

RESISTÊNCIA À NISTATINA E FLUCONAZOL DA CANDIDA ALBICANS PRESENTE NA SALIVA DE INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITO TIPO 2

JUAN PABLO AITKEN SAAVEDRA¹; ALFREDO MOLINA BERRIOS²; ROMINA
HUENCHUNAO²; RAFAEL GUERRA LUND¹ SANDRA BEATRIZ TARQUINIO
CHAVES³

¹ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas – juanpabloaitken@gmail.com

² Universidade do Chile

³ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas – sbtarquinio@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellito tipo 2 (DM2) é a doença metabólica mais comum no mundo (LAMICHHANE, 2015). O método para estabelecer controle metabólico da DM2 é a hemoglobina glicada (HbA1c), que avalia a porcentagem de hemoglobina ligada a glicose durante um período de 60 a 90 dias. O objetivo do tratamento da DM2 é manter o nível de HbA1c abaixo de 7%, o que é considerado compensação metabólica. Acima deste nível, os indivíduos afetados são mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções, especialmente a candidíase (RAUTEMAA, 2011). *C. albicans* é a espécie de *Candida* mais comumente identificada na saliva e é a principal causa de candidíase oral em DM2 (ZOMORODIAN, 2009; TORRES, 2002). Além disso, um ambiente salivar ácido poderia potencializar seus fatores de patogenicidade como uma morfologia mais invasiva, aumentando assim a resistência à terapia antifúngica (FORD, 2015). As terapias atuais para candidíase oral em pacientes com DM2 incluem a administração de agentes antifúngicos tópicos, como nistatina ou alguns azoles, incluindo o fluconazol (KORAY, 2005). Há algumas evidências que *C. Albicans*, pode desenvolver resistência aos agentes antifúngicos e diminuir a disponibilidade de fluconazol no plasma (DE VASCONCELLOS AA, 2014). No entanto a avaliação da sua resistência a agentes antifúngicos comumente usados na candidíase oral em indivíduos com DM2, especialmente nistatina, ainda é escassa. Como a DM2 é uma doença de alta frequência e a maioria dos pacientes afetados são descompensados (HU FB, 2011), a candidíase oral é uma consequência comum e a resistência antifúngica é um problema de saúde global. Não existem protocolos para tratar a candidíase oral de acordo com os diferentes estados de controle metabólico em indivíduos com DM2 e possíveis mudanças salivares associadas, especialmente pH salivar. O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência de *C albicans* de acordo com diferentes níveis de controle metabólico e pH salivar. Os resultados deste estudo podem ser usados para melhorar as terapias para tratar a candidíase oral em indivíduos com DM2, potencialmente proporcionando maior eficácia e menos efeitos adversos.

2. METODOLOGIA

Amostras. Foram coletadas amostras salivares de 52 indivíduos com DM2 da Associação Chilena de Diabetes, os quais assinaram um formulário de consentimento informado aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade do Chile, respeitando os princípios da Declaração de Helsinki (DOMJÁN A, 2014). Os resultados da hemoglobina glicada (HbA1c) foram solicitados. Amostras de saliva não estimulada foram obtidas por um único operador e coletadas individualmente em tubos de 50 ml (Falcon, BD, EUA) de acordo com o protocolo descrito por Navazesh (NAVAZESH M, 1992). Após a coleta, as amostras foram armazenadas a 5 ° C e transportadas para o

Laboratório de Bioquímica Oral e Biologia da Faculdade de Odontologia da Universidade do Chile onde foi medido o pH salivar.

