fueron los siguientes:**

Criterios de Inclusión

- Adultos mayores de 18 años.
- Provenientes del Estado de Puebla.
- Ambos sexos.
- Individuos diabéticos con más de un año de haber sido diagnosticados.
- Individuos con una HbA1c >6.5% y Niveles de Glucosa (>100mg/dl).
- No padecer enfermedades crónicas diferentes a DMT2 (SIDA, cáncer, enfermedades cardiovasculares).
- No haber padecido infecciones fúngicas con anterioridad.
- No estar en tratamiento con antibióticos, antivirales, o antifúngicos.

Criterios de exclusión

- No cumplieron con las muestras requeridas.
- No proporcionaron información suficiente (datos generales).
- Estuvieran en algún tratamiento odontológico.
- Consumen con regularidad bebidas alcohólicas, son fumadores o drogadictos.
- Sean portadores de prótesis dental.
- Mujeres embarazadas.
- Estén recibiendo tratamiento médico con antibióticos.

Los criterios para la selección de las cepas de estudio fueron los siguientes:

- Provenientes de pacientes diabéticos
- UFC >100
- Pertenecientes al género *Candida*
- Un pH salival entre 6 y 7

Recolección de la muestra

Oral: La muestra de saliva de los pacientes sanos y diabéticos se recolectaron bajo los mismos criterios; sin aseo previo de la boca al despertarse y sin consumir alimentos hasta la obtención de la muestra total (15ml).

En un recipiente estéril, los pacientes depositaron la mayor cantidad de saliva posible (15ml) estimulando la salivación únicamente con papel parafilm, una vez obtenidos, la muestra se mantuvo en hielo y se llevó a procesar de inmediato al laboratorio en donde el pH se midió utilizando un pH-metro para finalmente esterilizar la muestra utilizando el método de filtración por membrana.

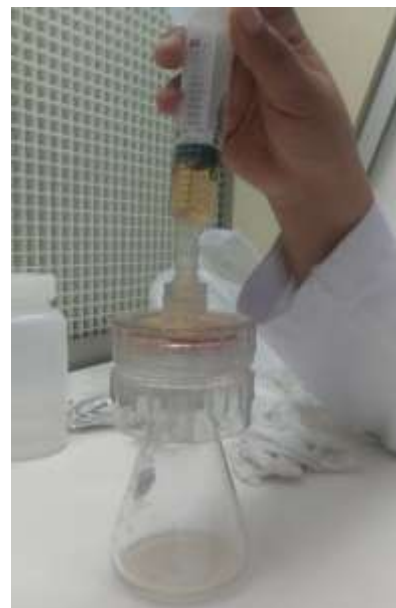


FIGURA 2. Método de esterilización por filtración
(Aguilar Angeles)

Pruebas de identificación para levaduras de *Candida*.

Una vez seleccionadas las cepas participantes del estudio lo primero que se realizó fue:

- Descripción morfológica: Se realizó la siembra de una muestra de colonias de *Candida* en Agar Dextrosa Sabouroud (ADS) en una placa con 10 ml de

medio por estría cruzada, después del periodo de incubación (48 horas a 37°) se registraron las características morfológicas de las especies de *Candida* como la textura (cremosa, lisa, seca, rugosa), bordes y tamaño (colonias pequeñas o grandes).

- Examen microscópico: donde se tomó una pequeña muestra de las colonias que crecieron en ADS de *Candida* y se disolvió en una gota de agua destilada para observarla bajo el microscopio óptico con el objetivo 40x y así describir su forma, tamaño y la presencia de hifas o pseudohifas.
- Crecimiento en el medio CHROMagar *Candida*®: finalmente se tomó una colonia y se realizó una siembra por estría cruzada o cola de pez en el medio selectivo CHROMagar *Candida*® de 20ml, se incubó a 37° por 48 horas.

TABLA 2. Coloración de colonias en medio CHROMagar	
Verde esmeralda	<i>C. albicans</i>
Rosa claro mate	<i>C. parapsilosis</i>
Violeta	<i>C. glabrata</i>
Verde militar	<i>C. dubliniensis</i>
Rosa con halo blanco	<i>C. krusei</i>
Azul metálico	<i>C. tropicalis</i>
Blanco/crema	<i>Candida spp.</i>

Debido a que posee sustratos artificiales que son degradados por enzimas específicas produce colores específicos (color verde esmeralda, verde militar, violeta, rosa, azul metálico, blanco, brillante u opaco) para diferentes especies de *Candida* y de esta manera poder diferenciarlas (López, 2018).

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

- Perfil de resistencia: De acuerdo al CLSI 2018 se determinó la susceptibilidad a 5 antifúngicos por el método de difusión en disco Kirby Baüer.

A partir de un cultivo en ADS de *Candida* de 24 horas de crecimiento se resuspendieron colonias en un tubo de ensaye con agua destilada estéril hasta ajustarlo a una turbidez de 0.2 en la escala de McFarland. Se inocularon las placas de Mueller-Hinton con un hisopo estéril impregnado con la suspensión ajustada, deslizándolo tres veces masivamente girando la placa 45° en cada

cambio y pasándolo por último sobre la periferia de la placa, para conseguir un crecimiento uniforme.

Posteriormente, con la ayuda de unas pinzas estériles, se colocaron los discos antimicrobianos (BBL™) en la placa, separados entre sí para no generar efectos antagónicos entre ellos. Finalmente, a las 24 horas se analizaron los halos de inhibición midiendo la zona visible. Los experimentos se realizaron por triplicado y los criterios de identificación antifúngica fueron los establecidos por el CLSI.

Ensayo de la formación de biopelícula por el método de Cristal Violeta

- Para este procedimiento se partió de un cultivo en medio Agar Dextrosa Sabouroud de 48 horas de crecimiento, se tomó una colonia, se inoculó en 20 ml de medio YPD y se incubó durante 16 horas a 37°C, transcurrido ese tiempo se tomó 1ml del cultivo y se centrifugó en un tubo eppendorf a 3000 rpm durante 5 minutos para obtener una pastilla de células la cual se resuspendió en 5ml de Caldo Sabouroud para realizar el ajuste a una D.O. de 0.200nm; a partir de este inóculo se procedió a realizar el llenado (1ml total por pocillo) de la placa multipozo de poliestireno de la siguiente manera:



FIGURA 3. Placa inoculada con saliva y medio RPMI

TABLA 3. Distribución de la placa multipozo.					
Saliva de diabético inoculada	Saliva sano inoculada	Inoculo + RPMI 6.2	Inoculo + RPMI 7.2	RPMI	RPMI 7.0 inoculado
Saliva de diabético inoculada	Saliva sano inoculada	Inoculo + RPMI 6.2	Inoculo + RPMI 7.2	RPMI	RPMI inoculado
Saliva diabético sin inocular	Saliva sano sin inocular	RPMI inoculado+ DMSO	Saliva diabético inoculado + AmB 100µl/ml	Saliva diabético inoculado + AmB 200µl/ml	RPMI inoculado + AmB 200 µl/ml
Saliva diabético sin inocular	Saliva sano sin inocular	RPMI inoculado + DMSO	Saliva sano inoculado + AmB 100µl/ml	Saliva sano inoculado + AmB 200µl/ml	RPMI inoculado + AmB 200 µl/ml

- Pasadas las 24 horas de incubación a 37° , con una pipeta se lavó cada pocillo para retirar el medio que llevara células planctónicas y se dejaron solo las adheridas a la pared; se fijó con etanol al 70% y se tiñó con cristal violeta al 0.02%. Tras la tinción se realizaron 2 lavados con agua estéril para eliminar el cristal violeta y el sobrenadante, posteriormente se agregó ácido acético glacial al 33% para permitir que el colorante adherido a las paredes del pocillo se liberara para así realizar la lectura de la formación de la biopelícula en un espectrofotómetro a una D.O. de 530nm (Fernández, 2017).

RESULTADOS

1.- Características generales de las cepas de estudio

Se trabajó con un total de 10 cepas de *Candida*, 2 cepas tipo ATCC y 8 aisladas de cavidad oral de pacientes diabéticos a las cuales se realizaron pruebas de identificación fenotípica.

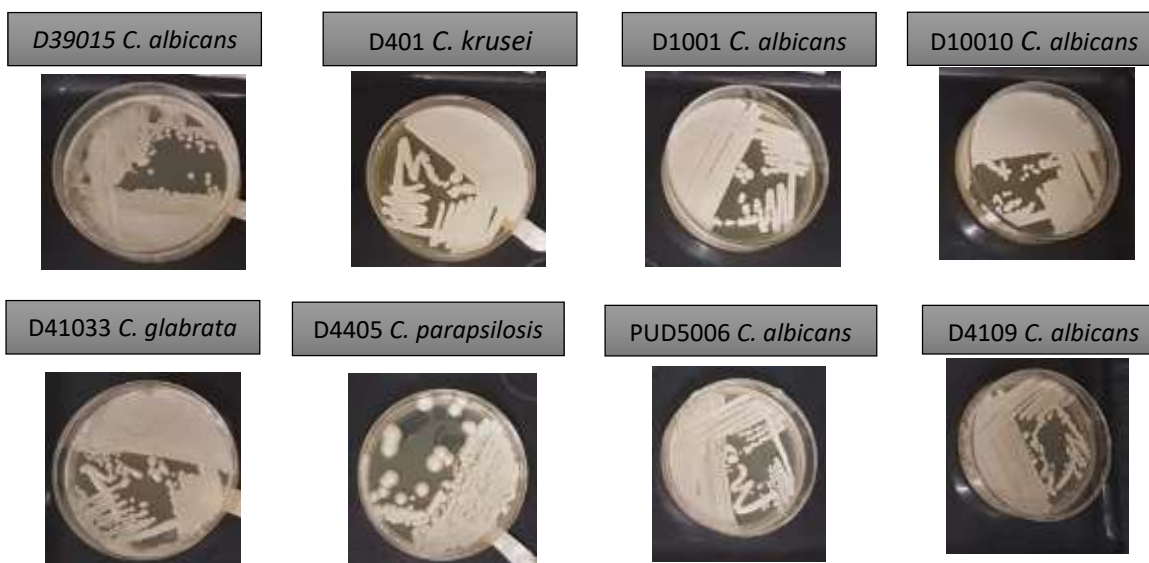


FIGURA 4. Morfología colonial de las distintas cepas de *Candida* presentes en este estudio.

Se confirmaron las especies de *Candida* con los métodos tradicionales.

TABLA 4. Pruebas de identificación de levaduras de <i>Candida</i>			
Crecimiento a 37°	Tubo germinal	CHROM agar	Especie
+	+	Verde esmeralda	<i>Candida albicans</i>
+	+		<i>Candida albicans</i>
+	+		<i>Candida albicans</i>
+	+		<i>Candida albicans</i>
+	+		<i>Candida albicans</i>
+	n/a	Rosa claro	<i>Candida parapsilosis</i>
+	-	Rosa con halo blanco	<i>Candida krusei</i>
+	-	Violeta	<i>Candida glabrata</i>

Todas tuvieron un crecimiento a 37°C y de acuerdo a las diferentes pruebas se confirmaron 5 especies de *Candida albicans*, una especie de *Candida parapsilosis*, *krusei* y *glabrata* respectivamente.

