



**UADY**

**CIENCIAS DE LA SALUD**

**POSGRADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**“Actividad proteolítica de genotipos de *Candida albicans* asociados a caries dental”**

Tesis presentada por:

**CD. Daniela Beatriz Romero Salazar**

En opción al grado:

**Maestra en Investigación en Salud**

**Directores de tesis:**

**Dr. Florencio Rueda Gordillo**

**Dra. Sandra Elena Hernández Solís**

Mérida Yucatán, diciembre de 2017



**UADY**

UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

**"Luz, Ciencia y Verdad"**

**Posgrado Institucional en  
Ciencias de la Salud**

Oficio: PICA/183/17.  
Noviembre 17 de 2017.

La tesis, "**Actividad proteolítica de genotipos de *Candida albicans* asociados a caries dental**", presentada por la **C.D. Daniela Beatríz Romero Salazar**, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de **Maestra en Investigación en Salud**, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de lo establecido en el Plan de Estudios vigente del Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud.

**Atentamente**

**Dra. Norma Elena Pérez Herrera**  
Coordinadora del Programa Institucional  
en Ciencias de la Salud



Ccp. Archivo

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Primeramente, quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Florencio Rueda Gordillo y a la Dra. Sandra Elena Hernández Solís, el haberme abierto las puertas del laboratorio de microbiología y biología molecular, y haber confiado en mí, permitiéndome trabajar en esta área una vez más, agradezco grandemente su apoyo y dirección, lo cual ha sido fundamental en la realización de este trabajo de tesis.

Mi agradecimiento también va dirigido a mi comité tutorial, formado por la Dra. Eugenia del Socorro Guzmán Marín, Dr. Miguel Ángel Puc Franco, Dr. Julio César Torres Romero, Dr. Javier Flores Abuxapqui y el Dr. Marco Antonio Ramírez Salomón, por su tiempo, esfuerzo y valiosa dirección en este trabajo.

Así mismo agradezco a los pasantes del laboratorio de microbiología, su ayuda, motivación, pero sobre todo su amistad, fue muy grato compartir esta etapa al lado de excelentes personas.

Este trabajo se realizó en el departamento de Microbiología oral y biología molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán. Esta tesis, forma parte del proyecto Genotipificación y factores de virulencia de *Candida albicans* aisladas de pacientes con y sin caries dental, con clave SISTPROY: FODO-2016-0009, financiado por: PAIIFO 2016.

## ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	4
<i>Candida albicans</i>	6
Mecanismos de patogenicidad de <i>C. albicans</i>	8
Actividad proteolítica de <i>C. albicans</i> y SAP	11
Síntesis de las SAP	12
Funciones de las proteinasas	12
Genotipos de <i>C. albicans</i>	15
Caries y <i>Candida albicans</i>	16
Actividad proteolítica en caries dental	18
Genotipos de <i>C. albicans</i> en caries dental	19
IV. OBJETIVOS	20
V. HIPÓTESIS	21
VI. METODOLOGÍA	22
6.1 TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO	22
6.2 UNIVERSO	22
6.3 MUESTRA	22
6.4 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN	23
6.5 CRITERIOS	23
6.5.1 Criterios de inclusión:	23
6.5.2 Criterios de exclusión:	23
6.5.3 Criterios de eliminación:	24
6.6 FUENTES Y RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	24
6.6.1 Determinación del índice CPO/ceo	24
6.6.2 Toma de la muestra:	26
6.6.3 Cultivo y pruebas microbiológicas	27
6.6.4 Identificación de <i>C. albicans</i> por medio de PCR	27

6.6.5 Cuantificación de la actividad proteolítica en cepas positiva a <i>Candida albicans</i>	29
6.6.6 Identificación del genotipo mediante PCR	30
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
VII. RESULTADOS	32
VIII. DISCUSIÓN	43
IX. CONCLUSIÓN	51
X.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
XII. ANEXOS	59

## I. RESUMEN

La caries dental, se define como un proceso patológico de origen multifactorial, que se inicia con la desmineralización del diente, hasta su pérdida. Las bacterias han sido las más estudiadas en cuanto a este proceso, sin embargo, se ha relacionado a *C. albicans* con el desarrollo de la caries, debido a que tiene la capacidad de tolerar y acidificar el medio, además de poseer diversos mecanismos de patogenicidad. Uno de estos mecanismos, de suma importancia, es la actividad proteolítica y es la que se cree que se asocia con el proceso cariogénico. Por otro lado, se conocen cinco genotipos de *C. albicans*, definidos como A, B, C, D y E, y se cree que se relacionan con la actividad proteolítica de este microorganismo.

Se tomaron muestras de la cavidad bucal de 293 niños. La identificación de *C. albicans* se realizó mediante métodos microbiológicos y moleculares (PCR). Se determinó la actividad proteolítica de *C. albicans* por medio de placas de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) y se clasificó según el índice Pz obteniéndose valores entre 0 y 1, donde los más cercanos a cero representaban mayor actividad. La identificación del genotipo de *C. albicans* se realizó por medio de la PCR.

De las 293 muestras, 173 (59.0%) fueron de niños con caries y 120 (41.0%) de niños sin caries. La prevalencia de *C. albicans* en niños con y sin caries fue de 22.5% (n=39) y 11.7% (n=14), respectivamente. Con respecto a los genotipos de *C. albicans*, se encontró que el 94% (n=50) de las cepas fueron genotipo A y que el 67% fueron de niños con caries. Sólo se identificaron dos cepas genotipo B (3.8%) y un genotipo C (1.9%) que pertenecieron a niños con caries. La media de la actividad proteolítica de las cepas de *C. albicans* aisladas de niños con caries fue de 0.67 y en los niños sin caries fue de 0.76 ( $p < 0.05$ ). No se encontró diferencia significativa en cuanto a la actividad proteolítica y los genotipos de *C. albicans* asociados a caries dental ( $p > 0.05$ ).

## II. INTRODUCCIÓN

La caries es conocida por formar cavidades oscuras dentro del diente, siendo una de las enfermedades dentales más comunes en todo el mundo y la que causa mayor pérdida dental, con prevalencias que van de un 60 a 90%.<sup>1,2</sup>

Los microorganismos más estudiados con relación a la caries dental son las bacterias, siendo *Streptococcus mutans* el microorganismo más estudiado,<sup>3</sup> sin embargo, en los últimos años se ha encontrado una relación de caries con *Candida albicans*. Este microorganismo es potencialmente cariogénico, debido a que puede tolerar y producir ácidos en presencia de carbohidratos y se ha encontrado en la cavidad bucal de niños con caries hasta un 98%, en contraste a lo encontrado en niños libres de caries donde la prevalencia es hasta de 33%.<sup>4</sup>

*C. albicans* es un hongo oportunista, el cual puede estar como comensal en la cavidad bucal de los seres humanos, pero suele ser invasivo y patógeno cuando el sistema inmune del individuo se encuentra comprometido.<sup>5,6</sup> Entre los mecanismos de patogenicidad destacan la producción de hifas o pseudohifas, la actividad proteolítica y el cambio fenotípico.<sup>7</sup> La actividad proteolítica ha mostrado ser el mecanismo de patogenicidad más importante, ya que a través de éste, *C. albicans* adquiere nutrientes del medio, invade y evade las defensas del sistema inmune del hospedero.<sup>8</sup> Dicha actividad proteolítica se ha encontrado de un 42% a un 94% de las cepas de *C. albicans* aisladas de la cavidad oral, esto depende de factores como el estado de salud del individuo o el tipo de lesión, siendo mayor en sujetos inmunocomprometidos y con candidiasis.<sup>8</sup>

La actividad proteolítica de *C. albicans* se relaciona con la presencia de las enzimas aspartil proteinasa secretadas (Sap, por sus siglas en inglés), las cuales tienen funciones especializadas como lo son la digestión de moléculas proteínicas como el colágeno, queratina, laminina, fibronectina, mucina, entre



otras, además es por medio de estas enzimas que se adhiere e invade los tejidos, para degradar o distorsionar la superficie celular del hospedero y destruir las células y moléculas del sistema inmune del mismo y así evitar o resistir el ataque a los antimicrobianos.<sup>7,9</sup>

Se han encontrado 3 genotipos principales de *C. albicans* en relación a cavidad bucal de niños sanos (A, B y C) y se cree que existe una relación de estos con la capacidad de producir proteasas y con la resistencia a los antifúngicos.<sup>10</sup> Se cree que el genotipo A se encuentra relacionado a la caries dental y con mayor actividad proteolítica de cepas de *C. albicans* en presencia de caries.<sup>11</sup> Existen otros estudios que proponen que las cepas del genotipo B son las que presentan mayor actividad proteolítica, sin embargo esto no está muy estudiado aún.<sup>10,12</sup>

Existen diversos estudios acerca de las proteasas y genotipos de *Candida albicans* con relación a las candidiasis ya sea orales o vaginales, sin embargo, se conoce muy poco acerca de la relación que existe con la caries dental y los pocos estudios que se conocen acerca de esto se han realizado en otros países.

### III. ANTECEDENTES

#### Caries dental

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido la caries dental como un proceso patológico localizado de origen multifactorial, el cual inicia después de la erupción dentaria, y es un proceso o enfermedad dinámica crónica, que afecta a la estructura dentaria en contacto con los depósitos microbianos.<sup>13</sup> En ella existe un desequilibrio entre la sustancia dental y el fluido de placa circundante, lo cual da como resultado pérdida del mineral de la superficie dental, cuyo signo, es la destrucción localizada de tejidos duros.<sup>13-15</sup>

Esta enfermedad inicia con la invasión y destrucción del esmalte y la dentina hasta alcanzar a la cámara pulpar ocasionando dolor muy intenso, lo que provoca la inminente necrosis pulpar e infecciones localizadas, en casos más graves los procesos se vuelven sistémicos, ejemplo de ello es la endocarditis bacteriana, la cual puede poner en peligro la vida de quien la padece.<sup>15-18</sup> La progresión de esta enfermedad es rápida ya que puede evolucionar en un lapso de 6 meses y ante la falta de atención ocasiona periodontitis apical aguda y crónica, ocasiona también la pérdida de hueso circundante al diente, destrucción coronaria o pérdida del diente afectado.<sup>17</sup> Esta enfermedad se presenta en cualquier género y a cualquier edad, sin embargo, se considera que es más frecuente en los niños y adolescentes y sus efectos llevan a problemas en el crecimiento y desarrollo maxilofacial.<sup>19</sup> Su presencia y progresión genera importantes consecuencias en la salud de los niños tales como la desnutrición; por otro lado, evita el adecuado desarrollo físico y mental de la población, problemas estéticos que pueden afectar la autoestima, problemas funcionales que afectan al lenguaje y fonación, así como ausentismo escolar y con ello, pérdida de la salud integral.<sup>19-22</sup>

Se ha encontrado que la principal causa de pérdida dentaria es por caries, seguida por enfermedad periodontal y por causas protésicas y que esto puede tener un impacto considerable sobre la salud general y la calidad de vida de pacientes sanos, su efecto en las personas con ciertas enfermedades crónicas y agudas puede ser más grave. En particular, los pacientes con enfermedades como las cardíacas, anemia, enfermedades malignas e inmunodeficiencias, presentan mayor riesgo de complicaciones mortales. Esto, debido a que las bacterias presentes en la caries son oportunistas, las cuales pueden entrar al torrente sanguíneo por medio de la deglución o directamente por infecciones localizadas iniciadas en los dientes.<sup>19,23,24</sup>

Según la OMS, entre el 60 y el 90% de la población mundial presenta caries, según los datos obtenidos, los países latinoamericanos son los que muestran mayores porcentajes de caries con índices de dientes, cariados, perdidos y obturados (CPOD)  $\pm 3$ .<sup>2,25</sup> El reporte de la OMS anticipa que los cambios en el estilo de vida y la dieta, harán que la prevalencia de la caries aumente en los años siguientes.<sup>25</sup> Por otro lado, los cuidados dentales curativos en los países industrializados representan una significativa carga económica, donde del 5 al 10% de los gastos en salud pública se relacionan con la cavidad oral.<sup>25</sup>

En nuestro país; el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de patologías bucales (SIVEPAB), en su último informe muestra una prevalencia de caries de 82% en niños de 2-17 años de edad, con un promedio en el índice CPOD de 3.8.<sup>26</sup>

La etiología de la enfermedad está condicionada por la interacción de 4 factores principales: el hospedero (dureza y formación del esmalte y dentina, pH genética, calidad de saliva, flora bucal propia del individuo y morfología dental), microorganismos involucrados, sustrato (alimentación e higiene) y tiempo.<sup>15,18</sup> Al ser una enfermedad de origen multifactorial, todos estos factores son importantes para el desarrollo de la caries, sin embargo, para el modelo biomédico la enfermedad es la respuesta a la presencia activa de agentes externos como lo son los microorganismos, los cuales juegan un

papel muy importante para que se desarrolle con rapidez, debido a que ellos son los que sintetizan polisacáridos extracelulares de los alimentos, acidifican el medio y crean un ambiente propicio para iniciar la desmineralización de los tejidos del diente.<sup>27</sup>

Los principales microorganismos implicados en la formación de la caries son ciertas especies del género *Streptococcus* (principalmente *S. mutans*), *Actinomyces* y *Lactobacillus*, los cuales se concentran en forma de biopelícula sobre la superficie de los dientes y se activan cuando hay carbohidratos fermentables como la sacarosa, produciendo ácido, el cual ataca la superficie de los dientes, siendo más frecuente la superficie oclusal.<sup>3,15-17</sup> A pesar de que las bacterias son las que mayor relación tienen con el proceso cariogénico, en los últimos años se ha relacionado a *Candida albicans* con la presencia de caries dental.<sup>15-17</sup>

