



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
DIRECCION DE EDUCACION MÉDICA
SUBDIRECCION DE EDUCACION MÉDICA

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN
INFECTOLOGÍA

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGIA

“Efecto de la hemoglobina glicosilada como marcador de control glicémico sobre la proliferación in vitro de *Rhizopus oryzae* en diferentes grupos de pacientes diabéticos y pacientes no diabéticos”

Presenta:
Dra. Grace Johanna Salazar Tamayo

DIRECTORA DE TESIS
Dra. Ana Patricia Rodríguez Zulueta
Ciudad de México, Enero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Efecto de la hemoglobina glicosilada como marcador de control glicémico sobre la proliferación in vitro de *Rhizopus oryzae* en diferentes grupos de pacientes diabéticos y pacientes no diabéticos”

Autora: Dra. Grace Johanna Salazar Tamayo

Vo. Bo.

Dra. Patricia Amalia Volkow Fernández
Titular del curso de especialización en Infectología

Vo. Bo.

Dra. Silvia Verónica Villavicencio Valencia
Subdirección de educación médica
Instituto Nacional de Cancerología

Vo. Bo.

Dra. Ana Patricia Rodríguez Zulueta
Directora de Tesis
Médico Adscrito al departamento de Infectología

INDICE

1. Resumen.....	4
2. Carátula.....	5
3. Antecedentes.....	7
4. Marco teórico.....	9
4.1. Factores patogénicos propios de <i>Rhizopus spp.</i> en diabetes mellitus.....	9
4.2. Defensa del huésped normal en la patogenia.....	9
4.3. Inmunidad innata en el diabético. Rol de la hiperglicemia y cetoacidosis.....	10
4.4. Otras comorbilidades que podrían afectar a la mucormicosis.....	11
4.5. <i>Rhizopus spp.</i> en la patogenia de la enfermedad en el diabético.....	11
4.6. Antecedentes de las mediciones in vitro de crecimiento de mucorales y antecedentes del procedimiento.....	12
4.7. Estabilidad de la hemoglobina glicosilada.....	13
5. Planteamiento del problema.....	15
6. Pregunta de investigación.....	16
7. Justificación.....	17
8. Hipótesis.....	18
9. Objetivos.....	19
9.1. Objetivo principal.....	19
9.2. Objetivos específicos.....	19
10. Diseño del estudio.....	20
11. Metodología.....	21
12. Resultados.....	27
13. Discusión.....	48
14. Conclusiones.....	50
15. Bibliografía.....	51

1. RESUMEN

Introducción

La mucormicosis es una entidad fúngica con alta mortalidad en pacientes con diabetes mellitus. Tiene importancia conocer aspectos fisiopatológicos y si el control glicémico se relaciona con el desarrollo de *R. oryzae* el principal agente de esta entidad.

Objetivo general

Observar el efecto de la hemoglobina glicosilada como marcador de control glicémico sobre la proliferación in vitro de *Rhizopus oryzae* en diferentes grupos de pacientes diabéticos y pacientes no diabéticos.

Materiales y métodos

Se recolectaron 95 pacientes, 65 con diabetes y 30 sin diabetes. Se excluyeron pacientes con previa infección, uso de antibiótico, enfermedad renal crónica, neutropenia o malignidad. EDTA. Cada muestra en tubo Vacutainer® BD fue lisada de forma mecánica y por congelamiento. Usando un aislamiento clínico de *R. oryzae* se preparó un inóculo de acuerdo a las guías CLSI M38A. El inóculo se mezcló 1:1 con sangre. El crecimiento fúngico fue evaluado a las 3, 6, 12 y 24 horas de incubación en número de conidias en cámara de Neubauer, conidiación, filamentación y crecimiento en SDA en milímetros. Se realizaron prueba de Kruskal Wallis y test de Wilcoxon para comparación de grupos. Un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado como significativo.

Resultados

El número de conidias disminuyó e incrementó la gemación desde la hora 3, con diferencias significativas entre los grupos en la hora 12 mostrando mayor desarrollo en los grupos con descontrol glicémico ($p < 0,001$). Entre el grupo de diabéticos y no diabéticos el número de conidias fue significativamente menor desde la hora 6 con incremento de la gemación a la hora 12 para los pacientes con diabetes mellitus ($p < 0,001$) y en todas las observaciones siempre hubo mayor filamentación en pacientes diabéticos comparados con los sanos ($p = 0,001$).

Conclusiones

Se observa mayor conidiación y filamentación en paciente con diabetes mellitus comparado con los pacientes sanos. El desarrollo de *R. oryzae* fue mayor en los grupos de descontrol glicémico.

2. CARÁTULA

2.1. Título

“Efecto de la hemoglobina glicosilada como marcador de control glicémico sobre la proliferación in vitro de *Rhizopus oryzae* en diferentes grupos de pacientes diabéticos y pacientes no diabéticos.”

2.2. Tipo de investigación:

Básica experimental

2.3. Investigadores

2.3.1. Investigador principal

Nombre: Dra. Ana Patricia Rodríguez Zulueta

Cargo: Médico Adscrito del Departamento de Infectología. Hospital General Doctor Manuel Gea González. México, D.F.

Correo electrónico: rozu76@hotmail.com

Firma: _____

2.3.2. Investigador asociado principal

Nombre: Dra. Grace Johanna Salazar Tamayo

Cargo: Residente de Infectología. Instituto Nacional de Cancerología. México, D.F.

Correo electrónico: grace.salazar@gmail.com

Firma: _____

2.3.3. Investigadores asociados

Nombre: QFB. Luis Esaú López Jácome

Cargo: Jefe del Laboratorio de Infectología. Instituto Nacional de Rehabilitación. México, D.F.

Correo electrónico: easulopezjacome@hotmail.com

Firma: _____

Nombre: Dra. Dora Patricia Corzo León

Cargo: Médico Adscrito de Infectología. Hospital General Doctor Manuel Gea González.
Secretaría de Salud. México, D.F.

Correo electrónico: cold200781@yahoo.com

Firma: _____

2.4. Sede

Departamento de Infectología. Hospital General Doctor Manuel Gea González.
Laboratorio de Infectología. Instituto Nacional de Rehabilitación.

3. ANTECEDENTES

La mucormicosis es una entidad fúngica, causada por hongos del orden de los mucorales. *Rhizopus spp.* son los causantes más comunes de esta entidad en la población general y en pacientes diabéticos. Estas infecciones usualmente afectan a pacientes inmunocomprometidos por neutropenia, malignidades hematológicas, uso de cortico esteroide, uso de deferoxamina, consumidores de drogas, diabetes mellitus o trauma, sin embargo, también descritas de forma ocasional en pacientes sin aparente alteración inmune a diferencia de los hongos filamentosos (1).

La incidencia de mucormicosis ha incrementado debido al aumento de procedimientos terapéuticos que llevan a inmunosupresión en varios campos médicos: reumatológicos, trasplantes, hematológicos, quimioterapia, etc. Esta entidad, sin tratamiento, alcanza 100% de mortalidad. Gracias al tratamiento antifúngico y el desbridamiento quirúrgico esta tasa de mortalidad ha mejorado, sin embargo, aún se mantiene en alrededor de 50% (2). Además, mucormicosis se asocia con una elevada morbilidad debido a la alteración anatómica que deja como secuela en la mayoría de los casos.

Esta patología se presenta en pacientes alrededor de 40 años de edad, pero puede presentarse en aquellos entre 5 y 80 años. La comorbilidad de base más reportada es diabetes mellitus. El número de casos y la tasa de mortalidad en pacientes con diabetes han incrementado a nivel mundial (3). Treinta a 52% de casos de mucormicosis se relacionan con diabetes mellitus, en estos casos se reporta una tasa de mortalidad de 32 a 57% (4, 5). El riesgo incrementado de desarrollar esta infección fúngica invasiva se asocia comúnmente con diabetes no controlada, 80% de estos casos a diabetes mellitus tipo dos y el 20% a diabetes tipo uno. En este grupo hasta un 34% de pacientes presentan mucormicosis en un cuadro de debut diabético con cetoacidosis diabética documentada (6, 3).

Luego del primer caso de mucormicosis reportado en 1885 los esfuerzos por conocer más sobre esta entidad se han incrementado con el afán de limitar su frecuencia dada su repercusión y el tipo de población afectada; la cual ha incrementado por la mejoría de la sobrevida gracias al adelanto que ha tenido el abordaje y tratamiento de pacientes con cáncer. Varias preguntas quedan aún por responder en cuanto al papel de las comorbilidades en la mucormicosis en especial de la diabetes, la hiperglicemia, el control glicémico, la cetoacidosis en estos pacientes y su relevancia en el manejo de

esta entidad fúngica. Esto ha llevado a revisiones fisiopatológicas importantes para dilucidar el porqué de esta predisposición.

La diabetes es la octava causa de muerte a nivel mundial. En México tiene una prevalencia del 11% de la población y más del 75% de los casos no tienen control de la misma. Esto objetiva la presencia de un grupo importante de riesgo en nuestra población.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Factores patogénicos propios de *Rhizopus spp.* en diabetes mellitus

La angiainvasión es el sello característico de la mucormicosis. Para que ésta se produzca se ha determinado la existencia de las proteínas homologas de la capa de la espora de los mucorales (CotH) que actúan como ligando de algunos receptores proteínicos de glucosa en especial de la GRP78. La proteína homóloga de la capa de la espora está presente en los mucorales patógenos y ausente en los no patógenos lo que clínicamente se traduce en mayor patogenicidad. Se han descrito 4 tipos de proteínas CotH: 1, 2, 3, y 4. La 3 y 4 tienen más del 40% de similitud estructural y son las que determinan virulencia, mientras que la proteína 2 está presente en agentes no patógenos (7).

4.2. Defensa del huésped normal en la patogenicia

La exposición a esporas por inhalación en personas inmunocompetentes no resulta en el desarrollo de mucormicosis. Los macrófagos alveolares en este caso son capaces de fagocitar las esporas e inhabilitarlas para la gemación pero su actividad fungicida es limitada (8, 9). Posterior a este contacto cuando algunas esporas evaden la actividad macrofágica e inician su germinación hacia la forma micelial también los neutrófilos polimorfonucleares junto con los monocitos atraídos por quimiotaxis son la segunda barrera de la inmunidad contra el agente agresor. En este caso la inmunidad celular no tiene un lugar importante en el control de la enfermedad fúngica (3).

Junto con la inmunidad innata, las plaquetas también juegan un papel agresor contra los mucorales, su gemación e hifas producidas ya que reducen su crecimiento por su capacidad de obstaculizar su proceso reproductivo y su desarrollo (10).

El papel del suero humano normal juega un rol importante en la contención de la enfermedad ya que se ha observado que *R. oryzae* requiere hierro para su desarrollo el cual puede adquirirlo del medio externo en este caso el suero humano. Esta adquisición se ve limitada por la fuerte unión de hierro a la proteína transportadora de hierro, transferrina, que evita la adquisición de este elemento por el hongo (3).

De esta manera solo en casos esporádicos en pacientes inmunocompetentes se ha observado el desarrollo de mucormicosis.

4.3. Inmunidad innata en el diabético. Rol de la hiperglicemia y cetoacidosis

Se ha observado que los pacientes que tienen alteraciones o déficit en la fagocitosis o inmunidad innata tienen mayor riesgo de mucormicosis a diferencia de los pacientes con HIV con deficiencia celular en los que se ha observado que el riesgo no incrementa, lo que indica que los neutrófilos polimorfonucleares, los macrófagos, y no las células T inhiben la proliferación fúngica como se ha detallado en el control de la mucormicosis en inmunidad normal.

En hiperglicemia y acidosis se ha observado alteración de la fagocitosis y quimiotaxis con defectos de la muerte intracelular por vías oxidativa y no oxidativa (11).

Se ha observado que los macrófagos alveolares de ratones inmunosuprimidos son incapaces de prevenir la germinación de las esporangioportas in vitro o después de infección intranasal (9).

En general las alteraciones de la inmunidad innata que ocurren en el contexto de hiperglicemia son significativas y han sido reportadas por numerosos autores. Delamaire et al. y Nowat et al. reportaron alteraciones cualitativas de los polimorfonucleares en suero de pacientes diabéticos. Describieron alteraciones de la quimiotaxis de células blancas de pacientes con hiperglicemia. Observaron el restablecimiento de la misma al añadir a dichos sueros glucosa más insulina. Esto se produjo por la oferta de glicemia en el medio y su factible internalización al intracelular con insulina disponible lo que le permitió al polimorfonuclear su activación energética y consiguiente movilidad. No se observó la misma respuesta en los sueros suplementados solo con glucosa o solo con insulina (12,13).

Otras alteraciones reportadas son alteraciones de la adherencia de células de la inmunidad innata. Aunque se han publicado resultados discordantes in vitro en pacientes diabéticos y no siempre se las ha correlacionado con niveles elevados de glicemia y hemoglobina glicosilada. Bagdade et al. reportaron en un número pequeño de pacientes diabéticos tipo 1 y 2 no tratados la disminución de la adherencia de polimorfonucleares a columnas de fibras de nylon la cual incrementó luego de la corrección de la hiperglicemia (14).