GRÁFICO 1. Porcentaje de aislados de especies de *Candida*

TABLA 5. Número de aislados por especie.	
<i>C. albicans</i>	5
<i>C. glabrata</i>	1
<i>C. parapsilosis</i>	1
<i>C. krusei</i>	1

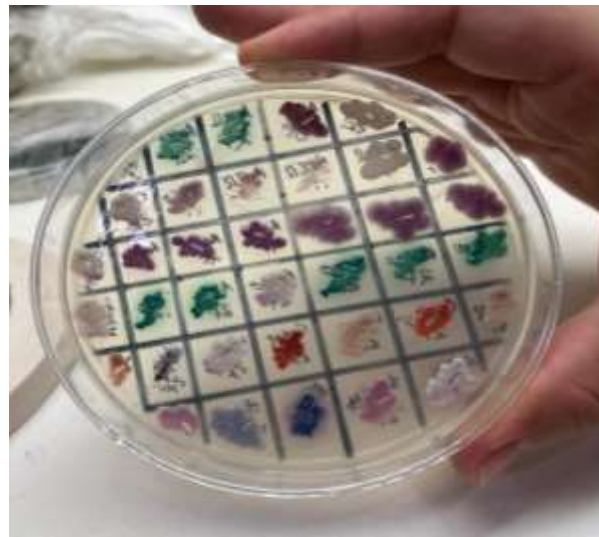
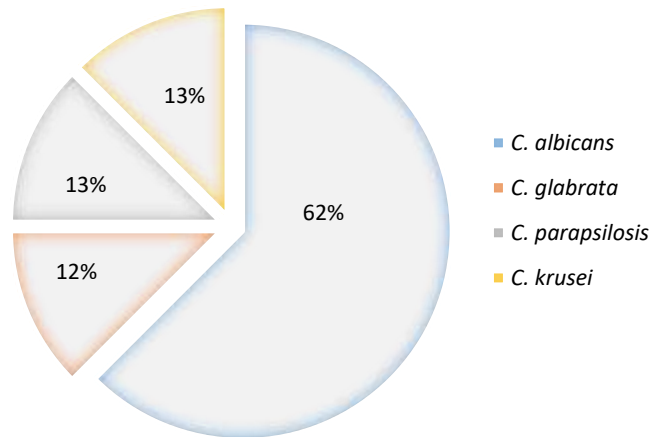


FIGURA 5. Detección de especies de *Candida* en CHROMagar

2.- Características de los grupos de estudio

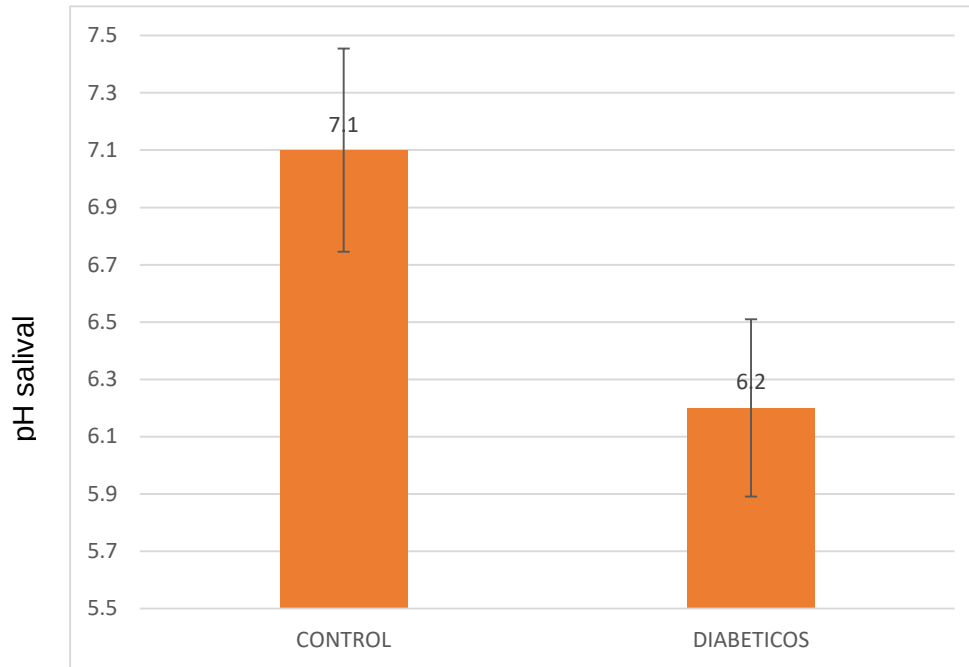
TABLA 6. Características de pacientes diabéticos de donde se aislaron las cepas de <i>Candida</i> utilizadas en este trabajo.							
	pH salival	HbA1c %	Glucosa mg/dl	UFC	EDAD	SEXO	# DE AÑOS CON DIABETES
<i>D39015 C. albicans</i>	6	11.3	160	600	66	M	>10
<i>PUD5006 C. albicans</i>	6	7.4	166	406	48	F	>10
<i>D4109 C. albicans</i>	6	11.3	164	600	65	M	>15
<i>D10010 C. albicans</i>	6	5.1	146	I	54	F	>10
<i>D1001 C. albicans</i>	6	5.1	146	100	54	F	>10
<i>D4405 C. parapsilosis</i>	6	8.1	152	200	74	F	>15
<i>D401 C. krusei</i>	6	14.2	162	I	74	M	>15
<i>D41033 C. glabrata</i>	6	11.3	164	I	65	M	>15
HbA1c (Hemoglobina glicosilada) UFC (Unidades Formadoras de Colonias) I (Incontables)							
(Marmolejo, 2018)							

Valores de pH salival del control y diabéticos

TABLA 7. pH salival (Datos estimados en media +- Desviación Estándar)					
GRUPO	Promedio	Desviación estándar	Moda	Mínima	Máxima
CONTROL	7.1	0.1814416	7	5.8	7.2
DIABETICOS	6.2	0.24978938	6.2	5.8	6.5

- El pH salival de nuestros pacientes sanos y pacientes diabéticos presenta una diferencia significativa, pues se observa mayor acidificación en los pacientes diabéticos ($\text{pH } 6.2 \pm 0.24$) que en el grupo control ($\text{pH } 7.1 \pm 0.18$).

GRÁFICO 2. Comparación del pH salival en pacientes sanos y pacientes diabéticos.



3.- Formación de biopelículas de *Candida* en presencia de saliva del paciente diabético.

TABLA 8. Producción de biopelícula de cepas de <i>Candida</i> en presencia de saliva como medio.						
Cepa	pH salival	Control (D.O. 530nm) Biopelícula	pH salival	Diabético 1 (D.O. 530nm) Biopelícula	pH salival	Diabético 2 (D.O. 530nm) Biopelícula
<i>PUD5006 C. albicans</i>	7.2	2.061	6.5	1.735	6.2	1.308
<i>D39015 C. albicans</i>	7.2	1.889	6.2	2.014	6.2	2.146
<i>D4109 C. albicans</i>	7.0	2.081	6.2	2.145	6.2	2.251
<i>D1001 C. albicans</i>	6.5	2.759	5.8	2.827	5.8	2.965
<i>D10010 C. albicans</i>	7.2	1.785	6.5	2.015	6.2	2.121
<i>D4405 C. parapsilosis</i>	7.2	1.089	6.5	1.943	6.2	2.064
<i>D401 C. krusei</i>	7.2	1.189	5.8	2.727	6.0	2.418
<i>D41033 C. glabrata</i>	7.0	1.678	6.0	2.532	6.2	2.243

GRÁFICO 3. Formación de biopelícula en presencia de saliva control con su pH salival correspondiente.

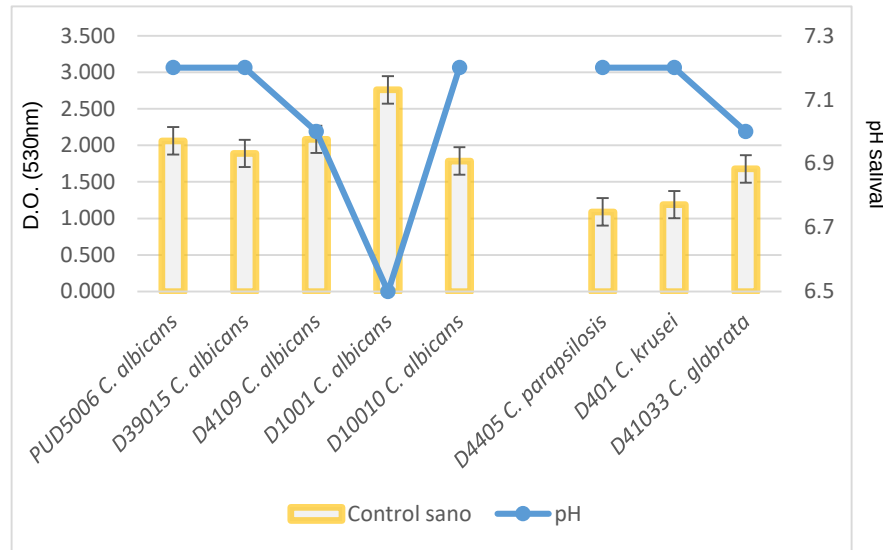


GRAFICO 4. Formación de biopelícula en saliva como medio de cultivo del diabético 1 con su pH salival correspondiente.

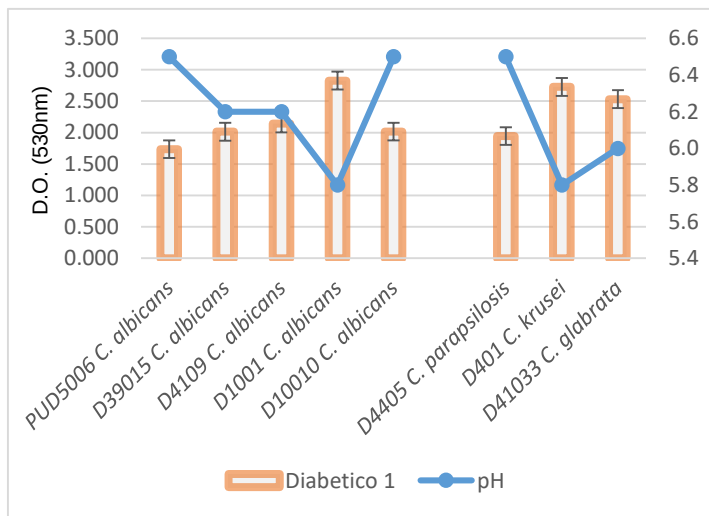
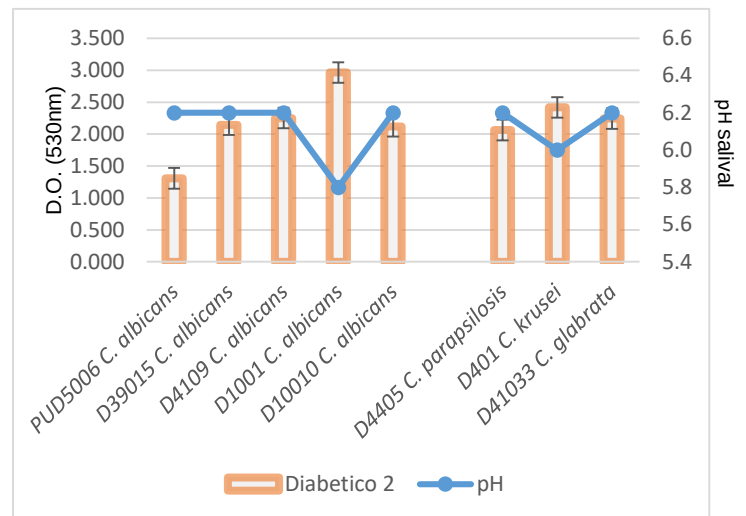


GRAFICO 5. Formación de biopelícula en saliva como medio de cultivo del diabético 2 con su pH salival correspondiente.