### *Candida albicans*

Los hongos constituyen una pequeña parte de la microbiota oral y hasta la fecha se sabe que existen más de 50,000 especies, pero sólo entre 100 y 150 son reconocidas como causantes de enfermedad en humanos.<sup>4,28,29</sup>

*Candida* es un hongo comensal, que en su forma no agresiva es dimórfico, pero que tiene la capacidad de formar pseudohifas, lo cual las hace invasivas y patógenas cuando hay una alteración en el equilibrio de la flora o en el hospedero.<sup>28</sup> Este género presenta más de 150 especies, de las cuales, 10 son responsables de infecciones en los seres humanos, como lo son *Candida albicans*, la cual es una de las más aisladas (entre 50 y 70%) y se puede encontrar en la microbiota normal del ser humano, invadiendo en mayor frecuencia la cavidad oral, sin embargo, también se puede encontrar en el tracto gastrointestinal, el tracto urogenital, ano, ingle y conducto vaginal.<sup>4-6,28,29</sup>

En la cavidad bucal se ha reportado una prevalencia de *C. albicans* de 10 % a 45% en personas sanas, de 15 -65% en niños sanos y de un 60% a 95% en pacientes inmunosuprimidos.<sup>4-6,28,29</sup>

La mucosa oral es un entorno único que ofrece una variedad de nichos ecológicos para la colonización microbiana. Entre los factores que influyen para la colonización de *C. albicans* se encuentran la edad del hospedero, calidad de la dieta, higiene oral, cambios en el flujo salival, trastornos sistémicos y en los últimos años se ha relacionado con la presencia de caries.<sup>29</sup>

Las enfermedades fúngicas han presentado una incidencia mayor en las últimas dos décadas y con los avances en la medicina, las intervenciones quirúrgicas y el aumento de la población inmunocomprometida, la diversidad de patógenos fúngicos va en aumento.<sup>30</sup>

Las levaduras *Candida albicans* son oportunistas, tienen la capacidad de invadir al individuo cuyos mecanismos de defensa se encuentre deteriorado, lo que provoca enfermedades que van desde micosis superficiales hasta infecciones diseminadas fatales. Existen ciertos factores predisponentes tanto locales como sistémicos, como el estado de inmunosupresión causado por la presencia del VIH, cáncer, diabetes mellitus, leucemia, edad (niños y ancianos), utilización de antibióticos de amplio espectro, utilización de esteroides u otros agentes inmunosupresores, quimioterapias citotóxicas, pacientes en terapia intensiva, pacientes postquirúrgicos, pacientes con alteraciones del sistema gastrointestinal, entre otros, que han contribuido al incremento de infecciones causadas por este microorganismo a nivel mundial.<sup>6,7,30</sup>

En un estado normal, el sistema inmune del hospedero puede resistir a las infecciones superficiales, pero las infecciones por *C. albicans* pueden conducir a serios problemas en personas inmunocomprometidas, se han reportado muertes en personas con trasplantes de corazón causadas por candidiasis orales.<sup>31,32</sup> Se relaciona también con endocarditis fúngicas y puede llegar al

torrente sanguíneo por medio de permeabilidad en el intestino, por medio de la deglución, por capilares y vasos sanguíneos en las mucosas; lo cual implica una infección sistémica, tal como una infección pulmonar, hepática, renal o cerebral.<sup>31</sup> Otra vía de diseminación es la externa o iatrogénica en la cual los microorganismos son introducidos al torrente sanguíneo por medio de catéteres, agujas o instrumentos quirúrgicos.<sup>33</sup> Existen también indicios de que *C. albicans* puede también propagarse dentro del sistema linfático, siendo la sangre la principal vía para la diseminación pudiendo así establecer infecciones profundas en diferentes órganos.<sup>33</sup>

*C. albicans* es considerada como la más común y virulenta de las especies del género *Candida*. La capacidad infectiva de *Candida*, depende de mecanismos de patogenicidad que le confieren la capacidad de colonizar superficies, invadir tejidos internos y evadir las defensas del huésped.<sup>6</sup>

#### Mecanismos de patogenicidad de *C. albicans*

La unión específica de *Candida albicans* a las superficies mucosas y epiteliales es el paso inicial y primordial para la colonización y posterior infección.<sup>34</sup> Esta capacidad de adhesión impide el desalojo del microorganismo por la acción de limpieza de las secreciones de la mucosa, lo que facilita el proceso infeccioso.<sup>34,35</sup> La adhesión de *C. albicans* a las células epiteliales y endoteliales involucra una variedad de interacciones entre adhesinas y ligandos ya que se ha demostrado que los componentes de la pared celular de la levadura son capaces de interactuar con una variedad de receptores específicos sobre la membrana de la célula huésped, incluyendo proteínas y carbohidratos, considerados componentes importantes del proceso de adhesión y posterior penetración intracelular del hongo.<sup>6,34,35</sup>

La inhibición de la adhesión de *C. albicans* a las superficies orales es considerada como una estrategia importante en la prevención de la candidiasis oral, por lo que la determinación de la capacidad de adhesión de

las cepas de *C. albicans* que colonizan la cavidad bucal es importante para el desarrollo de nuevos enfoques para la prevención de la colonización de este microorganismo.<sup>6,36</sup>

*C. albicans* posee diversos mecanismos de patogenicidad como la capacidad para formar hifas, las cuales crecen continuamente por extensión apical.<sup>29</sup> Además este hongo tiene la capacidad de cambiar de estado hidrofílico de su superficie celular a estado hidrofóbico, dicho cambio está relacionado con la patogenicidad y por lo tanto, se ha pensado que las células hidrofóbicas son más patógenas y se adhieren con más facilidad a las células epiteliales y a las superficies plásticas inertes que las células hidrofílicas.<sup>37</sup> También se ha demostrado que otros factores dentro del medio ambiente bucal, tales como la calidad y cantidad de saliva, el pH y la presencia de bacterias, tienen influencia sobre la adhesión de *Candida* a diversas superficies de la cavidad bucal.<sup>37</sup>

Además, de presentar capacidad para adherirse a superficies mucosas, multiplicarse y formar hifas, el proceso patológico va seguido de producción de enzimas hidrolíticas; fosfolipasas que son capaces de catalizar la hidrólisis de fosfoglicéridos y proteinasas que hidrolizan las cadenas peptídicas de las células.<sup>7,29</sup> Estas enzimas al ser hidrolíticas permiten destruir o alterar componentes de la membrana, trayendo como consecuencia la disrupción de la misma, debido a que los fosfolípidos y proteínas son los principales constituyentes dichas membranas celulares (cuadro 1).<sup>35</sup>

**Cuadro 1.** Mecanismos de patogenicidad de *C. albicans*<sup>7</sup>

Mecanismo	Factores involucrados	Papel del mecanismo
Morfogénesis	Formación de hifas, pseudohifas o tubos germinales	Invasión a los tejidos y penetración celular
Actividad enzimática	Producción de enzimas (fosfolipasas, proteinasas [SAP], Lipasas)	Daño a los tejidos, evasión de respuesta inmune, nutrientes, degradación de proteínas humanas
Adherencia	Adhesinas (Als, Hwo1, Int1p, Mnt1p)	Adherencia a células del hospedero

Als: secuencias parecidas a aglutininas. Hwo1: Manoproteína de superficie externa. Int1p: Proteína parecida a integrina. Mnt1p: Proteína de membrana. Sap: Aspartil Proteínasa Secretada (por sus siglas en ingles)

Los factores de patogenicidad expresados por *C. albicans* para causar infecciones varía dependiendo de la cepa, del tipo de infección, la etapa, lugar de la infección y la naturaleza de la respuesta del hospedero.<sup>7,9</sup>

Aunque se han reconocido un gran número de factores de patogenicidad potenciales como la morfología celular, la adhesión, el cambio fenotípico y extracelular. La actividad proteolítica se ha reconocido desde hace tiempo como uno de los mecanismos más importantes, debido a que por medio de ella *C. albicans* puede crecer de forma excesiva, ya que estas enzimas facilitan la adherencia, penetración e invasión al hospedero. Entre las enzimas más importantes se encuentran las fosfolipasas y las aspartil proteinasas secretadas (Sap).<sup>9,38</sup>

La actividad proteolítica de estas cepas está regulada por las Sap, las cuales son codificadas por genes de la familia *SAP* compuesta por 10 miembros, los cuales reciben el mismo nombre (*SAP1-SAP10*). La familia Sap es diferencialmente regulada y distintos genes son expresados bajo una variedad de condiciones ya sea *in vivo* o *in vitro*.<sup>7,9,30</sup>



## Actividad proteolítica de *C. albicans* y SAP

La actividad proteolítica de *C. albicans* está regulada por la presencia de una enzima proteínasa, la cual le garantiza al hongo un sistema eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista.<sup>39</sup> La proteínasa tiene funciones especializadas durante el proceso infeccioso que incluyen la degradación de proteínas de la membrana de las células del hospedero, facilita la adhesión y la invasión a los tejidos, así como la digestión de moléculas del sistema inmunitario del huésped.<sup>8</sup>

En *C. albicans* se han descrito varios miembros de una gran familia de enzimas de secreción aspártico proteinasas o aspartil proteínasa secretada (Sap), a las cuales se les debe su actividad proteolítica, estas son codificadas por los genes de la familia *SAP*, la cual cuenta con diez miembros y que está regulada diferencialmente; además, sus distintos miembros se expresan bajo una variedad de condiciones de crecimiento de laboratorio y durante las infecciones experimentales *in vivo* e *in vitro*.<sup>7</sup> Ocho de estas proteinasas (Sap1-8) se secretan en el espacio extracelular, mientras que Sap 9 y Sap10 en la membrana de proteínas ancladas.<sup>40</sup>

Las Saps se han encontrado solo en especies patogénicas como son *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Mientras que está ausente en aquellas cepas que no son tan patogénicas. Una cepa de *C. albicans* puede tener varios genes *SAP*, sin embargo, actúa sobre diferentes proteínas del hospedero y tejidos en vivo.<sup>9</sup>

## Síntesis de las SAP

Los diez genes *SAP* codifican pre y proenzimas de aproximadamente 60 a 200 aminoácidos, mayor que la proteína madura. El segmento señal N-terminal es fragmentado por una señal peptidasa en el retículo endoplásmico. El propéptido se remueve para activar la enzima por una proteínasa semejante a

subtilisina Kex-2 en el aparato de Golgi, antes de que sea transportada, vía vesículas, hacia la superficie de la célula para la secreción o glucosilación.<sup>41</sup> Se sabe que existen otros procesos alternativos para la activación de las Sap de *C. albicans*, como la autoactivación que ocurre extracelularmente para Sap1, Sap 2, SaP 3 y Sap 6 a ciertos valores de pH. Las proteínas maduras contienen una secuencia de motivos típicos de todas las aspartil proteasas, que incluyen los dos residuos aspartato conservados en el sitio activo. Es posible que los residuos cisteína conservados mantengan la estructura tridimensional de las enzimas.<sup>7,9</sup>

### Funciones de las Proteinasa

Durante el proceso infeccioso, las proteinasas tienen funciones especializadas, las cuales incluyen digestión de moléculas proteínicas para adquirir nutrientes, sin embargo, ya han evolucionado y tienen funciones más directas, como la adhesión e invasión a los tejidos, para degradar o distorsionar la superficie celular del huésped para evitar o resistir el ataque de los antimicrobianos, así mismo, pueden degradar defensas inmunológicas y estructurales tales como IgA secretora, la cual se cree que contribuye a la defensa contra la candidiasis bucal,  $\alpha$ -macroglobulina, proteína C3, lactoperoxidasa, colágena y fibronectina.<sup>7,9,39</sup>

Sap 2 ha sido una de las proteinasas más estudiadas. La actividad de la Sap2 permite que el hongo crezca de manera eficiente en medios de cultivo que contienen albúmina de suero u otras proteínas como única fuente de nitrógeno.<sup>41</sup> Esta isoenzima actúa principalmente a valores de pH ácidos y actúa sobre una gran variedad de sustratos, digiere proteínas del huésped para proporcionar nitrógeno para las células, degradando proteínas como las de la matriz extracelular, colágeno, queratina, laminina, fibronectina y mucina. Además, puede degradar proteínas de defensa, tales como la lactoferrina salival, el inhibidor de la proteína alfa macroglobulina, las enzimas

respiratorias, macrófagos y casi todas las inmunoglobulinas, incluyendo a la IgA secretora, que normalmente es resistente a la mayoría de las proteinasas bacterianas.<sup>9,40,41</sup> Sap 2 tiene la capacidad de activar citoquinas proinflamatorias, las cuales juegan un papel importante en la activación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria epitelial.<sup>9,40</sup> Además, puede alterar la homeostasis vascular debido a que activa la cisteína epidérmica inhibidora A y se une al precursor peptídico 1 (péptido vasoconstrictor).<sup>9</sup>

La virulencia de *C. albicans* se ha correlacionado con el nivel de actividad proteolítica, dado que se ha demostrado que las cepas provenientes de pacientes que presentan infecciones ya sean orales o vaginales presentan mayor actividad proteolítica que aquellas que provienen de pacientes portadores asintomáticos de *C. albicans*.<sup>41,42</sup>

Se ha encontrado también, que la adhesión de *C. albicans* también es regulada por la actividad proteolítica, demostrándose que aquellas cepas que se encontraban más fuertemente adheridas a la mucosa presentaban mayor proteólisis que aquellas que no se encontraban tan fuertemente adheridas.<sup>41</sup>