En cuanto a la capacidad de fagocitosis se ha observado que puede estar alterada en pacientes diabéticos no controlados, y normal en pacientes que tienen mejores controles

de hemoglobina glicosilada. Se ha mostrado incluso relaciones inversas entre hemoglobina glicosilada y tasa de fagocitosis la cual se corregía con el efecto de la normoglicemia mantenida más de 36 horas aunque no volvía a ser semejante que el control normal (15, 16, 17).

Por último el hierro en la patogenia de enfermedades infecciosas cumple un rol importante. Es de uso común por varios microorganismos incluidos los hongos dentro de su metabolismo, en su crecimiento y replicación. Usualmente el hierro en suero se encuentra unido a proteínas plasmáticas sobretodo transferrina lo que permite baja o nula utilidad de este por los microorganismos. Alteraciones de esta homeostasis pueden favorecer la disponibilidad de hierro para el patógeno. Esto puede ocurrir en variaciones de pH sobre todo en la acidosis. A menor nivel de pH se favorece la disociación entre hierro y ferritina (18).

4.4. Otras comorbilidades que podrían afectar a la mucormicosis

La gran mayoría de pacientes diabéticos tienen comorbilidades metabólicas y tienen indicación de uso de estatinas. En relación a estos medicamentos se ha observado que tienen varias actividades que no se relacionan solamente a la inhibición de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A. Estudios con agentes micóticos han observado que tienen actividad antifúngica in vitro contra levaduras no patógenas así como levaduras patógenas con *Candida spp.* y *Cryptococcus neoformans*. Chin et al. demostraron que la MIC in vitro a *Candida spp.* y *Criptococcus neoformans* se reducía por una actividad sinérgica entre azoles: fluconazol e itraconazol, más fluvastatina (19).

Otros estudios han observado además que esta actividad sinérgica contra *Candida spp.*, actividad contra levaduras no patógenas (20).

En relación a mucormicosis se ha evaluado la actividad de estos fármacos en Zygomycetos. Chamilos et al. Observaron efecto in vitro de lovastatina contra siete aislados de Zygomycetos observando actividad antifúngica independiente y sinérgica con voriconazol contra las cepas estudiadas (21).

4.5. *Rhizopus spp.* en la patogenia de la enfermedad en el diabético

Rhizopus spp. es el agente etiológico más frecuente de mucormicosis y pacientes diabéticos. La exposición a esporas en estos pacientes y aquellos con uso de

corticoesteroides resulta en el desarrollo de mucormicosis ya que, como se ha mencionado, el principal mecanismo de contención es la inmunidad innata que se encuentra alterada en estos pacientes. En estas condiciones, los macrófagos alveolares no son capaces de fagocitar las esporas e inhabilitarlas para la gemación (22, 8, 9). Al ser esta habilidad limitada por déficit de fagocitosis, quimiotaxis etc., las esporas libres inician su germinación a la forma micelial y son los neutrófilos polimorfonucleares junto con los monocitos atraídos por la débil quimiotaxis los que actúan conteniendo la gemación del hongo. Este efecto está claramente limitado por falta de adherencia de los neutrófilos polimorfonucleares (3). Las plaquetas que de forma indirecta juegan un rol importante en el control de la enfermedad por mucorales también se encuentran alteradas en pacientes diabéticos ya que presentan modificaciones en la membrana y alteraciones del metabolismo del óxido nítrico el cual es el principal estímulo para movilidad y adherencia. (23)

El hierro puede jugar un rol importante en la patogénesis de la mucormicosis. *R. oryzae* crece poco en suero humano a menos que este suplementado con hierro y en pacientes diabéticos y con cetoacidosis se ha observado que tienen mayor cantidad de hierro libre con niveles de pH de acidosis no a más de 7,4. Esto sucede por el pH en acidosis (1).

Además la sobreexpresión de proteínas ligadoras que permiten la unión del hongo a células de forma directa se han identificado en pacientes diabéticos. Se ha identificado la proteína reguladora de glucosa GRP78 como mediadora de la penetración y daño endotelial por mucorales. Conocida también como BiP/HSPA5 es una proteína celular inducida por inanición de glucosa. Esta proteína es principalmente una chaperona incluida en muchos procesos celulares. Se reporta en estudios la translocación de la fracción GRP78 a la superficie celular en una variedad de células que en ratón experimental se ha observado mayor expresión a nivel pulmonar y de la mucosa de senos paranasales en presencia de niveles o concentraciones elevadas de glucosa y hierro libre como en el estado de cetoacidosis resultando en la expresión, unión y penetración endotelial por mucorales (24).

Existe por tanto una serie de factores fisiopatológicos que sustentan la característica predisposición de los pacientes diabéticos al desarrollo de mucormicosis por tanto el control glicémico, y su mejor marcador la hemoglobina glicosilada, podría incidir en el desarrollo micótico.

4.6. Antecedentes de las mediciones in vitro de crecimiento de mucorales y antecedentes del procedimiento

La determinación de crecimiento micótica se encuentra estandarizada en la norma M38 A del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). En esta guía los procedimientos son claros en cuanto a utilización de cepas, procedimientos, medios y diluciones para medición de susceptibilidad micótica (27). Estos ordenamientos se han aplicado a observaciones de crecimiento con varias sustancias inhibitorias y suplementarias realizando procedimientos modificados a la norma de CLSI (30, 31).

Algunos ejemplos tenemos en los siguientes trabajos reportados. Lewis et al. describieron el efecto de deferasirox en mucorales modificando la norma CLSI suplementando el medio usado con glucosa al 2%.

En cuanto al tiempo de crecimiento y evaluación la mayoría de autores que ha realizado evaluación de crecimiento micótico realiza sus observaciones en un plazo de crecimiento en placa SDA de 48 horas a temperatura de 30 grados ya que es un microorganismo de crecimiento rápido 24 a 26 horas. CLSI recomienda para hongos filamentosos que incluye *Rhizopus* spp. incubación de 7 días en SDA a 30 – 35 grados Celsius de temperatura (27).

Para la observación se ha realizado tanto métodos directos como indirectos. Se ha reportado la observación directa con microscopía de la cantidad de hifas y conidias así como medición de colonias macroscópica. Dolatabadi midió en su trabajo los diámetros en sus colonias dos veces al día por 3 días en un experimento de nomenclatura de mucorales (31). Lewis reporto la inhibición a través del contaje de conidias luego de lavado en solución salina y medición por fotocromografía (32).

También se tienen datos sobre la estabilidad de los mucorales a diversas temperaturas. Partida et al. cultivaron sus cepas de *Rhizopus microsporus* en agar dextrosa sabouraud (SDA) por 6 días y posteriormente preservaron los micelios en tubos estériles por dos días a menos 80 grados sin que esto interfiera en el desarrollo micótico. También cultivaron sus cepas para observación en SDA a diversas temperaturas. En todas las placas se obtuvieron crecimientos (33).

Para el procedimiento de contaje y evaluación de crecimiento CSLI recomienda medición por densidad óptica cada densidad obtenida por Mc Farland corresponde a un

determinado número de unidades formadoras de colonias para *Rhizopus spp.* (27). Petraitis et al. evaluaron diferentes porcentajes de germinación de esporangiosporas luego de lavado mediante conteo con hemocitómetro. Luego de crecimiento en SDA de diferentes concentraciones cada hora obtuvieron una alícuota similar para evaluar el porcentaje de germinación de un total de 100 esporangiosporas evaluadas para comparar la patogenicidad de *Cunninghamella bertholletiae* versus *R. oryzae*.

Como se ha detallado no existe por tanto una guía estandarizada para realización de crecimiento y suplementación micótica, sin embargo en base a las guías de la CLSI se realizará un procedimiento modificado que será aplicado en este estudio y descrito posteriormente.

4.7. Estabilidad de la hemoglobina glicosilada

La hemoglobina glicosilada (HbA1c) es el biomarcador recomendado para evaluar el control glicémico y predicción de complicaciones vasculares en pacientes diabéticos. Como la cantidad de HbA1c está estrictamente relacionada a las concentraciones de glucosa la American Diabetes Association (ADA) ha recomendado su uso para diagnóstico y seguimiento de pacientes diabéticos.

Este biomarcador se forma con la glicosilación de eritrocitos los cuales in vivo tiene una vida media de 120 días Conforme maduran esta glicosilación es irreversible. La ADA determina que un paciente diabético tiene adecuado control cuando tiene mediciones de hemoglobina glicosilada menores a 7% bajo tratamiento, control moderado hasta 9% y descontrol glicémico mayor de 9%. Estudios han reportado bajos porcentajes de variabilidad biológica y poca variabilidad con los diferentes métodos de laboratorio usados (25). Si se ha descrito un porcentaje mayor de variabilidad en pacientes con anemia severa además de pacientes transfundidos (33, 28).

La estabilidad de esta molécula en congelación también ha sido valorada. Duck, Lee y D Alessio evaluaron y determinaron la estabilidad de la hemoglobina glicosilada luego de congelación hasta por 18 meses posteriores a uso de muestras en banco de sangre. Varios estudios posteriores a este en los que se ha usado hemoglobina glicosilada han captado muestras y las han preservado en congelación para realización de sus procedimientos sin variaciones en sus valores (28, 29).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se conoce que el descontrol glicémico es uno de los principales factores de riesgo de los pacientes diabéticos para desarrollo de la mucormicosis por diferentes efectos celulares en la inmunidad celular. Sin embargo no se ha corroborado *in vitro* el efecto de los diferentes valores de hemoglobina glicosilada en el desarrollo de este agente.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la hemoglobina glicosilada como marcador de control glicémico sobre la proliferación in vitro de *Rhizopus oryzae* en diferentes grupos de pacientes diabéticos y pacientes no diabéticos?

7. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es la comorbilidad más frecuente asociada con mucormicosis y ambas tienen una elevada mortalidad lo que justifica realizar estudios que contribuyan con el entendimiento de estas dos patologías. Por otro lado no se conoce con claridad el efecto del control glicémico crónico representado en la hemoglobina glicosilada en la evolución de la mucormicosis in vivo y tampoco in vitro, es claro controlar la enfermedad de base como pilar del tratamiento de la mucormicosis pero en el caso de los pacientes diabéticos se desconoce el tiempo de control. Entender este hecho fisiopatológico puede aclarar dudas sobre la importancia del control glicémico en estos pacientes. Varios reportes han expuesto claramente la relación fisiopatológica y bioquímica entre el agente causal de la mucormicosis y el receptor diabético a través de receptores de internalización y unión de mucorales, factores de virulencia propios del huésped, alteraciones de la inmunidad innata, deterioro de la fagocitosis, quimiotaxis etc. (1, 2, 3, 7, 9, 10, 12), sin embargo el crecimiento de mucorales in vitro suplementado con sangre de pacientes diabéticos no se ha realizado en el afán de objetivar que el medio de descontrol glicémico, objetivado a través del valor de hemoglobina glicosilada, favorece al desarrollo de este patógeno.

8. HIPOTESIS

La proliferación de *R. oryzae* medida en crecimiento, filamentación y germinación/conidiación es mayor en presencia de sangre total de pacientes con descontrol glicémico (medido en diferentes valores de hemoglobina glicosilada) que en sangre total de pacientes diabéticos controlados y sangre total de pacientes no diabéticos.

9. OBJETIVOS

9.1. General

Observar el efecto de la hemoglobina glicosilada como marcador de control glicémico sobre la proliferación in vitro de *Rhizopus oryzae* en diferentes grupos de pacientes diabéticos y pacientes no diabéticos.

9.2. Específicos

- Comparar la tasa de proliferación de *R. oryzae*, medida como crecimiento, filamentación y germinación/conidiación, en presencia de sangre total de pacientes diabéticos en diferentes niveles de control glucémico, usando como marcador de control la hemoglobina glicosilada.
- Comparar la tasa de proliferación de *R. oryzae*, medida como crecimiento, filamentación y germinación/conidiación, en presencia de sangre total de pacientes diabéticos en diferentes, usando como marcador de control la hemoglobina glicosilada y en individuos sin diabetes mellitus.

10. DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental

11. METODOLOGÍA

11.1. Universo de estudio: pacientes que se realizarán análisis de laboratorio en el Hospital Manuel Gea González.

Población de estudio: la población de estudio será dividida en los siguientes grupos:

Grupo A: pacientes que acudan a toma de muestra en laboratorio clínico que no tengan diabetes mellitus, mayores de 18 años sanos y firmen el consentimiento informado.

Grupo B: pacientes mayores de 18 años con diabetes mellitus en control glicémico con hemoglobina glicosilada menos o igual de 7%.

Grupo C: pacientes mayores de 18 años con diabetes mellitus y descontrol glicémico con hemoglobina glicosilada entre 7,1 y 8,9%.

Grupo D: pacientes mayores de 18 años con diabetes mellitus y descontrol glicémico con hemoglobina glicosilada mayor o igual a 9%

Grupo E: pacientes mayores de 18 años con cetoacidosis diabética.

Se incluye en la población de estudio a la cepa de *R. oryzae* obtenida de aislamiento clínico, identificada morfológicamente y realizada secuenciación.

