

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO FIN DE GRADO EN MEDICINA



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Título del Trabajo de Fin de Grado:

LEVADURAS ASOCIADAS A ESTOMATITIS PROTÉSICAS: NUEVAS PROPUESTAS DE MANEJO.

AUTOR: CORBÍ MARTÍNEZ, SARA.

TUTORA: COLOM VALIENTE, M^a FRANCISCA

COTUTORA: FERRER RODRÍGUEZ, CONSUELO

Departamento y Área: Producción Vegetal y Microbiología. Microbiología.

Curso académico: 2021 - 2022.

Convocatoria: 25 de mayo de 2022.

ÍNDICE

1.	RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	3
1.1	RESUMEN	3
1.2	ABSTRACT	4
2.	INTRODUCCIÓN.....	5
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
3.1	HIPÓTESIS	9
3.2	OBJETIVOS	9
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
4.1	DISEÑO: ESTUDIO PILOTO, PROSPECTIVO Y EXPERIMENTAL	10
4.2	POBLACIÓN A ESTUDIO: SELECCIÓN DE PACIENTES	10
4.3	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	11
4.4	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	11
4.5	IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	12
4.5.1	<i>Estudio del Fenotipo</i>	12
4.5.2	<i>Estudio del Genotipo</i>	15
4.6	ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTISÉPTICOS Y ANTIFÚNGICOS	16
4.6.1	<i>Estudio de la sensibilidad a Antisépticos</i>	16
4.6.2	<i>Estudio de la sensibilidad a Antifúngicos</i>	17
5.	RESULTADOS.....	19
5.1	AISLAMIENTO DE LEVADURAS IMPLICADAS EN ESTOMATITIS	19
5.2	IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	20
5.2.1	<i>Identificación Fenotípica</i>	20
5.2.2	<i>Identificación genotípica. Amplificación y secuenciación del ITS</i>	22
5.3	TEST DE SENSIBILIDAD EN PLACA MULTIPOCILLO Y PLACA DE SDA	24
6.	DISCUSIÓN.....	28
7.	CONCLUSIONES.....	31
8.	BIBLIOGRAFÍA	32
	ANEXOS.....	35

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

1.1 RESUMEN

La cavidad oral se halla colonizada por diversos microorganismos cuyo equilibrio es fundamental para evitar muchas patologías. Numerosos son los factores que pueden alterar dicho equilibrio, entre ellos, las prótesis dentales. Tal es así que, un elevado porcentaje de portadores de prótesis acaba desarrollando estomatitis protésica, proceso inflamatorio de la mucosa oral estrechamente relacionado con la infección candidiásica, especialmente con *C. albicans* principal especie implicada en las infecciones humanas y diana de los tratamientos convencionales empleados para resolverlas. No obstante, la literatura muestra elevadas tasas de fracaso terapéutico y recurrencia en torno a este problema.

Partiendo de la hipótesis de que otras especies de *Candida* son las causales de la estomatitis protésica y que su sensibilidad a los distintos antifúngicos y antisépticos puede variar según el tipo, así como, por la formación de biopelículas (*biofilm*) que estas levaduras hacen sobre las prótesis, se ha diseñado un estudio analítico-experimental para caracterizar las especies de *Candida* implicadas en la estomatitis protésica de un grupo de ancianos portadores de prótesis, pacientes del Grupo Médico Dental de Elche (GMD) con quien hemos trabajado en colaboración. Además, analizar sus diferencias de sensibilidad frente a distintos antisépticos y antifúngicos de uso común permitirá establecer tratamientos más personalizados y efectivos.

Para la identificación se emplearon tanto técnicas convencionales basadas en cultivo como técnicas moleculares. El estudio de sensibilidad se hizo con test en placa multipocillo y de difusión en placa de agar.

Con todo lo anterior, hemos obtenido resultados que confirman nuestra hipótesis mostrando la presencia de distintas especies de *Candida* y diferencias en cuanto a su respuesta frente a los antimicrobianos.

Palabras clave: estomatitis protésica, candidiasis protésica, *C. albicans*, prótesis dental, biopelículas, antifúngicos, antisépticos.

1.2 ABSTRACT

The oral cavity is colonised by various microorganisms whose balance is essential to prevent many pathologies. Numerous factors can alter this balance, including dental prostheses. This is why a high percentage of prosthesis wearers end up developing prosthetic stomatitis, an inflammatory process of the oral mucosa closely related to candidal infection, especially with *C. albicans*, the main species involved in human infections and the target of the conventional therapies used to treat them. However, the literature shows high rates of treatment failure and recurrence around this problem.

Based on the hypothesis that other *Candida* species are responsible for denture stomatitis and that their sensitivity to different antifungals and antiseptics may vary depending on the type, as well as the formation of biofilms that these yeasts form on the prostheses, an analytical-experimental study was designed to characterise the *Candida* species involved in denture stomatitis in a group of elderly prosthesis wearers, patients of the *Grupo Médico Dental* of Elche (GMD) with whom we have worked in collaboration. In addition, analysing their differences in sensitivity to different commonly used antiseptics and antifungals will allow us to establish more personalised and effective treatments.

Both conventional culture-based and molecular techniques were used for identification. Sensitivity studies were carried out using multiwell plate and agar plate diffusion tests.

With all of the above, we have obtained results that confirm our hypothesis showing the presence of different *Candida* species and differences in their response to antimicrobials.

Key words: prosthetic stomatitis, Candida stomatitis, *C. albicans*, dental prosthesis, biofilms, antifungals, antiseptics.

2. INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que la cavidad bucal se halla colonizada por numerosos microorganismos como bacterias, hongos, virus y protozoos que, en su conjunto, constituyen lo que denominamos microbiota oral. Dicha microbiota se caracteriza por su gran diversidad y heterogeneidad interindividual e intrabucal, ya que difiere en las distintas partes que componen la cavidad oral (mejillas, lengua, paladar, dientes...) e incluso intraindividual, es decir, en un mismo individuo puede cambiar a lo largo del tiempo por influencia de factores como la alimentación, higiene, ciertas enfermedades, así como la toma de fármacos o drogas. Estos microorganismos han de hallarse en equilibrio ya que, cualquier alteración en esta microbiota se relaciona con la aparición de enfermedades, entre ellas, la estomatitis protésica objeto de estudio de este trabajo. Concretamente, nos centraremos en la relación existente entre la aparición de dicha patología y el uso de prótesis dental (4, 6).

La estomatitis protésica es un proceso inflamatorio de la mucosa oral que se halla en contacto con la superficie interna de una prótesis removible afectando, generalmente, al maxilar superior. De acuerdo con la bibliografía revisada, en torno al 40-60% de los portadores de prótesis, con predominio en las mujeres, acaban desarrollándola en grado variable. Así pues, se creó la clasificación de Newton que establece 3 grados de estomatitis protésica en función del nivel de afectación de la mucosa palatina (2, 3, 6, 8, 10).



Figura 1: Imágenes correspondientes a los tres grados de afectación clínica definidos en la Clasificación de Newton. Obtenidas de: López JV, et al. 2013 (grado I y II) y F. Salinas. 2014 (grado III) (9).

Se trata de una patología multifactorial en la que se han determinado dos agentes causales clave para su desarrollo: portar prótesis dental y la colonización de la mucosa por levaduras del género *Candida* (2, 3, 5). No obstante, no todos los individuos con prótesis o infección candidiásica acaban teniendo estomatitis y es aquí donde adquiere gran relevancia una serie de factores predisponentes sobre los cuáles se podría incidir para evitar su aparición.

Sobre la candidiasis oral, hay que comentar que ésta es la infección micótica bucal más común (7). Causada por *Candida*, este género comprende un amplio número de especies de levaduras (más de 300 distintas) pero solo una minoría

están implicadas en enfermedades humanas siendo *C. albicans* la principal (8). Centrándonos en ésta, es una levadura de morfología ovalada o redondeada, tamaño de 3-9 x 2-8 micras cuyo crecimiento se ve favorecido a temperaturas en torno a 33-35°C y pH ácido (1). Microorganismo comensal de la mucosa oral, tracto gastrointestinal y urogenital de muchos individuos que ante alteraciones y desequilibrios del entorno puede transformarse en oportunista provocando infección y transformando portadores sanos en sujetos con enfermedad infecciosa (6, 8, 11).

En cuanto a los factores predisponentes, unos se relacionan con el huésped como, por ejemplo, la edad avanzada, malas condiciones higiénicas bucales y de manos, hiposalivación con disminución de lisozimas, citoquinas salivares y lactoferrina (controla la proliferación de *Candida*), consumo de tabaco y alcohol, inmunodeficiencias y déficits nutricionales, enfermedades sistémicas... Otros, por el contrario, se asocian a la prótesis. Su uso ya de por sí crea un ambiente ácido propicio para el desarrollo de *Candida* lo que, además, se ve favorecido por el hecho de que las superficies acrílicas y rugosas como las de las prótesis favorecen la adherencia de la levadura y la formación de biopelículas. También, se han descrito factores favorecedores como no retirar la prótesis para dormir, una mala higiene de la misma y un mal ajuste que produce microtraumatismos de repetición (1, 3, 6, 8).

En relación a las manifestaciones clínicas, cabe señalar que la mayoría de los pacientes son asintomáticos (8) salvo una minoría que presenta edema, molestias, sensación dolorosa, gusto desagradable, halitosis y/o sequedad bucal. Por ello, su diagnóstico es fundamentalmente clínico, basado en el

hallazgo y observación de una serie de signos en la mucosa bucal: edema, eritema, placas blanquecinas o aspecto granular de la mucosa subyacente a la prótesis (3, 5, 7).