Las Sap 1-6 presentan una importante actividad invasiva y su actividad proteolítica se relaciona con el pH del medio, Sap 1-3 tienen mayor actividad a valores de pH más bajos (pH 2-5) y se expresan en los estados iniciales de la infección cuando el hongo es levaduriforme, mientras que, Sap 4-6 presentan mayor actividad a valores más altos (pH 3-7) cuando presenta forma de hifa, además, han demostrado ser más resistentes a la fagocitosis y se han relacionado con infecciones sistémicas, incluyendo mucosas, sistema nervioso central, corazón, páncreas y riñones.<sup>7,41,42</sup> Las Sap 1-3 y 6 se han relacionado con las infecciones de la cavidad bucal, mientras que las Sap 1 y 2 en infecciones vaginales. En el cuadro dos se resumen las principales propiedades de las Sap (cuadro 2).<sup>7,40</sup>

**Cuadro 2.** Principales propiedades de las enzimas aspartil-proteasas de *C. albicans* (Sap).<sup>7</sup>

<b>Característica</b>	<b>Sap1</b>	<b>Sap2</b>	<b>Sap3</b>	<b>Sap4</b>	<b>Sap5</b>	<b>Sap6</b>	<b>Sap7</b>	<b>Sap8</b>	<b>Sap9</b>
<b>Presente en infecciones orales</b>	x	x	x			x			
<b>Presente en infecciones vaginales</b>	x	x							
<b>Presente a las 72h de infección</b>	x	x		x	x				x
<b>Presentes en forma de levadura</b>	x	x	x						
<b>Presentes en forma de hifa</b>				x	x	x			
<b>Presentes en enfermedad invasiva</b>	x	x	x	x	x	x			
<b>pH óptimo (2-5)</b>	x	x	x						
<b>pH optimo (3-7)</b>				x	x	x			
<b>Infecciones sistémicas</b>	x	x	x	x					
<b>Regulada por temperatura</b>									x

La actividad proteolítica se ha encontrado de un 42% a un 94% de las cepas de *C. albicans*, dependiendo del sitio anatómico de donde se aíslan, si presenta o no candidiasis y del estado de salud general del paciente, siendo más proteolíticas en pacientes inmunocomprometidos.<sup>8,40,43</sup>

#### Genotipos de *C. albicans*

Se cree que la producción de proteinasas está relacionada con algunos genotipos de *C. albicans*. Sugita y cols., en 2002, asociaron un alto nivel de producción de proteinasa y un genotipo que alberga un intrón del tipo I de autoempalme (CaLSU) localizado en el gen que codifica la subunidad grande

del rRNA.<sup>10</sup> Las cepas de *C. albicans* se pueden diferenciar de acuerdo a la presencia del intrón en CaLSU en tres genotipos principales, el genotipo A, sin el intrón, el genotipo B, que alberga el intrón, y el genotipo C, que es heterocigoto, que posee y no, el intrón en un único genoma.<sup>10,43</sup>

En los últimos años se han descrito otros dos genotipos, a los cuales se les ha denominado genotipo D y E. Para clasificar las cepas de *C. albicans* se utiliza el gen 25S rRNA, la clasificación se basa en los productos de amplificación, genotipo A (450pb), B (840), C (450 y 840pb), D (1080pb) y E (1400pb). Por otro lado, se ha encontrado una correlación entre el genotipo y la susceptibilidad a los antifúngicos.<sup>44</sup> Un estudio muestra que el genotipo A fue menos resistente a los azoles en contraste con el genotipo B que resulto ser más resistente al Fluconazol.<sup>45</sup> Sin embargo, otro estudio muestra mayor resistencia del genotipo A la flucitocina que los genotipos B y C, además, se ha encontrado que la resistencia a antifúngicos se debe a la pérdida del intron en el gen 25S rRNA (lo cual indica que es genotipo B), lo que hace suponer que la resistencia se va adquiriendo cuando cambia de genotipo B a genotipo A, y que el genotipo C es una transición entre uno y otro o alguna combinación de ambos, sin embargo esto no se ha comprobado.<sup>46</sup>

Se ha encontrado que el genotipo más prevalente en los aislados de *C. albicans* es el A, y se ha asociado a la patogenicidad y el potencial invasivo de las cepas.<sup>43</sup> Sin embargo, se ha relacionado al genotipo B con la producción de proteinasas, dato que lleva a considerar que el genotipo B se relaciona con mayor patogenicidad de las cepas de *C. albicans*.<sup>10,12</sup>

Los genotipos A, B y C pueden detectarse en la mucosa oral y en la placa dental de niños sanos. El genotipo D se ha aislado en la bolsa periodontal de los pacientes sistemáticamente sanos con periodontitis, mientras que el genotipo E raramente está presente en la cavidad oral.<sup>47</sup>

## Caries y *Candida albicans*

La caries dental es una enfermedad bucal que destruye los tejidos duros del diente. Es causada por la interacción de 4 factores principales. Entre ellos destaca la interacción de bacterias acidógenas, las cuales tienen la capacidad de sintetizar ácidos a partir de hidratos de carbono (por lo regular una sacarosa), lo que resulta en la destrucción de los tejidos duros del diente.<sup>27,48</sup>

Entre las bacterias encontradas en la caries dental destacan *S. mutans*, *Actinomyces* y especies de *Lactobacillus*<sup>22</sup>. Sin embargo, en los últimos años se considera que *Candida albicans* tiene un alto potencial cariogénico, este microorganismo se encuentra con frecuencia en dentina cariada debido a que presenta capacidad para producir y tolerar ácidos, aunque se conoce muy poco acerca de su papel en la etiología de la caries, principalmente en niños, seguido por adolescentes y adultos jóvenes.<sup>4,22</sup> *Candida albicans* puede interactuar con diversas bacterias relacionadas a la caries, de hecho se cree que mejora la adhesión de *Streptococcus mutans* a la biopelícula oral y a la sustancia dental cariada.<sup>4,22,49,50</sup>

Al igual que otras bacterias relacionadas con la caries dental, *C. albicans* tiene un alto potencial acidogénico y formador de biopelículas en presencia de azúcares de la dieta y, aunque estudios muestran pocas unidades formadoras de colonias en las cavidades cariosas, este microorganismo presenta una biomasa mayor que la de otras bacterias como los *Streptococcus*.<sup>31</sup> Además de relacionarse con las cavidades cariosas, este microorganismo muestra relación con las infecciones endodónticas y fracasos en tratamientos, hallándose en conductos radiculares infectados.<sup>28</sup>

Estudios *in vitro* demuestran la capacidad que tiene *Candida albicans* de aumentar su adherencia a las superficies celulares epiteliales y objetos inanimados en presencia de carbohidratos. Estas observaciones pueden ser relevantes si se consideran las dietas ricas en carbohidratos, lo cual puede

predisponer a los individuos a infecciones orales con *Candida*. Este mecanismo es debido a la producción de una capa fibrilar superficial.<sup>51</sup>

*C. albicans* tiene la capacidad de adherirse a los túbulos dentinarios por medio de la producción de hifas, además, tiene características que lo hacen cariogénico, excreta ácidos orgánicos por reducción del pH.<sup>50,52</sup> La velocidad de la formación de ácidos a partir de glucosa por parte de *C. albicans* y *Lactobacillus* orales han mostrado una acidogenicidad similar en ambos microorganismos, *S. mutans* acidifica a un pH de 5.5 hasta un pH de 4.2, mientras que *C. albicans* sigue secretando ácidos a un pH de 4.<sup>50,52</sup> *C. albicans* puede secretar ácidos orgánicos, principalmente pirúvico y láctico. Además, *C. albicans* se adhiere a la hidroxiapatita del esmalte dental y puede disolverla 20 veces más rápido que otros microorganismos cariogénicos como *S. mutans*, y ya en la dentina, se une al colágeno tipo I, que es el componente principal de la materia orgánica de la dentina (90%), donde secreta una enzima proteolítica (Sap) que es capaz de degradar dicho colágeno en condiciones ácidas.<sup>31,50,52</sup>

Estudios en niños y con relación a caries y *Candida*, muestran una mayor prevalencia de este microorganismo en presencia de caries, ya sea en la cavidad oral o directamente en piezas dentales afectadas.<sup>52</sup> Akdeniz en 2002, realizó un estudio en la cavidad oral de niños con y sin caries, encontrando 69% de *C. albicans* en la cavidad oral de niños con dientes cariados, mientras que solo encontró 5% en la cavidad oral de niños sin caries.<sup>53</sup> De Carvalho y cols., en 2006, encontraron una prevalencia de 60.4% de *C. albicans* en dentina y placa dental de niños con caries, mientras que en aquellos niños que no presentaban caries solo encontró una prevalencia de 14.3%.<sup>22</sup> Siah-Benlarbi y cols. en 2010, por su parte encontraron 75.4% de *C. albicans* en la cavidad oral de niños con caries, y 26% en niños libres de caries.<sup>31</sup> Yang y cols., en 2012, encontraron *C. albicans* en 57% en dientes cariados y en 14% de superficies dentales sanas de los mismos pacientes que presentaban caries, en contraste con las superficies dentales de niños sin caries, en donde

no se logró aislar *C. albicans*.<sup>44</sup> En 2012, Srivastava reportó una prevalencia de 98% de *C. albicans* en la cavidad oral de pacientes pediátricos con caries mientras que solo un 33% en pacientes libres de caries.<sup>4</sup>

#### Actividad proteolítica en caries dental

Como ya se ha mencionado, *C. albicans* tiene la capacidad de adherirse a los túbulos dentinarios y acidificar el medio para formar cavidades dentro de los dientes.<sup>52</sup> Además de esta capacidad, ciertas proteinasas actúan bajo pH ácido y tienen el potencial de degradar fibras de colágeno y proteínas, las cuales son los principales componentes de la dentina (colágeno tipo I y glucoproteínas).<sup>48,52</sup>

Hasta ahora, este tipo de investigación se ha centrado principalmente en los niveles de actividad proteolítica de candidiasis bucal, vaginal, orofaríngea y gastrointestinal. Sin embargo, la actividad proteolítica en muestras obtenidas de biofilm dental y su relación con la caries aún no se conoce bien.<sup>48</sup>

En el estudio de Li (2014), se detectó actividad proteolítica tanto de niños con y sin caries, encontrando mayor prevalencia en el grupo de niños con caries. Estos hallazgos sugieren que la actividad proteolítica podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de caries.<sup>48</sup>

En 2012 Portela y cols., realizaron un estudio acerca de la actividad proteolítica de *C. albicans* provenientes de la mucosa oral y dentina cariada de niños con VIH, encontrando que las cepas provenientes de la dentina cariada presentaban mayor actividad proteolítica y mayor capacidad de degradar colágeno tipo I.<sup>11</sup>

Otro estudio en relación a caries dental, realizado en población infantil de Brasil, no mostró diferencia significativa entre la actividad proteolítica de las cepas de *C. albicans* aisladas de la cavidad oral de niños con y sin caries, dado que el 94% de las cepas que aislaron presentaron dicha actividad.<sup>29</sup>



## Genotipos de *C. albicans* en caries dental

Existen estudios acerca de los genotipos de *Candida* en las diferentes partes del cuerpo, pero se sabe muy poco acerca de la genotipificación en relación a la caries dental.<sup>44</sup>

Xia y cols., encontraron en un 75% del genotipo A, 8.3% del genotipo B y 16.4% del genotipo C en dientes cariados de niños chinos.<sup>44</sup>

Li y cols., en 2014 encontraron los genotipos A, B y C de *C. albicans* en los biofilms dentales de niños con caries, siendo más prevalente el genotipo A en este grupo de niños (56.4%), mientras que los genotipos A y C fueron detectados en los biofilms dentales de niños libres de caries, siendo más prevalente el genotipo C (52.9%), en este grupo de niños no encontraron genotipo B. También encontraron una correlación significativa entre el genotipo A y mayor actividad proteolítica en niños con y sin caries.<sup>48</sup>

Por su parte Qui y cols., en 2015 encontraron mayor prevalencia del genotipo A en niños sin caries. De todas las cepas provenientes de niños sin caries el 83.3% perteneció al genotipo A, mientras que el 19% perteneció al genotipo B, pero no se encontró este genotipo en niños libres de caries. El genotipo C fue encontrado tanto en las cepas de niños con y sin caries (24.8 y 16.7% respectivamente).<sup>47</sup>

Sobre genotipos de *C. albicans* y caries dental aún no se conoce mucho, por lo cual falta realizar más estudios de esta índole.<sup>47</sup>

#### IV. OBJETIVOS

##### GENERAL

- Determinar la asociación entre la actividad proteolítica y genotipos de *C. albicans* con la caries dental.

##### ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de *C. albicans* en la cavidad oral de niños con y sin caries dental.
- Identificar los genotipos de *C. albicans* presentes en la cavidad oral de niños con y sin caries.
- Evaluar la actividad proteolítica de cepas de *C. albicans* en niños con y sin caries dental.
- Determinar el índice CPOD/ceo de niños portadores y no portadores de *C. albicans*.
- Determinar la asociación entre la actividad proteolítica, los genotipos de *C. albicans* y la caries dental, así como la asociación de dicha actividad con el índice CPOD/ceo.

## V. HIPÓTESIS

Existe una asociación positiva entre *Candida albicans*, la actividad proteolítica de estas cepas y sus genotipos con la presencia de caries dental.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1 Tipo y diseño del estudio**

Estudio de corte transversal, observacional con muestreo no probabilístico por selección intencionada.