Por los valores de D.O. obtenidos se observa un mayor crecimiento de biopelícula en saliva de pacientes diabéticos que en el grupo control, así como un aumento en la formación de biopelícula cuando el pH salival disminuye.

4.- Formación de biopelículas de *Candida* a diferentes valores de pH en medio RPMI.

TABLA 9. Producción de biopelícula de cepas de <i>Candida</i> en presencia de medio RPMI.			
	RPMI 6.2 D. O. (530nm)	RPMI 7 D. O. (530nm)	RPMI 7.2 D. O. (530nm)
PUD5006 <i>C. albicans</i>	1.565	1.936	1.482
D39015 <i>C. albicans</i>	1.884	2.175	1.517
D4109 <i>C. albicans</i>	1.522	2.441	1.346
D1001 <i>C. albicans</i>	3.219	3.293	2.356
D10010 <i>C. albicans</i>	1.982	2.111	1.648
D4405 <i>C. parapsilosis</i>	0.784	1.341	0.628
D401 <i>C. krusei</i>	1.247	1.471	0.930
D41033 <i>C. glabrata</i>	0.943	1.487	0.852

Al comparar la formación de biopelícula en medio RPMI a tres diferentes variaciones de pH (6.2, 7 y 7.2) se observó que de todas las cepas probadas la D1001 correspondiente a *C. albicans* aislada de cavidad oral de un paciente diabético con las siguientes características fue la cepa con mayor formación de biopelícula en las 3 variaciones de pH.

- pH 6
- HbA1c 5.1%
- Glucosa 146 mg/dl
- UFC Incontables

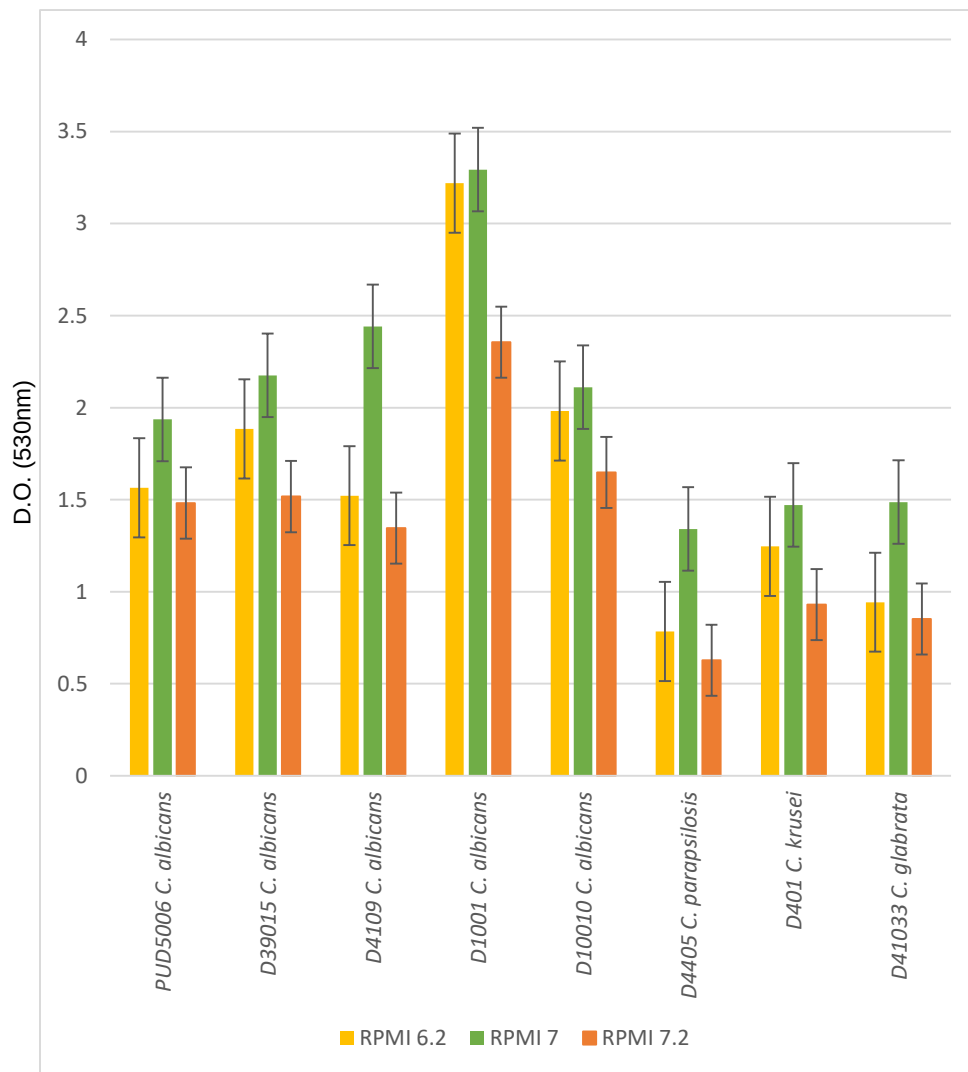
Mientras que la cepa D4405 correspondiente a *C. parapsilosis* aislada igualmente de cavidad oral de un paciente diabético con las siguientes características fue la cepa con la menor formación de biopelícula en las 3 variaciones de pH del medio.

- pH 6
- HbA1c 8.1%

- Glucosa 152 mg/dl
- UFC 200

La formación de la biopelícula en las diferentes concentraciones de pH en el medio RPMI presenta mayor crecimiento a pH de 7, seguidos de 6.2 y el menor crecimiento a pH de 7.2 (Tabla 9, Gráfico 6).

GRÁFICO 6. Crecimiento de biopelícula de diferentes especies de *Candida* aisladas de cavidad bucal a diferentes pH.



Las cepas del grupo de especies *no albicans* presentaron menor crecimiento de biopelícula comparadas con especies de *C. albicans* en los tres valores de pH.

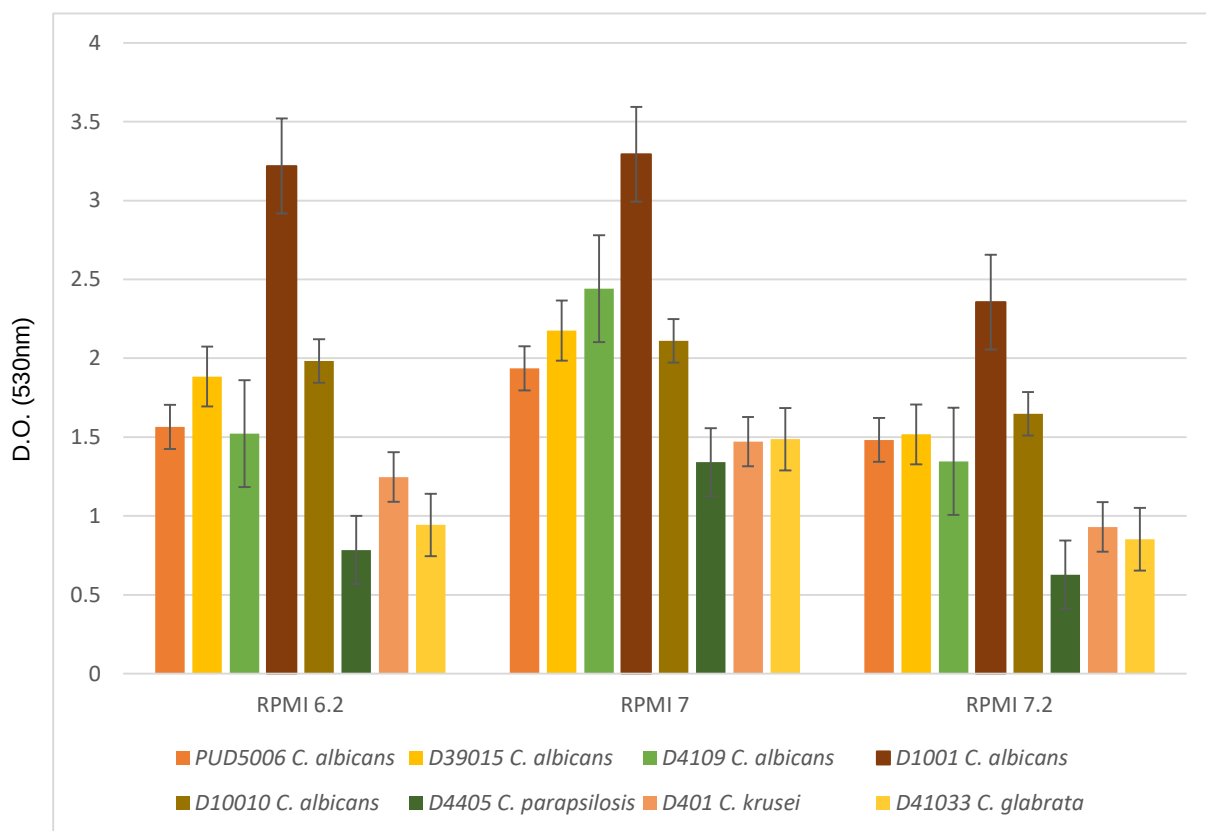


GRÁFICO 7. Formación de biopelícula de *Candida albicans* y no *albicans* en medio RPMI a diferentes concentraciones de pH (6.2, 7 y 7.2)

5.- Formación de biopelícula de especies de *Candida* en saliva de pacientes diabéticos y medio RPMI pH 7.

C E P A		RPMI 7 D. O. (530nm)	DIABETICO 1 D. O. (530nm)	DIABETICO 2 D. O. (530nm)
<i>C. albicans</i>	<i>PUD5006 C. albicans</i>	1.936	1.735	1.308
	<i>D39015 C. albicans</i>	2.175	2.014	2.146
	<i>D4109 C. albicans</i>	2.441	2.145	2.251
	<i>D1001 C. albicans</i>	3.293	2.827	2.965
	<i>D10010 C. albicans</i>	2.111	2.015	2.121
<i>C. no albicans</i>	<i>D4405 C. parapsilosis</i>	1.341	1.943	2.064
	<i>D401 C. krusei</i>	1.471	2.727	2.418
	<i>D41033 C. glabrata</i>	1.487	2.532	2.243