El tratamiento de la estomatitis ha de estar enfocado a la consecución de una serie de objetivos. Por un lado, es fundamental el control de los factores predisponentes, por ejemplo, dejar de fumar, solucionar los problemas de hiposalivación, etc. Por otro, controlar la presencia de *Candida* tanto de la mucosa como de la prótesis. Para ello, se emplean medidas higiénicas individuales y de las prótesis, como recambio de cepillos, limpiezas periódicas para controlar la placa dental, retirar la prótesis para dormir, limpiarla introduciéndola en una solución de clorhexidina al 0,2-2% o en hipoclorito sódico 0,5-2%, y secarla al aire. Cuando estas medidas no sean suficientes para solventar el problema, en pacientes inmunodeprimidos o ante cuadros agresivos se pautarán, además, antifúngicos y antisépticos. El tratamiento convencional está dirigido contra *C. albicans*, principal especie relacionada con la estomatitis. Éste se basa principalmente en el uso de 3 grupos de fármacos antifúngicos: poliénicos (Nistatina), imidazoles (Miconazol tópico) y triazoles (Itraconazol y Fluconazol). Los antisépticos más empleados son la clorhexidina, hipoclorito de sodio, aceites esenciales con fenoles (eugenol, mentol, geraniol, linalool...), fitoquímicos e irradiación en horno de microondas. Por último, también estaría indicado el recambio protésico (2, 6, 7, 10, 11). No obstante, existen elevadas tasas de fracaso terapéutico y recidiva en relación a este problema (5, 6).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Ante las elevadas tasas de fracaso y recurrencia en el tratamiento de la estomatitis protésica en ancianos, conocer las especies de levaduras implicadas en esta patología y su sensibilidad específica a distintos compuestos antifúngicos y germicidas, permitirá diseñar un abordaje terapéutico más personalizado y efectivo para este problema.

3.2 OBJETIVOS

Para demostrar esta hipótesis hemos llevado a cabo un estudio analítico-experimental estableciendo los siguientes objetivos:

- **PRINCIPAL:** valorar la efectividad de los tratamientos antifúngicos y antisépticos convencionales para la estomatitis sobre la base de las especies implicadas y su sensibilidad a los antimicrobianos.
- **SECUNDARIOS:**
 - Conocer las especies de levaduras implicadas en la candidiasis oral de los ancianos portadores de prótesis que acuden al centro odontológico del Grupo Médico Dental de Elche (GMD).
 - Conocer la sensibilidad de los aislamientos de levaduras obtenidos de estomatitis protésica, a los antifúngicos de uso tópico y oral.
 - Conocer la sensibilidad de los aislamientos de levaduras obtenidos de estomatitis protésica, a los antisépticos de uso tópico y oral.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO: estudio piloto, prospectivo y experimental

Este proyecto se ha realizado en colaboración con el Grupo Médico Dental (GMD) de Elche dirigido por el Dr. Ambrosio Bernabéu que se encargó de seleccionar aquellos pacientes que cumplían una serie de criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos, tomar las muestras orales y enviarlas al laboratorio de Micología Médica del campus de San Juan de la UMH donde entraba en juego mi labor. Personalmente, me he encargado de la recepción de las muestras y su procesamiento, de la lectura de los cultivos e identificación de los aislamientos, así como, del estudio de la sensibilidad de dichos aislamientos a distintos antifúngicos y antisépticos de uso convencional. A continuación, desarrollaré más detalladamente los procedimientos llevados a cabo en cada una de las etapas de este proyecto. También he participado en el diseño del estudio y del documento de información del paciente y consentimiento informado, así como el contenido de la hoja de datos de paciente (anexo 1 y 2). A continuación, desarrollaré más detalladamente los procedimientos llevados a cabo en cada una de las etapas de este proyecto.

4.2 POBLACIÓN A ESTUDIO: SELECCIÓN DE PACIENTES

La población definida como objeto del estudio son pacientes ancianos portadores de prótesis. Entre septiembre de 2021 y marzo de 2022 se muestreó un total de 14 pacientes del GMD de Elche, 12 de los cuales cumplían los siguientes criterios:

INCLUSIÓN: mayores de 65 años, portadores de prótesis, con clínica compatible con estomatitis protésica y que aceptan participar en nuestro proyecto mediante la firma del consentimiento informado (anexo 1).

EXCLUSIÓN: aquellos que no cumplen los criterios de inclusión o quienes sí los cumplen, pero presentan un proceso infeccioso agudo en ese momento, han estado con tratamiento antimicrobiano en las 4 semanas previas o han empleado antisépticos orales en los 7 días previos a la toma de muestras. Asimismo, excluimos a quienes rechazaron su participación.

4.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

La toma de muestras, llevada a cabo por los odontólogos, se realizó mediante hisopado de las zonas que presentaban lesiones en la boca y de la superficie de la prótesis. Previamente, el hisopo era humedecido en suero salino fisiológico estéril. Tras ello, rellenaban una hoja de datos relativos al paciente y su prótesis (anexo 2). Dichas muestras eran enviadas al laboratorio Micología Médica donde se recibían e iniciaba su procesamiento antes de que pasaran 24 horas de la obtención. Durante la espera (si la había) se mantenían refrigeradas a 4°C.

4.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez en el laboratorio, se realizaba una siembra directa con el hisopo en medios de cultivo como Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y CHROMagar Candida. Estos hisopos posteriormente también se lavaban en suero fisiológico estéril con agitación fuerte en vórtex durante 30 segundos. El líquido de lavado se recogió en microtubos de 1,5 mL con el que se realizaron nuevas siembras

directas (0,1 mL) en los mismos medios de cultivo. Este procedimiento se simplificó a partir de la quinta muestra ya que no se obtenían diferencias en ambos procedimientos, y se mantuvo únicamente la siembra directa del hisopo. La incubación de las placas se realizó en cualquier caso a 35°C.

Pasadas 24–48 horas se hacía lectura del cultivo: se estudiaba la morfología de las colonias, si eran similares o había varios tipos y anotaba cuántas había de cada clase describiendo su morfología y aspecto macroscópico. Posteriormente, las distintas colonias se pasaban a cultivo puro y, una vez obtenidos los aislamientos, las células se resuspendían en 1 mL de agua destilada estéril en microtubos. Estos se sellaban con Parafilm® y se guardaban a 4°C y – 80°C para futuros estudios o experimentos. Las placas iniciales y de cultivo puro se mantenían y revisaban durante 21 días siendo finalmente desechadas.

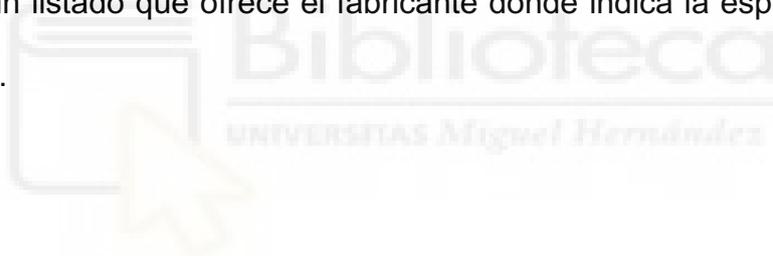
4.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

Una vez tuvimos los aislamientos en cultivo puro en SDA y CHROMagar procedimos a su identificación. Para ello, estudiamos sus rasgos fenotípicos mediante análisis de su morfología macroscópica y microscópica, así como, de su metabolismo con pruebas fisiológicas. Además, realizaremos una caracterización genotípica empleando técnicas de biología molecular.

4.5.1 Estudio del Fenotipo

En primer lugar, se valoró la morfología macroscópica mediante descripción y toma de fotografías de las colonias crecidas en SDA y CHROMagar Candida. Seleccionamos estos dos medios dado que el primero es el estándar para el crecimiento de hongos y el segundo, es un medio que permite orientar la especie

Candida en función de la tonalidad de las colonias crecidas. Además, se estudió la morfología celular con microscopio óptico tras tinción con azul de Lactofenol. Por último, se realizó un estudio fisiológico de capacidad de asimilación de azúcares mediante un método comercial llamado AuxaColor2 Bio-Rad® que se basa en poner en contacto el aislamiento con distintos azúcares y valorar la capacidad de asimilación de estos a las 24, 48 y 72 horas (ver figura 2). El perfil de auxonograma se expresa con un código numérico de cinco dígitos que es específico de cada especie. El resultado se lee agrupando los azúcares de 3 en 3. Cada trío, representado por un color diferente en la figura 2, da origen a un número que se obtiene sumando el valor 1, 2 y/o 4 si el resultado es positivo en las posiciones 1, 2 y 3 respectivas de cada trío (figura 2). El código final se localiza en un listado que ofrece el fabricante donde indica la especie a la que corresponde.