### **6.2 Universo**

Niños que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (FOUADY).

### **6.3 Muestra**

Todos los niños de 6-12 años con dentición temporal, mixta o permanente que acudieron al Departamento de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, del periodo de mayo a diciembre del 2015.

## 6.4 Definición de las variables y escalas de medición

**Cuadro 3.** Establecimiento de variables

<b>Variables</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Grado de precisión</b>	<b>Indicador</b>
<b>Presencia de caries</b>	Independiente	Cualitativa Nominal	Con presencia Sin presencia	Índice Ceo/CPO
<b>Presencia de cepas de <i>C. albicans</i> en la cavidad oral</b>	Dependiente	Cualitativa Nominal	Con presencia Sin presencia	PCR
<b>Genotipos de <i>C. albicans</i></b>	Dependiente	Cualitativa Nominal	Tipo de genotipo A, B, C	PCR
<b>Actividad proteolítica</b>	Dependiente	Cuantitativa Continua	0-1	Índice Pz
<b>Género</b>	Independiente	Cualitativa Nominal	Hombre o mujer	Cuestionario
<b>Edad</b>	Independiente	Cuantitativa Discreta	Años de edad	Cuestionario

## 6.5. Criterios

### 6.5.1 Criterios de inclusión:

- Niños sanos de 6-12 años de edad, de uno u otro género que acudieron al posgrado de Odontopediatría de la FOUADY, para atención odontológica.
- Niños cuyos cuidadores brindaron su consentimiento informado y autorizaron que los niños participen en el estudio.

### 6.5.2. Criterios de exclusión

- Niños que presentaron enfermedades sistémicas.
- Niños que presentaron infecciones en la cavidad oral o en la garganta.
- Niños que se encontraban tomando antibióticos.
- Niños que no permitieron que se les tome muestra de la cavidad oral.

### 6.5.3 Criterios de eliminación:

1. Muestras que se contaminaron o que se perdieron durante la manipulación.

## 6.6 Fuentes y recolección de la información

A los cuidadores de todos los niños que cumplieron con los criterios de inclusión, se les explicó el procedimiento y se les dio una carta de consentimiento informado, la cual fue firmada (anexo1). Se llenó un cuestionario con preguntas sobre hábitos, alimentación de los niños y observaciones bucodentales (anexo2).

### 6.6.1 Determinación del índice CPO/ceo

Se valoró la cavidad oral de los niños que participaron en el estudio y se les sacó el índice CPOD/ceo, según lo descrito por Nezar y la OMS en la encuesta de salud bucal, que consiste en sumar los dientes dañados o cariados, extraídos y obturados.<sup>54,55</sup>

El índice CPOD es para dientes permanentes y se saca tomando en cuenta el número de dientes Cariados, Perdidos y Obturados

Entre los cariados se incluyeron:

- Dientes con cavidad cariosa.
- Con restauraciones filtradas o dañadas.
- Con una raíz.
- Restauraciones temporales.

Entre los perdidos se incluyeron:

- Dientes extraídos por tratamiento de ortodoncia, impactación o enfermedad periodontal.
- Los dientes no erupcionados.

- Ausencia congénita.
- Avulsión de dientes debido a un trauma o accidente.

Entre los dientes obturados se incluyeron:

- Obturados por trauma (fractura).
- Obturados por hipoplasia o estética.
- Por un tratamiento de conductos sellado.
- Sellado de fosas y fisuras.

Nota:

1- Un diente se considera que está en erupción cuando se expone sólo la punta de la cúspide del borde de la superficie oclusal o incisivo. Los dientes excluidos en el índice CPOD son:

- Los dientes supernumerarios.
- El tercer molar

2- Limitaciones - índice CPO puede ser válido en los adultos mayores o en los niños porque puede sobrestimar registro de caries por casos distintos de la caries dental.

3- Cada diente sólo puede tener una clasificación.

Cálculo del índice CPOD= C + P + O

Número máximo 32

El índice ceo es parecido al índice CPO, solo que cambia el componente "P" por "e", donde no se toman en cuenta los dientes extraídos, sino que solo los indicados para extracción.

Número máximo 20.

Para la dentición mixta se realiza tanto el índice CPO como el ceo.<sup>54,55</sup>

Con base en los resultados de los índices CPOD/ceo, los niños se dividieron en dos grupos: un grupo de niños con caries o que presentaron un índice ceo o CPO mayor o igual a 1 y un grupo control que presente un índice ceo y CPO igual a cero.

### 6.6.2 Toma de la muestra:

Las muestras se tomaron a todos los participantes del estudio, para posteriormente ser procesadas en el laboratorio de Microbiología Oral y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la UADY.

Las muestras microbiológicas fueron obtenidas con un hisopo estéril para cada niño, pasándolo 5 veces en forma circular por la mucosa oral (carrillos, paladar, lengua), en el epitelio gingival y en lesiones cariosas en caso de pertenecer al grupo de niños con caries y tejidos dentales de niños libres de caries.<sup>5</sup> Las muestras fueron transportadas al laboratorio en caldo Tood Hewitt.<sup>5</sup>

### 6.6.3 Cultivo y pruebas microbiológicas

#### a) Pruebas fenotípicas

Las muestras fueron cultivadas en agar dextrosa sabouraud (ADS) durante 24-48 horas a 37 °C<sup>5</sup>. De acuerdo a lo observado las colonias sospechosas se sembraron en CHROMagar *Candida* mediante la técnica de estría cruzada para el aislamiento de colonias, durante 24-48horas a 37 °C.<sup>6,56</sup>

Posteriormente de acuerdo a la incubación se seleccionaron las cepas presuntivas de *C. albicans* con base en lo establecido en el cuadro 4.



**Cuadro 4.** Características morfológicas de *Candida albicans* en medios de ADS y CROMagar *Candida*.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Morfología</b>
Agar Dextrosa Sabouraud	Colonias de <i>Candida</i> con morfología circular, lisas, elevadas ligeramente convexas, de 1 a 3mm.  Crecimiento abundante de coloración blanca. <sup>6</sup>
CRHOMagar Candida	Colonias abundantes, de color verde claro, indicativo de <i>Candida albicans</i> . <sup>5,56</sup>

#### 6.3.4 Identificación de *C. albicans* por medio de PCR

La confirmación de la especie se llevó a cabo mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como control positivo se utilizó la cepa de referencia de *C. albicans* ATCC10231 y como control negativo agua destilada estéril.

##### a) Extracción del DNA para el análisis molecular:

La extracción del DNA de las cepas a estudiar se llevó a cabo utilizando un método de extracción rápida, el cual ha demostrado su eficacia en diversos estudios. El método se basa en un proceso simple de ebullición y congelación. Se toma una UFC de la levadura desarrollada en ADS durante 48 horas a 37 °C, posteriormente se suspendió en 500 µL de agua destilada estéril y se calentó durante 15 minutos a 95 °C, seguidamente se congeló a -70 °C durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo, la suspensión lisada se descongeló a temperatura ambiente y se procedió a la separación de los desechos celulares presentes en el extracto a través de centrifugación durante 5 minutos a 16,000 rpm. El sobrenadante se colocó en un tubo Eppendorf estéril para su conservación a -70 °C, hasta el momento de su uso.<sup>57</sup>

b) Identificación de *C. albicans* mediante la técnica de PCR:

Para la confirmación de la especie de *C. albicans* se llevó a cabo el método de PCR multiplex según el procedimiento descrito por Yang y cols. Se utilizó un par de oligonucleótidos en cada ensayo, para la amplificación del gen 25S rRNA (cuadro 5).<sup>58</sup>

**Cuadro 5.** Oligonucleótidos específicos para *C. albicans*

Oligonucleotidos	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado	Especificidad
CAL5	5'-TGTTGCTCTCTCGGGGCGGCCG-3'	175 pb	<i>C. albicans</i>
NL4CAL	5'-AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTA TAA-3'		

La mezcla de reacción de PCR para un volumen total de 25 µL se preparó de la siguiente manera: 20 pmol de cada uno de los oligonucleótidos específicos, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, buffer PCR (10 mM de Tris-HCl, 10 mM de KCl), 0.2 mM de la mezcla de dNTPs, 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa, 10 ng de DNA en estudio y agua destilada hasta completar a 25 µL. La reacción de amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial a 95 °C durante 6 min, seguido de 30 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a 58 °C y 30s a 72 °C, con una incubación final de 10 min. a 72 °C.<sup>58</sup>

c) Electroforesis en gel de agarosa:

Todos los productos de la PCR, fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%, en un buffer de corrida TBE (Tris 1M, ácido bórico 0.9M, EDTA 0.01 M) 1X a 100 V durante 1 hora. Los geles se tiñeron con 0.5 mg/mL de bromuro de etidio durante 15 min. Posteriormente, las bandas

fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV. El tamaño del fragmento del DNA amplificado se determinó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb.<sup>59</sup> La cepa de *C. albicans* ATCC 10231 se utilizó como control positivo.

#### 6.6.5 Cuantificación de la actividad proteolítica en cepas positiva a *Candida albicans*

A las cepas positivas para *C. albicans* se le cuantificó la actividad de la proteinasa. Se cultivó 1 colonia de la cepa de *C. albicans* crecida previamente en ADS, durante toda la noche en 5 mL de medio líquido dextrosa sabouraud (CDS) a 36 °C y en agitación a 200 rpm en una incubadora orbital; posteriormente, las células se recolectaron por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y se realizaron 3 lavados con solución de buffer fosfato (PBS pH 7.4) a 3000 rpm durante 3 minutos, posteriormente fueron suspendidas de nuevo hasta alcanzar una densidad de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Se tomaron 5 µL de la suspensión y se colocaron en el medio Agar Suero Albúmina Bovina (1% de bactoagar, 0.1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5% de  $\text{MgSO}_4$ , 1% de glucosa, 0.16% albúmina sérica bovina), pH 3.5. Los inóculos se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 7 días.<sup>8,60</sup> Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en dos ocasiones diferentes, usándose la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 como control positivo.<sup>8,60</sup>

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se observó la presencia de halos alrededor de las colonias (zona de producción enzimática) y se calculó el índice de actividad enzimática (Pz), para esto se dividió el diámetro de la colonia levaduriforme entre el diámetro de la colonia más la zona de producción enzimática. El índice de Pz puede tomar valores que van de cero a uno, índices de Pz comprendidos entre 0.64 y 0.99, son considerados como actividad positiva. La escala de Pz se divide de la siguiente manera: los valores menores de 0.69 son considerados como de muy fuerte actividad, los valores comprendidos entre 0.70 y 0.79 de actividad fuerte, los que se

encuentren entre 0.80 y 0.89 de actividad débil y los que se encuentren entre 0.9 y 0.99 como de muy débil actividad.<sup>8,60</sup>

### 6.6.6 Identificación del genotipo mediante PCR

#### a) PCR

Las cepas positivas a *C. albicans*, fueron sometidas al siguiente PCR multiplex descrito por Li y cols. en 2014<sup>48</sup>. Para la determinación del genotipo se utilizó un par de primers (cuadro 6), el cual permite identificar a los cinco genotipos.<sup>48,61</sup>

**Cuadro 6.** Oligonucleótidos específicos para la determinación del genotipo

Oligonucleótidos	Secuencias (5'-3')	Tamaño del producto amplificado (pb)	Especificidad
<b>CA-INT-L</b>	ATAAGGGAAGTCGGCAAATAGATCCGTAA	450	<i>C. albicans</i> genotipo A
		840	<i>C. albicans</i> genotipo B
		450 y 840	<i>C. albicans</i> genotipo C
		1080	<i>C. albicans</i> genotipo D
<b>CA-INT-R</b>	CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT	1400	<i>C. albicans</i> genotipo E

La mezcla de reacción de PCR para un volumen total de 50µL que se preparó con: 1 µM de cada uno de los oligonucleótidos específicos, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de la mezcla de dNTPs, 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa, 2.0 µL de DNA en estudio (5 µg/mL). La reacción de amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial a 93°C durante 6 min, seguido de 40 ciclos de 30 s a 93°C, 45 s a 55°C y 45 s a 72°C, con una incubación final de 10 min a 72°C.<sup>46,48</sup>

b) Electroforesis en gel de agarosa:

Todos los productos de la PCR, fueron analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, en un buffer de corrida TBE (Tris 1 M, ácido bórico 0.9 M, EDTA 0.01 M) 1X a 70 V durante 30 minutos. Los geles se tiñeron con 0.5 mg/mL de bromuro de etidio durante 15 minutos. Posteriormente, las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV. El tamaño del fragmento del DNA amplificado se determinó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb.<sup>48</sup>

De acuerdo con el resultado de la electroforesis, los genotipos de *C. albicans* fueron divididos en 5 grupos: 450 pb para el grupo A, 840 pb para el grupo B, ambos para el grupo C, 1080pb para el genotipo D y 1040 pb para el genotipo E.<sup>61</sup>

## **6.7 Análisis estadístico**

Para la presentación de resultados se elaboró una base de datos con toda la información, utilizando el paquete estadístico SPSS V22.0. Se realizó el análisis descriptivo de las variables mediante proporciones, frecuencias y desviaciones estándar. Para la comparación de grupos se utilizó chi-cuadrado, regresión lineal simple y análisis de varianza.