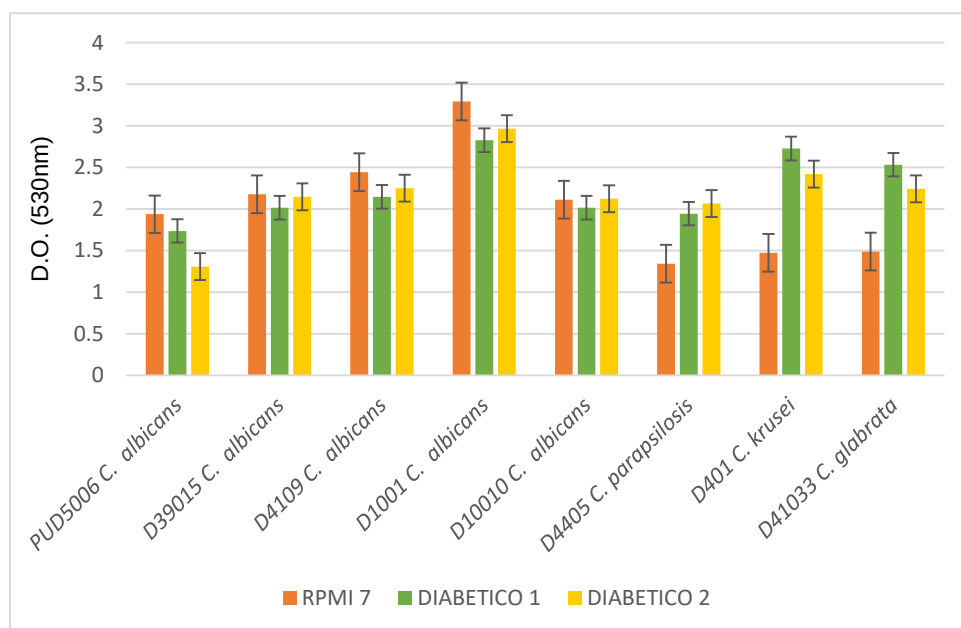


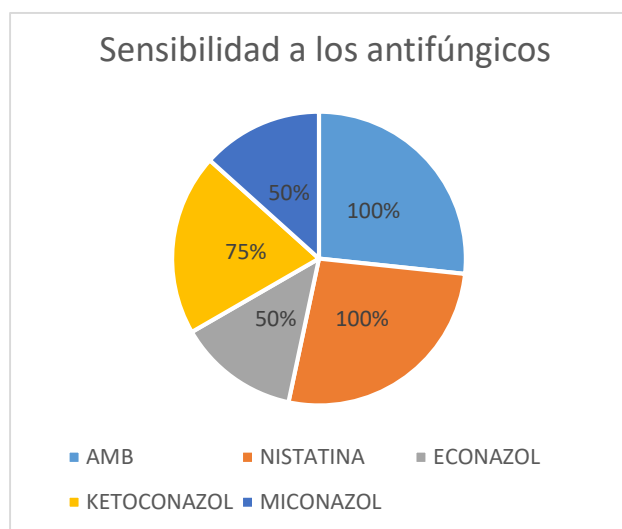
GRÁFICO 8. Producción de biopelícula de cepas de especies de *Candida* en presencia de medio RPMI y saliva de pacientes diabéticos como medio de cultivo.

Se puede observar que la mayor formación de biopelícula se dio en presencia de medio RPMI para las cepas de *C. albicans*, mientras que para las *Candida no albicans* fue en presencia de saliva.

6.-Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos

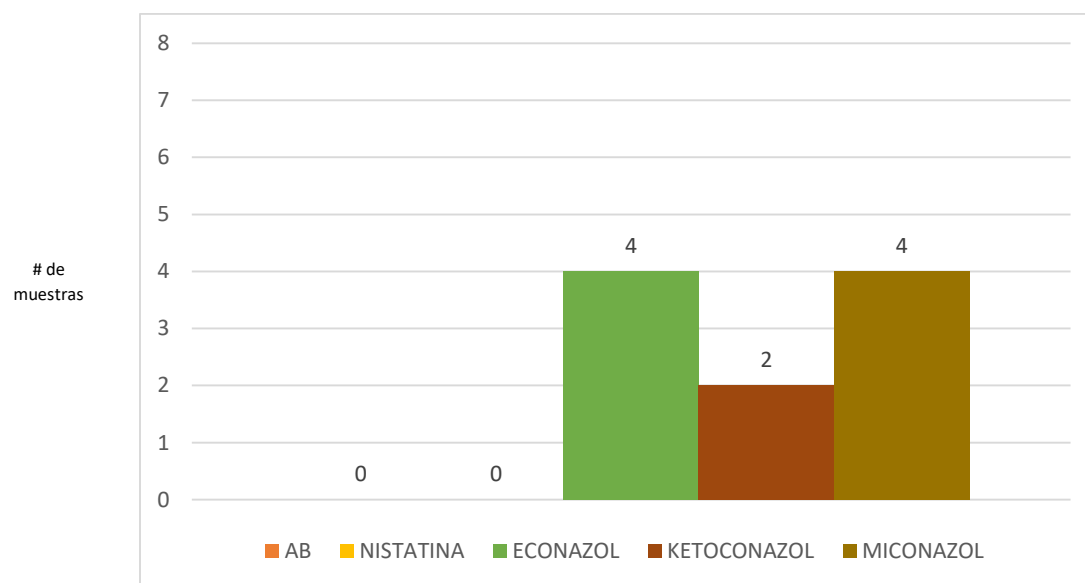
TABLA 11. Sensibilidad a antifúngicos de los aislados de <i>C. albicans</i> y <i>no albicans</i> de pacientes diabéticos.						
CEPA		POLIENOS		AZOLES		
		AmB (20 µg)	NISTATINA (100 UI)	ECONAZOL (10µg)	KETOCONAZOL (10µg)	MICONAZOL (10µg)
<i>Candida albicans</i>	D39015	S	S	S	S	S
	PUD5006	S	S	S	S	S
	D4109	S	S	R	S	R
	D10010	S	S	S	S	R
	D1001	S	S	S	S	S
<i>Candida no- albicans</i>	D4405 <i>parapsilosis</i>	S	S	R	S	R
	D401 <i>krusei</i>	S	S	R	R	S
	D41033 <i>glabrata</i>	S	S	R	R	R
Cepa control	ATCC10231	S	S	S	S	S
	ATCC66027	S	S	S	S	S
S → Sensible						
R → Resistente						

GRÁFICO 9. Porcentaje de sensibilidad de las cepas del género *Candida*



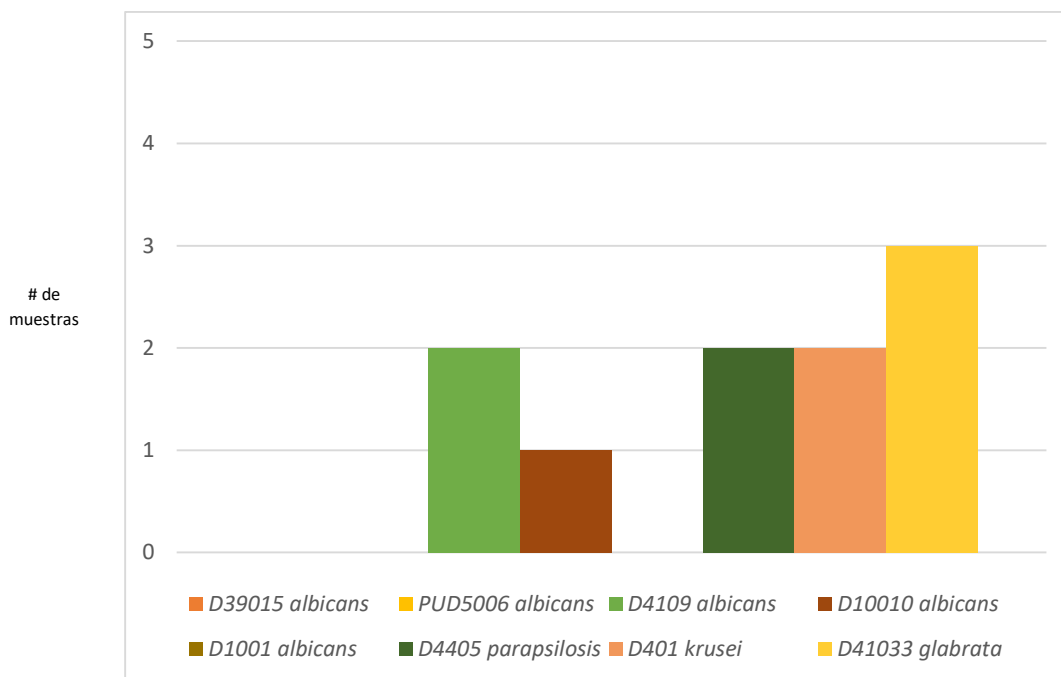
Como se muestra en los datos del gráfico, todas las cepas probadas en este estudio fueron sensibles al grupo de los polienos (AmB y Nistatina), mientras que para el grupo de los azoles (Ketoconazol, Miconazol y Econazol) el porcentaje corresponde a un 50 y 75% de sensibilidad.

GRÁFICO 10. Distribución del número de cepas resistentes a cada uno de los antifúngicos probados.



De manera individual se muestra la cantidad de cepas que fueron resistentes a cada uno de los antifúngicos, observamos que únicamente cuatro de las ocho cepas presentaron resistencia a Econazol y Miconazol, seguidos de Ketoconazol con tres de los ocho y finalmente ninguna cepa resistente a AmB y Nistatina.

GRÁFICO 11. Distribución de cepas de *Candida albicans* y no *albicans* resistentes a antifúngicos.



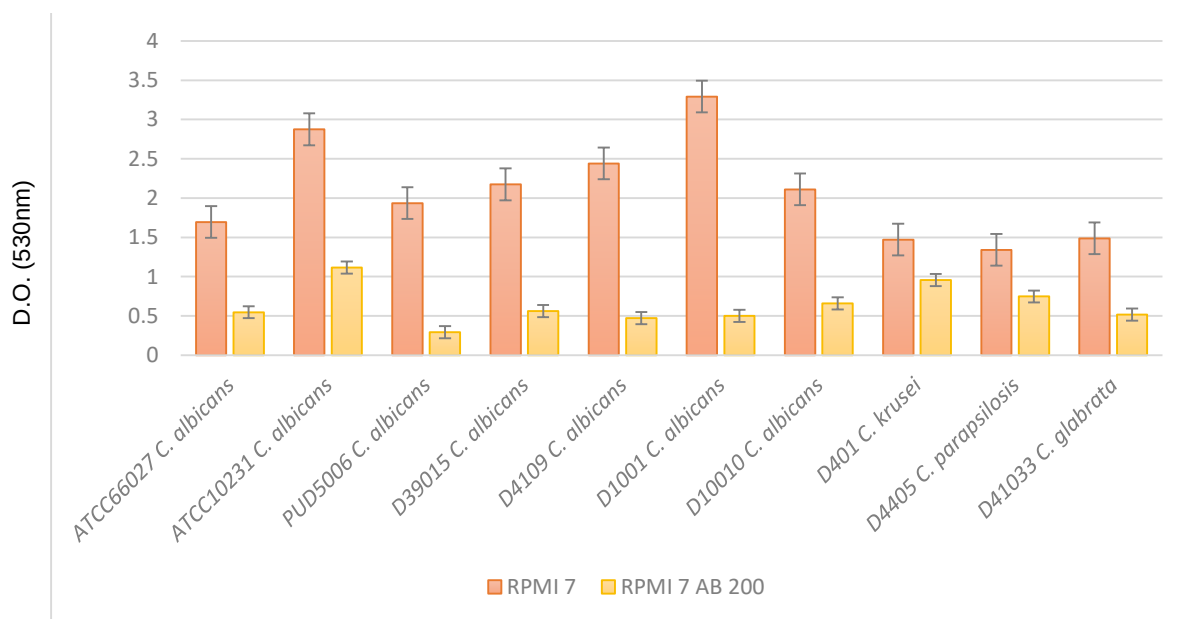
Se probaron los cinco antifúngicos en cada una de las cepas y observamos que *C. glabrata* fue la cepa que tuvo resistencia a tres de los cinco antifúngicos, de los cuales tres son azoles (Econazol, Ketoconazol y Miconazol), en cuanto a *C. parapsilosis*, *C. krusei* y una *C. albicans* fueron resistentes a dos de los cinco antifúngicos, finalmente las demás cepas de *C. albicans* no presentaron resistencia a ningún antifúngico o en su caso solo a uno.

7.- Acción de AmB a diferentes concentraciones contra la formación de biopelículas de *Candida* en medio RPMI y saliva.