11.2. Tamaño de la muestra.

El estudio es exploratorio. El universo de estudio será por conveniencia. Se seleccionaran 100 individuos para ser clasificados en los diferentes grupos de estudio (20 por cada grupo) de la siguiente forma: pacientes sin diabetes mellitus, pacientes con diabetes mellitus en buen control glicémico con hemoglobinas glicosiladas menores o iguales a 7%, pacientes con diabetes mellitus con descontrol glicémico en dos grupos: entre 7,1 y 8,9%, más de 9% y, pacientes con cetoacidosis diabética. El equilibrio entre los grupos se mantendrá al conservar la selección estricta de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión además de mantener el mismo número de pacientes por grupo y será valorado en el análisis univariado de datos.

Características del grupo de estudio:

11.3. Criterios de selección: pacientes que acudan a cita programada de laboratorio clínico, o que acudan a urgencias, terapia intensiva y urgencias metabólicas

11.3.1. Criterios de Inclusión.

Grupo A: pacientes que acudan a toma de muestra en laboratorio clínico que no tengan diabetes mellitus, mayores de 18 años sanos y firmen el consentimiento informado.

Grupo B: pacientes mayores de 18 años que firmen el consentimiento informado, con diabetes mellitus y hemoglobina glicosilada menos o igual de 7%.

Grupo C: pacientes mayores de 18 años que firmen el consentimiento informado, con diabetes mellitus y hemoglobina glicosilada entre 7,1 y 8,9%.

Grupo D: pacientes mayores de 18 años que firmen el consentimiento informado, con diabetes mellitus y hemoglobina glicosilada mayor o igual a 9%.

Grupo E: pacientes mayores de 18 años que firmen el consentimiento informado y que tengan diagnóstico actual de cetoacidosis diabética.

11.3.2. Criterios de exclusión.

Grupo A: pacientes con diabetes mellitus, con neutropenia profunda: menos de 500 neutrófilos totales, malignidad hematológica o sólida, con falla renal establecida con creatinina mayor de 1,3 mg/dl o en tratamiento sustitutivo renal, uso de antibióticos o antifúngicos reportados hasta un mes previo a la toma de muestra, hemoglobina menor de 9 g/dl, transfusión en los últimos 3 meses.

Grupo B: pacientes con neutropenia profunda: menos de 500 neutrófilos totales, malignidad hematológica o sólida, falla renal establecida con creatinina mayor de 1,3 mg/dl o en tratamiento sustitutivo renal, uso de antibióticos o antifúngicos reportados en el pedido de laboratorio, hemoglobina menor de 9 g/dl, transfusión en los últimos 3 meses.

Grupo C: pacientes con neutropenia profunda: menos de 500 neutrófilos totales, malignidad hematológica o sólida, falla renal establecida con creatinina mayor de 1,3 mg/dl o en tratamiento sustitutivo renal, uso de antibióticos o antifúngicos reportados en el pedido de laboratorio, hemoglobina menor de 9 g/dl, transfusión en los últimos 3 meses.

Grupo D: pacientes con neutropenia profunda: menos de 500 neutrófilos totales, malignidad hematológica o sólida, falla renal establecida con creatinina mayor de 1,3 mg/dl o en tratamiento sustitutivo renal, uso de antibióticos o antifúngicos reportados en el pedido de laboratorio, hemoglobina menor de 9 g/dl, transfusión en los últimos 3 meses.

Grupo E: pacientes con neutropenia profunda: menos de 500 neutrófilos totales, malignidad hematológica o sólida, falla renal establecida con creatinina mayor de 1,3 mg/dl o en tratamiento sustitutivo renal, uso de antibióticos o antifúngicos reportados en el pedido de laboratorio, hemoglobina menor de 9 g/dl, transfusión en los últimos 3 meses.

11.3.3 Criterios de eliminación.

Ninguno

11.4. Definición de variables

Variable	Tipo	Escala
Hemoglobina glicosilada	Cualitativa ordinal	Grupo A Sanos Grupo B Diabetes mellitus <7% Grupo C Diabetes mellitus 7,1 – 8,9% Grupo D Diabetes mellitus >9% Grupo E Cetoacidosis diabética
Crecimiento	Cuantitativa discreta	Milímetros
Filamentación	Cualitativa ordinal	+ Poca filamentación ++ Filamentación moderada +++ Filamentación abundante ++++ Muy Abundante, no es posible identificar hifas
Conidiación	Cuantitativa continua	Densidad óptica
Glucosa	Cuantitativa continua	mg/dl
Sodio	Cuantitativa discreta	mmol/L
Hierro	Cuantitativa continua	mg/dl

11.4.1 Descripción de cada variable

Variable	Definición
Hemoglobina glicosilada	Valor asignado a la medición obtenida en laboratorio en tubo con EDTA por cromatografía
Crecimiento de <i>R. oryzae</i>	Medición de colonia en tamaño por milímetros a las 3, 6, 12 y 24 horas de crecimiento
Conidiación de <i>R. oryzae</i>	Medición por espectrofotometría a la hora, 3, 6, 12 y 24 horas de las diferentes siembras
Filamentación de <i>R. oryzae</i>	Medición duplicación a la hora, 3, 6, 12 y 24 horas de las diferentes siembras
Glucosa	Valor asignada a la medición obtenida en laboratorio en suero de glicemia en la muestra de sangre para el estudio medida en mg/dl
Sodio	Valor asignado a la medición obtenida en laboratorio en suero de sodio en la muestra de sangre para el estudio medida en mmol/l
Hierro	Valor asignado a la medición obtenida en laboratorio en suero de hierro en la muestra de sangre para el estudio medida en mg/dl

11.5. Descripción de procedimientos.

11.5.1. Obtención de las muestras

De 1505 sujetos que acudieron a laboratorio clínico en el periodo de junio a agosto de 2015 para venopunción se seleccionaron 65 con diabetes mellitus y 30 sin diabetes mellitus.

Se obtuvieron dos muestras de sangre por cada paciente: una en tubo BD Vacutainer con EDTA-K2® que contiene 1,2 – 2mg de EDTA por mililitro (ml) de sangre para un total de 4ml. de contenido y, la segunda muestra de 4 ml en tubo sin EDTA BD Vacutainer®. Luego de la obtención de las muestras, ambos tubos fueron procesados por lisis; primero de forma mecánica por un total de 5 minutos en agitador tipo vórtex y, segundo por congelación al ser preservadas hasta la realización del experimento a temperatura -70°C en ultracongelador.

11.5.2. Cepa de estudio

Se utilizó una cepa de *R. oryzae* obtenida de un aislamiento clínico, la cual fue identificada fenotípica y por genotipificación. Fue conservada a -70 grados hasta la realización del estudio.

11.5.3. Preparación del inóculo

La cepa de *R. oryzae* fue propagada en agar dextrosa Sabouraud (SDA) e incubada por 5 días a 30°C. Se realizó raspado al cultivo con un hisopo estéril para preparar un inóculo denso en tubos cónicos de 15 ml por caja SDA. Los inóculos se sedimentaron por periodo de 1 hora. Se tomó el sobrenadante y se ajustó al 0,5 de McFarland de conidias de *R. oryzae* equivalente a una concentración conocida de 1×10^5 conidias/ml. Este procedimiento fue realizado con base en las indicaciones referidas en la guía internacional CLSI - M08 para la preparación de inóculos para realizar pruebas de susceptibilidad (14). Los inóculos preparados fueron preservados en ultracongelación a -70°C hasta su ulterior utilización experimental.

11.5.4. Preparación de la muestra para evaluación y observación de crecimiento

Se realizaron dos mezclas para cada paciente: 1) 0,5 ml. del inóculo con 0,5 ml. de sangre con EDTA y, 2) 0,5 ml. de inóculo con 0,5 ml. de sangre sin EDTA. Fueron incubadas a 30°C durante todo el experimento y fueron procesadas por duplicado.

Se evaluó en cada mezcla el crecimiento de *R. oryzae* por: 1) conteo de número de conidias y porcentaje de gemación, 2) producción de hifas o filamentación y 3) crecimiento en placa SDA.

El conteo de conidias se realizó en cámara de Neubauer obteniendo el número de conidias por 1 uml. Del total de conidias contadas se separaron las conidias en gemación obteniendo así un porcentaje en relación al total de conidias.

Para valorar la cantidad de hifas o filamentación se colocó una cantidad de 10 uml. de la muestra en portaobjetos con KOH. La evaluación se realizó con observación y conteo directo en escala calificada por el observador de la siguiente forma: 0 correspondiente a ausencia de hifas; 1 correspondiente a una cantidad de 1 a 100 hifas por 100 campos observados; 2 correspondiente a un conteo de 101 a 200 hifas por 100 campos observados; 3 correspondiente a una cantidad de 201 o más hifas por 100 campos observados.

Todas las evaluaciones se realizaron al tiempo cero, 3, 6, 12 y 24 horas (hrs) de incubación. La estimación de crecimiento en placa SDA se realizó midiendo en milímetros el crecimiento de *R. oryzae* luego de inocular 10 uml. en el centro de la placa. Esta siembra se realizó después de 12 horas de mantener la mezcla preservada a 30°C.

11.6. Hoja de captura de datos.

Anexo 1.

11.7. Análisis

Se realizó una descripción general del grupo y subgrupos con proporciones y valores de medianas y rangos. Las variables nominales se presentan en proporciones. El conteo de conidias fue reportado y comparado con medianas de conidias por mm³. La gemación se describe en porcentaje en relación a las conidias contadas. Se usaron además las medianas de filamentación en cruces de acuerdo a la observación. El análisis comparativo de conidiación, gemación y filamentación entre todos los grupos se realizó con prueba de Kruskal-Wallis. Se usó la prueba de rangos señalados de U Mann Whitney para el análisis comparativo entre dos grupos pareados. Se utilizó análisis de correlación de Spearman para comparar los grupos pareados. Se consideró un valor de p menor de 0,05 como estadísticamente significativo. Todos los datos se analizaron en el programa SPSS versión 21.

12. RESULTADOS

12.1. Descripción del grupo

Se evaluaron un total de 95 sujetos distribuidos de la siguiente forma: grupo A correspondiente con sujetos sin diabetes mellitus (n=30), grupo B con diabetes mellitus y HbA1c <7% (n=24), en el grupo C sujetos con HbA1c entre 7,1 y 9% (n=20) y grupo D con 21 sujetos con HbA1c >9%.

El total de la cohorte tuvo una mediana de edad de 55 años (mínimo 21 y máximo 92). Del total sesenta y tres sujetos (66,3%) fueron hombres. Veinticinco (26,3%) se encontraban usando estatinas al momento de la venopunción, 7 pacientes (7,3%) tenían obesidad, 24 (25,2%) hipertensión arterial, 5 (5,2%) dislipidemia y 11 (11,5%) hipotiroidismo. Entre otras comorbilidades los pacientes presentaron: enfermedad arterial coronaria en 2 casos, artritis reumatoidea, hepatitis C, fibromialgia y enfermedad por reflujo gastroesofágico en un caso cada una. No hubo diferencias en cuanto a edad, sexo, uso de estatinas y presencia de comorbilidades entre los grupos A, B, C y D. Las características demográficas por grupo se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características demográficas y comorbilidades de los pacientes del grupo de estudio.

	Diabetes mellitus			No diabetes	p ^{**}
	Grupo B*	Grupo C*	Grupo D*	Grupo A*	
Edad (mediana) (valor mínimo y máximo)	55 (30 - 92)	62 (21 - 88)	59 (30 - 85)	50 (26 - 81)	0,45
Masculino N (%)	16 (66,7)	13 (65)	13 (61,9)	21 (70)	0,94
Uso de estatinas N (%)	6 (25)	8 (40)	6 (28,6)	5 (16,7)	0,39
Comorbilidad					
Hipertensión arterial N (%)	7 (29,2)	7 (35)	4 (19)	6 (20)	0,55
Obesidad N (%)	1 (4,2)	1 (5)	1 (4,8)	4 (13,3)	0,51
Dislipidemia N (%)	1 (4,2)	1 (5)	0 (0)	3 (10)	0,46
Hipotiroidismo N (%)	4 (16,7)	0 (0)	1 (4,8)	6 (20)	0,1

* Grupo A: sin diabetes. Grupo B: HbA1c menos o igual a 7%. Grupo C: HbA1c de 7,1 a 9%. Grupo D: HbA1c mayor a 9%.

** Valor de p por prueba de Kruskal Wallis

12.2. Descripción de las características bioquímicas

Los valores bioquímicos obtenidos para cada grupo se muestran en medianas en la tabla 2. No se observaron diferencias entre ningún grupo para los parámetros bioquímicos excepto el esperado para cada grupo en el valor de la hemoglobina glicosilada. Se observaron diferencias entre los grupos de estudio en los valores de creatinina clínicamente no relevantes dado que todos los valores se encuentran dentro de rango normal.

Tabla 2. Medianas de los valores bioquímicos de los pacientes distribuidos en los diferentes grupos.