## VII RESULTADOS

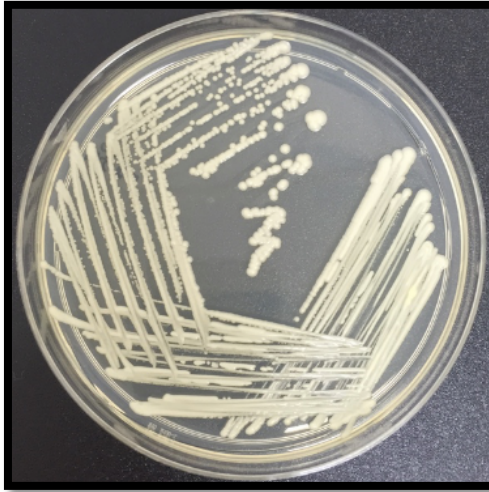
Se analizaron 293 muestras de la cavidad bucal obtenidas del mismo número de niños con edad de entre 6 y 12 años, de los cuales, 135 (46.1%) correspondieron al sexo femenino y 158 (53.9%) al sexo masculino. La edad promedio fue de 8.5 años de edad.

De las 293 muestras analizadas, 173 (59.0%) presentaron caries y 120 (41.0%) se encontraron libres de caries (cuadro 7).

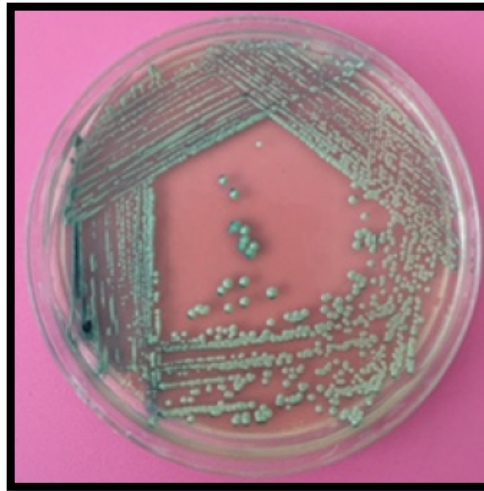
**Cuadro 7.** Frecuencia y porcentaje de niños con y sin caries

<b>Caries</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Presencia	173	59.0
Ausencia	120	41.0
Total	293	100.0

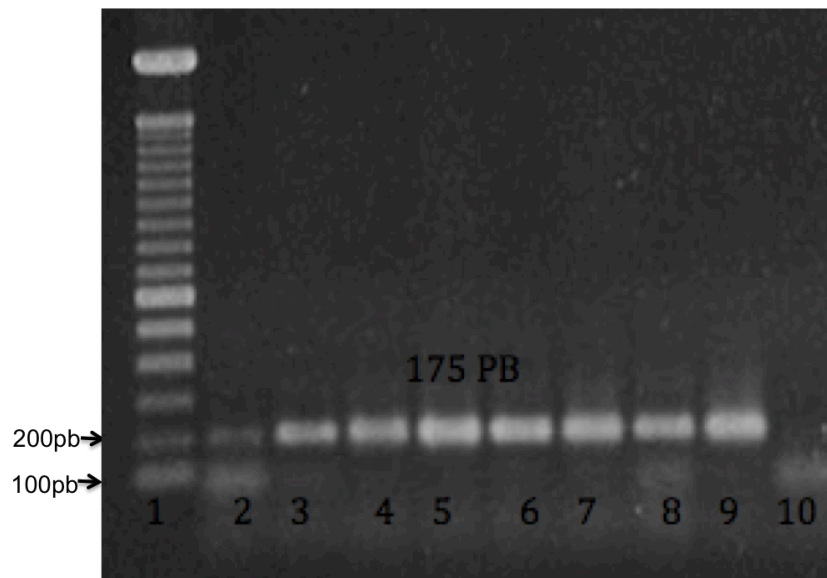
Del total de todas las muestras obtenidas, los cultivos en ADS mostraron que el 20.5% (60) fueron positivos al género *Candida*, sin embargo, los cultivos en CHROMagar *Candida* como diagnóstico presuntivo mostraron que de éstos, el 88.3% (53/60) pertenecieron a *C. albicans*. Estos cultivos fueron confirmados por medio de la PCR, dando todos positivos, es decir el 18.1% (53/293) de todos los niños estudiados, fueron portadores de *C. albicans* (fig 1, 2 y 3).



**Figura 1.** Cultivo de *Candida* en ADS  
(Fuente: Departamento de Investigación en Microbiología Oral, FOUADY).



**Figura 2.** Cultivo de *C. albicans* en CHROMagar *Candida*, colonias de color verde claro, con diagnóstico de *C. albicans*  
(Fuente: Departamento de Investigación en Microbiología Oral, FOUADY).



**Figura 3.** PCR de muestras *C. albicans*, carril 1=MPM de 100 pb 2= control positivo ATCC10231, carril 3-9 muestras positivas a *C. albicans* a 175 Pb, carril 10= control negativo (Fuente: Departamento de Investigación en Microbiología Oral, FOUADY).

Del total de niños que presentaron caries, el 26.0% (45/173) fueron portadores de *Candida*, mientras que del grupo de niños libres de caries solo 12.5% (15/120) presentaron *Candida* ( $X^2=7.94$   $p<0.05$ ). De los aislados de *Candida* perteneciente al grupo de niños con caries el 86.6% (39/45) fueron identificados como *C. albicans*, es decir el 22.5% (39/173) de este grupo de niños presentó *C. albicans*. En tanto que de los aislados de *Candida* provenientes del grupo de niños libres de caries el 93.3% (14/15) fueron identificadas como *C. albicans*, es decir que solo el 11.7% (14/120) de los niños libres de caries presentó *C. albicans* ( $X^2=5.66$   $p<0.05$ ) (cuadro 8 y 9). De las 53 cepas identificadas como *C. albicans*, el 73.6% (39) provinieron de niños con caries, mientras que el 26.4% (14) provinieron de niños libres de caries.



**Cuadro 8.** Distribución de *Candida* en niños con caries y libres de caries

<i>Candida</i>	Niños con caries (%)	Niños sin caries (%)	Total	X <sup>2</sup>	P
Positivos	45 (26.0)	15 (12.5)	60		0.005
Negativos	128 (74.0)	105 (87.5)	133	7.94	
Total	173	120	293		

**Cuadro 9.** Distribución de *C. albicans* en niños con caries y niños libres de caries

<i>Candida albicans</i>	Niños con caries (%)	Niños sin caries (%)	Total	X <sup>2</sup>	P
Positivos	39(22.5)	14 (11.7)	53		
Negativos	134 (77.5)	106 (88.3)	240	5.66	0.017
Total	173	120	293		

Se realizó un análisis y comparación de las medias del índice ceo y del índice CPOD en el grupo de niños portadores como en el de los no portadores de *C. albicans*. La media del índice ceo en niños no portadores de *C. albicans* fue de 2.10, mientras que la media de dicho índice en portadores fue de 3.26, con una  $p < 0.05$  (cuadro 10). La media CPOD en niños no portadores de *C. albicans* fue de 0.56, mientras que la media de dicho índice en portadores fue de 0.71 con una  $P > 0.05$  (cuadro 11). En general se observa una diferencia de medias de dientes cariados en niños portadores y no portadores de *C. albicans* de 3.94 y 2.66 respectivamente con una  $p < 0.05$ , indicando diferencia significativa entre ambos grupos (cuadro 12).

**Cuadro 10.** Comparación de medias del índice ceo en portadores y no portadores de *C. albicans*

<i>C. albicans</i>	N	Media	Desviación estándar	p
No portadores	240	2.10	2.77	0.007
Portadores	53	3.26	3.07	
Total	293	2.31	2.86	

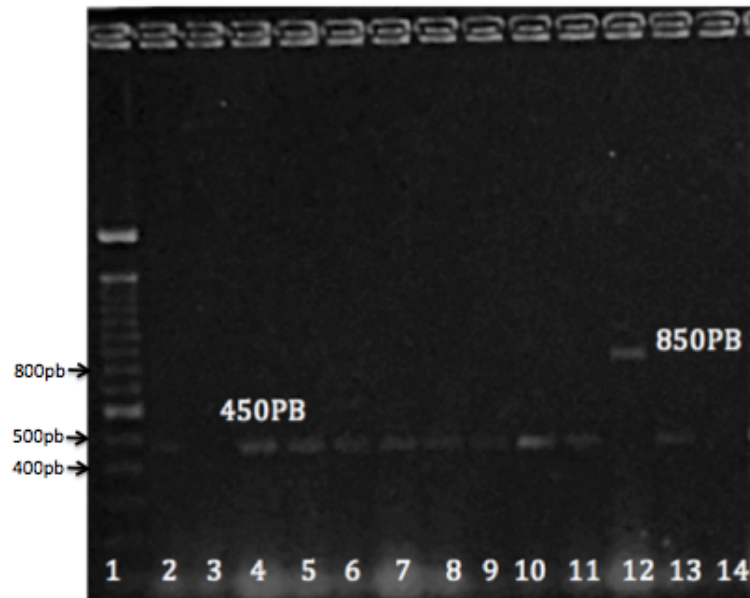
**Cuadro 11.** Comparación de medias del índice CPOD en portadores y no portadores de *C. albicans*

<i>C. albicans</i>	N	Media	Desviación estándar	p
No portadores	240	0.56	1.15	0.39
Portadores	53	0.71	1.34	
Total	293	0.59	1.19	

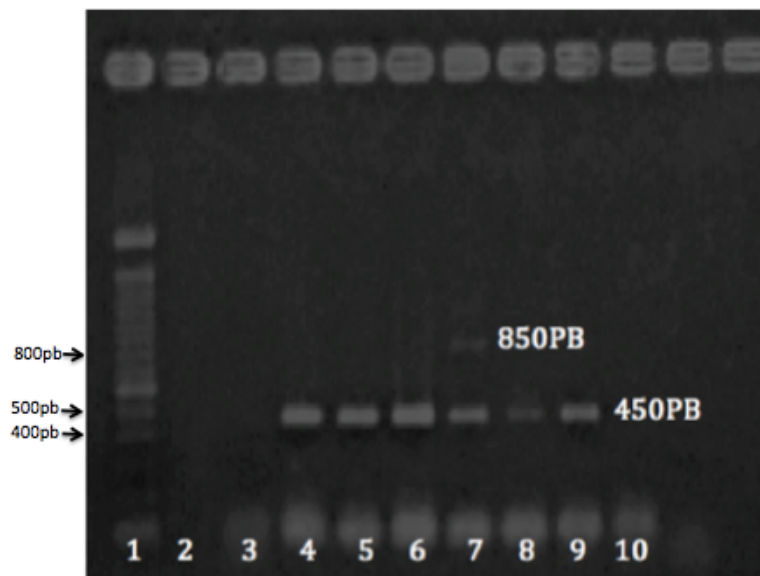
**Cuadro 12.** Comparación de medias del número total de caries en portadores y no portadores de *C. albicans*

<i>C. albicans</i>	N	Media	Desviación estándar	p
No portadores	240	2.66	3.15	0.009
Portadores	53	3.94	3.34	
Total	293	2.89	3.23	

Se realizó la prueba de la PCR para la identificación de genotipos de las cepas identificadas previamente como *C. albicans*. Del total de cepas, 50 (94.3%) fueron genotipo A, (siendo el 67.9% provenientes de niños con caries y el 26.4% de niños sin caries); solo dos (3.8%) genotipo B y 1 (1.9%) genotipo C (ambas de niños con caries). Sin diferencia significativa entre los diferentes genotipos y grupos de estudio ( $p < 0.05$ ) (figura 4 y 5, cuadro 13).



**Figura 4.** PCR para genotipificación de cepas *C. albicans*. Carril 1 MPM de 100 pb, carril 4 control positivo ATCC 10231, carriles 5,6,8 y 9 genotipo A (450pb), carril 7 genotipo C (450 y 850pb), carril 10 control negativo. (Fuente: Departamento de Investigación en Microbiología Oral, FOUADY).



**Figura 5.** PCR para genotipificación de cepas *C. albicans*. Carril 1 MPM de 100 pb, carril 2 control positivo ATCC10231, carriles 4-11 y 13 genotipo A (450pb), carril 7 genotipo B (450pb), carril 14 control negativo. (Fuente: Departamento de Investigación en Microbiología Oral, FOUADY).

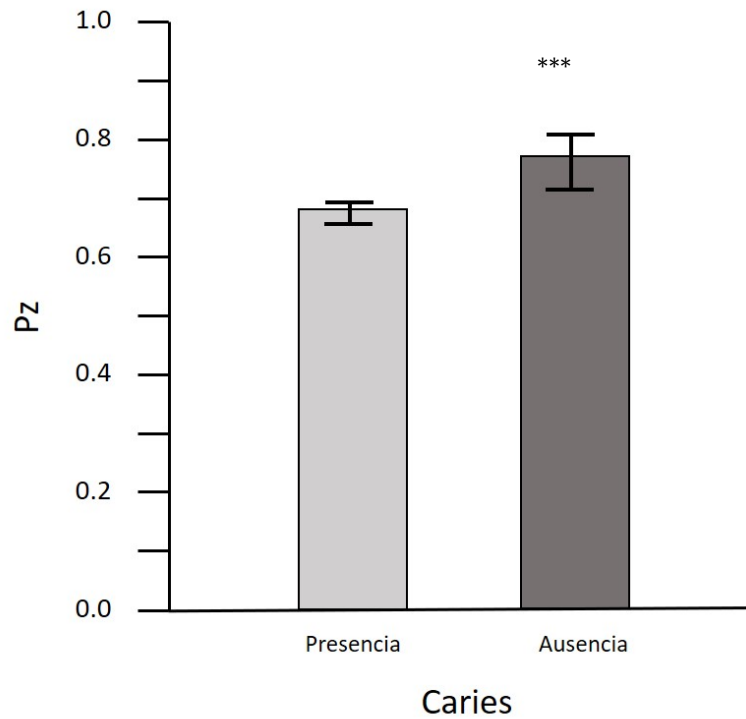
**Cuadro 13.** Distribución general de Genotipos de *C. albicans* en niños con y sin caries, Porcentajes de acuerdo a la distribución general de los diferentes genotipos en presencia o ausencia de caries

Grupos de estudio	Genotipos de <i>C. albicans</i> (%)			Total	P
	A	B	C		
Con caries	36 (67.9)	2 (3.8)	1 (1.9)	39 (73.6)	0.56
Sin caries	14 (26.4)	0	0	14 (26.4)	
Total	50 (94.3)	2 (3.8%)	1 (1.9)	53 (100)	

A los aislados de *C. albicans* se les evaluó la actividad proteolítica utilizando el índice Pz, encontrándose que, todas las cepas de *C. albicans* provenientes de la cavidad bucal presentaron diversos tipos de actividad proteolítica, la cual varió de baja actividad a muy alta actividad. La media de la actividad de las cepas encontradas en la cavidad oral de los niños fue de 0.70; en niños libres de caries se encontró una media de 0.76, mientras que, en niños con caries se encontró una media de 0.67 con una  $p < 0.05$  (fig. 6 y 7).