TABLA 12. Acción de AmB en las cepas formadoras de biopelícula en medio RPMI

CEPA	RPMI 7 (D.O. 530nm)	RPMI 7 + AmB 200 µg/ml (D.O. 530nm)
<i>PUD5006 C. albicans</i>	1.936	0.291
<i>D39015 C. albicans</i>	2.175	0.561
<i>D4109 C. albicans</i>	2.441	0.473
<i>D1001 C. albicans</i>	3.293	0.502
<i>D10010 C. albicans</i>	2.111	0.660
<i>D401 C. krusei</i>	1.471	0.955
<i>D4405 C. parapsilosis</i>	1.341	0.747
<i>D41033 C. glabrata</i>	1.487	0.516

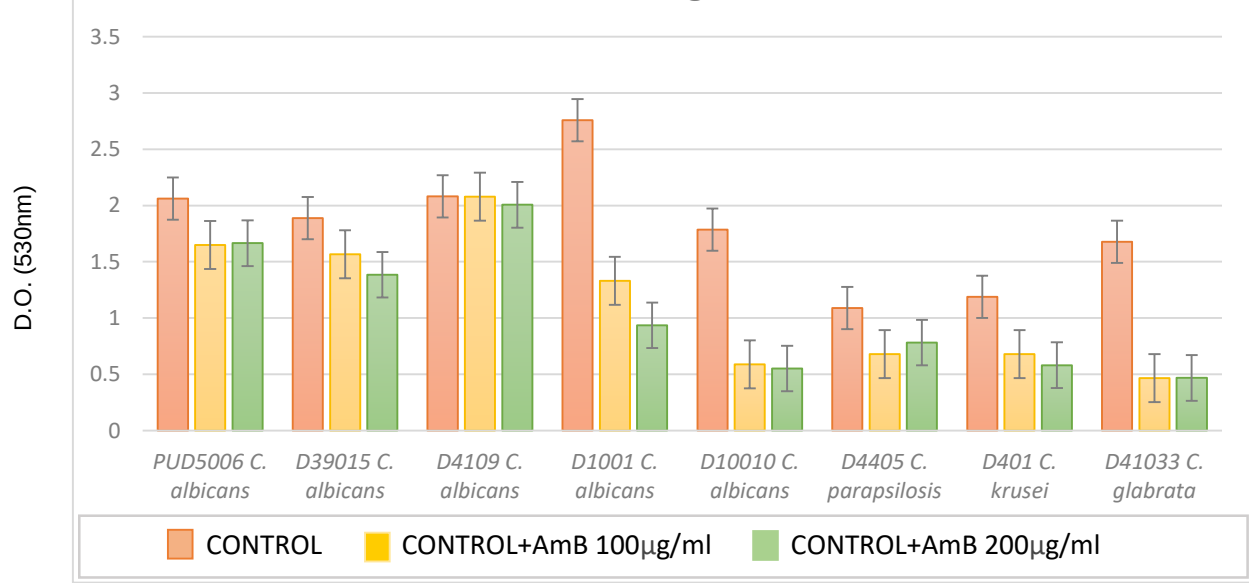
GRÁFICO 12. Producción de biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de medio RPMI y su inhibición con AmB 200µg/ml.



Al comparar el crecimiento de las cepas en medio RPMI y medio RPMI adicionado con AmB 200 µg/ml se observó que todas las cepas presentaron inhibición por parte del antifúngico y la cepa con mayor crecimiento en medio RPMI fue *C. albicans* D4109, misma en donde se observa un porcentaje mayor de inhibición de AmB 200µg/ml.

TABLA 13. Acción de AmB 100µg/ml y 200µg/ml en las cepas formadoras de biopelícula en presencia de saliva del paciente control			
CEPA	Paciente control saliva como medio (D.O. 530nm)	Paciente control + AmB 100 µg/ml (D.O. 530nm)	Paciente control + AmB 200 µg/ml (D.O. 530nm)
<i>PUD5006 C. albicans</i>	2.061	1.649	1.665
<i>D39015 C. albicans</i>	1.889	1.566	1.384
<i>D4109 C. albicans</i>	2.081	2.079	2.006
<i>D1001 C. albicans</i>	2.759	1.330	0.936
<i>D10010 C. albicans</i>	1.785	0.588	0.551
<i>D4405 C. parapsilosis</i>	1.089	0.679	0.782
<i>D401 C. krusei</i>	1.189	0.679	0.581
<i>D41033 C. glabrata</i>	1.678	0.465	0.468

GRÁFICO 13. Producción de biopelícula de *cepas de Candida* en presencia de saliva de paciente control como medio y su inhibición con AmB 100µg/ml y 200µg/ml.



CEPA	Diabético 1 (D.O. 530nm)	Diabético 1 + AmB 100 µg/ml (D.O. 530nm)	Diabético 1 + AmB 200 µg/ml (D.O. 530nm)
<i>PUD5006 C. albicans</i>	1.735	1.367	1.105
<i>D39015 C. albicans</i>	2.014	1.731	1.480
<i>D4109 C. albicans</i>	2.145	1.588	1.543
<i>D1001 C. albicans</i>	2.827	1.595	1.313
<i>D10010 C. albicans</i>	2.015	1.019	0.751
<i>D4405 C. parapsilosis</i>	1.943	1.407	1.123
<i>D401 C. krusei</i>	2.727	0.724	0.637
<i>D41033 C. glabrata</i>	2.532	0.793	0.705

GRÁFICO 14. Producción de biopelícula de *cepas de Candida* en presencia de saliva como medio del paciente diabético 1 y su inhibición con AmB 100µg/ml y 200µg/ml.

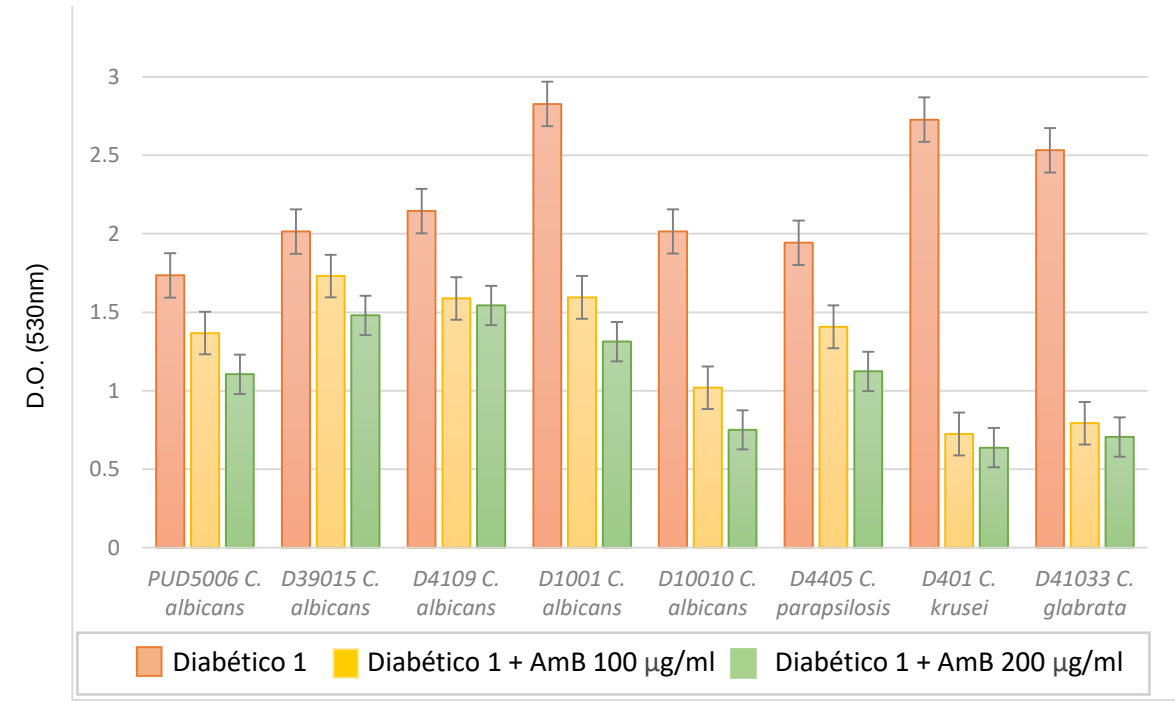
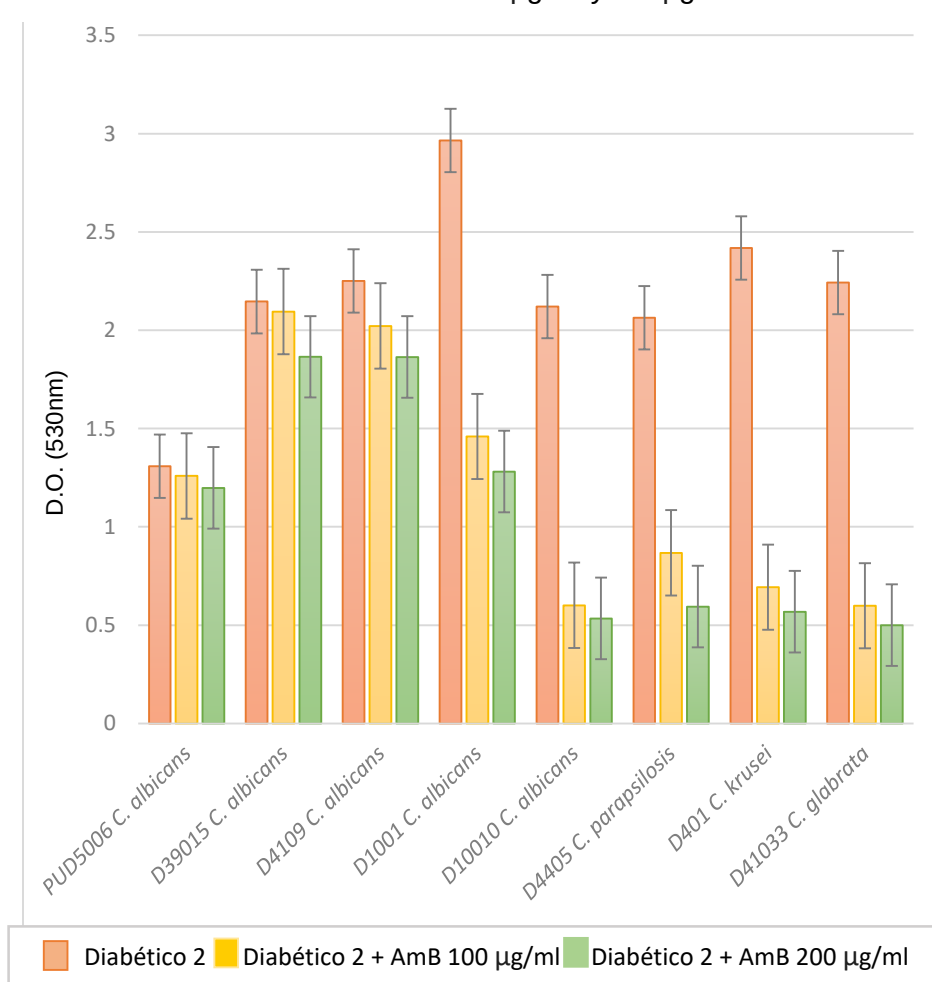


TABLA 15. Acción de AmB 100µl y 200µl en las cepas formadoras de biopelícula en presencia de saliva del paciente diabético 2

CEPA	Diabético 2 (D.O. 530nm)	Diabético 2+AmB 100µg/ml (D.O. 530nm)	Diabético 2+AmB 200µg/ml (D.O. 530nm)
<i>PUD5006 C. albicans</i>	1.308	1.259	1.198
<i>D39015 C. albicans</i>	2.146	2.095	1.865
<i>D4109 C. albicans</i>	2.251	2.022	1.864
<i>D1001 C. albicans</i>	2.965	1.460	1.281
<i>D10010 C. albicans</i>	2.121	0.601	0.534
<i>D4405 C. parapsilosis</i>	2.064	0.868	0.594
<i>D401 C. krusei</i>	2.418	0.693	0.588
<i>D41033 C. glabrata</i>	2.243	0.599	0.500

GRÁFICO 15. Producción de biopelícula de cepas de *Candida* en presencia de saliva como medio de paciente diabético 2 y su inhibición con AmB 100µg/ml y 200µg/ml.