	Diabetes*			No diabetes	p^{**}
	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo A	
Leucocitos/mm³ (Mediana) (Valor mínimo máximo)	8.000 (660 – 13.400)	7.900 (5.400 – 12.500)	7.000 (4.000 – 10.100)	7.300 (3.000 – 14.400)	0,51
Hemoglobina g/dl (Mediana) (Valor mínimo máximo)	14,05 (11 – 17)	14,7 (12 – 18)	14,6 (11 – 18)	14,8 (10 – 17)	0,31
Plaquetas/mm³ (Mediana) (Valor mínimo máximo)	251.000 (110.000 – 405.000)	217.500 (162.000 – 335.000)	237.500 (116.000 – 470.000)	236.500 (145.000 – 411.000)	0,70
Sodio mg/dl (Mediana) (Valor mínimo máximo)	139 (139 – 139)	135 (135 – 135)	134 (130 – 141)	138 (135 – 140)	0,24
Creatinina mg/dl (Mediana) (Valor mínimo máximo)	0,69 (0,48 – 1,03)	0,87 (0,53 – 1,3)	0,71 (0,53 – 1,21)	0,77 (0,59 – 1,26)	0,01
Glucosa mg/dl (Mediana) (Valor mínimo máximo)	108,5 (69 – 153)	154,5 (94 – 239)	192 (83 – 456)	94 (79 – 104)	0,67
Hemoglobina glicosilada % (Mediana) (Valor mínimo máximo)	6,4 (5,3 – 7)	8 (7,1 – 8,9)	10,8 (9,3 – 15,3)	5,7 (4 – 6,4)	0,00

máximo)					
---------	--	--	--	--	--

* Grupo A: sin diabetes. Grupo B: HbA1c menos o igual a 7%. Grupo C: HbA1c de 7,1 a 9%. Grupo D: HbA1c mayor a 9%.

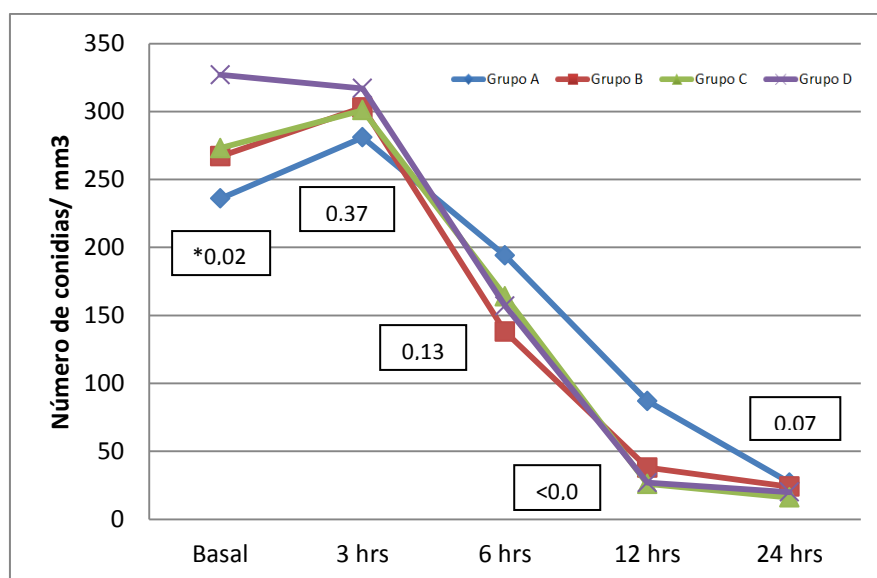
** Valor de p por prueba de Kruskal Wallis

12.3. Primer grupo de experimentos sin EDTA

12.3.1. Conidiación y gemación

La conidiación del primer duplicado de experimentos se muestra en la figura 1. Se puede observar cómo el número de conidias disminuyó súbitamente desde la tercera hora hasta ser muy escaso a la hora 24 para todos los grupos con conteo menor a 25 conidias por mm³. Este patrón fue observado en todos los grupos aunque existieron diferencias significativas en el conteo basal (momento de la inoculación) teniendo mayor contaje de conidias el grupo D en relación al C y B y estos en relación al A. No se observaron diferencias en la hora 3 y 6 del conteo de conidias intergrupo pero si en la hora 12 en la cual el grupo A tuvo mayor número de conidias en relación a B y este en relación al C y D. Esta diferencia numérica se mantuvo hasta la hora 24. Observamos que la disminución del conteo de conidias es inversamente proporcional al incremento de porcentaje de gemación, es decir el contaje de conidias disminuye a medida que estas se transforman en conidias gemantes.

Figura 1. Conidias en número por mm³ en relación al tiempo en horas para el grupo 1 de las observaciones pareadas.



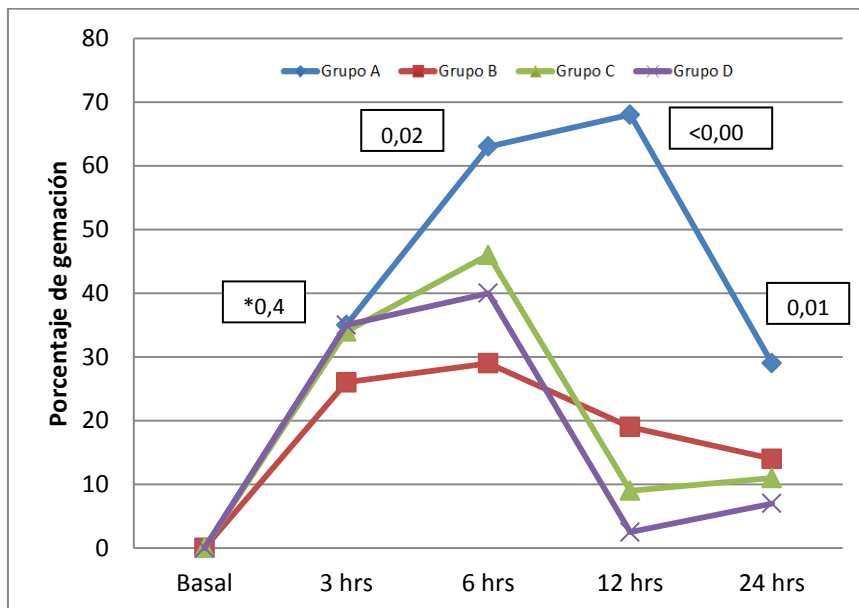
* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

* Grupo A: sin diabetes. Grupo B: HbA1c menos o igual a 7%. Grupo C: HbA1c de 7,1 a 9%. Grupo D: HbA1c mayor a 9%.

** Valor de p por prueba de Kruskal Wallis

Todos los grupos iniciaron su gemación a partir de la hora 3 con porcentajes que no sobrepasaron el 35% e incrementaron progresivamente a la hora 6 y 12 en el grupo A alcanzando un porcentaje de gemación de hasta 68% (Figura 2). A partir de la hora 6 la gemación decrece como se observa en la gráfica hasta la hora 12 para todos los grupos excepto el grupo A el cual tarda en decrecer hasta la hora 24 observándose una curva de evolución retrasada en tiempo de la evolución observada en los grupos restantes (B, C y D). El porcentaje de decremento de hifas fue inversamente proporcional a la presencia de hifas, es decir disminuye el porcentaje de conidias en gemación observadas porque estas se han transformado en hifas. Se observaron diferencias significativas entre los grupos en la gemación desde la hora 6, cuando se nota un porcentaje mayor de gemación para el grupo A (por lo tanto menos hifas) y un menor porcentaje para los grupos restantes siendo más notoria esta diferencia a la hora 12 y a la hora 24 sucesivamente, manteniendo mayor porcentaje de gemación el grupo A en relación al B, este en relación al C y este en relación al D ($p=0,00$ y $p=0,01$).

Figura 2. Porcentaje de gemación del total de número de conidias observadas en relación al tiempo en horas para el grupo 1 de observaciones pareadas.

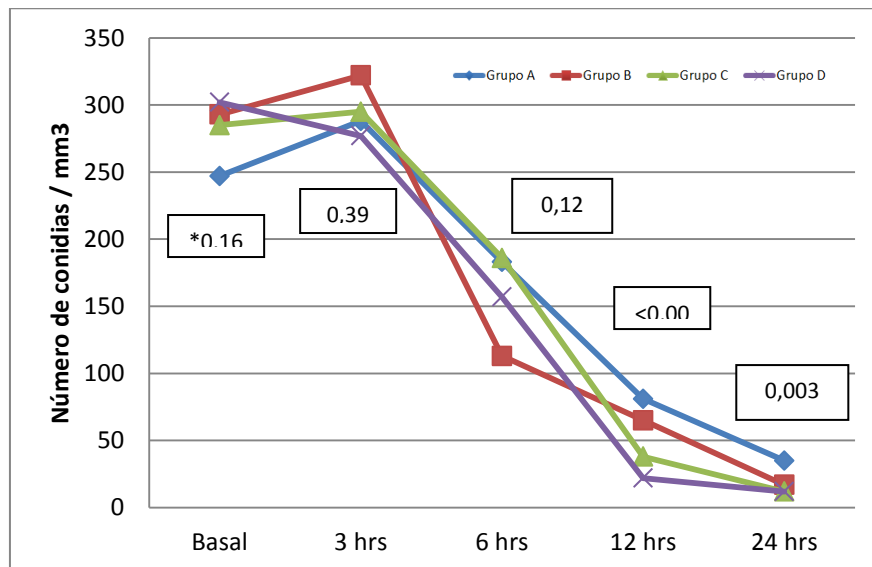


* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

Los experimentos pareados realizados se muestran en las figuras 3 y 4. De forma similar a sus primeros pares las conidias disminuyen súbitamente desde la tercera hora hasta observarse escaso número de conidias a la hora 24 (Figura 3). En este caso no existieron diferencias para el conteo basal y se mantuvieron las diferencias intergrupo observadas en el número de conidias en la hora 12 y en la hora 24 cuando se observó mayor número en el grupo A en relación al B y este en relación al C y D sucesivamente y acorde al incremento de gemación.

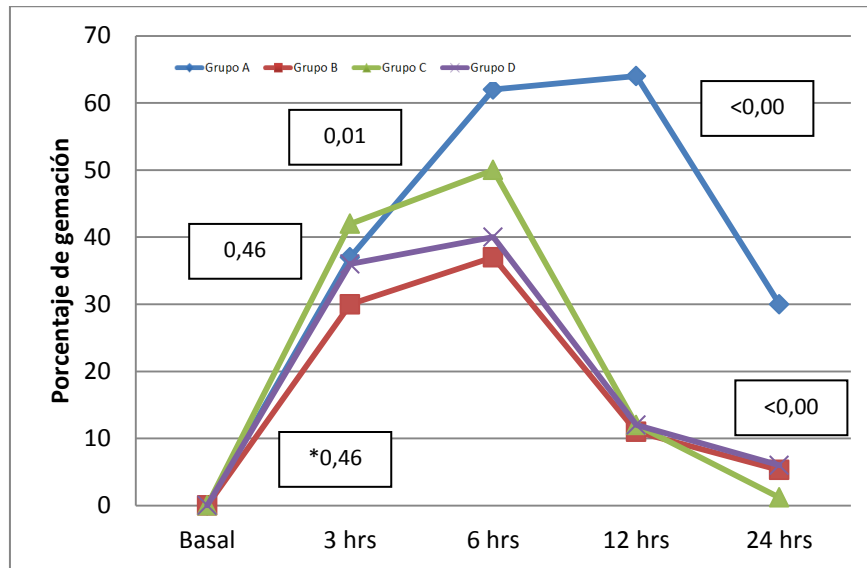
De igual forma la gemación en este grupo pareado se observó a partir de la hora 3 con ascenso hasta la hora 6 luego de lo cual decrece siendo notoria en la hora 12 para todos los grupos excepto para el grupo A que en relación al tiempo parece tener retraso en la evolución de la curva que grafica la gemación de los grupos restantes (Figura 4). También se observaron diferencias significativas intergrupo en la gemación a la hora 6, 12 y 24 cuando se observa un porcentaje de gemación mayor para el grupo A y menor para los grupos restantes B, C y D de forma sucesiva. Es decir en el grupo A se observan conidias en gemación en mayor porcentaje y decae en los restantes sucesivamente ya que estas se han transformado en hifas.

Figura 3. Conidias en número por mm³ en relación al tiempo en horas para el grupo 2 de las observaciones pareadas.



* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

Figura 4. Porcentaje de gemación del total de número de conidias observadas en relación al tiempo en horas para el grupo 2 de observaciones pareadas.