Figura 4. Placa de BSA, donde se observa el diámetro del inóculo de *C. albicans* y el halo de precipitación por la actividad proteolítica  
(Fuente: Departamento de Investigación en Microbiología Oral, FOUADY).



**Figura 5.** Comparación de medias la actividad proteolítica de cepas de *C. albicans* en presencia y ausencia de caries (p=0001)

De las 53 cepas provenientes de la cavidad oral de los niños sanos ninguna presentó actividad proteolítica muy baja, 6 (11.3%) presentaron actividad baja, 21 (39.6%) actividad alta y 26 (49.1%) actividad muy alta. De estos resultados se obtiene que las cepas que provinieron de los niños con caries solo presentaron actividad proteolítica alta y muy alta (38.5 y 61.5% respectivamente). Las cepas de niños sin caries presentaron actividad baja (42.9), actividad alta (42.9%) y en menor frecuencia actividad muy alta (14.2%) (p<0.05) (cuadro 14).

**Cuadro 14.** Frecuencia de actividad proteolítica de las cepas de *C. albicans* en niños con y sin caries

Origen de las cepas	Muy baja actividad (%)	Baja actividad (%)	Alta actividad (%)	Muy alta actividad (%)	Total	p
Niños con caries	0	0	15 (38.5)	24 (61.5)	39	
Niño sin caries	0	6 (42.9)	6 (42.9)	2 (14.2)	14	0.0001
Total	0	6 (11.3)	21 (39.6)	26(49.1)	53	

La actividad proteolítica baja solo se observó en los aislados de niños libres de caries, mientras que la actividad alta y muy alta se observó en aislados de niños con y sin caries, en donde el índice ceo en actividad alta fue de 3.14 y en actividad muy alta de 4.11, el índice CPOD fue de 0.71 y 0.88 respectivamente, sin diferencia significativa entre ellos ( $p>0.05$ ).

Con respecto a los genotipos de *C. albicans* y la actividad de la proteinasa, de las 50 cepas identificadas como genotipo A, el 12% (6/50) presentaron actividad proteolítica baja, el 38% (19/50) actividad alta y el 50% (25/50) actividad muy alta. De los dos aislados de genotipo B, uno presentó actividad alta y la otra actividad muy alta. El único aislado del genotipo C presentó actividad muy alta ( $p>0.05$ ) (cuadro 15).

**Cuadro 15.** Grado de actividad proteolítica asociada a genotipos de *C. albicans* y su distribución de acuerdo a la presencia o ausencia de caries.

Genotipo	Número	Actividad Proteolítica		
		Media de PZ±DS	F	P
A	50	0.70±0.07	0.71	0.93
B	2	0.72±0.08		
C	1	0.71		
<b>Total</b>	53	0.70±0.07		

Se realizó una comparación de medias de la actividad proteolítica de los diferentes genotipos de *C. albicans*, sin diferencia significativa entre ellos ( $p>0.05$ ) (cuadro 16).

**Cuadro 16.** Diferencia de medias de la actividad proteolítica de cepas de *C. albicans* dentro de los diferentes Genotipos

Act. Proteolítica		Genotipos de <i>C. albicans</i> (%)				P
		A	B	C	Total	
Act. Baja	SC	6 (12)	0	0	6 (11.3)	0.760
	C	0	0	0		
Act. Alta	SC	6 (12)	0	0	21 (39.6)	
	C	13 (26)	1 (50)	1 (100)		
Act. Muy alta	SC	2 (4)	0	0	26 (49.1)	
	C	23 (46)	1 (50)	0		
Total		50(100)	2 (100)	1(100)	53 (100)	

SC= Niños libres de caries, C= Niños con caries

El genotipo A fue el único que tuvo distribución entre los niños con y sin caries, por lo cual se realiza una comparación de medias de la actividad proteolítica de éste, en presencia y ausencia de caries, encontrándose que las cepas del genotipo A, que provienen de niños con caries presentan mayor actividad de proteasas que las que provienen de niños sin caries ( $p < 0.05$ ) (cuadro 17).

**Cuadro 17.** Comparación de medias de la actividad proteolítica de cepas de *C. albicans* genotipo A, en presencia y ausencia de caries dental

		<b>N</b>	<b>Media Pz ± DS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
	SC	14	0.764 ± 0.08		
<b>Genotipo A</b>	C	36	0.675 ± 0.54	18.55	0.0001
	Total	50	0.700 ± 0.07		

SC= Niños libres de caries, C= Niños con caries,



## VII. DISCUSIÓN

La prevalencia encontrada en este estudio (18.1%), difiere a la encontrada en otros países como Polonia, donde Rozkiewicz y cols. (2006), encuentran una prevalencia del 59.7% de *C. albicans* en niños y adolescentes sanos, más alto que el que se reporta en este trabajo, sin embargo, el alto porcentaje reportado por estos autores podría deberse a que, además de tomar la muestra directamente de la placa dental también incluyeron la faringe de dichos niños, mientras que, en el presente estudio se tomó solo de la cavidad oral de los niños.<sup>62</sup> Por otro lado en China Qiu y cols. (2015), encuentran una prevalencia de 35% en niños sanos de 3-5 años de edad.<sup>47</sup> Hay que tomar en cuenta que la edad es un factor importante en la colonización de *C. albicans*, además de que las condiciones de vida y de alimentación en aquel país son diferentes a las de nuestro país. El estudio de Ribeiro y cols. (2004) en Brasil, reportó una alta prevalencia de *C. albicans* en niños con síndrome de Down de 83% a causa de que el sistema inmune en estos niños se encuentra comprometido por alteraciones de las inmunoglobulinas, además de que las condiciones en la cavidad bucal de estos niños son aptas para la colonización de microorganismos, sin embargo estos mismos autores encuentran una prevalencia de 16.7% de *C. albicans* en niños sanos similar a la encontrada en este trabajo.<sup>63</sup> El estudio de Gaitan y cols (2012) en México, reporta también una prevalencia similar de 17.5% de *C. albicans* en niños Tarahumaras sanos, pero también encontró una menor prevalencia en niños sanos de la ciudad de Chihuahua (10.3%), debido a que los niños de la ciudad se encontraban participando en un programa de prevención de caries y salud bucal. Además reporta una mayor prevalencia en niños con VIH (51.7%) y niños desnutridos (38.3%),<sup>64</sup> esta diferencia puede deberse a que *C. albicans* es un patógeno oportunista el cual tiene la capacidad de colonizar el cuerpo

humano cuando éste se encuentra inmunocomprometido. También en México, Hernández y cols. (2008) realizaron un estudio en niños de una comunidad yucateca, encontrando una prevalencia más alta que la encontrada en éste estudio, ellos reportan que el 31.3% de los niños de la comunidad de Dzidzantún Yucatán, son portadores de *C. albicans* y relacionan el alto porcentaje encontrado a que en Yucatán existen comunidades rurales en las cuales la desnutrición constituye un problema de salud pública.<sup>5,65</sup>

Con respecto a *C. albicans* y caries dental, en este estudio se encuentra una prevalencia de 22.5% de *C. albicans* en niños con caries, mientras que solo un 11.7% de éste microorganismo en niños libres de caries. Haciendo un análisis estadístico se encuentra una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, lo cual pudiera indicar que *C. albicans* es un patógeno implicado en la formación de caries. En México no se cuenta con estudios de este tipo, sin embargo, en otros países como Turquía, Akdeniz y cols. (2002), encuentran que la prevalencia de *C. albicans* fue de 69.2% en la cavidad bucal niños con dentición infantil con más de 4 dientes con grandes lesiones cariosas, mientras que en un grupo de niños libres de caries encontraron solo 5% de *C. albicans*.<sup>53</sup> en otro estudio De Carvalho y cols. (2006) tomaron muestras de la cavidad oral de niños de 1-5 años de edad; ellos reportaron una prevalencia de 60.4% *C. albicans* en niños con grandes lesiones cariosas y que presentaban lactancia prolongada por las noches, mientras que en un grupo de niños con caries moderada, sin lactancia nocturna encontraron prevalencia de 12.5% de *C. albicans* y 14.3% en niños libres de caries.<sup>22</sup> Por otro lado, Thaweboon y cols. (2008) muestran una prevalencia de 53% en un grupo de niños tailandeses con caries rampante, mientras que no encuentran *Candida albicans* un grupo de niños libres de caries dental.<sup>66</sup> Yang y cols. (2012) en China tomaron muestras directamente de las lesiones cariosas y reportaron una prevalencia de *C. albicans* de 57.1% en dichas lesiones, también tomaron muestras de las superficies dentales sanas de los mismo niños con caries en donde aíslan a este microorganismo en un 14.3%,

mientras que no encuentran *C. albicans* en niños libres de caries.<sup>44</sup> Todos estos estudios muestran porcentajes diferentes al encontrado aquí, sin embargo la diferencia podría encontrarse en los hábitos alimenticios de los niños, el sitio de la toma de la muestra y la edad de los pacientes. A pesar de esta diferencia en porcentajes los resultados concuerdan con éste análisis, en que *C. albicans* tiene relación con la presencia de caries y que podría ser un microorganismo involucrado en el proceso cariogénico, debido a que puede tolerar y producir ácidos que desmineralizan la matriz del diente y disuelve hidroxiapatita del esmalte, puede adherirse al tejido dental y a los túbulos dentinarios, donde puede anclarse en forma de hifa, además de que es capaz de ayudar a otras bacterias a adherirse.<sup>4,44,52</sup>

A pesar de que en diversos estudios se relaciona a *C. albicans* con la presencia de caries dental, casi no se reporta la cantidad de dientes cariados en presencia y ausencia de *C. albicans*. Solo el estudio de Khurana y cols. (2015) donde analizaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de la saliva de niños sanos, ellos reportan que utilizaron un grupo control de <3 dientes cariados y un grupo experimental de >4 dientes cariados y encontraron una prevalencia de 88% de *C. albicans* en el grupo experimental y 64% en el grupo control, con una diferencia significativa en este resultado, así como mayor UFC en el grupo experimental.<sup>67</sup> En este estudio, con respecto al índice ceo se encontró una media de 3.2 dientes cariados en niños portadores, en comparación con la media encontrada en niños no portadores que fue de 2.1 dientes cariados, con una diferencia significativa entre ambos. En cuanto al índice CPOD ambos grupos mostraron medias similares, sin diferencia significativa entre ambos. Esta diferencia entre la caries en dientes deciduos y dientes permanentes podría deberse a que al ser niños en edad de dentición mixta los dientes permanentes tienen menor tiempo de haber erupcionado, siendo el tiempo uno de los factores etiológicos de la formación de lesiones cariosas. Sin embargo, si se analiza la cantidad total de dientes cariados, tanto permanentes como deciduos se encuentra una diferencia de medias entre

niños portadores y no portadores de 3.9 y 2.6 respectivamente, con una diferencia significativa entre ambos grupos.