En el gráfico 15 se muestra la comparación del crecimiento de las cepas usando como medio la saliva de los pacientes diabéticos con adición de AmB a diferentes concentraciones (100 y 200 µg/ml), donde se observó de manera individual que todas las cepas a las que se les adicionó el antifúngico presentaron inhibición, aunque en las cepas de *Candida* no *albicans* no se presentó mayor inhibición.

Evaluando el comportamiento general de las cepas como respuesta a la presencia de AmB podemos observar que existe inhibición, sin embargo, al comparar las 2 concentraciones de AmB que se añadió a las biopelículas se observa que la inhibición fue parcial.

DISCUSIÓN

Para este estudio se tomaron levaduras aisladas de cavidad oral de pacientes diabéticos del Estado de Puebla a partir del trabajo de López Marmolejo realizado en 2018, las cuales corresponden a:

- 5 *C. albicans*
- 1 *C. glabrata*
- 1 *C. parapsilosis*
- 1 *C. krusei*

En su trabajo se reporta a *Candida albicans* como la especie prevalente con un porcentaje del 67.74% de aislamientos, estos datos coinciden con la prevalencia de aislamientos de esta especie en pacientes inmunocomprometidos reportados por varios grupos de investigadores en diferentes partes del mundo como Campisi et al., 2002 Italia (65.9%), Luque et al., 2009 Argentina (62.3%) y Hamza et al., 2008 África (84.5 %) y en nuestro país cifras como el 75.5% de aislamientos en la ciudad de Tijuana (Clarck Ordoñez et.al. 2017) y el 66.7% en la ciudad de México (de Repentigny y Jolicoeur, 2004). En cuanto a los datos obtenidos de las especies *no albicans* se encontraron las siguientes frecuencias de aislamientos: *C. krusei* (3.7%), *C. parapsilosis* (1%) y *C. glabrata* (18.5%), lo que concuerda con los autores Al-Attas y Amro., 2010 y Premkumar et al., 2014, Suarez-Álvarez, et. al., 2016, Aitken-Saavedra et al., 2018 y Eslava Rico en 2020, quienes reportaron que en las personas diabéticas se obtiene una mayor cantidad de *Candida albicans* y con menor frecuencia la presencia de especies *no albicans* como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Aunque la colonización de *Candida spp.* puede estar relacionada con las condiciones y factores de riesgo de cada paciente como el nivel de higiene oral, uso de prótesis dentales, hábitos de fumar, aumento de glucosa en saliva, disminución del pH salival, edad, entre otros, la diabetes ha demostrado ser un factor importante para que especies de *Candida* predominen en muestras orales de estos pacientes.

Nuestros resultados muestran que el pH salival de personas sanas fue de 7.1 ± 0.18 y 6.2 ± 0.24 en diabéticos, esto corresponde con lo planteado por algunos autores que señalan que pacientes con DM pueden presentar un pH salival menor que los pacientes no diabéticos. KM y colaboradores en 2013 obtuvieron datos significativos al comparar el pH salival de pacientes con DM al obtener un promedio de 6.69 en comparación con pacientes sanos quienes presentaron un pH de 7.09. Por otra parte Mohamadi y colaboradores en 2016 obtuvieron valores de 6.52 ± 0.48 en muestras de pacientes diabéticos, mientras que para su grupo control los valores de pH fueron de 6.87 ± 0.29 . El grupo de Islami en 2011 reportó valores de pH para pacientes diabéticos y sanos de 6.96 ± 0.71 y 7.53 ± 0.58 respectivamente; en 2018 López, obtuvo valores de 6.29 ± 0.46 para un grupo de pacientes diabéticos en el Estado de Puebla y 6.8 ± 0.35 para el grupo control; en 2021 Avellaneda y colaboradores reportaron que el pH salival en pacientes sanos en promedio es de 8.3, mientras que para los pacientes diabéticos 6.5; finalmente Hajisadeghi y colaboradores en 2023 evaluaron el efecto de la saliva controlada de diabéticos y no diabéticos sobre la adherencia de *Candida albicans* encontrando que el pH salival era más bajo en el grupo de diabéticos (KM et.al., 2013; Mohamadi et.al., 2016; López, 2018; Avellaneda et.al., 2021; Hajisadeghi et.al., 2023) .

En los últimos años el estudio de *Candida spp.* y su relación con el pH se ha centrado en determinar la diversidad y prevalencia de este microorganismo. Nuestro trabajo evaluó la capacidad de formar biopelículas en saliva de pacientes diabéticos, cómo podemos observar en la Tabla 8 hay un pequeño aumento en la formación de biopelícula en estos pacientes demostrando así que la saliva de estas personas tiene cierto potencial al facilitar la formación de la biopelícula tal y como lo reportó Gulia y colaboradores en 2018; de igual manera al evaluar el pH y el comportamiento de la biopelícula se pueden comparar los gráficos 4 y 5 con el gráfico 3 donde los datos sugieren que a menor pH salival mayor formación de biopelícula, datos que coinciden con Mohamadi, et. al., 2016; Bhuyan, et. al., 2018, Rodríguez, et. al., 2019; Vijayalakshmi et.al., 2020 y Domingues, et. al., 2022, demostrando que existe mayor cantidad de colonias de *Candida spp.* a pH bajo en el grupo de pacientes diabéticos, así como un crecimiento excesivo asociado a una

rápida disminución del pH y una facilidad de adherencia a diversas superficies, lo que genera la proliferación, adherencia e invasión de estas comunidades de microorganismos desencadenando la formación de una biopelícula. Además, en los mismos gráficos se puede observar el comportamiento de las especies *no albicans*, cuya formación de biopelícula en saliva de pacientes diabéticos muestra un aumento significativo. Este fenómeno podría estar influenciado por diversos factores, como el pH o la concentración de glucosa, según lo mencionan Domingues y colaboradores (Domingues et.al., 2022) .El papel de la saliva en este proceso es controvertido, ya que algunos autores sostienen que reduce la adherencia del hongo debido a la actividad protectora de las enzimas salivales, mientras que otros han reportado que las biopelículas formadas en saliva favorecen la fase inicial de adherencia de *Candida albicans* sin afectar las fases posteriores del proceso.

Existen diversas razones por las cuales un diabético presenta una acidificación en cavidad oral: factores locales como caries dental, el grado de control metabólico, la Candidiasis y la activación de proteinasas y fosfolipasa favorecen un ambiente rico en glucosa podrían ser solo algunos de los factores por los cuales se presentan niveles de pH bajos.

Evaluamos la adaptación de *Candida spp.* a diferentes parámetros de pH utilizando el medio RPMI, el cual Del Pozo y Cantón describen como óptimo para el desarrollo de biopelículas de *Candida spp.* debido a sus componentes específicos que optimizan el crecimiento y a sus amortiguadores que reducen las variaciones de pH. En el Gráfico 6, se observa como todas las cepas probadas fueron capaces de desarrollar biopelículas en los tres pH evaluados, aunque con diferentes tasas de crecimiento. Se concluyó que estas biopelículas se desarrollaron mejor a pH neutro cuando se utilizó el medio RPMI, lo cual sugiere una alta adaptabilidad de *Candida*, lo que podría explicar el elevado número de casos de candidiasis bucal, tal como señalan en su estudio Barbosa y colaboradores en 2020 (Del Pozo y Cantón, 2016; Barbosa et. al., 2020).

Al observar el grafico 7 las especies de *Candida albicans* a diferencia del crecimiento de las especies no *albicans* en saliva de diabético observamos como en el medio RPMI estas cepas no tuvieron un óptimo crecimiento.

Sensibilidad a los antifúngicos

La resistencia a los antifúngicos es un problema de salud grave, especialmente para pacientes inmunocomprometidos, como aquellos con diabetes, ya que las infecciones fúngicas pueden ser no solo graves, sino también fatales. En este estudio, se comparó la susceptibilidad de diferentes especies de *Candida* aisladas de pacientes con diabetes mellitus (DM) frente a cinco antifúngicos comúnmente usados en el tratamiento de micosis en la cavidad oral. Estos antifúngicos se agrupan en azoles (Econazol, Ketoconazol y Miconazol) y polienos (Anfotericina B y Nistatina). Se demostró que la resistencia a los azoles varió según la cepa; en particular, algunas cepas no *albicans*, como *C. glabrata*, mostraron resistencia a los tres azoles probados. Estos resultados coinciden con los de Rodrigues, et.al., 2019, quienes mencionan que el uso excesivo de azoles ha promovido la resistencia en especies como *C. glabrata* y *C. krusei* en pacientes diabéticos, debido a que estos ya han estado expuestos a terapias antifúngicas con dichos fármacos, lo que disminuye su efectividad. Además, nuestros hallazgos concuerdan con estudios de autores como Porte et.al., 2012; Manzano-Gayosso et al. 2007; Rodríguez et al., 2019 y Mohd Sazlly Lim, et, al., 2020, quienes han reportado una excelente efectividad de la Anfotericina B contra cepas de *C. albicans* y *C. no albicans*.

La Nistatina resultó ser un antifúngico eficaz, mostrando 100% de susceptibilidad en las siete cepas, incluyendo las especies de *C. albicans* y *C. no-albicans* aisladas de pacientes diabéticos y aunque algunos autores como Huenchunao y Aitke-Saavedra y colaboradores, mencionan que la efectividad de nistatina es mejor en pacientes descompensados, en nuestro caso fue diferente, pues las cepas fueron aisladas de pacientes con un buen control metabólico; aun así la efectividad y baja toxicidad de este fármaco lo convierte en una excelente opción, de igual manera Aitken-Saavedra y colaboradores reportaron en su trabajo que la Nistatina presentó

mejor susceptibilidad a un pH de 6.5-7 mientras que nosotros obtuvimos un pH de 6 y de igual manera presentaron excelente sensibilidad (Huenchunao, 2016; Aitke-Saavedra et.al., 2018) .

Aunque se ha reportado que la toxicidad y efectos secundarios de estos fármacos (Nistatina y AmB) es mayor que otros, se ha demostrado que son útiles como terapia antifúngica contra *Candida spp.*

Los pacientes diabéticos son propensos a infecciones causadas por *Candida spp.* debido a la inmunosupresión que presenta su organismo. La incidencia de candidiasis ha aumentado a lo largo de los años, lo que ha impulsado la búsqueda de mejores y nuevos tratamientos. Dado que existe información limitada sobre la resistencia a antifúngicos en nuestro país, es importante considerar los reportes de diferentes estados de la República que coinciden con nuestros datos. Por ejemplo, López -Ávila y colaboradores en Mérida, Yucatán, menciona una mayor resistencia a los azoles; en Baja California, Clarck –Ordoñez y colaboradores reportaron un fenotipo de resistencia del 3.9 % y un 8.6 % de sensibilidad entre las cepas aisladas. Para los fármacos poliénicos, observaron menores porcentajes de resistencia y sensibilidad (1.7 % y 0.5 %, respectivamente). En nuestro estudio, los porcentajes de resistencia a polienos fueron nulos, mientras que, para los azoles, la mitad de las cepas fueron resistentes a Miconazol y Econazol, y el 75 % mostró resistencia a Ketoconazol (López-Ávila et.al., 2016; Clarck-Ordoñez et.al., 2017).