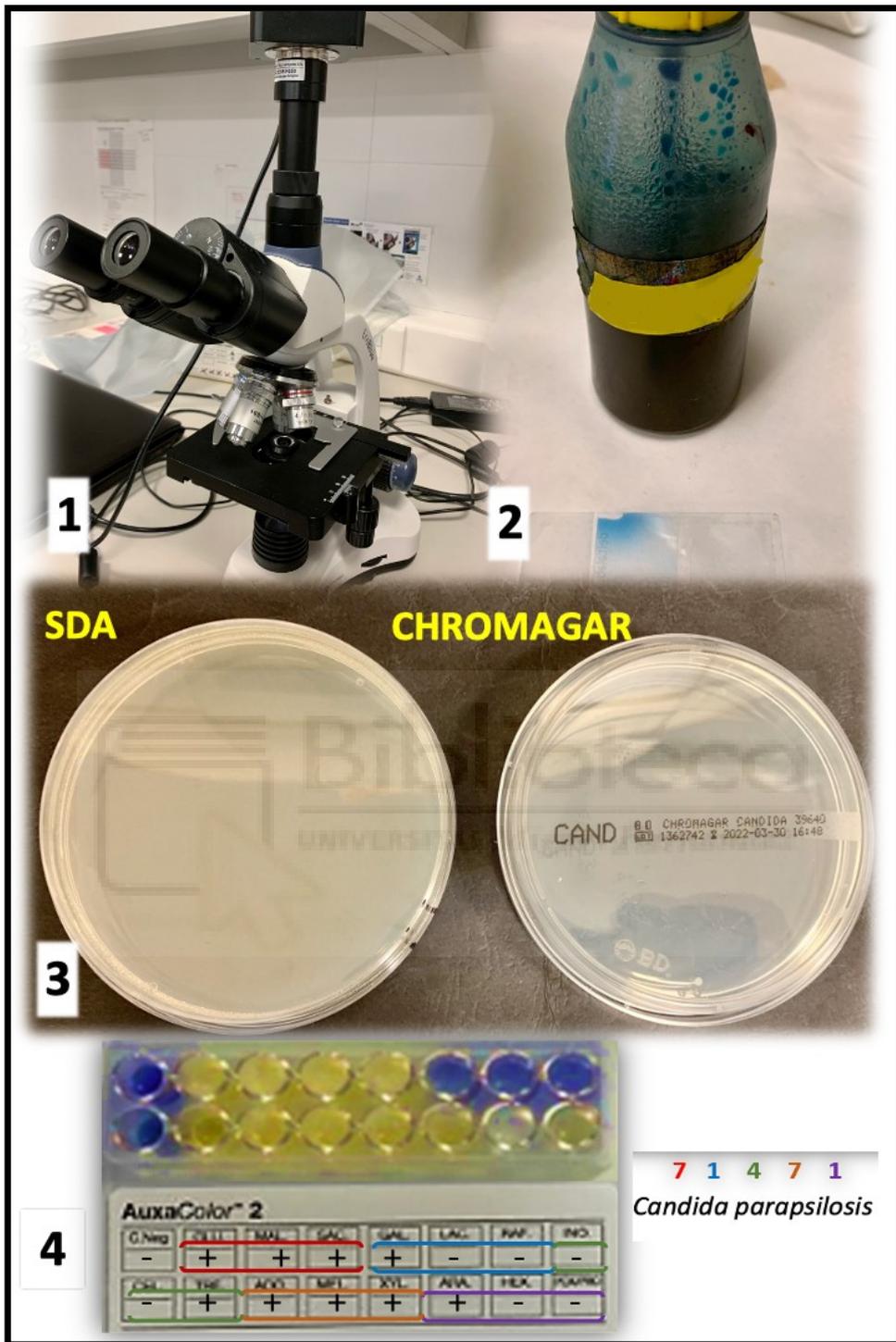


Figura 2: 1. Microscopio óptico del laboratorio 2. Tinción con azul de Lactofenol 3. Placas de SDA y CHROMagar Candida 4. Prueba de AuxaColor² Biorad® Código 71471: *C. parapsilosis*

4.5.2 Estudio del Genotipo

Para la caracterización genotípica empleamos técnicas de biología molecular con las cuales extrajimos el DNA de las levaduras para, posteriormente, amplificar las regiones ITS del rDNA. Tras ello, éstas fueron secuenciadas y comparadas con las bases de datos de ácidos nucleicos (Genbank NCBI).

La extracción de DNA se realizó con el sistema InstaGene™ Matrix (BioRad) que consiste en la digestión enzimática de compuestos celulares para obtener el DNA fúngico. Una vez extraído se realizó la amplificación del segmento que comprende los espaciadores internos y el 5.8S DNA ribosomal (ITS1–5.8S-ITS2) mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) de ronda única. Utilizamos un termociclador Eppendorf MasterCycler®. El fragmento amplificado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (ver figura 3).

El material genético obtenido se secuenció en una empresa externa (Macrogen®) y se comparó con las secuencias contenidas en la base de datos GenBank del NCBI permitiéndonos identificar las especies de *Candida*. Para

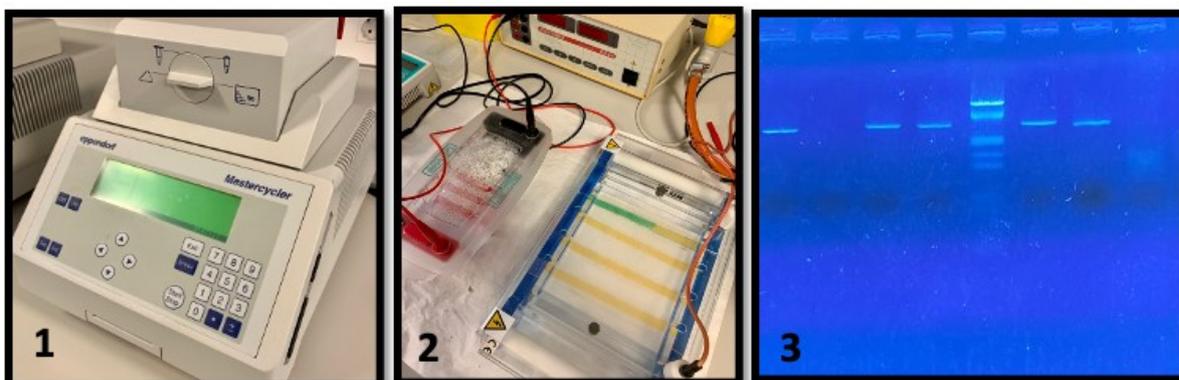


Figura 3: 1. Termociclador PCR 2. Equipo de electroforesis 3. Gel de agarosa mostrando los fragmentos de DNA amplificados de *C. albicans*

asignar una cepa a una especie tiene que haber una concordancia del 97% o más entre la secuencia estudiada y la de la base de datos.

4.6 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTISÉPTICOS Y ANTIFÚNGICOS

De los aislamientos obtenidos, se estudió la sensibilidad frente a antisépticos y antifúngicos de uso común en el tratamiento de la estomatitis protésica. Seleccionamos como antisépticos el enjuague bucal de clorhexidina, el etanol y el peróxido de hidrógeno mientras que, los antifúngicos testados, fueron Nistatina, Miconazol e Itraconazol.

4.6.1 Estudio de la sensibilidad a Antisépticos

Diseñamos la prueba de sensibilidad mediante técnica de microdilución en placa. Ésta consta de 12 columnas y 8 filas con un total de 96 pocillos que nos permite testar y ver la respuesta de las cepas frente concentraciones diferentes de los antimicrobianos. Para su desarrollo, nos basamos en los protocolos estandarizados por el comité europeo para la estandarización de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos (EUCAST). Seleccionamos un total de 7 cepas de las aisladas de estomatitis y se prepararon inóculos de aproximadamente 100 células/ml con los que se inoculó cada una de las cepas en una fila de la placa, siendo la última (H) el control sin inóculo. Los antisépticos se añadieron por columnas, con tres concentraciones distintas para cada uno. Las columnas 4, 8 y 12 se dejaron libres de antiséptico como controles (ver figura 4). Las concentraciones empleadas de antisépticos vienen reflejadas en la figura 4, siendo siempre la primera la de máxima concentración. En el caso de la

clorhexidina la máxima concentración (CLORH1) fue del 0,12%, ya que es la utilizada en los preparados comerciales para enjuague bucal. A partir de ésta realizamos diluciones 1/10 (CLORH2) y 1/100 (CLORH3). En el caso del alcohol etílico, se utilizó como máxima concentración el etanol al 100% (ETOH1), seguido de 96% (ETOH2) y al 70% (ETOH3). El peróxido de hidrógeno a concentración máxima fue el comercial a 10 volúmenes (H_2O_2 1) y sus diluciones 1/10 (H_2O_2 2) y 1/100 (H_2O_2 3). Las placas se pusieron a incubar a 35°C y se hicieron varias lecturas en los días sucesivos (aproximadamente a las 24, 48 y 72 horas).

También, realizamos un ensayo de crecimiento en placa de Petri con medio de cultivo preparado con cada uno de los antisépticos a testar. Se testaron las mismas cepas y antisépticos, pero estos se añadieron al agar de Sabouraud estéril antes de que se solidificara. Se prepararon placas con diferentes concentraciones de antiséptico o antifúngico, dejando una sin antimicrobiano como control. Cada placa se dividió en 8 secciones y en cada una de ellas se inoculó una gota con células de cada una de las cepas, dejando la octava como control sin inóculo. Se incubaron 48 horas y, pasado este tiempo, realizamos la lectura y análisis de los crecimientos (ver figura 5).

4.6.2 Estudio de la sensibilidad a Antifúngicos

La sensibilidad a antifúngicos también se testó mediante dos tipos de ensayo uno en placa multipocillo y otro en placa de Petri con agar de Sabouraud. Se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento realizado al estudiar la sensibilidad de los antisépticos pero, en este caso, utilizando los siguientes fármacos y concentraciones: Nistatina (Mycostatin®) a concentración máxima de

100000 U/ml (NIST1) y sus diluciones 1/10 (NIST2) y 1/100 (NIST3); Miconazol (Daktarin gel oral) 25mg/mL (MICO1) y sus diluciones 1/10 (MICO2) y 1/100 (MICO3) y, por último, el Itraconazol (Itraconazol Cinfa 100 mg) cuya concentración máxima fue de 1 mg/mL a partir del cual se hicieron también diluciones 1/10 y 1/100 similares a las anteriores. (ver figura 4 y 5).