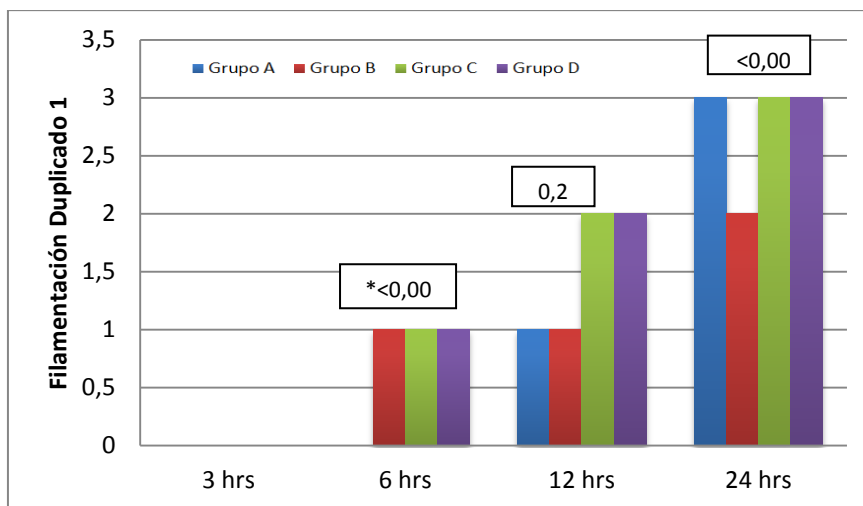


* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

12.3.2. Filamentación

La figura 5 muestra la filamentación del primer grupo pareado en la que se puede observar ausencia de hifas hasta la hora 3. A partir de esta momento se observaron hifas en todas las evaluaciones con notorio incremento en el tiempo para todos los grupos. Se observaron diferencias significativas entre los grupos en la hora 6 entre el grupo A que no presentó filamentación versus los grupos B, C y D. Estas observaciones son concordantes con lo descrito en el proceso de gemación que muestra mayor porcentaje para el grupo A lo que indica menor formación de hifas en este grupo. En la hora 24 la diferencia fue observada con el grupo B que presentó menos filamentación en relación a los grupos A, C y D.

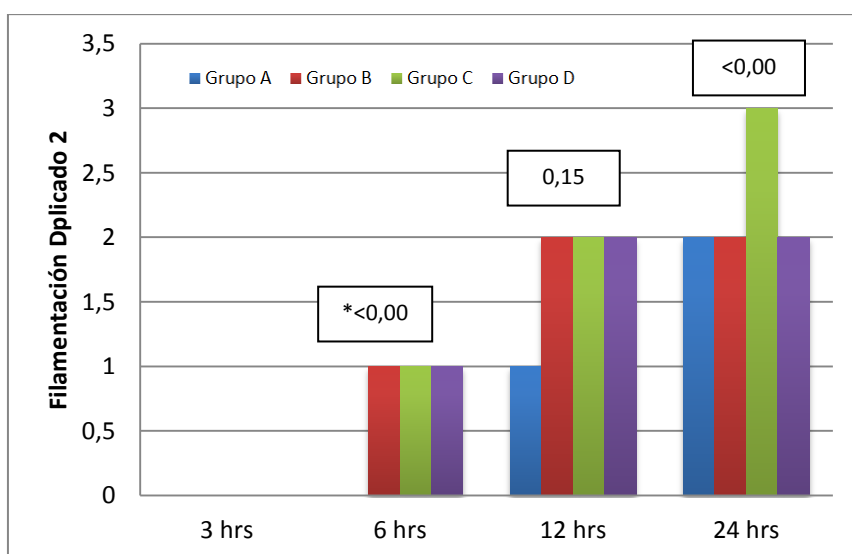
Figura 5. Filamentación observada en escala objetiva (en cruces) en relación al tiempo en horas para el grupo 1 de observaciones pareadas.



* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

En la figura 6 correspondiente al segundo grupo pareado se observan las mismas características de filamentación descritos para el primer grupo. A diferencia de su grupo par a la hora 24 se observó mayor cantidad de hifas en el grupo C en comparación con el grupo A, B y D. Cabe recalcar que en comparación a la gemación se conservaron las mismas relaciones inversas. En general los dos grupos pareados mostraron progresiva y mayor filamentación de acuerdo a su ascenso en descontrol glicémico teniendo como marcador la hemoglobina glicosilada.

Figura 6. Filamentación observada en escala objetiva (en cruces) en relación al tiempo en horas para el grupo 2 de observaciones pareadas.

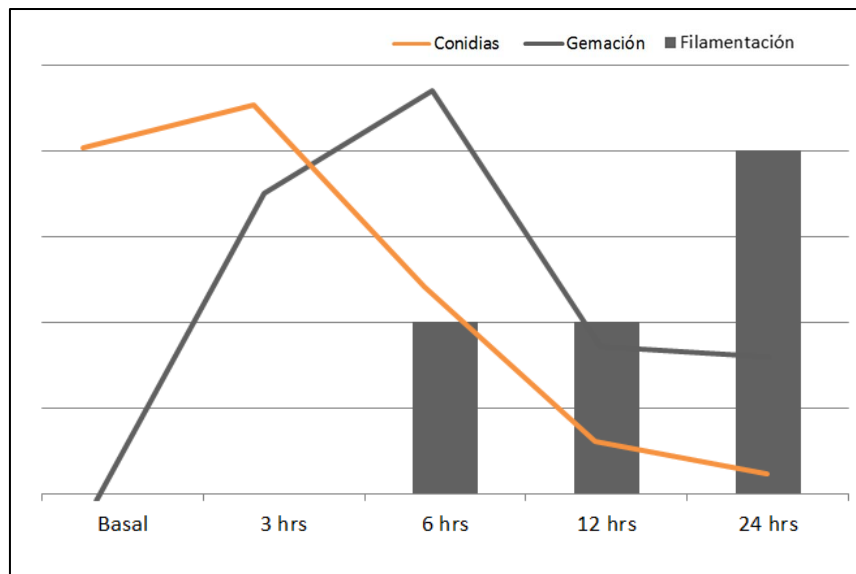


* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

12.3.3. Dinámica entre número de conidias, gemación y filamentación

La dinámica entre número de conidias, gemación y filamentación de *R. oryzae* en sangre para el grupo uno de las observaciones pareadas se muestra en medianas en la gráfica 7. El experimento inicia con determinado número de conidias, cero porcentaje de gemación y ausencia de hifas. A la hora tres se observa un número relativamente igual de conidias algunas de ellas ya en gemación sin embargo aun sin presencia de hifas. A la hora 6, se observa, un decremento del conteo de conidias a expensas de incremento de la gemación y de transformación de estas a hifas. A la hora doce el porcentaje de conidias decrece junto con el porcentaje de gemación ya que el número de hifas se mantiene en incremento y esta misma relación más notoria se observa a la hora 24 en la que predominan las hifas por lo que ya se observan pocas conidias y poca gemación. Este fue el proceso observado en general con las diferencias ya señaladas en ambas observaciones en relación al tiempo con retraso de filamentación en los grupos A, B, C y de forma sucesiva. En las fotos 4, 5, 6 y 7 se muestra la dinámica de desarrollo de los grupos observada por microscopía.

Figura 7. Dinámica entre conidiación, gemación y filamentación para las observaciones pareadas en relación al tiempo de observación.

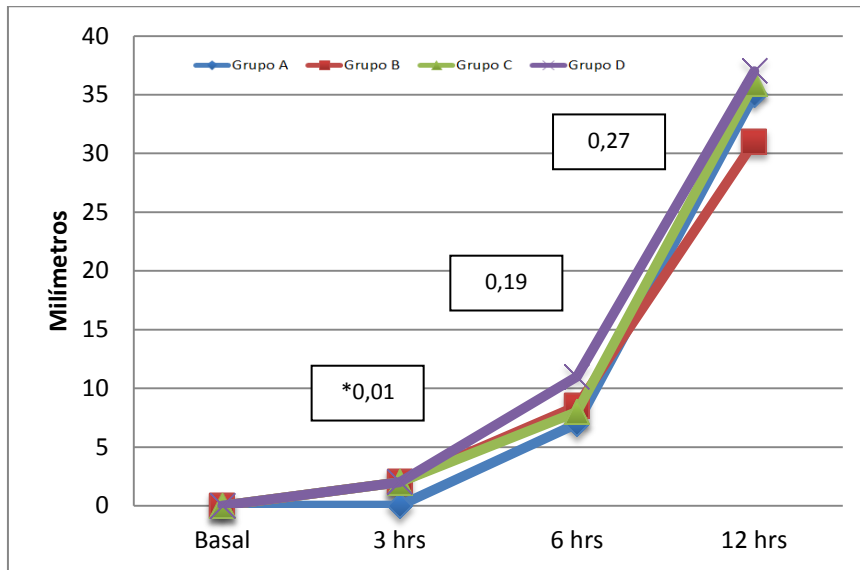


12.3.4. Crecimiento en placa SDA

Las medianas de las observaciones de crecimiento en placa SDA se muestran para los grupos pareados en las figuras 8 y 9. Se observó progresivo crecimiento desde la hora 3 con excepción del grupo A el cual no tuvo desarrollo hasta después de la hora tres con diferencia significativa respecto a los grupos restantes. Para las observaciones a la hora

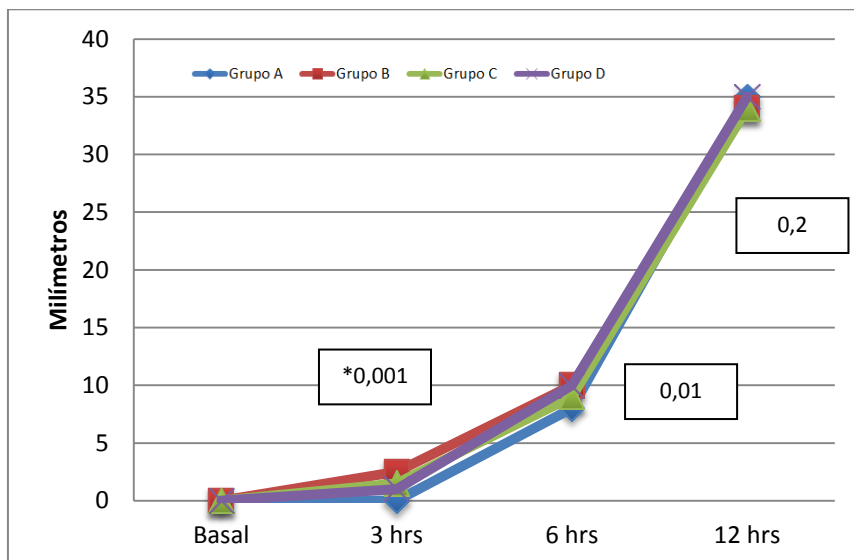
6 y 12 no existieron diferencias y, a la hora 24 el crecimiento fue completo en placa SDA (85mm). Esto evidencia un retraso de crecimiento en placa agar a la hora 3 en el grupo de pacientes sin diabetes mellitus que posteriormente iguala a los grupos restantes.

Figura 8. Crecimiento en milímetros en placa SDA evaluada en relación al tiempo del primer grupo de observaciones pareadas.



* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

Figura 9. Crecimiento en milímetros en placa SDA evaluada en relación al tiempo del segundo grupo de observaciones pareadas.



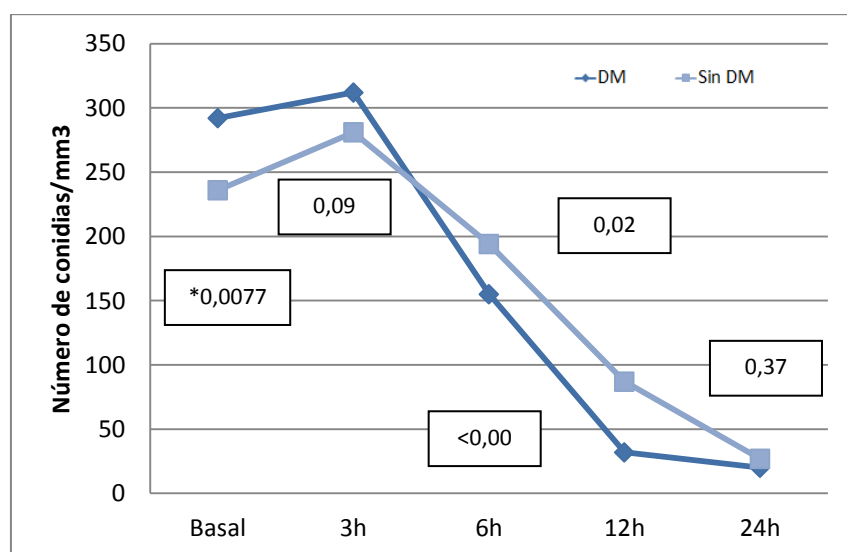
* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

12.4. Comparación entre grupo de diabéticos y no diabéticos

12.4.1. Conidiación y gemación

Las diferencias observadas en los experimentos realizados entre los grupos de pacientes con y sin diabetes mellitus se muestran en las figuras 10 y 11. Hubo una diferencia significativa en el conteo inicial de conidiación estando a favor el número de conidias para el grupo de pacientes diabéticos. De acuerdo a la dinámica esperada se observa un ligero incremento las primeras horas de incubación y cae a partir de la sexta hora siendo mayor para el grupo de pacientes diabéticos de forma similar a lo que se observa a la hora doce. A las 24 horas sin embargo estas diferencias desaparecen entre los grupos con un total de conidiación en los dos grupos que no sobrepasa las 30 conidias/mm.

Figura 10. Conidias en número por mm³ en relación al tiempo en horas para los grupos de pacientes con y sin diabetes mellitus.