Uno de los mecanismos de patogenicidad de este microorganismo que pudiera estar involucrado en la formación de caries, es la producción de enzimas, principalmente la proteinasa, la cual es la encargada de la actividad proteolítica de estas cepas. Todas las cepas analizadas provenientes de niños sanos presentaron un grado de actividad proteolítica, que varió de 0.53 a 0.85, con una media de 0.70. Este hallazgo es importante debido a que hay estudios acerca de la actividad proteolítica de *C. albicans* en pacientes con condiciones de salud desfavorables, pero en nuestro país no existen estudios en niños sanos; Hernandez y cols. (2014) realizaron un estudio en Yucatán, México, donde analizaron la actividad proteolítica de cepas provenientes de sujetos con diferentes condiciones de salud, entre ellos sujetos sanos y encontraron que solamente el 42% de las cepas de estos sujetos, presento algún grado de actividad.<sup>8</sup> Este dato nos lleva a pensar que las cepas que invaden la mucosa bucal de los niños en nuestro estado son más agresivas que las que invaden la cavidad oral de los adultos, esto podría deberse a que los niños presentan un sistema inmune menos desarrollado que los adultos y a que en Yucatán existe un alto nivel de desnutrición en niños de edad escolar.<sup>5,65,68</sup>

Las cepas provenientes de niños con caries presentaron estadísticamente mayor actividad proteolítica (media de 0.67) que las cepas provenientes de niños sin caries (media de 0.76). El 100% de las cepas provenientes de cavidades orales con caries presentaron actividad proteolítica alta y muy alta, siendo la muy alta la que más predominó (61.5%). De las cepas provenientes de niños libres de caries la mayoría presentó baja actividad y alta, mientras que solo el 14.3% de ellas presentaron actividad proteolítica muy alta. Estos resultados concuerdan con el estudio de Li (2014), en el cual analizó la cavidad bucal de niños chinos y también encontró que las cepas provenientes de pacientes con caries mostraban mayor actividad proteolítica, pero a diferencia de este estudio la media de sus valores fue de 0.36 en niños con

caries y 0.39 en niños sin caries, esta diferencia con éste estudio podría deberse a la diversidad de cepas de acuerdo a la ubicación geográfica.<sup>48</sup> También Barbosa y cols. (2012) realizaron un estudio con niños con VIH y encontraron que las cepas provenientes de niños con caries fueron más proteolíticas que las cepas de los niños libres de caries.<sup>11</sup> Estos resultados muestran que las cepas de *C. albicans* que se relacionan con el proceso cariogénico tienden a ser más patógenas que las que no se relacionan a la caries dental, quizá este mecanismo de patogenicidad sea el encargado de la formación de caries dental debido a que la proteinasa facilita la adhesión e invasión a los tejidos, por medio de ella adquiere nutrientes y puede degradar colágeno, el cual es principal elemento orgánico en el dentina.<sup>48</sup> En cuanto a la actividad proteolítica y el índice ceo/CPOD, no se encontró diferencia dicho índice y el grado de actividad proteolítica.

Con respecto a los genotipos de *C. albicans*, se encontró mayor prevalencia de cepas de genotipo A (94.3%), seguidas por genotipo B (3.8%) y genotipo C (1.9%). El genotipo B y C solo se encontró en cepas provenientes de niños con caries, sin diferencia significativa en este hallazgo. Yang y cols. (2012), encontraron en las cavidades cariosas de niños chinos, genotipos A (75%), B (8.3%) y C (16%), siendo el genotipo A el más prevalente al igual que en el presente estudio, pero, a diferencia de este encontraron mayor prevalencia del genotipo C que del genotipo B<sup>44</sup>.

En el estudio de Qiu y cols (2015), encuentran cepas de genotipos A, B y C, en lesiones cariosas y placa dental de niños sin caries, siendo el genotipo A el más prevalente (61.2%) al igual que en el presente estudio, seguido por el genotipo C (23.3%) y el genotipo B (15.5%), diferente a lo que encontramos en este estudio, donde la prevalencia del genotipo B fue mayor que la del genotipo C. A pesar de que Qiu reporta que el genotipo A es el que más se encontró al igual que este estudio, difiere en la prevalencia, ya que aquí se encuentra en un 94.3% de todas la cepas; Qiu también encontró que la mayor parte de las cepas provenientes de niños sin caries fueron genotipo A, el

genotipo B solo lo encuentra en niños con caries y el genotipo C lo encontró tanto en niños con caries como en niños sin caries, siendo mayor la prevalencia en los niños con caries, además midieron la capacidad de formación de ácidos de los tres genotipos y encontraron que los B y C fueron más acidogénicos que los del genotipo A<sup>47</sup>. Otro estudio (Li y cols. 2014), reporta también mayor prevalencia de genotipo A en biopelículas de cavidades bucales de niños con y sin caries (56.5 y 47.1% respectivamente), al igual que en este estudio, encuentran solo genotipo B en niños con caries (30.4%), y genotipo C en niños con y sin caries (13.1 y 52.9% respectivamente)<sup>48</sup>. En todos estos estudios se observa que existe mayor prevalencia de genotipo del genotipo A al igual que en el presente trabajo, sin embargo, difieren en cuanto a las prevalencias, siendo mayor las encontradas en este trabajo, mientras que solo 2 cepas fueron genotipo B y 1 genotipo C. La discrepancia en cuanto a la prevalencia de los genotipos de *C. albicans* podría deberse a que las condiciones bucales de los niños son únicas y difieren en cuanto a la distribución geográfica, las condiciones de vida, edad de la población y sitio anatómico de donde se obtiene. Diferentes ambientes podrían facilitar la colonización de diferentes genotipos de *C. albicans*<sup>47</sup>.

De las cepas identificadas como genotipo A, 6 (12%) presentaron actividad proteolítica baja, 19 (38%) actividad alta y 25 (50%) actividad muy alta. De las 2 (3.8%) cepas identificadas como genotipo B, una presentó actividad alta y la otra actividad muy alta. la cepa identificada como genotipo C (1.9%) presentó actividad proteolítica alta. No se encontró diferencia significativa en cuanto a la actividad proteolítica y el genotipo de *C. albicans*.

La comparación de medias de la actividad proteolítica en el genotipo A, muestra que el grupo de cepas provenientes de niños con caries presento mayor actividad proteolítica que las provenientes de niños libres de caries. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Li y cols (2014), donde también analizó la actividad proteolítica en ambos grupos y concluyó que, el genotipo A es más agresivo en la progresión de la caries dental<sup>48</sup>. En el

presente estudio, no se pudo realizar dicha comparación con los genotipos B y C ya que todas estas cepas provienen del grupo de niños con caries, sin embargo, el mismo estudio de Li indica que no hay diferencia significativa de la actividad proteolítica del genotipo C en niños con y sin caries.<sup>48</sup>

El hecho de que la variabilidad genotípica está relacionada con la patogenicidad de *C. albicans* aún resulta incierta. El genotipo A, se ha relacionado a infecciones profundas, mientras que los genotipos B y C se relacionan con infecciones no profundas.<sup>69</sup> Por otro lado, otro estudio sugiere que el genotipo C, está más relacionado con infecciones profundas e invasivas y lo relacionan con *Leucoplaquia Candida*, con posibilidad de desarrollar cáncer bucal.<sup>70,71</sup> En el presente trabajo solo una cepa fue identificada como genotipo C; el análisis de la historia clínica del niño, muestra que es completamente sano, sin antecedentes de alergia, ni antibioticoterapia o infecciones con 3 meses de anticipación a la toma de la muestra, tampoco presentaba signos o síntomas que hicieran pensar que tuviera infección por *Candida*. Algunos otros estudios relacionan dicha variabilidad genética con la resistencia a los antifúngicos.<sup>45,46</sup>

Otros estudios relacionan la variabilidad genética con la actividad proteolítica; Sugita y cols (2002) encuentran mayor grado de actividad proteolítica en cepas del genotipo B que en cepas A y C provenientes de muestras de sangre, además sugiere que para entender la patogenicidad de *C. albicans* se deben de tomar en cuenta a los genotipos. Por otro lado, Nawrot y cols (2004) realizaron un estudio de este tipo en cepas de la cavidad bucal, encontrando mayor actividad en el genotipo B que en el genotipo A, pero sin diferencia significativa entre estos dos y el genotipo C, por lo cual propone que la actividad proteolítica está relacionada con la presencia del intrón en el gen 25S rRNA (que lo caracteriza como B), ya que posiblemente existe una asociación entre el caritipo y los mecanismos reguladores implicados en la expresión de genes *SAP*.<sup>12</sup> Estos mismos autores realizan otro estudio (2008) en cepas de la sangre y del tracto respiratorio y encuentran mayor actividad

del genotipo B en ambos grupos, siendo mayor la actividad en las del tracto respiratorio y concluyen que la asociación entre las proteasas y la presencia del intrón depende del sitio de la muestra.<sup>43</sup> Tomando en cuenta a las dos cepas genotipo B encontradas en nuestro trabajo, ambas presentaron actividad proteolítica alta y muy alta como lo reportan estos autores.

En este estudio no se encontraron genotipo D y E, pero tampoco se han relacionado a la cavidad bucal de niños sanos. El genotipo D se ha encontrado en vulvovaginitis, en bolsas periodontales de pacientes con periodontitis, aunque también se considera que pertenece a cepas *C. dubliniensis*. Mientras que el genotipo E no se ha encontrado en la cavidad bucal.<sup>45-47</sup>

En este estudio no se encontró asociación entre la actividad proteolítica de los diferentes genotipos de *C. albicans* en presencia de caries dental, esto debido a que las muestras de los genotipos B y C fueron muy pocas como para realizar un análisis estadístico.

Aún se conoce muy poco acerca de la actividad proteolítica de los genotipos de *C. albicans* asociados a caries dental, por lo cual es importante seguir realizando estudios para conocer los mecanismos por los cuales las proteasas intervienen en este proceso y el papel que juegan en los genotipos de esta microorganismo.



## IX. CONCLUSIONES

La prevalencia de *C. albicans* en los niños sanos de 6-12 años de edad fue de 18.1%. Se encontró una diferencia significativamente mayor en el grupo de niños que presentaron caries dental la cual fue de 22.5%, que en el grupo de niños libres de caries cuya prevalencia fue de 11.7%. Este resultado sugiere que existe una asociación entre la presencia de caries y este microorganismo. De igual forma en presencia de *C. albicans* el índice ceo fue estadísticamente mayor (3.2) que en ausencia de *C. albicans* (2.1), mientras que el índice CPOD no tuvo diferencia en presencia o ausencia (0.71 y 0.56 respectivamente) de dicho microorganismo.

Otro de los objetivos del trabajo fue evaluar la actividad proteolítica de las cepas encontradas y se obtuvo que la media del índice Pz para la actividad proteolítica fue de 0.70 y que las cepas que se aislaron de los niños con caries presentaron una media estadísticamente mayor de 0.76 en contraste con la media en los aislados de niños libres de caries que fue de 0.67.

En cuanto a los genotipos de *C. albicans* se identificó que el 94.3% de todas las cepas fueron genotipo A, el 3.8% fueron genotipo B y solo en 1.9% fueron genotipo B, sin diferencia en presencia o ausencia de caries. Tampoco se encontró una asociación entre la actividad proteolítica y los genotipos de *C. albicans*, ni de dicha actividad con el índice ceo/CPOD.

Si se toman en cuenta solamente las cepas genotipo A, se tienen que las de los niños con caries presentaron mayor actividad proteolítica que las de los niños sin caries.

## XI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herrera D, Apaza F, Pariona M, Vilca L. Necesidad de tratamiento endodóncico y prevalencia de caries en escolares de 12 años en la parroquia yanuncay cuenca-Ecuador. *Revista oactiva UC Cuenca*. 2016; 1(2):35-38.
2. OMS. Salud bucodental. 2015; Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>. Accessed Septiembre/ 11, 2017.
3. Kouidhi B, Fdhila K, Slama RB, Mahdouani K, Hentati H, Najjari F, et al. Molecular detection of bacteria associated to dental caries in 4–12-year-old Tunisian children. *Microb Pathog* 2014;71:32-36.
4. Srivastava B, Bhatia HP, Chaudhary V, Aggarwal A, Kumar Singh A, Gupta N. Comparative Evaluation of Oral *Candida albicans* Carriage in Children with and without Dental Caries: A Microbiological in vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2012;5(2):108-112.
5. Hernández-Solís S, Rueda-Gordillo F, Pereira-Góngora J, Villamil-Urzaiz J. Frecuencia de portadores de *C. albicans* en un grupo de niños de una comunidad rural del estado de Yucatán. *Rev Odontol Latinoam*. 2008(1):1-4.
6. Hernández Solís S, González Ramírez A, Rueda Gordillo F. Capacidad de adhesión de cepas de *Candida albicans* aisladas de una población de niños portadores sanos. *Rev Odontol Latinoam*. 2010;2(2):33-37.
7. Rivera LEC, Ramos AP, Desgarenes CP. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Revista Mexicana*. 2005;49(1):12-27.
8. Hernandez-Solis SE, Rueda-Gordillo F, Rojas-Herrera RA. Proteinase activity in *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of immunocompromised patients, with oral candidiasis and in healthy subjects. *Rev Iberoam Micol*. 2014 Apr-Jun;31(2):137-140.
9. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 2001;147(8):1997-2005.
10. Sugita T, Kurosaka S, Yajitate M, Sato H, Nishikawa A. Extracellular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiol Immunol*. 2002;46(12):881-883.
11. Portela MB, das Chagas MS, Cerqueira DF, de Souza, Ivete Pomarico Ribeiro, Souto-Padrón T, de Araújo Soares, Rosangela Maria, et al.