	H2O2 1	H2O2 2	H2O2 3		ETOH 1	ETOH 2	ETOH 3		CLORH 1	CLORH 2	CLORH 3	
<i>C. albicans 1</i>												
<i>C. albicans 2</i>												
<i>C. albicans 3</i>												
<i>C. glabrata</i>												
<i>M. carphophila</i>												
<i>C. tropicalis</i>												
<i>C. parapsilosis</i>												
CONTROL												

	NIST 1	NIST 2	NIST 3		MICO1	MICO2	MICO3		ITRA1	ITRA2	ITRA3	
<i>C. albicans 1</i>												
<i>C. albicans 2</i>												
<i>C. albicans 3</i>												
<i>C. glabrata</i>												
<i>M. carphophila</i>												
<i>C. tropicalis</i>												
<i>C. parapsilosis</i>												
CONTROL												

ANTISÉPTICOS				ANTIFÚNGICOS			
SDB	150 UI/POCILLO			SDB	150 UI/POCILLO		
H2O2	1: 10 VOL	2: 1/10	3: 1/100	Nistatina	100000U/ml	1/10	1/100
ETOH	100%	96%	70%	Miconazol	25mg/ml	1/10	1/100
CLROH	CONC	1/10	1/100	Itraconazol	1mg/mL	1/10	1/100
INÓCULO	35 uL/pocillo			INÓCULO	35 uL/pocillo		

Figura 4: Diseño de test de sensibilidad frente antisépticos y antifúngicos en placa multipocillo.

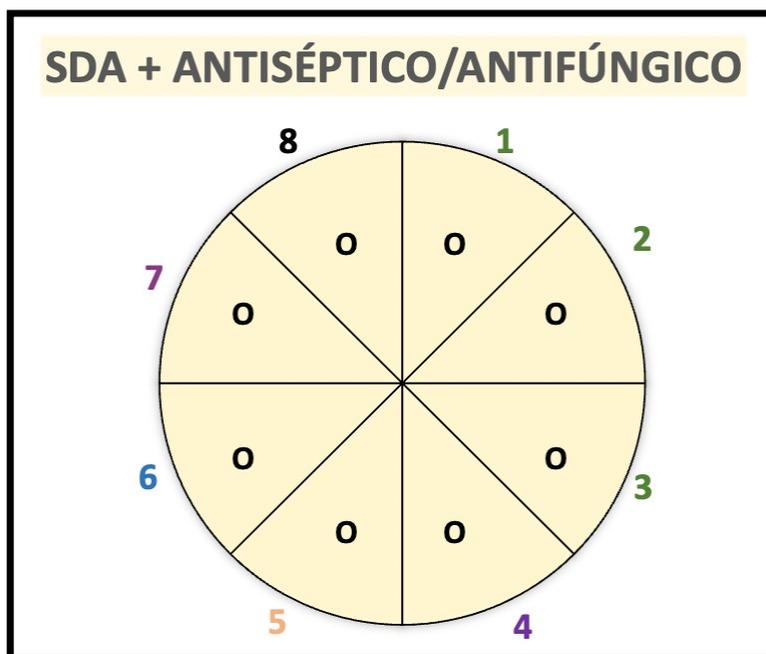


Figura 5: Diseño de prueba de sensibilidad en placa de Petri con SDA. O = 5 μ L inóculo. 1 – 2 – 3: *C. albicans* 4: *C. glabrata* 5: *M. carophila* 6: *C. tropicalis* 7: *C. parapsilosis* 8: control.

5. RESULTADOS

En total recibimos 22 muestras de 14 pacientes, 15 procedían de boca y 7 de prótesis. Además, se sembró hisopo y suero en 6 de ellas (PE001B, PE001P, PE001B.2, PE004B, PE005B y PE005P); con el resto se empleó únicamente hisopo. En conjunto, se obtuvieron un total de 57 aislamientos todos ellos guardados en agua estéril (ver figura 7).

5.1 AISLAMIENTO DE LEVADURAS IMPLICADAS EN ESTOMATITIS

Se obtuvieron 29 aislamientos a partir de las 22 muestras sembradas en SDA. Éstos se denominaron empleando el prefijo PE00 + nº de muestra + P/B (muestra tomada de prótesis o boca) + S (si sembrado desde suero) + 2-3-4 (en caso de haber varios aislamientos en una misma siembra). Hubo crecimiento en todas las placas a excepción de PE004B.

5.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

5.2.1 Identificación Fenotípica

La **morfología macroscópica** predominante en SDA era la de pequeñas colonias redondeadas, de coloración blanquecina y consistencia firme (ver figura 6). No obstante, nos encontramos con otras diferentes como 2 aislamientos (PE001.2BS.2 y PE003B.2) de colonias redondeadas rosas, 1 crecimiento puntiforme y mucoso (PE004B) y, además, algunas placas (PE001B, PE001P, PE001.2B, PE0010B), presentaron colonias de coloración similar al tipo predominante, pero de mayor tamaño y consistencia mucho más mucosa.

Todas las muestras también fueron sembradas en medio CHROMagar, obteniéndose a partir de él 28 aislamientos etiquetados de la siguiente forma: PE00 + nº muestra + B/P + coloración de la colonia. Hubo crecimiento de todas salvo de PE004B. Se obtuvieron 4 tipos de colonias distintas mostradas en la figura 6. El número de aislamientos de cada una, así como, su proporción está indicado en la figura 7.

Sobre la **morfología microscópica**, ésta fue similar en todos los casos: células redondeadas u ovaladas, de tamaño entre 5 y 7 micras y con presencia de blastoconidias.

En cuanto a las pruebas de **asimilación de azúcares** (auxonograma de carbono), realizada a 3 de los aislamientos obtuvimos los siguientes resultados:

Tabla 1: Resultados obtenidos con AuxaColor2 Biorad

ASLAMIENTO	CÓDIGO	IDENTIFICACIÓN
PE001BS	71471	<i>Candida parapsilosis</i>
PE001PS	Negativo	---
PE001.2BS	10520/10400	<i>Candida glabrata/Candida zeylanoides</i>

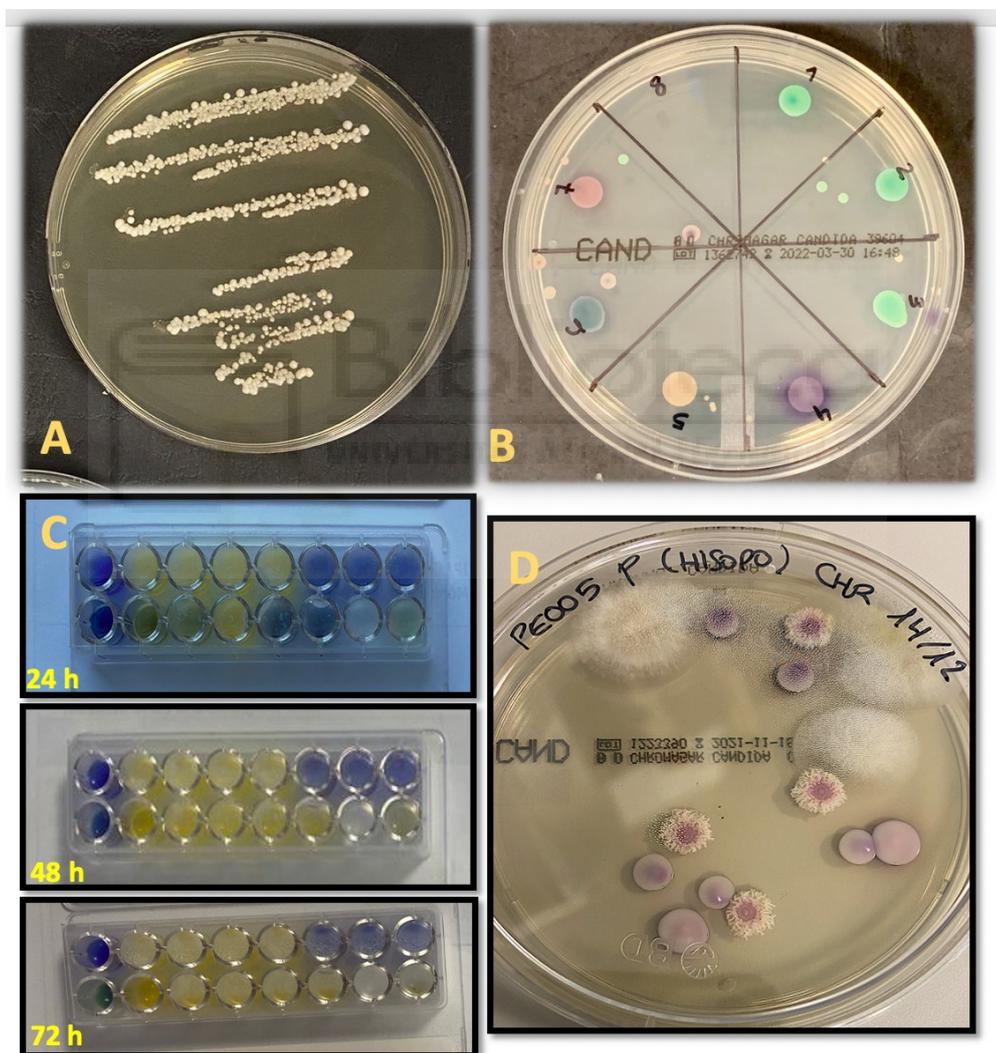


Figura 6: A: Crecimiento múltiples colonias redondeadas en SDA B: CHROMagar con distintas cepas de candida: *C. albicans* (verde), *C. glabrata* (morada), *M. carpophila* (amarilla), *C. tropicalis* (azul) y *C. parapsilosis* (rosada). C: Perfil de asimilación de azúcares (AuxaColor² Biorad®) a las 24 – 48 – 72 horas de inoculación donde aparecen pocillos positivos (amarillos) y negativos (azules). D: Colonias descritas como colonias tipo flor-crema y mucosas lilas.