Os tubos contendo as amostras de saliva foram submetidos a vortex por 15 segundos. 100 µl de saliva e foram colocados em uma placa de Petri contendo agar Sabouraud glucose (SGA) (tetraciclina 50 µg / ml). As placas foram incubadas durante 48 h a 30 ° C. As colônias foram recuperadas e colocadas em placas SGA frescas, e foram estimadas as unidades formadoras de colônias por mililitros de saliva (CFU / ml). 100 µl de amostra foi utilizada para identificação presumtiva de *C. albicans* usando placas CHROMagar Candida®. O método CLSI M44-A (Espinel-Ingroff, 2007) foi utilizado para testar a susceptibilidade de diferentes cepas de *C. albicans* à terapia com fluconazol e nistatina. Após o cultivo de CHROMagar Candida® durante 24 h a 35 ° C, preparou-se um inóculo de solução de turvação de McFarland em 0,15 M de cloreto de sódio estéril. Para a difusão, foram utilizadas placas de Petri de 100 mm de diâmetro com 20 ml de SGA suplementado com cloranfenicol. O inóculo foi espalhado na superfície de cada placa de petri em três direções e deixou-se secar por 10 a 15 minutos a 35 ° C. Posteriormente, discos de fluconazol (OXOID®) ou nistatina (OXOID®) 6 mm foram colocados equidistante das margens da placa. Após a incubação durante 24 h a 35 ° C, as placas foram examinadas em uma superfície preta e não reflexiva iluminada pela luz refletida. Os diâmetros ao redor dos discos foram medidos a partir do milímetro mais próximo até o ponto onde a redução proeminente no crescimento foi observada. De acordo com o diâmetro da inibição do halus, as espécies foram classificadas como sensíveis (mais de 20 mm), intermediárias (entre 12 e 19 mm) ou resistentes (menos de 11 mm). O teste exato de Fisher foi usado para comparar variáveis de gênero, controle metabólico e transporte de colonias de *C. albicans* entre pacientes compensados e não compensados. O teste t de Student foi utilizado para comparar a susceptibilidade ao tratamento com fluconazol / nistatina. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 52 indivíduos que foram recrutados (26 com HbA1c > 7% e 26 com HbA1c < 7%), 40 (76,9%) eram mulheres. A idade média, foi de 63,3 anos (DS = 10,5). Trinta e nove indivíduos (75%) eram portadores de *C. albicans*. Entre eles, 18 (69,2%) foram pacientes com compensação (HbA1c < 7%) e 21 (80,8%) foram descompensados (HbA1c > 7%). O pH salival médio foi de 7,54. A diferença de pH entre transportadores e não-transportadores foi estatisticamente significativa na faixa de pH de 7,1-8 ($p = 0,004$). Em indivíduos descompensados, observou-se diferença significativa entre portadores e não-portadores apenas na faixa de pH de 7,5 a 8 ($p = 0,01$). É relatado que os indivíduos com DM2, independentemente do seu controle metabólico, podem ter baixo pH salivar em comparação com os pacientes não diabéticos. Em nosso estudo, observou-se uma tendência para a acidificação do pH salivar no grupo descompensado. Maior número de colonias de *C. albicans* foram observados na faixa de pH de 7,01 a 8, o que indica que a maioria dos microorganismos presentes na cavidade oral requerem pH neutro para sobreviver. Observamos uma relação inversa entre o número de espécies de leveduras na saliva de pacientes com DM2 e pH salivar. Um pH ácido na boca favorece o crescimento de leveduras sobre o crescimento da microbiota bacteriana normal. Leveduras do gênero *Candida* toleram valores de pH muito ácidos (RAUTEMAA, 2011). *C. albicans* é capaz de baixar o pH do meio com alta glicemia (FISHER, 1987). A glicose na saliva também serve como nutriente para *Candida* e suprime a capacidade fagocítica dos neutrófilos, o que promove a

colonização da *C. Albicans* (BALAN P, 2015). Nossos resultados sugerem a necessidade de modificar a abordagem terapêutica das infecções fúngicas da cavidade oral de pacientes diabéticos com base no seu pH salivar. A resistência aos antifúngicos é um problema sério. Está se tornando cada vez mais difícil tratar a candidíase (COURVALIN P., 2016; MEZIANE-CHERIF D., 2015; ALBATAINEH MT, 2014). Segundo nossos resultados, houve uma ligeira correlação negativa entre as variantes pH e susceptibilidade para nistatina ($p = 0,01$), sugerindo que com maior acidificação, *C. albicans* é mais suscetível ao tratamento. Observou-se maior inibição a valores de pH mais baixos, o que sugere que pode ter maior eficácia em indivíduos com maior acidificação salivar. Com relação ao fluconazol, os resultados não foram significativos. Alguns estudos avaliaram anteriormente os efeitos de diferentes apresentações de nistatina, como o enxaguatório bucal (HUR, 2013; BAKHSHI M, 2012; HUSSEIN-AL-ALI SH, 2014) e como ingrediente de condicionadores de tecido (LIMA JFM, 2016). Seria interessante avaliar a eficácia desses formatos. Estudos futuros são necessários para investigar as interações medicamentosas. É relatado que sulfonilureias e meglitinidas, que são utilizadas na DM2, podem ter interações farmacológicas com o fluconazol (SCHEEN AJ., 2005). Além disso, é necessário avaliar mudanças salivares em indivíduos com cárie e a doença periodontal porque um pH salivar mais ácido tem sido descrito em indivíduos cáries e pH mais alcalino tem sido descrito em indivíduos com doença periodontal (RAJESH KS, 2015). O uso de próteses removíveis também deve ser considerado porque *C. albicans* tem uma habilidade excepcional para aderir às superfícies de materiais artificiais. Além disso, seria importante também avaliar a morfologia da *C. albicans* de acordo com o controle metabólico e os estados salivares, que podem estar associados à maior virulência.