Se ha descrito que la sensibilidad entre *C. albicans* y las especies de *C. no-albicans* en pacientes con DM varía significativamente, esto debido en gran parte a su composición y arquitectura por lo cual cobran relevancia los datos obtenidos de *C. glabrata*, cepa que mostró resistencia a tres de los cinco antifúngicos probados, de los cuales pertenecen al grupo de los azoles, lo que la convierte en una cepa multiresistente y que coincide con un estudio realizado por Pfaller quien reportó un caso clínico de multiresistencia por parte de una cepa de *C. glabrata* (Pfaller, 2012) ;de igual manera coincide con lo reportado por Manzano-Gayosso et.al., 2007; Tapia, 2012; Navarro, 2019.

Se puede determinar que *C. glabrata* se ha convertido en una cepa con sensibilidad intrínseca o secundaria debido al constante contacto previo con los antifúngicos, pues en todos los reportes se describe una resistencia por parte de esta especie a distintas terapias antifúngicas. Algunos autores sugieren que esta susceptibilidad reducida a los antifúngicos se podría deber a los altos niveles de azúcar que presentan los pacientes diabéticos, pues los datos no solo se demuestran in vitro sino también en el ámbito clínico (Mohd Sazlly Lim, et.al., 2020; Bhuyan, et.al., 2018; Bremenkamp, et.al., 2011; y Al-Attas y Amro, 2010).

Finalmente, del grupo de los azoles probados en este trabajo (Econazol, Miconazol y Ketoconazol) se pudo observar una disminución en su efectividad, lo cual coincide con los estudios realizados por Ortigoza-Medrano y Arroyo-Espinosa; Pérez; Bhuyan y colaboradores; y Mohd Sazlly Lim y colaboradores, quienes mostraron en su estudio que la efectividad de este grupo de antifúngicos, aunque aún es buena su efectividad, tiene una tasa de resistencia que se ha reportado va en aumento (Ortigoza-Medrano y Arroyo-Espinosa, 2014; Pérez, 2015; Bhuyan et.al., 2018; Mohd Sazlly Lim et.al., 2020).

La anfotericina B suele actuar sobre las biopelículas de *Candida* ya que interfiere en la síntesis del ergosterol y altera la permeabilidad de la membrana celular ocasionando su muerte. *Candida* mostró sensibilidad a este antifúngico cuando se probó en las células planctónicas de las cepas, por ello, se decidió evaluar si se presentaba resistencia a este antifúngico en la formación de biopelículas, como se ha planteado en estudios previos como los de Rodrigues y colaboradores y Kuhn y colaboradores (Rodrigues et.al., 2018; Kuhn et.al., 2002). Sin embargo, obtuvimos resultados contrarios, ya que la formación de biopelícula se redujo. Esto sugiere que la Anfotericina B podría utilizarse como tratamiento en casos de infección por diferentes especies de *Candida* y seguir siendo considerada una opción eficaz en el tratamiento de infecciones por *Candida spp* como han señalado otros estudios como el de Fernández en 2017 y Rivera-Toledo en 2020. Aunque el número de muestras no es representativo de una población completa, estos resultados ofrecen un indicador del comportamiento de diferentes especies frente a este antifúngico.

Es importante resaltar que los individuos diabéticos de quienes se aislaron las cepas de *Candida*, así como los donadores diabéticos de saliva, mencionaron no haber recibido ningún tratamiento con antifúngicos. Esto podría explicar la sensibilidad observada tanto en las células planctónicas como en las biopelículas.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que las variaciones en la sensibilidad a la Anfotericina B en las diferentes cepas de *Candida* podrían depender de la especie, lo cual se explicaría por las características de cada una en la formación de biopelículas. Por ejemplo, *Candida albicans* forma una red compleja de células levaduriformes, hifas y pseudohifas interconectadas con una matriz extracelular de múltiples capas; *Candida krusei* no presenta hifas septadas; *Candida parapsilosis* se organiza en agregados de células levaduriformes y pseudohifas menos complejos y densos; y *Candida glabrata* se presenta únicamente en forma de levadura embebida en la matriz extracelular, con menor biomasa y actividad metabólica.

CONCLUSIONES

- El pH salival de los pacientes diabéticos es más ácido con respecto al de pacientes sanos.
- A menor pH hay mayor formación de biopelícula de *Candida spp.*
- Se presentó una mayor resistencia a los antifúngicos del grupo de los azoles que al grupo de los polienos.
- Las biopelículas de *Candida* presentaron inhibición parcial frente a Anfotericina B.

LIMITACIONES

En el presente estudio, se identificaron limitaciones que pueden influir en la interpretación de los resultados. El tamaño de la muestra es reducido, lo que limita la generalización de los hallazgos, el volumen de saliva disponible para el análisis vario en algunas de las tomas de muestra. Otra limitante es la variación en la composición de la saliva, debido a diversos factores como la dieta, el estrés, la hidratación, higiene bucal y el ayuno, los cuales pueden alterar sus propiedades bioquímicas y afectar la precisión de los resultados. Estos factores deben ser considerados al evaluar los datos y al diseñar futuros estudios.

PERSPECTIVAS

Se planea aumentar el tamaño de la muestra de la población de adultos diabéticos, con la finalidad de reducir el margen de error y aumentar la precisión de los resultados, lo que permitiría comprender de forma más completa como el pH y la composición de la saliva pueden afectar los procesos biológicos, como la formación de biopelículas y su respuesta a los tratamientos, lo cual es crucial para mejorar los enfoques terapéuticos y preventivos. Se puede realizar el estudio con poblaciones diabéticas de diferentes edades, lo cual podría brindar un panorama más amplio sobre los efectos de la diabetes en diferentes etapas de la vida y como el estilo de vida puede influir en la relación del pH salival y la formación de biopelículas de estos pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Attas, S. A., & Amro, S. O. (2010). Candidal colonization, strain diversity, and antifungal susceptibility among adult diabetic patients. *Annals of Saudi medicine*, 30(2), 101–108. <https://doi.org/10.4103/0256-4947.60514>
- Alburquenque O, C., & Tapia P, C. (2013). Interacción *Candida albicans*-Hospedero: un proceso complejo en el que la inmunidad innata juega un importante papel. *Boletín Micológico*, 28(2):37-47. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2013.28.2.875>
- Aitken-Saavedra, J., Lund, R. G., González, J., Huenchunao, R., Perez-Vallespir, I., Morales-Bozo, I., Molina-Berríos, A. (2018). Diversity, frequency and antifungal resistance of *Candida* species in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Odontologica Scandinavica*. 76(8):580-586. <https://doi.org/10.1080/00016357.2018.1484154>
- Araiza J, Sánchez-Pedraza V, Carrillo AK, Fernández-Samar D, Tejeda J, Bonifaz A. (2023). Mixed oral candidiasis in type 2 diabetic patients: Identification and spectrum of sensitivity. *Biomedica*. 43(Sp. 1):97-108.
- Avellaneda López, M. D. (2021). Determinación del PH salival en pacientes adultos con diabetes mellitus compensados. *Revista Peruana De Investigación Materno Perinatal*, 10(3), 38–41. Recuperado de <https://doi.org/10.33421/inmp.2021241>
- Balan P, B Gogineni S, Kumari N S, Shetty V, Lakshman Rangare A, L Castelino R, Areekat K F. (2015). *Candida* Carriage Rate and Growth Characteristics of Saliva in Diabetes Mellitus Patients: A Case-Control Study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 9(4):274-9.
- Barbosa A, Araújo D, Ribeiro E, Henriques M, Silva S. (2020). *Candida albicans* Adaptation on Simulated Human Body Fluids under Different pH. *Microorganisms*. 8(4):511.
- Bhuyan L, Hassan S, Dash KC, Panda A, Behura SS, Ramachandra S. (2018). *Candida* species diversity in oral cavity of type 2 diabetic patients and their *In vitro* antifungal susceptibility. *Contemp Clin Dent*. 9(Suppl 1):S83-S88.

- Bremenkamp, R. M., Caris, A. R., Jorge, A. O., Back-Brito, G. N., Mota, A. J., Balducci, I., Brighenti, F. L., & Koga-Ito, C. Y. (2011). Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Archives of oral biology*, 56(6), 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.11.018>
- Campisi, G., Pizzo, G., Milici, M. E., Mancuso, S., & Margiotta, V. (2002). Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus–infected subjects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 93(3), 281-286.
- Clark-Ordóñez, I., Callejas-Negrete, O. A., Aréchiga-Carvajal, E. T., & Mouriño-Pérez, R. R. (2017). *Candida* species diversity and antifungal susceptibility patterns in oral samples of HIV/AIDS patients in Baja California, México. *Medical mycology*, 55(3), 285–294. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw069>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Método para la prueba de susceptibilidad de levaduras mediante difusión de disco antifúngico (CLSI documento M44, 3ª ed.)*. CLSI
- de Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. 2004. Immunopathogenesis of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Microbiol Rev* 17: <https://doi.org/10.1128/cmr.17.4.729-759.2004>
- Del Pozo, J. L., & Cantón, E. (2016). Candidiasis asociada a biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2015.06.004>
- mycology, 55(3), 285–294. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw069>
- Domingues, P. C. A., Oliveira, V. C., Bim, F. L., Aires, C. P., Santos, A. P. D., Castro, D. T., Silva-Lovato, C. H., Andrade, D., & Watanabe, E. (2022). Influence of glucose supplementation on biofilm formation of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolated from diabetic and non-diabetic individuals. *Archives of oral biology*, 134, 105339. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105339>

- El-Azizi, M., Farag, N. & Khardori, N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14, 21 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0083-3>
- Eslava Rico, L. (2020). Prevalencia de *candida albicans* en cavidad oral de personas sistemicamente sanas. Revisión de la literatura. [Universidad Antonio Nariño] <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/2738>.
- Fernández, M. E., (2017) Estudio de la formación de la biopelícula de *Candida* spp. y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas. [Tesis de doctorado, Universidad de navarra]. https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/43758/1/Tesis_FernandezRivero.pdf
- Garza, E. (2012). “Caracterización taxonómica y molecular de *Candida* spp. en aislados clínicos de origen bucal en pacientes sanos y diabéticos de nuevo león” [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/2868/1/1080256559.pdf>
- Guilarte, C., & Pardi, G. (2009). Pruebas para identificar especies de *Candida* en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(3), 201–205. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652009000300027
- Gulia S, Bhatt V, Shetty M, Prasad KD, Gupta P. (2018). Effect of Type II Diabetes Mellitus, *Candida Albicans* and *Streptococcus Mutans* on the Biofilm Formation on Prosthetic Materials. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. (12):1538-1545. PMID: 30713186.
- Hajisadeghi, S., Fateh, R., Jangjoo, A., & Behrouzirad, A. (2023). The Effect of Controlled Diabetic and Non-diabetic Saliva on *Candida albicans* Adherence to Heat Polymerized Acrylic Resin Discs. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 30(1), 58-63. doi: 10.34172/jkmu.2023.10
- Hamza, O. J., Matee, M. I., Moshi, M. J., Simon, E. N., Mugusi, F., Mikx, F. H., & Verweij, P. E. (2008). Species distribution and in vitro antifungal susceptibility