5.2.2 Identificación Genotípica. Amplificación y secuenciación del ITS

En un primer momento, nos planteamos realizar secuenciación de los 28 aislamientos de CHROMagar. Finalmente, con el fin de agilizar el proceso, se realizó secuenciación de 19 de ellos. Los 9 restantes al proceder de colonias verdes, coloración específica de *C. albicans* en CHROMagar, no precisaban pruebas adicionales para su identificación. De los de SDA, se identificaron aquellos cuya morfología macroscópica difería a la de *Candida albicans*. Se obtuvieron estos resultados:



Tabla 2: Resultados identificación del genotipo (secuenciación del ITS 1-4).

AISLAMIENTO	MEDIO	MACRO ¹	GENOTIPO	AISLAMIENTO	MEDIO	MACRO	AISLAMIENTO
PE001Plila	CH ²	lilas-redon ³	<i>Candida glabrata</i>	PE006Pazul	CH	azul/gris-redon	<i>Candida tropicalis</i>
PE001.2B.2	SDA	rosas-redon	<i>Rhodotorula sp</i>	PE007Bverde	CH	verdes-redon	<i>Candida albicans</i>
PE003Bverde	CH	verdes-redon	<i>Candida albicans</i>	PE008Bverde	CH	verdes-redon	<i>Candida albicans</i>
PE003B.2	SDA	rosas-redon	<i>Rhodotorula sp</i>	PE009Pverde	CH	verdes-redon	<i>Candida albicans</i>
PE004B	SDA	puntiforme mucoso	<i>Negativo (Bacteria)</i>	PE0010Bverde	CH	verdes-redon	<i>Candida albicans</i>
PE005Pflor	CH	flor-crema	<i>Meyerozyma carpophila</i>	PE0011Bverde	CH	verdes-redon	<i>Candida albicans</i>
PE005Bflor	CH	flor-crema	<i>Meyerozyma carpophila</i>	PE0012Pverde	CH	verdes-redon	<i>Candida albicans</i>
PE005Plila	CH	lilas-redon	<i>Candida parapsilosis</i>	PE0012Plila	CH	lilas-redon	<i>Candida glabrata</i>
PE005Blila	CH	lilas-redon	<i>Candida parapsilosis</i>	PE0012Blila	CH	lilas-redon	<i>Candida glabrata</i>
PE006Bverde	CH	verdes-redon	<i>Candida albicans</i>	PE0013Blila	CH	lilas-redon	<i>Candida glabrata</i>
PE006Bazul	CH	azul/gris-redon	<i>Candida tropicalis</i>	PE0014Blila	CH	lilas-redon	<i>Candida glabrata</i>

1. Macro: morfología macroscópica 2. CH: CHROMagar 3. Redon: redondeada

Así pues, los aislamientos quedaron identificados 17 de ellos como *C. albicans* (61%), 5 como *C. glabrata* (18%), y 2 aislamientos (7%) como cada una de las especies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *M. carphophila*. (figura 7).

Cabe señalar que el 50% de los pacientes (7) presentaban colonizaciones mixtas, es decir, en sus muestras se aislaron dos especies distintas simultáneamente, en un 42,86 % (6) solo se determinó una especie mientras que en el paciente restante no se aisló ninguna. (ver tabla 3).

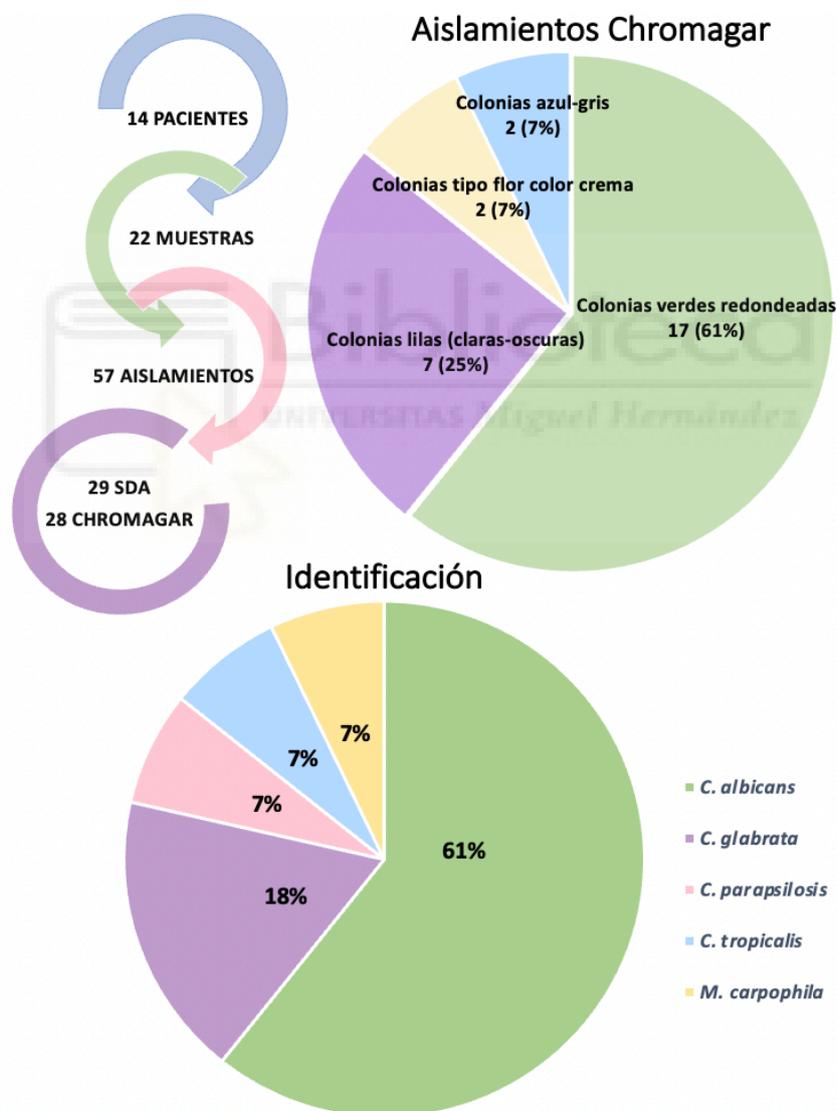


Figura 7: Pacientes participantes, muestras procesadas y aislamientos obtenidos desde septiembre de 2021 y marzo de 2022.

Tabla 3: Especies implicadas en las estomatitis protésicas de nuestros pacientes.

PACIENTE	COLONIZACIÓN SIMPLE (42,86%)	PACIENTE	COLONIZACIÓN MIXTA (50%)
PE002	<i>Candida albicans</i>	PE001	<i>Candida glabrata</i> + <i>Candida parapsilosis</i>
PE003	<i>Candida albicans</i>	PE005	<i>Meyerozyma carphophila</i> + <i>Candida parapsilosis</i>
PE007	<i>Candida albicans</i>	PE006	<i>Candida albicans</i> + <i>Candida tropicalis</i>
PE008	<i>Candida albicans</i>	PE010	<i>Candida albicans</i> + <i>Candida glabrata</i>
PE009	<i>Candida albicans</i>	PE012	<i>Candida albicans</i> + <i>Candida glabrata</i>
PE011	<i>Candida albicans</i>	PE013	<i>Candida albicans</i> + <i>Candida glabrata</i>
PE004	---	PE014	<i>Candida albicans</i> + <i>Candida glabrata</i>

5.3 TEST DE SENSIBILIDAD EN PLACA MULTIPOCILLO Y PLACA DE SDA

La lectura de las placas de SDA ha sido mucho más clara que la de los pocillos, dado que estos últimos adquirirían una turbidez y coloración propia del producto o excipiente dificultando la visualización del crecimiento, sobre todo, en el caso de los antifúngicos. Este ruido se ha tratado de minimizar comparando fundamentalmente los pocillos que contenían el antimicrobiano más diluido con el control (ver figura 8). Esta lectura ofrece los resultados mostrados en la figura 8.