- Differential collagenolytic activity of *Candida albicans* isolated from oral mucosa and dentinal carious lesions of HIV-infected children. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2012;113(3):378-383.
12. Nawrot U, Skala J, Noczynska A, Potocka N, Koczocik K, Baran E. Distribution of Ca. LSU intron and acid protease production by *Candida albicans* strains isolated from gastrointestinal tract of diabetes children. *Polskie Towarzystwo Mikrobiologów The Polish Society Of Microbiologists*. 2004;53(3):189-191.
  13. World Health Organization . “OralHealthSurveys”:Basicmethods.4ta Edition G 1997. oral health. “OralHealthSurveys”:Basicmethods.4ta Edition, Ginebra. 1997; Available at: [http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2009/OH\\_st\\_Esurv.pdf](http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2009/OH_st_Esurv.pdf). Accessed septiembre/9, 2017.
  14. Oropeza-Oropeza C, Molina-Frechero N, Castañeda-Castaneira E, Zaragoza-Rosado C, Cruz Leyva C. Caries dental en primeros molares permanentes de escolares de la delegación Tláhuac. *Revista ADM*. 2012;69(2):63-68.
  15. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *The Lancet*. 2007;369(9555):51-59.
  16. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PloS one*. 2012;7(10):e47722.
  17. Alzamora AAO. Microbiología endodóntica. *Duazary: Revista Internacional de Ciencias de la Salud*. 2004;1(1):39-44.
  18. Centeno JEO, Muñoz CAR, Centeno MO, Badillo CA. Análisis desde los modelos conceptuales de salud pública de la caries dental en México. *Revista Nacional de Odontología*. 2014;10(19):55-60.
  19. Brown A. Caries prevalence and treatment needs of healthy and medically compromised children at a tertiary care institution in Saudi Arabia. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*. 2009;15(2):378-386.
  20. Martínez-Pérez KM, Monjarás-Ávila AJ, Patiño-Marín N, Loyola-Rodríguez JP, Mandeville PB, Medina-Solís CE, et al. Estudio epidemiológico sobre caries dental y necesidades de tratamiento en escolares de 6 a 12 años de edad de San Luis Potosí. *Rev de Invest Clín*. 2010;62(3):206-213.
  21. Medina-solis CE, Avila-burgos L, Hidalgo D. Políticas de salud bucal en

- México: Disminuir las principales enfermedades. Una descripción. *Rev Biomed*. 2006;17(4):269-286.
22. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2006;51(11):1024-1028.
  23. Medina-Solís CE, Pontigo-Loyola AP, Pérez-Campos E, Hernández-Cruz P, De la Rosa-Santillana R, Navarrete-Hernández J. Principales razones de extracción de dientes permanentes en una muestra de adultos mexicanos. *Rev Invest Clin*. 2013;65(2):141-149.
  24. Faba BR, Trujillo VS, Peña GP, Lobos RG, Wolff RM. Actinomicosis torácica por *Actinomyces odontolyticus*: A case report and review of the literature. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*. 2014;30(1):40-45.
  25. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community. *Dent Oral Epidemiol*. 2003;31(s1):3-24.
  26. Perfil epidemiológico de salud oral 2010. Reporte de la secretaria de salud. junio 2011. 2011; Available at: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P\\_EPI\\_DE\\_LA\\_SALUD\\_BUCAL\\_EN\\_MEXICO\\_2010.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LA_SALUD_BUCAL_EN_MEXICO_2010.pdf). Accessed abril/15, 2017.
  27. Vilchis DBC, Castillo REP, Clavel JFG. El concepto de caries: hacia un tratamiento no invasivo. *Revista adm*. 2013;70(2):54-60.
  28. Kaur A, Soodan P, Soodan K, Priyadarshni P. Evaluation of prevalence of *Candida* species in the root canals and oral cavity of children and adult patients. *J Dent Med Sci*. 2014;13(7):100-104.
  29. Mardegan RdC, Klein MI, Golvea MB, Rodrigues JAO, Gonçalves RB, Höfling JF. Biotyping and genotypic diversity among oral *Candida albicans* strains from caries-free and caries-active healthy children. *Brazilian J Microbiol*. 2006;37(1):26-32.
  30. Sachin C, Ruchi K, Santosh S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. *International journal of Medicine and Biomedical research*. 2012;1(2):153-157.
  31. Siahi-Benlarbi R, Nies SM, Sziegoleit A, Bauer J, Schranz D, Wetzel W. Caries-, *Candida* and *Candida* antigen/antibody frequency in children after heart transplantation and children with congenital heart disease. *Pediatr Transplant*. 2010;14(6):715-721.
  32. Victorio GB, Bourdon LMB, Benavides LG, Huerta-Olvera SG,

- Plascencia A, Villanueva J, et al. Antifungal activity of caspofungin in experimental infective endocarditis caused by *Candida albicans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017(AHEAD):0-0.
33. Mavor A, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets*. 2005;6(8):863-874.
  34. Bokor-Bratić MB. Oral candidiasis-adhesion of non-albicans *Candida* species. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*. 2008(114):69-78.
  35. Mata de Henning M, Perrone M. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Cándida albicans* en cavidad bucal. *Acta Odontol Venez*. 2001;39.
  36. Deepa K, Jeevitha T, Michael A. In vitro evaluation of virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavity. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 2015;7(3):28-32.
  37. Pardi G. Determinantes de Patogenicidad de *Candida albicans*: Revisión Bibliográfica. *Acta Odontológica Venezolana*. 2002;40(2):185-192.
  38. Silva S, Hooper SJ, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011;17(2):264-272.
  39. De La Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina*. 2012;26(1):43-55.
  40. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005;48(6):365-377.
  41. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(3):400-28.
  42. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*. 2004;6(10):915-926.
  43. Nawrot U, A JSKA, Odarczyk KW. Proteolytic Activity of Clinical *Candida albicans* Isolates in Relation to Genotype and Strain Source. 2008;57(1).
  44. Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, Yang R, Liu Y, Zou J. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2012;57(8):1048-1053.
  45. Liu XP, Fan SR, Bai FY, Li J, Liao QP. Antifungal susceptibility and genotypes of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*. 2009;52(1):24-28.

46. McCullough MJ, Clemons K V., Stevens D a. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(2):417-421.
47. Qiu R, Li W, Lin Y, Yu D, Zhao W. Genotypic diversity and cariogenicity of *Candida albicans* from children with early childhood caries and caries-free children. *BMC Oral Health.* 2015;15(1):144.
48. Li W, Yu D, Gao S, Lin J, Chen Z, Zhao W. Role of *Candida albicans*-secreted aspartyl proteinases (Saps) in severe early childhood caries. *International journal of molecular sciences.* 2014;15(6):10766-10779.
49. Jose T, Thomas A, Pidamale R, Mhambrey S, Shetty SB. Research article correlation between *C. albicans*, *S. mutans*, *S. sanguinis* and *Lactobacillus* in ecc, S-ECC and caries free children. *International Journal of Recent Scientific Research.* 2014;5(2):352-356.
50. Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res.* 2011;45(2):100-106.
51. Costa Pires MDF, Corrêa B, Gambale W, Paula CR. Experimental model of *Candida albicans* (Serotypes A and B) adherence in vitro. *Brazilian J Microbiol.* 2001;32(3):163-169.
52. Lai G, Li M. The possible role of *Candida albicans* in the progression of dental caries. *Int Res J Microbiol.* 2011;2:504-506.
53. Akdeniz BG, Koparal E, Sen BH, Ateş M, Denizci AA. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. *ASDC J Dent Child.* 2002;69(3):289-292, 235. 54.
54. Al-hebshi NN, Abdulhaq A, Quadri MFA, Tobaigy FM. Salivary carriage of *Candida* species in relation to dental caries in a population of Saudi Arabian primary school children. *Saudi J Dent Res.* 2015;6(1):54-59.
55. World Health Organization. Oral health surveys: basic methods. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1997. Disponible en: [http://www.google.com.mx/search?q=World+Health+Organization.+Oral+health+surveys%3A+basic+methods.+4th+ed.+Geneva%3A+World+Health+Organization%3B+1997.&hl=es-MX&gbv=2&oq=&gs\\_l=](http://www.google.com.mx/search?q=World+Health+Organization.+Oral+health+surveys%3A+basic+methods.+4th+ed.+Geneva%3A+World+Health+Organization%3B+1997.&hl=es-MX&gbv=2&oq=&gs_l=). Accessed May 24, 2015.
56. Nevzatoglu S, Küçükkeles N, Kadir T. Frecuencia de la *Candida albicans* en niños que utilizan aparatos de ortodoncia removible. *Rev Esp Ortod.* 2011;41:49-53.
57. Hernandez-Solis SE, Rueda-Gordillo F, Flota-Alcocer AD, Agullar-Ayala FJ, Rodriguez-Fernandez Mdel S, Lama-Gonzalez EM. Influence of orthodontic appliances on the occurrence of *Candida* spp. in the oral cavity. *Rev Chilena Infectol.* 2016 Jun;33(3):293-297.

58. Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, Yang R, Liu Y, Zou J. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2012;57(8):1048-1053.
59. Martins M, Henriques M, Ribeiro AP, et al. Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. *Rev Iberoam Micol organo la Asoc Esp Espec en Micol.* 2010;27(3):119-124.
60. Ozkan S, Kaynak F, Kalkanci A, Abbasoglu U, Kustimur S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(3):319-323.
61. Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, Yazawa K, Nishimura K. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group I intron. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4309-4315.
62. Rozkiewicz D, Daniluk T, Zaremba ML, et al. Oral *Candida albicans* carriage in healthy preschool and school children. *Adv Med Sci.* 2006;51(1):187-190.
63. Ribeiro EL, Carvalhaes MS, Campos CdC, Ferreira WM, Cardoso CG, Nagato GM, et al. Cepas gigantes de *Candida albicans* y su potencial de expresión/fenotípica en niños portadores del síndrome de down. *Acta odontologica venezolana.* 2006;44(1):1-7 2006.
64. Gaitán-cepeda LA, Sánchez-vargas LO, Pavia-ruz N, Muñoz-hernández R, Villegas-ham J, Caballos-salobreña A. VIH / sida , desnutrición o marginación social. 2012;31(1):48-53.
65. Azcorra H, Vázquez-Vázquez A, Baqueiro Cárdenas JE, Salazar-Rendón JC. Crecimiento y estado nutricional de escolares de tres comunidades de Yucatán, México. *Arch Latinoam Nutr.* 2016;66(2):135-141.
66. Thaweboon S, Thaweboon B, Nakornchai S, Jitmaitree S. Salivary secretory IgA, pH, flow rates, mutans streptococci and *Candida* in children with rampant caries. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2008;39(5):893-899.
67. Khurana N, Sharma DS, Sharma H, Pathak AK. Oral *Candida albicans* and its correlation with caries in children in vivo. *J Pierre Fauchard Acad (India Sect.* 2015;29(1):1-4.
68. Fontan G. Maduración de la Respuesta Inmune en el niño. *Inmunologia.* 1999;18:53-54.
69. Karahan ZC, G&#252; H, Ağrbaşı H, et al. Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25s intron analysis with regard to invasiveness. *Mycoses.* 2004;47(11):465-469.

70. Gurbuz M, Kaleli I. Molecular analysis of *Candida albicans* isolates from clinical specimens. *Mycopathologia*. 2010;169(4):261-267.
71. Abdulrahim MH, Mcmanus BA, Flint SR, Coleman DC. Genotyping *Candida albicans* from *Candida* Leukoplakia and Non-*Candida* Leukoplakia Shows No Enrichment of Multilocus Sequence Typing Clades but Enrichment of ABC Genotype C in *Candida* Leukoplakia. 2013;8(9):1-11.



## XII ANEXOS

### Anexo 1

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Investigadores: CDEE. Daniela Beatriz Romero Salazar. Dr. Florencio Rueda  
Gordillo

M. en C. Sandra Elena Hernández Sólis.

#### POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS DE SALUD

NOMBRE: \_\_\_\_\_

DIRECCIÓN: \_\_\_\_\_ TELÉFONO: \_\_\_\_\_

El propósito de este estudio es identificar por métodos moleculares la presencia de *C. albicans*, el serotipo y la actividad de la proteinasa y la presencia de genes SAP's en dichas cepas, aisladas de la cavidad oral de niños con caries y niños sin caries. Este estudio pretende utilizar los resultados en beneficio de los pacientes, para establecer un diagnóstico y una prevalencia, para ser utilizados en investigaciones posteriores.

Se me ha explicado que mi participación en esta investigación consistirá en responder algunas preguntas de un cuestionario en el que aportare información personal tales como nombre, edad, género y enfermedades. Se me explicó el protocolo a seguir y que el niño mi cargo no corre ningún riesgo adicional durante el procedimiento de toma de la muestra.

Se mantendrá total y plena confidencialidad acerca de los datos proporcionados por mi persona, la investigación no tendrá ningún costo, así como tampoco habrá ningún tipo de remuneración económica ya que esta investigación se realiza sin fin de lucro.

Por medio de la presente, acepto voluntariamente y sin presión participar en el proyecto de investigación, para que se me realicen los estudios necesarios y que los datos obtenidos puedan ser utilizados para lo que el investigador considere o requiera para la realización y publicación de la investigación. Doy mi consentimiento informado y voluntario de participar en este estudio.

Firma o huella de consentimiento de la

Firma del investigador

Cuidador del niño

Mérida, Yucatán, México de de 201\_

Anexo 2

**HOJA DE REGISTRO**

Nombre: \_\_\_\_\_  
Dirección \_\_\_\_\_ Teléfonos: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
Sexo: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

¿El niño padece alguna enfermedad? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_  
¿Cuál? \_\_\_\_\_

¿el niño se encuentra tomando antibióticos? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_  
¿Cuál? \_\_\_\_\_

¿Quién realiza la higiene oral del niño? \_\_\_\_\_

¿Con qué frecuencia cepilla sus dientes? \_\_\_\_\_

¿Usa auxiliares de higiene oral? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

¿Consumo golosinas? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ ¿Con qué frecuencia? \_\_\_\_\_

¿Toma leche o jugos en biberón? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿cuántas horas pasa con el biberón en la boca al día? \_\_\_\_\_

¿Duerme con el biberón? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Cepilla sus dientes después de tomar biberón? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Ha observado enrojecimiento en la cavidad oral del niño, o una capa blanquecina sobre la lengua o carrillos? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿El niño ha presentado algún tipo de dolor en los dientes? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Cuándo fue la última vez q asistió al dentista? \_\_\_\_\_

Observación Clínica

Índice CPOD	Numero de dientes afectados
Diente Cariado	
Diente extraído	
Diente obturado	
Total del índice CPO	

observaciones \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Índice ceo	Numero de dientes afectados	observaciones_____
Diente Cariado		_____
Diente indicado para extracción		_____
Diente obturado		_____
Total del índice CPO		_____

---