- of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. *BMC microbiology*, 8, 1-9.
- Huenchunao Ávalos, R. (2016). Resistencia a nistatina y fluconazol de levaduras de especie *Candida albicans* en saliva en pacientes diabéticos tipo 2 con distinto control metabólico. *Uchile.cl*. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/142378>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Secretaría de Salud. (2024). Informe trimestral de salud: SVEDMT 2-2T 2024 [Informe]. Gobierno de México.
- Junior, J. J. (1996). Influencia de fatores locais e sistemicos na presença do genero *Candida* na boca de idosos. *LA Referencia (Red Federada de Repositorios Institucionales de Publicaciones Científicas)*. <https://doi.org/10.47749/t/unicamp.1996.108252>
- K M, P., Johnson, P., Ganesh, M., & Subhashini, A. S. (2013). Evaluation of Salivary Profile among Adult Type 2 Diabetes Mellitus Patients in South India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7(8), 1592–1595. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5749.3232>
- Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. (2002). Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 46(6):1773-80.
- López A. L. (2018). Prevalencia de especies del genero *Candida* en adultos diabéticos del estado de Puebla. [Tesis de licenciatura, Benemérita universidad Autónoma de Puebla].
- López-Ávila, K., Dzul-Rosado, K. R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J. J., Zavala-Castro, J. E., López-Ávila, K., Dzul-Rosado, K. R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J. J., & Zavala-Castro, J. E. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Revista Biomédica*, 27(3), 127–136. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v27i3.541>
- Luque, A. G., Biasoli, M. S., Tosello, M. E., Binolfi, A., Lupo, S., & Magaró, H. M. (2009). Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. *Mycoses*, 52(1), 53–59. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01542.x>

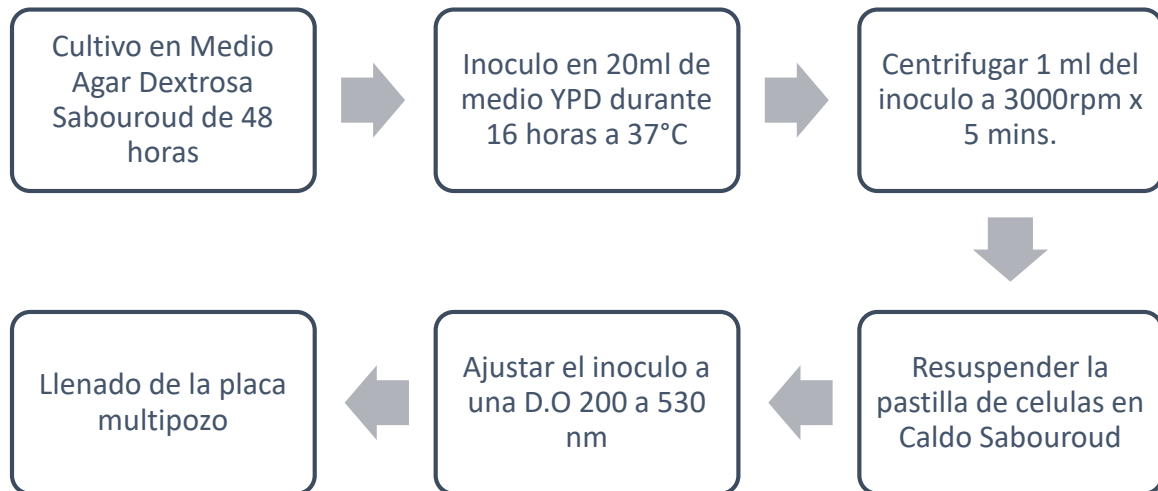
- Llena Puy, C. (2006). La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal* (Internet), 11(5), 449–455. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000500015
- Mantilla-Florez, Y. F., Tuta-Quintero, E., Brito-Rodríguez, A. J., & Clavijo-Moreno, L. C. (2021). Candidiasis y Candida Albicans. *Boletín de Malariología Y Salud Ambiental*, 61(3), 391–400. <https://doi.org/10.52808/bmsa.7e5.613.003>
- Manzano-Gayosso, P., Mendez-Tovar, L., Hernandez-Hernandez, F., Lopez Martinez, R. (2007). La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en Mexico. *Gac Méd Méx* 144(1).
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Mohammadi F, Javaheri MR, Nekoeian S, Dehghan P. (2016). Identification of Candida species in the oral cavity of diabetic patients. *Curr Med Mycol*. 2(2):1-7.
- Mohd Sazlly Lim, S., Sinnollareddy, M., & Sime, F. B. (2020). Challenges in Antifungal Therapy in Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), 2878. <https://doi.org/10.3390/jcm9092878>
- Mosquera-Cárdenas, H. J. (2022). Identificación de candida en cavidad bucal de pacientes con diabétes y vih/sida. *Revista Estomatología*, 30(1). <https://doi.org/10.25100/re.v30i1.9305>
- Navarro, P. (2019). Mecanismos de resistencia a azoles en especies de Candida no-albicans. [Tesis de doctorado, Universitat Rovira i Virgili, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud].
- Organización Mundial de la Salud. Diabetes [Internet]. 2023 [citado 20 Oct 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
- Ortigoza-Medrano E, Arroyo-Espinosa DI. (2014). Susceptibilidad in vitro de las especies de Candida a los antifúngicos en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente. *Med Int Méx*;30:373-380.

- Pardi, G., & Cardoso, E. I. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 40(1), 9–17. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652002000100003
- Pérez, I. M. (2015). "Recuento y determinación de diversidad de especies de levaduras del género *Candida* y su asociación con pH Salival en Pacientes Diabéticos tipo 2, con distinto grado de control metabólico [Tesis de Licenciatura]. <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/141513/Recuento-y-determinaci%C3%B3n-de-diversidad-de-especies-de-levaduras-del-g%C3%A9nero-Candida.pdf?sequence=1>
- Pfaller M. A. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*, 125(1 Suppl), S3–S13. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>
- Porte, L., León, P., Gárate, C., Guzmán, A., Labarca, J., & García, P. (2012). Susceptibilidad a azoles y anfotericina B de aislados de *Candida* spp: Experiencia de una red de salud universitaria, entre 2004 y 2010. *Revista chilena de infectología*, 29(2), 149-155. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200005>
- Premkumar, J., Ramani, P., Chandrasekar, T., Natesan, A., & Premkumar, P. (2014). Detection of species diversity in oral candida colonization and antifungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 5(1), 148–154. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.127315>
- Rebolledo, S. (2018). Microbiota oral en cáncer bucal [Tesina de Licenciatura]. <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000773517/3/0773517.pdf>
- Rivera-Toledo, E., Jiménez-Delgadillo, A. U., & Manzano-Gayosso, P. (2020). Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 63(2), 7-17. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02>

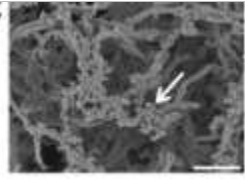
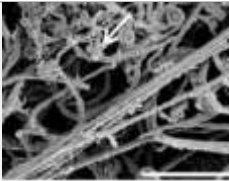
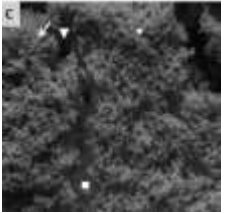
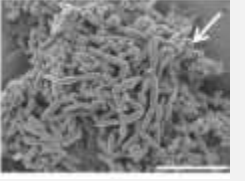
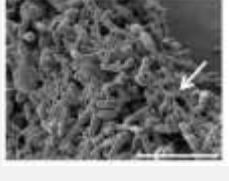
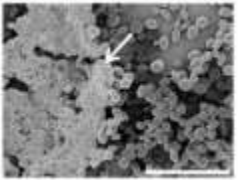
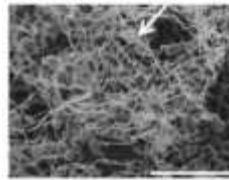
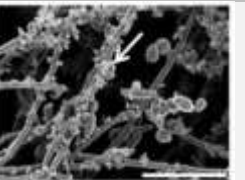
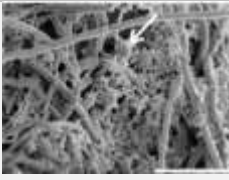
- Rodrigues, C.F., Alves, D.F., Henriques, M. (2018). Combination of Posaconazole and Amphotericin B in the Treatment of Candida glabrata Biofilms. *Microorganisms*. 6, (4):123. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040123>
- Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E., & Henriques, M. (2019). Candida sp. Infections in Patients with Diabetes Mellitus. *Journal of clinical medicine*, 8(1), 76. <https://doi.org/10.3390/jcm8010076>
- Rivera, E., Ramos, A., Del Carmen, M., Desgarennnes, P., Laura, D., & Castrillón, E. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex*, 57. https://www.esi.academy/wp-content/uploads/Biopelículas_fungicas.pdf
- Suárez Álvarez, P., Llanos González, I., Montoya Ojeda, R., Puello Hoyos, M., Young Castro, G., & Reyes Ramos, N. (2016). Colonización por Candida spp. en sujetos diabéticos y no diabéticos. *Revista cubana de endocrinología*, 27(1), 0-0.
- Tapia C. (2012). Antifúngicos y resistencia. *Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 29(3), 357. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000300020>
- Ugalde, C.M. (2008). Prevalencia de especies de Candida en la cavidad oral en pacientes diabéticos tipo 2. [Tesis doctoral, Universidad de Granada]. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/2065/17677968.pdf;jsessionid=BC3530358E1C0D3C9933699C394EDCD9?sequence=1>
- Vijayalakshmi, L., Raj, J. B. S., Kavitha, J., Krishnaraj, S., Manovijay, B., & Manikandan, D. (2020). A Case-Control Study to Evaluate Candidal Parameters in the Oral Cavity of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(Suppl 1), S389–S393. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_115_20
- Zaragoza, Ma. T. de J., & Velasco, J. A. (2018). La saliva, auxiliar diagnostico (1 edición). <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/Saliva.pdf>

ANEXOS

SECUENCIA METODOLÓGICA



Formación de biopelícula de diferentes especies de *Candida*

ESPECIE	BIOPELÍCULA	Levadura	Hifa	Pseudohifas	Permeables a antifúngicos	In vitro	In vivo
<i>Candida albicans</i>	Formada por una red compleja de células levaduriforme, hifas y pseudohifas interconectadas con una matriz extracelular formada por múltiples biocapas. El mayor componente de la matriz extracelular son los hidratos de carbono.	Si	Si	Si	++		
<i>Candida krusei</i>	Presencia o ausencia de hifas septadas o pseudohifas. Presenta pseudomicelio-no presenta pseudomicelio	Si	No	Si	+++		
<i>Candida parapsilosis</i>	Formada por agregados de células levaduriformes y pseudohifas, menos complejas y menos densas. La matriz tiene gran cantidad de hidratos de carbono y relativamente pocas proteínas.	Si	No	Si	++		
<i>Candida glabrata</i>	Formadas por grupos de células levaduriformes embebidas en la matriz extracelular, con menos biomasa y actividad metabólica. La matriz extracelular contiene una cantidad elevada de proteínas e hidratos de carbono.	Si	No	No	+++		
<i>Candida tropicalis</i>	Formadas por hifas y pseudohifas. El mayor componente de la matriz extracelular en esta especie son las hexosaminas unidas mediante un enlace B-1,6 formando un polisacárido similar a la quitina. Contiene menos proteínas e hidratos de carbon.	Si	Si	Si	+		

(Aguilar Angeles, 2024)