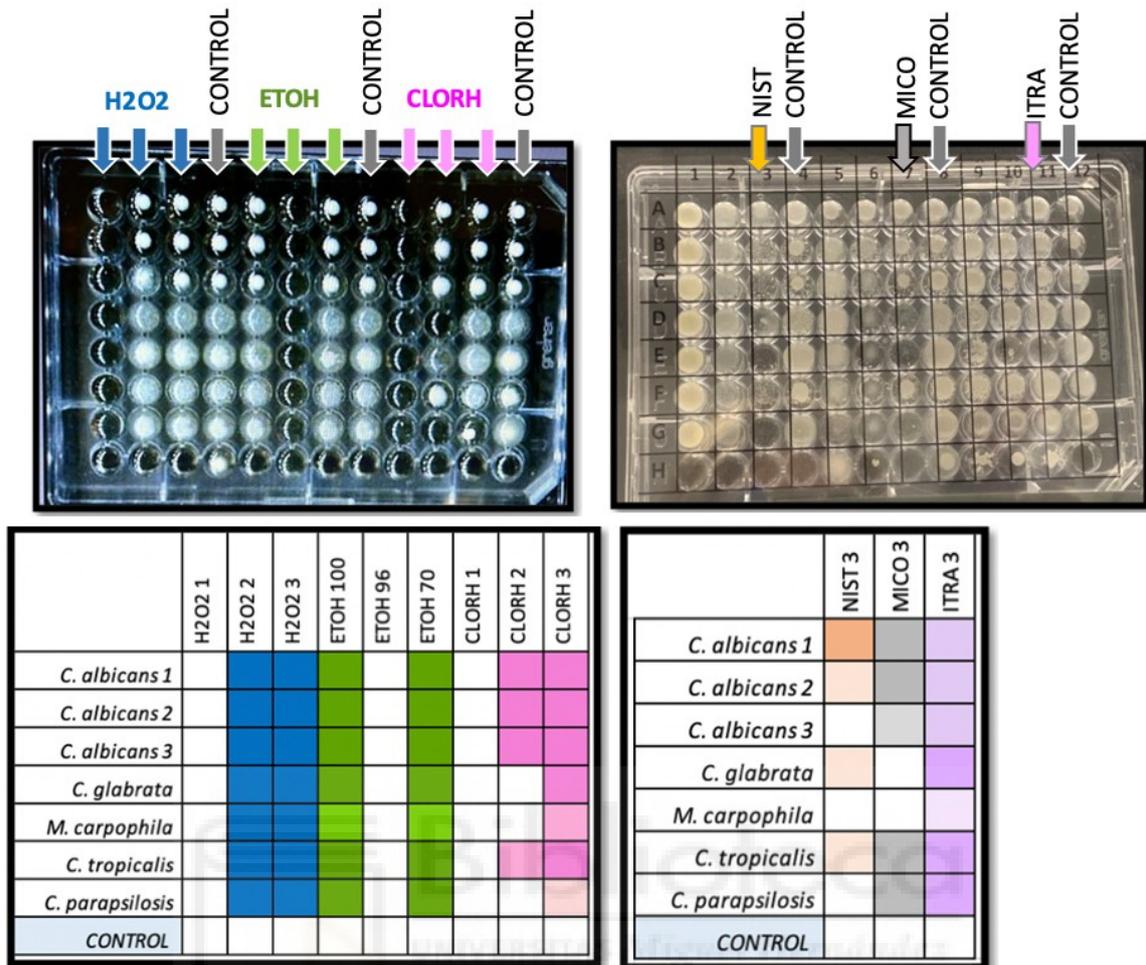


Figura 8: Resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en placa multipocillo. A) Placa con antisépticos. B) Placa con antifúngicos. En la parte inferior se muestra la interpretación de los resultados de las placas. La intensidad del color es directamente proporcional al grado de turbidez (crecimiento) en los pocillos.

En las figuras 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas en placa de SDA con agentes antimicrobianos añadidos.

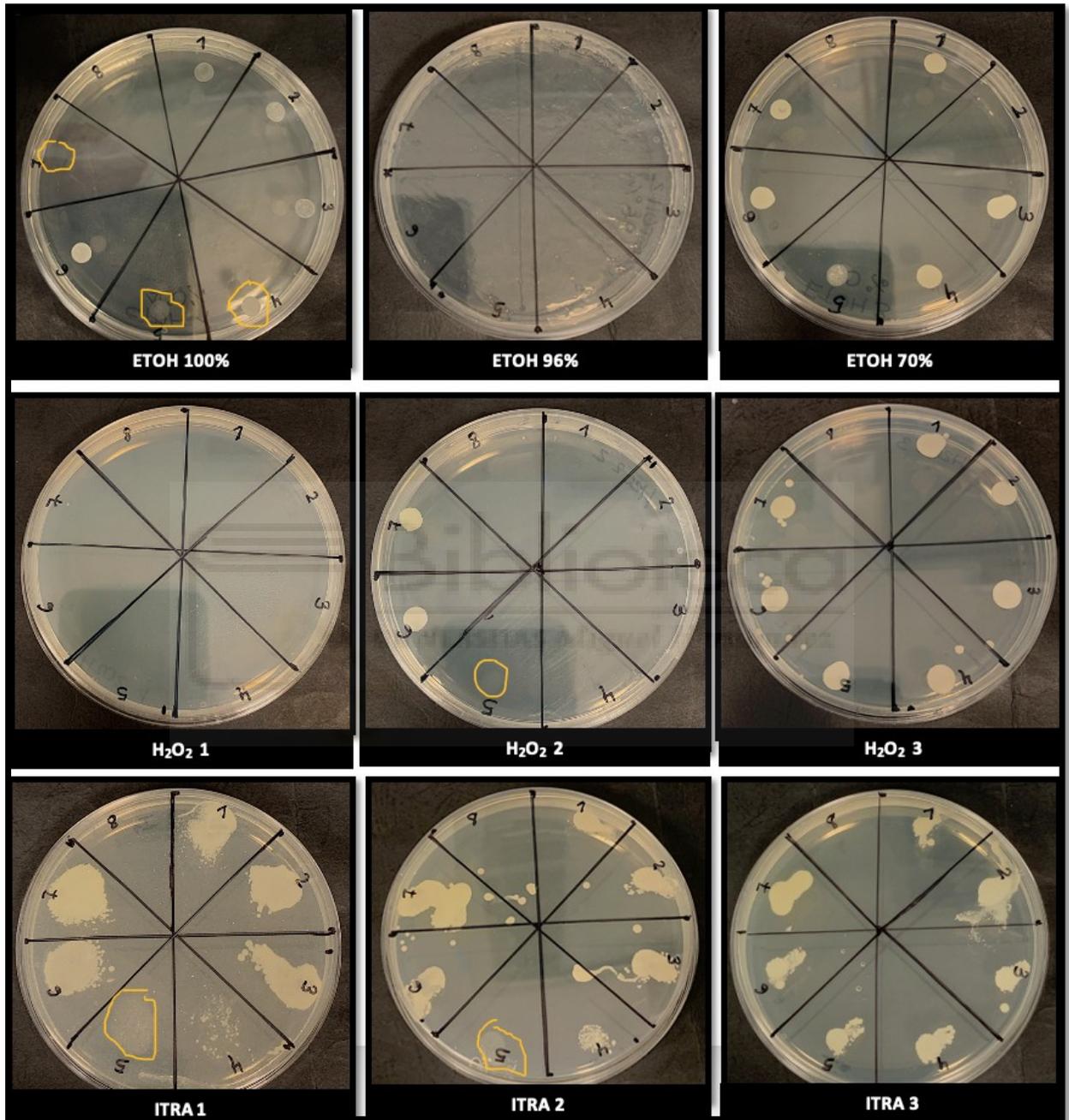


Figura 9: Ejemplos de resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad en placa de Petri con SDA. Imágenes correspondientes a las placas de ETOH, H₂O₂ e Itraconazol a distintas concentraciones.

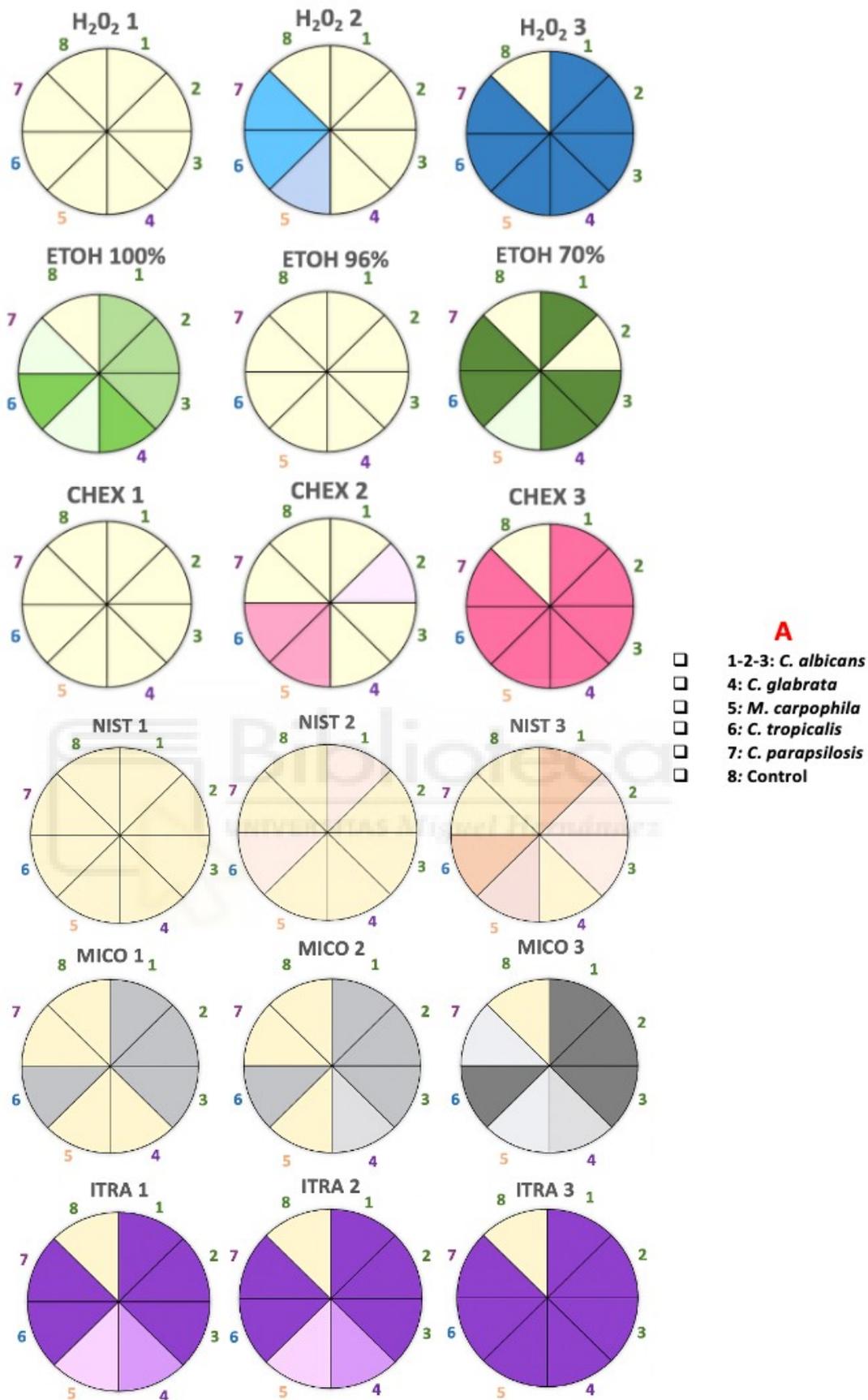


Figura 10: Resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad en placa SDA con antimicrobianos. A) Cepas testadas. En la parte inferior se muestra el color correspondiente al antimicrobiano. La intensidad del color es directamente proporcional al grado de crecimiento en la placa.