4. CONCLUSÕES

Em pacientes com DM2 descompensados, houve associação inversa entre o valor de HbA1c e o pH salivar. Na medida que os indivíduos apresentaram maior acidificação salivar, observou-se maior quantidade de colônias de *C. albicans*. Com o uso de nistatina, observou-se maior susceptibilidade a pH salivar mais baixo, o que sugere que este agente antifúngico poderia ser mais eficaz em pacientes descompensados, que tendem a apresentar maior acidificação salivar.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LAMICHHANE R, BOAZ K, NATARAJAN S, SHRESTHA M. Assessment of Candidal carriage in patients with Type II Diabetes Mellitus. **J Pathol Nepal**; v.5, n.9, p.733, 2015.
- RAUTEMAA R, RAMAGE G. Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. **Crit Rev Microbiol.**; n. 37, v.4, p. 328-336, 2011.
- ZOMORODIAN K, KAVOOSI F, PISHDAD GR. Prevalence of oral Candida colonization in patients with diabetes mellitus. **J Mycol médicale.**; v. 26, n. 2, p.103-110, 2016.
- TORRES SR, PEIXOTO CB, CALDAS DM. Relationship between salivary flow rates and Candida counts in subjects with xerostomia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**; v. 93, n. 2, p. 149-154, 2002
- FORD CB, FUNT JM, ABBEY D. The evolution of drug resistance in clinical isolates of candida albicans. **Elife**; n. 4, p. 1-27, 2015.
- KORAY M, AK G, KURKLU E. Fluconazole and/or hexetidine for management of oral candidiasis associated with denture-induced stomatitis. **Oral Dis.**; n. 11, v. 5, p. 309-313, 2005

DE VASCONCELLOS AA, GONÇALVES LM, DEL BEL CURY AA, DA SILVA WJ. Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole. **Microb Pathog.** v. 6, p. 39-44, 2014.

HU FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care.**;v. 34, n. 6, p. 1249-1257, 2011.

DOMJÁN A, KAKUK P, SÁNDOR J. The Helsinki Declaration at 50 years: comments on the 2013 modifications. **Lege Artis Med;** v. 24, n. 3, p. 152-158, 2014

NAVAZESH M, MULLIGAN RA, KIPNIS V, DENNY PA, DENNY PC. Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy Caucasian young and aged adults. **J Dent Res.** v. 71, n. 6, p. 1275-1278, 1992.

FISHER BM, LAMEY PJ, SAMARANAYAKE LP, MACFARLANE TW, FRIER BM. Carriage of *Candida* species in the oral cavity in diabetic patients: relationship to glycemic control. **J Oral Pathol.**; v. 16, n. 5, p. 282-284, 1987.

BALAN P, B GOGINENI S, KUMARI N S. *Candida* Carriage Rate and Growth Characteristics of Saliva in Diabetes Mellitus Patients: A Case-Control Study. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects;** v. 9, n. 4, p. 274-279,2015.

COURVALIN P. Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease? **Clin Microbiol Infect.**; v; 22, n. 5, p. 405-407, 2016.

MEZIANE-CHERIF D, COURVALIN P. Antibiotic resistance: to the rescue of old drugs. **Nature.**; v. 510. n. 7506, p. 477-478, 2014.

ALBATAINEH MT, SUTTON DA, FOTHERGILL AW, WIEDERHOLD NP. Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. **Infect Dis Clin North Am.**; v.30, n. 1, p. 13-35, 2016.

HU R, JIANG X, WU Y. Prospective trial finds nystatin mouthwash effective prophylaxis for pulmonary invasive fungal infections that originate in the throat of patients with hematologic malignancies. **Neoplasma.**; v. 60, n. 3, p. 315-321, 2013.

BAKHSI M, TAHERI J-B, SHABESTARI SB, TANIK A, PAHLEVAN R. Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. **Gerodontology.**; v.29, n. 2, p. 680-684, 2012.

HUSSEIN-AL-ALI SH, EL ZOWALATY ME, KURA AU. Antimicrobial and controlled release studies of a novel nystatin conjugated iron oxide nanocomposite. **Biomed Res Int.**: v. 12, 2014.

LIMA JFM, MACIEL JG, ARRAIS CAG, PORTO VC, URBAN VM, NEPELENBROEK KH. Effect of incorporating antifungals on the water sorption and solubility of interim resilient liners for denture base relining. **J Prosthet Dent.**;v. 115, n. 5, p. 611-616, 2016.

SCHEEN AJ. Drug interactions of clinical importance with antihyperglycaemic agents: an update. **Drug Saf.**; v. 28, n. 7, p. 601-631, 2005.

RAJESH KS, ZAREENA, HEGDE S, ARUN KUMAR MS. Assessment of salivary calcium, phosphate, magnesium, pH, and flow rate in healthy subjects, periodontitis, and dental caries. **Contemp Clin Dent.** v. 6, n. 4, p. 461-465.