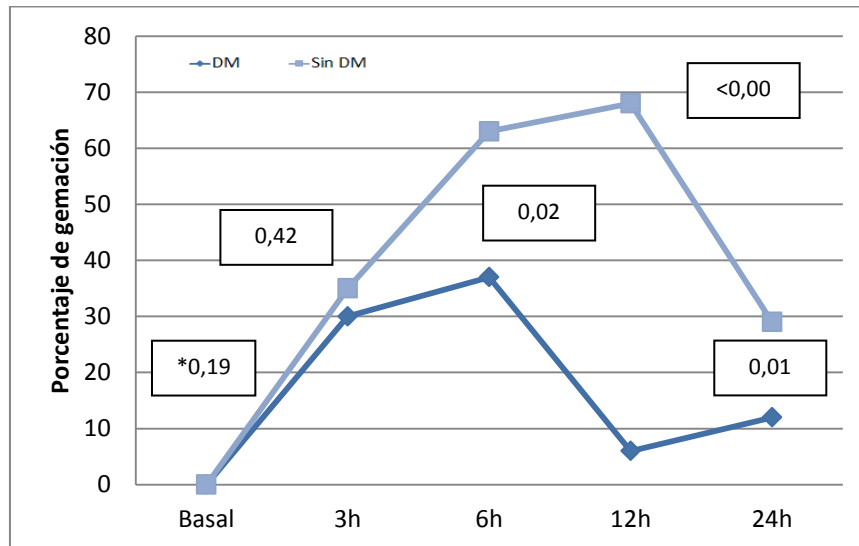


* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

La gemación para los dos grupos fue observada a partir de la hora 3 y durante las 24 horas de observación. Incrementó hasta la hora 6 para los dos grupos aunque con diferencias significativas, observándose menor gemación para el grupo de pacientes diabéticos. A medida que incrementaba la gemación disminuía de forma inversamente proporcional el conteo de conidias de tal manera que, a la hora doce, la gemación decayó de forma importante para el grupo de pacientes diabéticos. El grupo de

pacientes no diabéticos parece tener el mismo decremento pero a partir de la hora 24 existiendo un retraso de la curva esperada en relación al grupo de pacientes diabéticos.

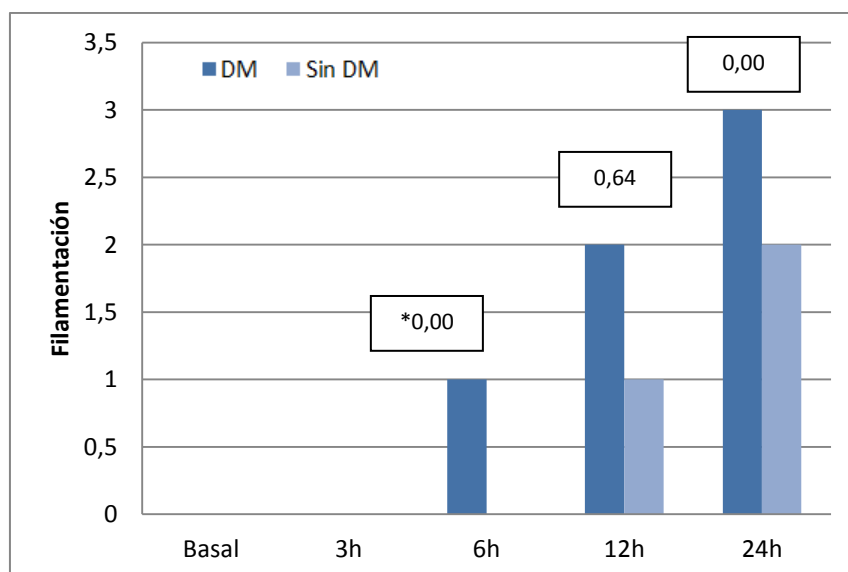
Figura 11. Porcentaje de gemación del total de número de conidias observadas en relación al tiempo en horas para los grupos de pacientes con y sin diabetes mellitus.



* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

12.4.2. Filamentación

Figura 12. Filamentación observada en escala objetiva (en cruces) en relación al tiempo en horas para los grupos de pacientes con y sin diabetes mellitus.

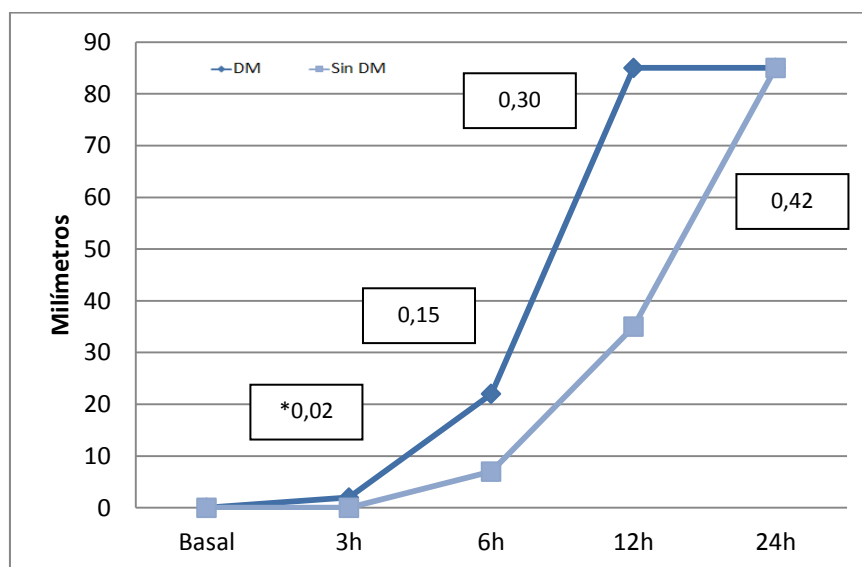


* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

Tanto en los grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos se observó filamentación, sin embargo como se muestra en la gráfica 12, hay un retraso en la formación de hifas en el grupo de pacientes no diabéticos de 6 horas ya que se observa filamentación en este grupo solo a partir de la hora 12. Este fenómeno se presenta de forma similar al retraso de la curva de porcentaje de gemación y el decremento de la curva del número de conidias para los pacientes no diabéticos (figura 10 y 11) por lo tanto, el número de conidias decrece mientras incrementa la gemación y estas a su vez disminuyen cuando se presenta filamentación en la muestra, un proceso que se ve acelerado en sangre de pacientes diabéticos en relación a pacientes no diabéticos.

12.4.3. Crecimiento en placa SDA

Figura 13. Crecimiento en milímetros en placa SDA evaluada en relación al tiempo para los grupos de pacientes con y sin diabetes mellitus.



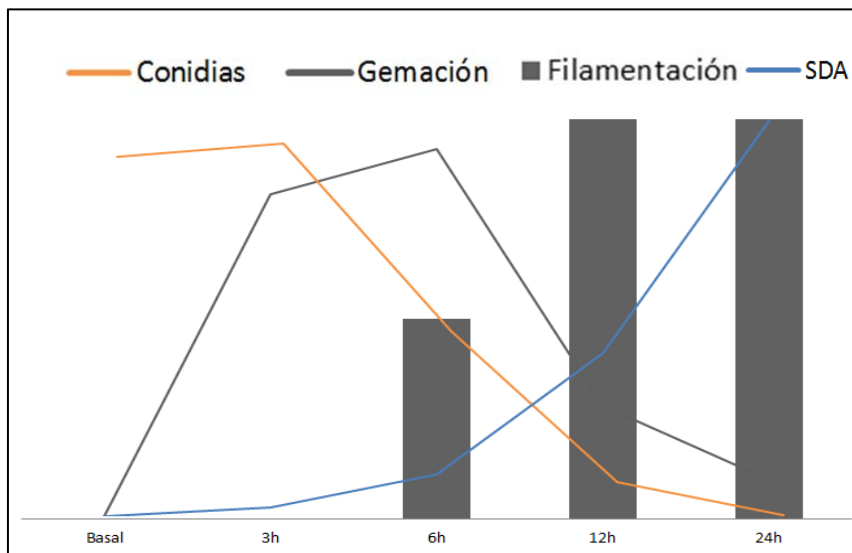
* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

Al comparar el crecimiento en placa SDA se observó una importante diferencia entre los grupos desde la tercera hora. Hay crecimiento rápido en el grupo de pacientes diabéticos en relación a los no diabéticos alcanzando crecimiento completo en placa SDA a partir de la hora doce lo que ocurrió en los pacientes sin diabetes pero solo hasta la hora 24. Las diferencias se muestran con su valor estadístico en el gráfico 13.

Los ensayos de crecimiento realizados en duplicado se muestran en la figura 14 y 15. A diferencia de los experimentos pares al comparar los pacientes con y sin diabetes el

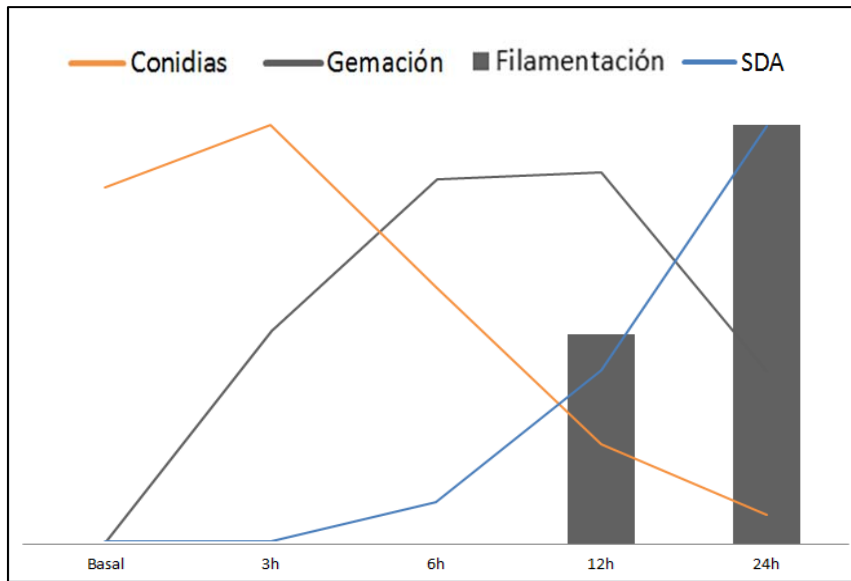
contaje de conidias basal no tuvo diferencias entre los dos grupos ($p=0,05$). Se observaron diferencias en la conidiación a la hora 12 ($p=0,00$) y 24 ($p=0,00$) momentos en los cuales el grupo de pacientes diabéticos tuvo menor número de conidias. Se mantuvieron las diferencias observadas en la gemación con el retraso de la curva descrito para los pacientes sin diabetes y la gemación incrementada con aumento de hifas en el grupo de pacientes con diabetes mellitus. En este caso hubo diferencias significativas para gemación y filamentación a partir de la hora doce ($p=0,00$). De igual forma se observaron diferencias significativas a la tercera hora de crecimiento en placa SDA mostrando crecimiento mayor el grupo de pacientes con diabetes a diferencia de su grupo control ($p=0,01$). Para las siguientes mediciones en el tiempo los experimentos sin diabetes igualaron a los ensayos con sangre de pacientes diabéticos.

Figura 14. Conidiación, gemación, filamentación y crecimiento el placa SDA para el grupo de pacientes con diabetes mellitus segundo grupo pareado.



* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

Figura 15. Conidiación, gemación, filamentación y crecimiento el placa SDA para el grupo de pacientes sin diabetes mellitus segundo grupo pareado.



* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

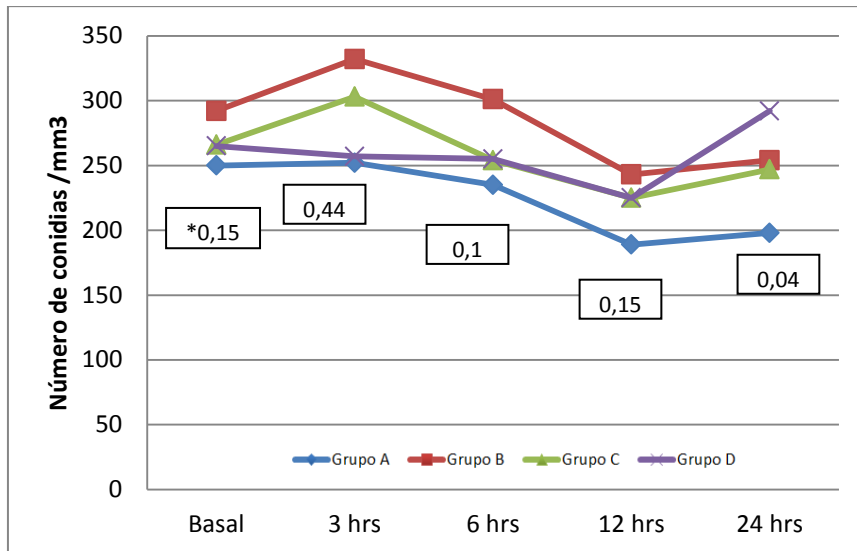
Se realizaron análisis para conidiación, gemación y filamentación para los grupos con uso de estatinas, obesidad e hipertensión sin encontrar diferencias en el desarrollo de *R. oryzae*.

12.5. Experimentos con EDTA

12.5.1. Conidiación y gemación

En los experimentos realizados con EDTA se observó que el número de conidias continuó relativamente estable en todos los grupos desde su conteo basal hasta la hora seis y declinan ligeramente a la hora doce. (Figura 16). No hubo diferencias entre los cuatro grupos para ninguna observación en el tiempo, excepto, en el número de conidias a la hora 24 de incubación en la que se puede observar tendencia a incremento de las mismas en todos los grupos siendo más notoria para el grupo D.