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la presencia de distintas especies de *Candida* siendo *C. albicans* la principal especie hallada, lo que coincide con lo publicado previamente.

En cuanto al método a utilizar para la identificación de las especies implicadas en un proceso de estomatitis, cada uno tienen sus ventajas e inconvenientes.

La determinación de la especie analizando exclusivamente su morfología macroscópica y microscópica, así como basándonos en pruebas fisiológicas presenta ciertas limitaciones. Por ejemplo, en medio SDA todas las levaduras *Candida* presentan un crecimiento prácticamente indistinguible lo cual también sucede con la morfología microscópica.

En relación a CHROMagar, el 61% de los aislamientos proceden de colonias verdes y todos corresponden a *C. albicans*. De forma similar ocurre con aquellos procedentes de colonias tipo flor-crema y azul-gris que representan el 7% y 7% de los aislamientos y han sido identificados como *M. carophila* y *C. tropicalis* respectivamente. El 25% restante corresponde a colonias lilas. Tras la secuenciación se ha determinado que 2 especies son las responsables de éstas: *C. glabrata* y *C. parapsilopsis*. Por tanto, de acuerdo con la literatura revisada, CHROMagar es un medio idóneo para caracterizar el tipo de *Candida* en función de las colonias crecidas. No obstante, esto solamente es aplicable a ciertas especies como, por ejemplo, *C. albicans* que específicamente produce una coloración verde. Otras, por el contrario, crecen dando un aspecto y color similar siendo, por tanto, necesario el empleo de técnicas adicionales para su identificación.

Algo parecido ocurre con el AuxaColor2 Bioad®. La lectura del mismo puede a veces no ser totalmente clara, que haya dudas y se esté entre 2 códigos correspondientes a 2 levaduras diferentes lo cual ocurre con la muestra PE001.2BS (códigos 10520/10400 correspondientes a *C. glabrata*/*C. zeylanoides*). Aquí igualmente sería necesario la realización de otras pruebas para su confirmación.

El método más preciso es la secuenciación del fragmento ITS-5.8rDNA pero es el que más tiempo consume y el menos económico. Por tanto, consideramos que el método más idóneo para identificar en una consulta es CHROMagar, teniendo presente que determinados resultados son específicos de una especie mientras que otros requerirán pruebas adicionales.

Los resultados de sensibilidad antisépticos muestran que el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) es eficaz frente a todas las especies en la concentración de uso convencional (10 vol.), pero a medida que disminuye su concentración, la sensibilidad varía, siendo *C. albicans* y *C. glabrata* las más sensibles, dado que su crecimiento continúa inhibido tras la primera dilución mientras que en el resto muestra crecimiento. La eficacia desaparece por completo frente todas las especies tras la segunda dilución.

En relación al etanol, la concentración del 96% posee gran actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de todas las cepas. Por el contrario, todas muestran cierta resistencia cuando está al 100% y 70%, siendo mayor en el alcohol etílico menos concentrado. Señalar que para ambas concentraciones *M. carpophila* es la especie más sensible.

Por último, la clorhexidina convencional es eficaz en todos los casos. Además, tras diluir 1/10 su actividad antifúngica se mantiene igual a excepción de *C.*

tropicalis y *M. carpophila* que presentan un crecimiento considerable y es completamente ineficaz frente a todas ellas tras realizar la dilución 1/100.

Así pues, los antisépticos de uso convencional (H_2O_2 10 volúmenes, ETOH 96% y clorhexidina al 0,12%) son eficaces frente a todas las especies aisladas.

De los tres antifúngicos testados Nistatina muestra ser el más efectivo puesto que todas las especies son sensibles a la misma. Además, tras la primera dilución su actividad se preserva considerablemente ya que solo aparece un difuso crecimiento en una de las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis*. No obstante, tras la segunda dilución, únicamente permanecen inhibidas *C. glabrata* y *C. parapsilopsis*, especies más sensibles frente a Nistatina.

En cuanto al Miconazol, *C. albicans* y *C. glabrata* presentan clara resistencia frente al mismo con crecimiento a cualquier concentración de antifúngico. Para las demás especies, aparece crecimiento al diluir, siendo *M. carpophila* y *C. tropicalis* las más sensibles.

Por último, cabe destacar que frente a Itraconazol todas las especies muestran resistencia ya que aparece abundante desarrollo frente a todas las concentraciones, siendo *M. carpophila* la que tiene un crecimiento ligeramente inferior al resto.

Por tanto, consideramos que el tratamiento antifúngico idóneo es la nistatina dado que todas las especies son muy sensibles a ella incluso tras la primera dilución. Por el contrario, itraconazol carece de efecto alguno sobre ellas. Para pautar miconazol, será preciso conocer la especie implicada dado que solo *C. glabrata*, *M. carpophila* y *C. parapsilosis* muestran ser sensibles al mismo.

Con este trabajo se ha conseguido demostrar la presencia de diversas especies *Candida* en relación con los procesos de estomatitis protésica, así como, su distinta respuesta frente a varios antisépticos y antifúngicos testados *in vitro*. Esta respuesta varía entre especies y, además, hemos encontrado diferencias entre cepas de una misma especie. No obstante, estos resultados pueden variar al aplicarlos *in vivo* dado que no se ha podido valorar si hay diferencias en cuanto a su sensibilidad cuando las levaduras se hallan formando biopelículas (*biofilm*) quedando esto pendiente para futuras investigaciones.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman nuestra hipótesis de que distintas especies de levaduras se hallan implicadas en la estomatitis protésica, estando a veces dos especies simultáneamente implicadas.

La respuesta a los antisépticos y antifúngicos varía según las especies e incluso para una misma especie.

Los antisépticos testados son efectivos para el control de las levaduras estudiadas cuando se aplican a concentraciones de uso convencional, pero su efectividad disminuye considerablemente si se diluyen.

De los antifúngicos testados, el de mayor efectividad es la Nistatina en concentración terapéutica. El miconazol varía según las especies, y el itraconazol presenta una baja efectividad frente a todas las especies incluso en concentración terapéutica.

Dada su distinta respuesta frente a los antimicrobianos, es importante conocer la especie implicada para un abordaje terapéutico personalizado más efectivo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Algunas consideraciones sobre Candida Albicans como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta odontol. venez [Internet]. 2002 Ene [citado 2022 Mayo 08] ; 40(1): 9-17. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652002000100003&lng=es.
2. Ayuso-Montero Raúl, Torrent-Collado José, López-López José. Estomatitis protésica: puesta al día. RCOE [Internet]. 2004 Dic [citado 2022 Mayo 08] ; 9(6): 645-652. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138-123X2004000600004&lng=es.
3. Brevis A.P, Cancino M.J, Cantín L.M (2008). Estomatitis subprótesis: estudio clínico y microbiológico de Candida. Int J Odontostomat 2(1):101-108
4. Cruz Quintana Sandra Margarita, Díaz Sjostrom Pedro, Arias Socarrás Dunier, Mazón Baldeón Gloria Marlene. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2017 Mar [citado 2022 Mayo 09] ; 54(1): 84-99. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072017000100008&lng=es.
5. de Souza RF, Khiyani MF, Chaves CAL, Feine J, Barbeau J, Fuentes R, Borie E, Crizostomo LC, Silva-Lovato CH, Rompre P, Emami E. Improving practice guidelines for the treatment of denture-related erythematous stomatitis: a study protocol for a randomized

- controlled trial. *Trials*. 2017 May 5;18(1):211. doi: 10.1186/s13063-017-1947-y. PMID: 28476133; PMCID: PMC5420092.
6. Gleiznys A, Zdanavičienė E, Žilinskas J. Candida albicans importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015;17(2):54-66. PMID: 26879270.
 7. Ibáñez MNG, Robles BC, Lecona AJ. The frequency of oral candidiasis associated with the use of dental prostheses in patients of the Dental Clinic at the Anahuac University. *Rev ADM*. 2017;74(2):74-78.
 8. Lee M Ximena, Gómez C Leyla, Vergara N Cristian, Astorga B Elizabeth, Cajas C Nataly, Ivankovic S Mariana. Asociación entre Presencia de Levaduras del Género Candida y Factores del Paciente Adulto Mayor con y sin Estomatitis Protésica. *Int. J. Odontostomat*. [Internet]. 2013 Ago [citado 2022 Mayo 08] ; 7(2): 279-285. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2013000200018&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2013000200018>.
 9. López-Labady JV, Gómez F, Herrera J, Romaris ME, Toro D. Prevalencia de estomatitis subprotésica en un grupo de pacientes venezolanos. Estudio clínico transversal. *Acta Odontológica Venezolana*. 2013; 51 (4). Disponible en: <http://www.actaodontologica.com/sdicioness/2013/4/art8.asp>.
 10. Pardi Germán. Algunas Consideraciones Sobre el Tratamiento de la Estomatitis Sub-Protésica de Origen Infeccioso: Revisión Bibliográfica. *Acta odontol. venez* [Internet]. 2002 Dic [citado 2022 Mayo 08] ; 40(3): 305-309. Disponible en:

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652002000300012&lng=es

11. Puerto J.L., García-Martos P., Márquez A., García-Agudo L., Mira J.. Candidiasis orofaríngea. Rev Diagn Biol [Internet]. 2001 Dic [citado 2022 Mayo 08] ; 50(4): 177-181. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732001000400001&lng=es



ANEXOS



ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Número admitido a trámite (OIR UMH):	210705151102
Número Expediente*: *Puede verificar la autorización ética del presente proyecto de investigación en el código QR superior	
Título del proyecto:	LEVADURAS ASOCIADAS A PRÓTESIS DENTAL: NUEVAS PROPUESTAS DE MANEJO
Investigador/a principal:	MARÍA FRANCISCA COLOM VALIENTE

Yo.....
(Nombre y apellidos manuscritos por el participante)

He leído esta hoja de información y he tenido tiempo suficiente para considerar mi decisión.
Me han dado la oportunidad de formular preguntas y todas ellas se han respondido satisfactoriamente.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones.