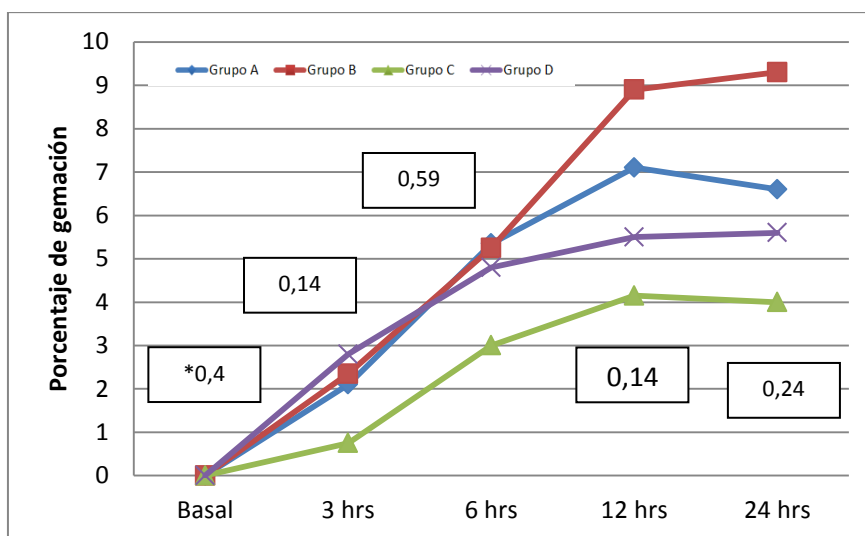
Figura 16. Conidias en número por mm³ en relación al tiempo en horas para el grupo de pacientes sin EDTA.



* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

Se observó conidias gemando a partir de la hora 3 en ascenso hasta la hora 12 a partir de la cual la curva de gemación se mantiene (Figura 17). Este incremento de gemación coincide con el ligero decremento de conidias observadas a la hora 12. Para todas las observaciones con EDTA no hubo diferencias estadísticas y la gemación no sobrepasó el porcentaje de 9,3% observado en el grupo B.

Figura 17. Porcentaje de gemación en relación a las conidias observadas en relación al tiempo en horas para el grupo de pacientes sin EDTA.



* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

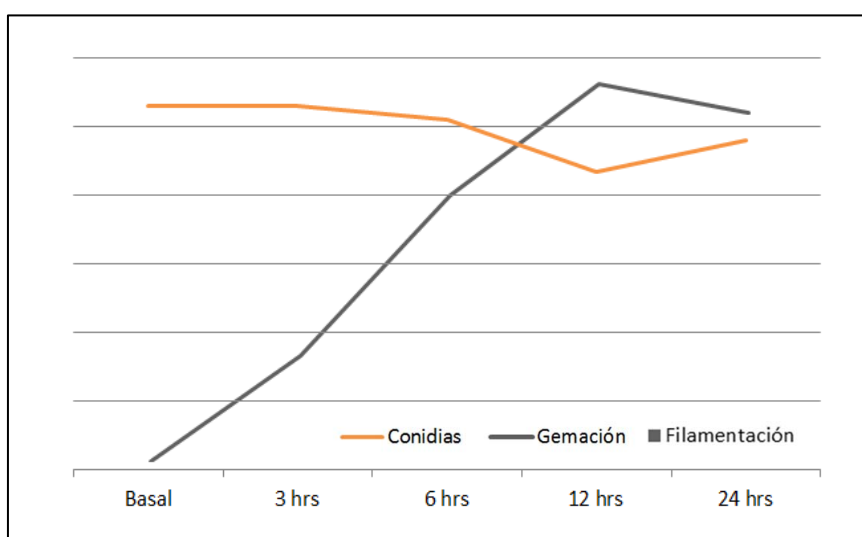
12.5.2. Filamentación

No se observó filamentación en ningún experimento realizado con EDTA a ninguna hora observada hasta la hora 24.

12.5.3. Dinámica entre número de conidias, gemación y filamentación

La dinámica del desarrollo de *R. oryzae* en sangre con EDTA se muestra en la figura 18. La conidiación se mantiene relativamente estable en el tiempo y en el único momento que decae ligeramente se sustituye por un incremento de gemación. Sin embargo la gemación es mínima y no permite que se desarrollen hifas por lo que no son observadas en ningún momento del experimento hasta la hora 24. La foto 8 muestra la dinámica de observaciones para el grupo con EDTA.

Figura 18. Dinámica entre conidiación, gemación y filamentación para las observaciones realizadas con EDTA en relación al tiempo de observación.

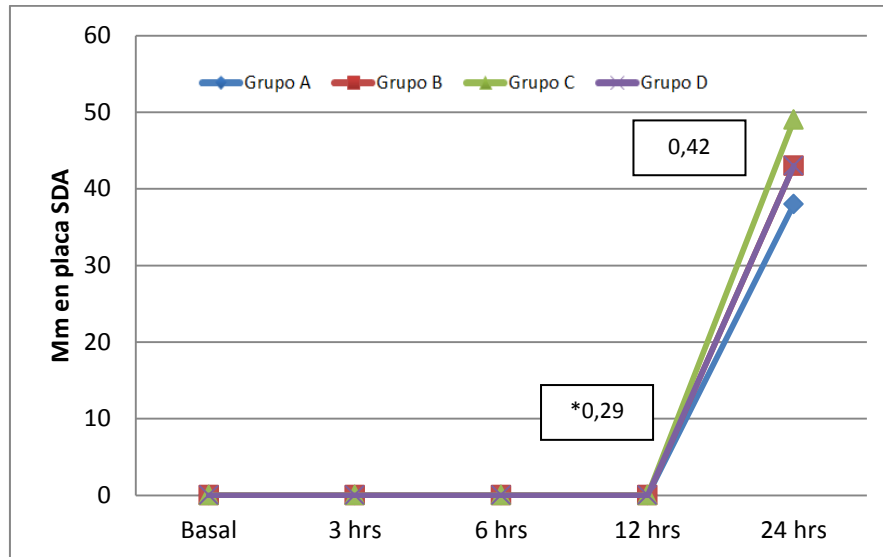


12.5.4. Crecimiento en placa SDA

Para los experimentos realizados con EDTA se observó ausencia de crecimiento de todas las placas hasta la hora 12 y desarrollo en las mismas a la hora 24 con valores mínimos y máximos de 0 a 72 mm, sin alcanzar el 100% de la placa (85mm) (Figura 19). Tres placas SDA no mostraron desarrollo a la hora 24, una correspondiente a un paciente en el grupo B y dos correspondientes al grupo D. Estas placas fueron

observadas a las 48 horas cuando las tres tuvieron desarrollo completo en la placa SDA. No hubo diferencias en el desarrollo a la hora 24 para los diferentes grupos.

Figura 19. Crecimiento en milímetros en placa SDA evaluada en relación al tiempo del grupo de observaciones realizadas con EDTA.



* Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

12.6. Comparación entre el grupos de experimentos realizados con EDTA y sin EDTA

12.6.1. Dinámica entre número de conidias, gemación y filamentación

Para esta comparación se tomó el total de pacientes en los cuales se realizaron dos ensayos uno con EDTA y otro sin EDTA. Las características descriptivas de los grupos en cuanto a conidiación, gemación filamentación y crecimiento en placa SDA se muestran en la tabla 3.

Tabla. 3. Medianas de conidias, porcentaje de gemación, filamentación y crecimiento en milímetros en placa SDA para los grupos de ensayos realizados con y sin EDTA.

	Conidias Número/mm ³			Gemación %			Filamentación (Cruces)			SDA Milímetros		
	EDTA			EDTA			EDTA			EDTA		
	Si	No	p^*	Si	No	p^*	Si	No	p^*	Si	No	p^*

Basal	268	292	0,52	0	0	0,99	0	0	1	0	0	1
3h	292	312	0,77	1,9	30,2	0,00	0	0	1	0	2	0,00
6h	262	155	0,00	4,8	37,9	0,00	0	+	0,00	0	9	0,00
12h	227	32	0,00	6,5	6,6	0,35	0	++	0,00	0	34	0,00
24h	254	20	0,00	6,3	12,5	0,47	0	+++	0,00	44	85	0,00

* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

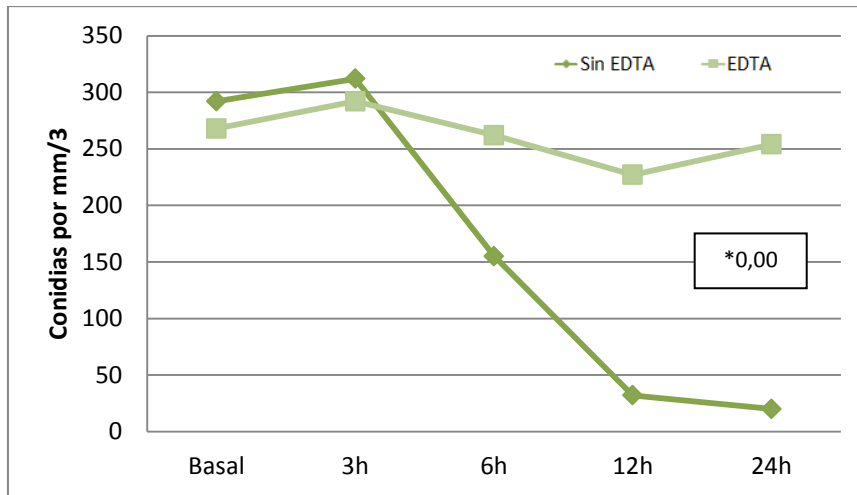
Se puede ver en la tabla decremento del número de conidias de acuerdo al avance del tiempo y a partir de la hora seis mientras incrementa la gemación en el grupo sin EDTA durante las primeras 6 horas para luego dar paso al incremento de hifas progresivamente durante la hora doce y 24. Se observan diferencias importantes en el número de conidias desde la hora seis entre los grupos, estas se mantienen constantes en el grupo con EDTA, de igual forma que en la gemación que tiene un ligero incremento desde la hora tres sin sobrepasar un porcentaje de gemación de 6,5% comparado con la gemación de los ensayos sin EDTA que tuvieron gemación de hasta 37,9%. No se observaron hifas en ningún experimento realizado con EDTA durante las 24 horas observadas por lo tanto el EDTA actuó como inhibidor de la gemación y filamentación.

En la valoración de placa SDA se observó un claro retraso de desarrollo de *R. oryzae* el cual se observó a partir de las 24 horas sin embargo los ensayos realizados sin EDTA presentaron crecimiento progresivo desde la hora 3 (tabla 3 y figura 23).

12.6.2. Conidiación, gemación y filamentación

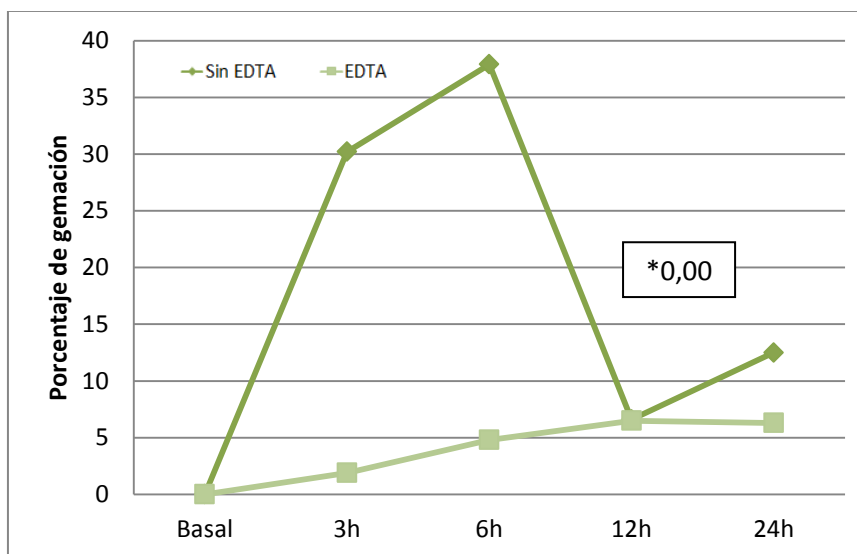
Las figuras 20, 21 y 22 muestran un comparativo de la conidiación, gemación y filamentación de los dos grupos. Se puede observar como el EDTA inhibe la gemación y filamentación en todos los experimentos mientras que *R. oryzae* se desarrolla en sangre sin EDTA como en la dinámica observada previamente, las conidias decrecen desde la hora tres de forma importante a la hora 6, 12 y 24 horas con reemplazadas conidias gemantes desde la hora tres alcanzando altos porcentajes los mismos que decaen solo cuando estas son reemplazadas por hifas (tabla 3).

Figura 20. Conidias en número por mm³ en relación al tiempo en horas para los ensayos realizados con y sin EDTA.



* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

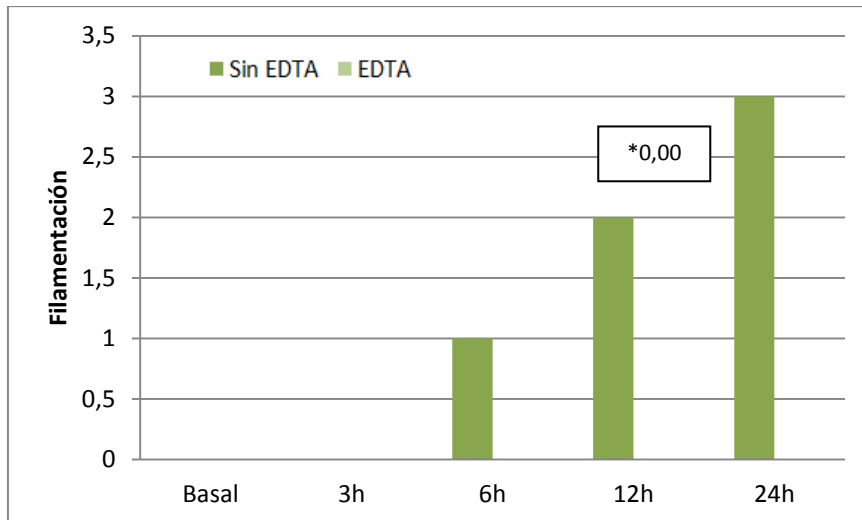
Figura 21. Porcentaje de gemación del total de número de conidias observadas en relación al tiempo en horas para los ensayos realizados con y sin EDTA.



* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

En el comparativo de filamentación se observa ausencia total de hifas durante las 24 horas del experimento en la sangre incubada con *R. oryzae* y EDTA (Gráfico 22).

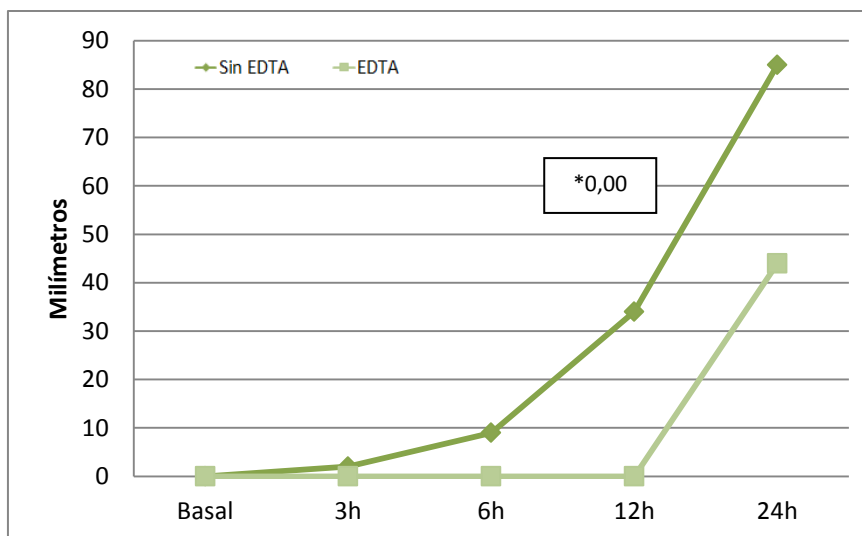
Figura 22. Filamentación observada en escala objetiva (en cruces) en relación al tiempo en horas para los ensayos realizados con y sin EDTA.



* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

12.6.3. Crecimiento en placa SDA

Figura 23. Crecimiento en milímetros en placa SDA evaluada en relación al tiempo en horas para los ensayos realizados con y sin EDTA.



* Valor de p por prueba de U de Mann Whitney.

12.7. Correlación entre los experimentos pareados

Las correlaciones para los experimentos pareados se muestran en la tabla 4. La correlación de las observaciones pareadas fue escasa para las observaciones basales. La mayoría de las evaluaciones pareadas en la hora 6 y 12 tuvieron una correlación adecuada. A la hora 24 tanto la conidiación como la gemación tuvieron baja correlación

entre las observaciones pareadas. Cabe recalcar que el conteo de conidias y la gemación a las 24 horas fueron escasos e irregulares en todas las observaciones por el desarrollo a hifas de estas estructuras.

Estas variaciones de correlación denotan la complejidad de la evaluación de los ensayos en cuanto al conteo de conidias así como el de gemación en relación a las observaciones realizadas en filamentación y medición de milímetros en placa SDA. Es importante señalar que, de forma independiente a la correlación estadística y como se ha observado en las curvas de análisis de los ensayos pareados realizados sin EDTA, los experimentos han sido reproducibles mostrando los dos grupos las similitudes comentadas.

Tabla 4. Correlación de Spearman de las observaciones de los experimentos en duplicado.

Correlación de Spearman (Significancia p)	Basal	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
Conidiación/mm³	0,3 (0,003)*	0,4 (0,00)	0,74 (0,00)	0,59 (0,00)	0,39 (0,00)
Gemación tasa	0,31(0,002)	0,74 (0,00)	0,69 (0,00)	0,64 (0,00)	0,36 (0,00)
Hifas	-	-	0,84 (0,00)	0,55 (0,00)	¿?
Crecimiento mm	-	-	0,75 (0,00)	0,79 (0,00)	¿?

*Valor de p por prueba de Kruskal Wallis.

13. DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos muestran inhibición completa de la filamentación de *R. oryzae* y menor gemación y crecimiento en placa SDA en muestras de sangre con EDTA de pacientes sanos y con diabetes mellitus comparadas con muestras de sangre sin EDTA. Del grupo de muestras evaluadas sin EDTA se observó que la gemación y filamentación fue mayor en los grupos de pacientes diabéticos con descontrol glicémico (HbA1c >9%) comparados con los pacientes diabéticos controlados (HbA1c <7%) y los no diabéticos. En sangre de pacientes diabéticos *R. oryzae* filamta más rápido que en no diabéticos sin embargo este fenómeno fue por completo inhibido al añadir EDTA.

Este hallazgo es congruente con otras observaciones de inhibición del EDTA solo y en sinergia frente a otros agentes filamentosos. Por ejemplo en relación a *Aspergillus spp.*, Ruhil y colaboradores evaluaron la actividad del EDTA en combinación con anfotericina B y nistatina en 8 aislados de aspergillus. Observaron una actividad sinérgica de los dos antifúngicos en combinación con este quelante sin incremento de la actividad citotóxica evaluada en una suspensión de eritrocitos (15).

De igual forma se ha reportado la habilidad del EDTA para inhibir la producción de biofilm en todas sus fases desarrollo producido por *Cryptococcus neoformans* reportado en las derivaciones auriculoventriculares de pacientes con afección crónica del sistema nervioso central al reducir la tasa de secreción de vesículas que contienen el principal factor de virulencia: el polisacárido capsular (16).

Otros estudios reportan el efecto aditivo del EDTA en la inhibición de especies de *candida glabrata* más hepcidina 20 un péptido catiónico humano que ejerce actividad fungicida en un buffer de fosfato de sodio. Para esto se investigó la actividad fungicida del péptido en un modelo de simulación de fluido vaginal y en fluido vaginal humano. El EDTA fue usado para quelar cationes que pudiesen ser la causa de la inhibición, sin embargo se observó que concentraciones de 1 mM de EDTA potenciaba la actividad del péptido de forma significativa (17).

Raad y colaboradores evaluaron la actividad del EDTA en combinación con anfotericina B liposomal en un modelo in vitro de biofilm de *candida spp.*, con base en previos análisis que demostraron que el añadir 30 mg/ml de EDTA a una solución antimicrobiana para catéteres tiene actividad sinérgica para erradicar *staphylococcus* y *candida spp.*, en biofilms (18, 19). Luego de usar EDTA solo, anfotericina liposomal y

EDTA más anfotericina liposomal dentro de 6 horas de efecto sobre discos de silicón incubados previamente con un inóculo de 1 ml a concentración de 5×10^5 UFC con plasma 24 horas a 37% se observó sinergia entre EDTA con anfotericina B liposomal observándose desarrollo de un número menor de UFC y cantidad de biofilm que los controles de forma significativa para dos especies de candidas: *albicans* y *parapsilosis*.

El EDTA ha sido usado con seguridad como terapia local en oftalmología como preservante y potenciador de actividad antibacteriana (11) y para el tratamiento de heridas (12). En este contexto cabe hipotetizar que podría ser un importante coadyuvante en terapia local sinérgica en pacientes con mucormicosis.

Dentro de las limitaciones del estudio mencionamos la imposibilidad de transpolar resultados a aplicación clínica. Este estudio fue realizado en un solo centro en grupos no pareados por edad ni sexo. Si bien se excluyeron pacientes sin factores de riesgo para micosis profundas dentro del grupo de pacientes sanos comparativo, este tuvo algunos pacientes con patologías establecidas. Las limitaciones incluyen también la posible variación dependiente del observador en la valoración de las muestras.

14. CONCLUSIONES

R. oryzae tiene mayor crecimiento en pacientes con diabetes mellitus y este crecimiento, observado en conidiación, gemación y filamentación es directamente proporcional al estado de descompensación glicémico. En todos estos casos el EDTA inhibió por completo la filamentación y produjo un retraso en la gemación y desarrollo en placa SDA de *R. oryzae* de modo que proponemos realizar estudios que pudieran corroborar su potencial acción como coadyuvante en el tratamiento de mucormicosis.

15. BIBLIOGRAFIA

1. Roden M., Zaoutis T., Buchanan W., Knudsen., Sarkisova T., Schaufele. et al. Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: A Review of 929 Reported Cases. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 634–53.
2. Luo G., Gebremariam T., Clemons K., Stevens D., Ibrahim A. Heat-killed yeast protects diabetic ketoacidotic-steroid treated mice from pulmonary mucormycosis. *Vaccine.* 2014; 32: 3573–3576.
3. Spellberg B., Edwards J., Ibrahim A. Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 556–569.
4. Roux B., Mechinaud F., Gay-Andrieu F., Lortholary O., Dannaoui E., Hoinard D., et al. Successful triple combination therapy of disseminated *Absidia corymbifera* infection in an adolescent with osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010; 32: 131–3.
5. Ibrahim A., Gebremariam T., Luo G., Fu Y., French S., Edwards J., et al. Combination therapy of murine mucormycosis or aspergillosis with iron chelation, polyenes, and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 1768–70.
6. Khor, B., Lee M., Leu H., Liu J. Rhinocerebral mucormycosis in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003; 36: 266–269.
7. Vironneau P., Verillaud B., Tran H., Altabaa K., Blancal P., Sauvaget E., et al. Rhino-orbito-cerebral mucormycosis, surgical treatment, state of the art. *Med Sci (Paris).* 2013; 1: 31-5.
8. Di Pentima C., Chan S., Powell J., Napoli A., Walter W., Walsh T. Topical amphotericin B in combination with standard therapy for severe necrotizing skin and soft-tissue mucormycosis in an infant with bilineal leukemia: case report and review. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014; 36(7): 468-70.
9. Amany A., Mohamed E., Hussain H. Chitosan–EDTA New Combination is a Promising Candidate for Treatment of Bacterial and Fungal Infections. *Curr Microbiol.* 2011; 62: 739–745.
10. Hachem R., Bahna P., Hanna H., Stephens C., Raad I. EDTA as an Adjunct Antifungal Agent for Invasive Pulmonary Aspergillosis in a Rodent Model. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2006; 1823–1827.
11. Ghelardi E., Celandroni F., Gueye S., Salvetti S., Campa M., et al. Antimicrobial activity of a new preservative for multiuse ophthalmic solutions. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013; 29(6): 586-90.

12. Finnegan S., Percival S. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. *Adv Wound Care*. 2015; (4) 7: 415-421.
13. Kolosowski K., Sodhi R., Kishen A., Basrani B. Qualitative Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Root Dentin Irrigated with Sodium Hypochlorite, EDTA, or Chlorhexidine. *J Endod*. 2015; 41(10): 1672-7.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3.
15. Ruhil S., Kumar V., Balhara M., Malik M., Dhankhar S., Kumar M., et al. In vitro evaluation of combination of polyenes with EDTA against *Aspergillus spp.* by different methods (FICI and CI Model). *Journal of Applied Microbiology*. 2014; 117: 643-653.
16. Robertson E., Wolf J., Casadevall A. EDTA Inhibits Biofilm Formation, Extracellular Vesicular Secretion, and Shedding of the Capsular Polysaccharide Glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; (78), 22: 7977–7984.
17. Del Gaudio G., Lombardi L., Maisetta G., Esin S., Batoni G., Sanguinetti M., et al. Antifungal Activity of the Noncytotoxic Human Peptide Hecpudin 20 against Fluconazole-Resistant *Candida glabrata* in Human Vaginal Fluid. *Antimicrobi Agents Chemother*. 2013; 4314–4321.
18. Raad I., Hanna H., Dvorak T., Chaiban G., Hachem R. Optimal antimicrobial catheter lock solution, using different combinations of minocycline, EDTA, and 25- percent ethanol, rapidly eradicates organisms embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 1: 78–83.
19. Raad I., Hachem R., Hanna H., Fang X., Jiang J., Dvorak T., et al. Role of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) in catheter lock solutions: EDTA enhances the antifungal activity of amphotericin B lipid complex against *Candida* embedded in biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008; (32): 515–518.