Después de haber meditado sobre la información que me han proporcionado, declaro que mi decisión es la siguiente:

Doy No doy

Mi consentimiento para la participación en el presente proyecto de investigación, así como para el acceso y utilización de mis datos personales en las condiciones detalladas en la hoja de información.

FIRMA DEL/DE LA PARTICIPANTE	FIRMA DEL INVESTIGADOR/A
NOMBRE:	NOMBRE:
FECHA:	FECHA:



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D/Dña. XXX revoco el consentimiento prestado en fecha y no deseo continuar participando en el estudio "_____".

FIRMA DEL/DE LA PARTICIPANTE	FIRMA DEL INVESTIGADOR/A
NOMBRE:	NOMBRE:
FECHA:	FECHA:



ANEXO 2: HOJA DE DATOS PACIENTE



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN **PRODENT2021**
UMH-GRUPO MÉDICO DENTAL
Investigador Principal: M^a FRANCISCA COLOM

LEVADURAS ASOCIADAS A PRÓTESIS DENTAL: NUEVAS PROPUESTAS DE MANEJO HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

INSTRUCCIONES

Una vez firmado el consentimiento informado, se le asignará al paciente un código o seudónimo que permitirá trabajar con sus datos y resultados de forma anónima. Se seguirá una numeración correlativa, cronológica, añadida a la primera letra de la localidad donde de toma la muestra. La relación entre la identidad del paciente y el seudónimo, únicamente la conocerá el facultativo responsable en el Grupo Médico Dental.

CÓDIGO O SEUDÓNIMO DE PACIENTE

SEXO: H M OTRO

	-				
--	---	--	--	--	--

EDAD (años)

FECHA DE LA TOMA DE MUESTRA (dd/mm/aaaa)

--	--	--

		-			-				
--	--	---	--	--	---	--	--	--	--

DATOS REALTIVOS A LA PRÓTESIS (completar todo lo que corresponda):

FIJA REMOVIBLE

MATERIAL/ES:

FECHA COMIENZO USO:

USO PERMANENTE INTERMITENTE

ZONA QUE OCUPA:

CUIDADOS:

OTROS:

ANEXO 3: COIR



Dra. Dña. M^a Francisca Colom Valiente
Dpto. Producción Vegetal y Microbiología

Elche, 16 de marzo de 2022

Tutora	M ^a Francisca Colom Valiente	
Estudiante	Sara Corbí Martínez	
Tipo de actividad	Otros	TFG
Título del proyecto	Levaduras asociadas a prótesis dental: nuevas propuestas de manejo	
Códigos GIS estancias donde se desarrolla la actividad	S02P1071	
Evaluación riesgos laborales	Conforme condicionado	
Evaluación ética uso muestras biológicas humanas	No solicitado	
Evaluación ética humanos	Favorable	
Evaluación ética animales	No solicitado	
Registro	210705151102	
Referencia	TFG.GME.MFCV.SCM.210705	
Caducidad	5 años	

Una vez atendidas las observaciones/condiciones mencionadas en el informe adjunto del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales, en caso de que las hubiera, se considera que el presente proyecto/contrato/prestación de servicios carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones y, por tanto, es conforme.

No se ha evaluado el uso de muestras biológicas humanas porque no se ha solicitado, ni se ha considerado necesario en base a la información aportada.

No se ha evaluado el uso de animales en un proyecto de investigación porque no se ha solicitado, ni se ha considerado necesario en base a la información aportada.

La evaluación de la participación de voluntarios humanos en un proyecto de investigación, desde el punto de vista ético y de riesgos laborales, es favorable.

Por todo lo anterior, el dictamen del CEII es **favorable**.

Atentamente,

Yolanda Miralles López
Secretaria CEII
Vicerrectorado Investigación

Domingo Orozco Beltrán
Presidente CEII
Vicerrectorado Investigación



Información adicional:

- En caso de que la presente actividad esté financiada y se gestione a través del servicio SGI-OTRI de la UMH, le recordamos que, para poder llevar a cabo dicha actividad en las instalaciones de la UMH, además del dictamen de la OEP, es necesario contar con la autorización del representante institucional. Esta gestión se realiza a través de SGI-OTRI, quien gestiona las correspondientes prestaciones de servicio, contratos /convenios y proyectos de investigación.
- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización del proyecto debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.



ANEXO 4: Modelo de autorización para el depósito de trabajos académicos



MODELO DE AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TRABAJOS ACADÉMICOS

TRABAJO FIN DE GRADO Y TRABAJO FIN DE MÁSTER

Documento de cesión de derechos y autorización para la difusión de trabajos académicos a favor de la Universidad Miguel Hernández de Elche

D./D.^a SARA CORBÍ MARTÍNEZ
DNI/NIF, NIE o pasaporte 45930112D Nacionalidad ESPAÑA
Domicilio ANTONINO VERA 29 PISO 1 Localidad ELDA 03600
País ESPAÑA e-mail saracorbi2405@gmail.com

En calidad de: ~~Autor~~ / coautor. En caso de varios autores, especificar:

1 Marque la opción deseada sobre la cesión de los derechos de autor en los términos indicados en el presente documento: Si cedo No cedo.....

En caso negativo especifique los motivos por los que no cede sus derechos de autor:

En caso afirmativo complete los datos solicitados.

2 Cede, con carácter no exclusivo, en virtud del presente documento, a la Universidad Miguel Hernández los derechos de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación sobre la obra titulada: Levaduras asociadas a estomatitis protésicas: nuevas protésicas nuevas propuestas de manejo

con la finalidad de que sea custodiado por la biblioteca de Campus Sant Joan d'Alacant de la UMH, y depositado en el repositorio institucional RediUMH de acceso abierto. En ningún caso esta autorización implica una cesión en exclusiva de los derechos de explotación del autor sobre la obra ni impide la explotación normal de la obra a través de las formas habituales.

3 Mediante la presente cesión, se autoriza a la Universidad Miguel Hernández a adaptar la obra en la medida que sea necesario para ponerla a disposición electrónica a través de Internet o a cualquier otra tecnología susceptible de adscripción a Internet, así como incorporar 'marcas de agua' o cualquier otro sistema de seguridad en el formato electrónico del trabajo académico. NO se autoriza a realizar ninguna modificación sobre el contenido.

4. El autor declara que es el legítimo propietario de los derechos de explotación de la obra cuya cesión concede con este documento. Si el Trabajo objeto de custodia incluye obras de las cuales el autor/es no es el propietario de los derechos de explotación (fotografías, dibujos, textos, etc.), se declara mediante el presente documento que ha obtenido el permiso sin restricción del titular correspondiente para conceder la presente autorización. En caso de NO haberse obtenido estos permisos el Trabajo tendrá que ser depositado sin las obras (fotografías, dibujos, textos, ect.)

4 El autor se responsabiliza de la veracidad de los datos así como de la originalidad de la/s obra/s y del goce en exclusiva de los derechos cedidos.

5 La Universidad, sin perjuicio de cualquier otro derecho que pueda corresponderle, podrá rescindir unilateralmente la presente cesión en caso de que un tercero haga prevalecer cualquier derecho sobre todo o parte del trabajo académico. En caso de la existencia de cualquier reclamación de un tercero relacionada con la obra, la Universidad quedará exenta de toda responsabilidad.

6 Esta cesión posee carácter gratuito y tendrá eficacia a nivel mundial. Asimismo, esta cesión tendrá la duración correspondiente al periodo legalmente establecido hasta el paso de la/s obra/s al dominio público.

7 El Trabajo Fin de Grado o Trabajo Fin de Máster quedará depositado en el repositorio institucional RediUMH protegiendo los derechos de autor del trabajo mediante licencia Creative Commons bajo las siguientes condiciones:



Reconocimiento — Debe reconocer adecuadamente la autoría, proporcionar un enlace a la licencia o indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de una manera que sugiera que tiene el apoyo del licenciador o lo recibe por el uso que hace.



NoComercial — No puede utilizar el material para una finalidad comercial.



SinObraDerivada — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no puede difundir el material modificado.

8 En cualquier caso, en el repositorio institucional RediUMH de acceso abierto se mantendrá la mención de la autoría y se prohibirá el uso de la obra con fines comerciales, excepto con fines de Investigación y docencia.

9 La Universidad no garantiza ni asume ninguna responsabilidad por la forma y manera como los usuarios hagan uso del posterior trabajo académico.

10 El presente documento se registrá de conformidad con la legislación española en todas aquellas situaciones y consecuencias no previstas en forma expresa en el presente acuerdo y, en concreto, de acuerdo con las prescripciones de la legislación española sobre propiedad intelectual vigente (RDL 1/1996, de 12 de abril) y demás legislación aplicable.

En Elda a 15 de mayo de 2022

SARA|
CORBI|
MARTINEZ

Firmado
digitalmente por
SARA|CORBI|
MARTINEZ
Fecha: 2022.05.15
16:13:46 +02'00'

Fdo. El autor/a