



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CS. ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA**

“Efecto de un sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) en el estatus de portación y variedad de especies de levaduras del género *Candida* en pacientes con xerostomía de diverso origen”.

Soledad Paulina Cavagnola Zúñiga

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REQUISITO
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Irene Morales Bozo

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Blanca Urzúa Orellana

Dra. Ana Ortega Pinto

Adscrito a Proyecto FONIS SA12I2207 “Ensayo clínico aleatorizado para evaluar la eficacia de un sustituto salival casero, en base a Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de aceite de linaza (*Linum usitatissimum*), en el alivio de la sensación de boca seca de distinto origen”

Santiago – Chile

2015



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CS. ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA**

“Efecto de un sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) en el estatus de portación y variedad de especies de levaduras del género *Candida* en pacientes con xerostomía de diverso origen”.

Soledad Paulina Cavagnola Zúñiga

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REQUISITO
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Irene Morales Bozo

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Blanca Urzúa Orellana

Dra. Ana Ortega Pinto

Adscrito a Proyecto FONIS SA12I2207 “Ensayo clínico aleatorizado para evaluar la eficacia de un sustituto salival casero, en base a Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de aceite de linaza (*Linum usitatissimum*), en el alivio de la sensación de boca seca de distinto origen”

Santiago – Chile

2015

A mi Abuelita Teresa (Q.E.P.D.), por su amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado en esta etapa:

A mi Madre Soledad Zúñiga por apoyarme y ayudarme de manera incondicional y haberme dado con mucho esfuerzo las herramientas para poder lograr este proceso, sin ella no podría haber sido posible.

A mis hermanos Bárbara y Roberto por acompañarme siempre, escucharme y apoyarme no sólo en los aspectos de la Universidad sino también en la vida.

A mi abuelita Teresa por haberme llenado de amor toda su vida, por haberme cuidado siempre y haberme demostrado que el amor incondicional existe.

A mi prima y amiga Daniela Pino, por estar siempre dispuesta a escucharme, orientarme y apoyarme.

A mis compañeros de Universidad y amigos de vida especialmente a Cristian Honorato, Camila Concha, Claudia Larenas, Ángela Castillo, Alexander Contreras, Ismael Aldunate, Sebastián Díaz, Andrés Rosa por aguantarme, apoyarme, ayudarme siempre, en los momentos buenos y malos. Gracias por las risas compartidas.

A la Doctora Irene Morales por darme la oportunidad de entrar en este proyecto, por todo su apoyo, confianza, dedicación y paciencia. Por las largas horas de trabajo, que sin duda fueron imprescindibles para poder lograr este proyecto con éxito.

A la Doctora Blanca Urzúa, por su excelente disposición, ayuda y orientación.

A la Dra. Maggiolo y al Dr. Mario Díaz por su linda amistad y apoyo.

Al personal del laboratorio de Bioquímica especialmente a Andrea Cortés por la disposición, cariño y paciencia.

A la Comisión evaluadora Dra. Patricia Palma, Dra. Daniela Adorno y Dr. Covarrubias por su rigurosa examinación y aporte en el desarrollo del presente estudio.

Y por último a todos los académicos que confiaron en mí y a los funcionarios de la FOUCH por su ayuda y amabilidad especialmente a Sisi, Ori, Pao, Paty, Moni, Pablo, Sole, Consu, Luis. Flor, Berta Mery, Luis y David.

Indice

1	Marco teórico.	1
1.1	Sensación de boca seca.	1
1.2	Factores causales de la sensación de boca seca.	3
1.3	Sensación de boca seca en adultos mayores.	4
1.4	Sustitutos salivales como paliativos de la sensación de boca seca.	5
1.5	Propiedades de la Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) y evidencia en el alivio de trastornos de la mucosa oral.	6
1.6	Evidencia del uso de semillas de linaza (<i>Linum usitatissimum</i>) en el alivio de trastornos de mucosa y de sensación de boca seca.	9
1.7	Antecedentes generales de <i>Cándida</i> .	11
1.8	Candidiasis en pacientes con xerostomía.	15
1.9	Planteamiento del problema.	17
2	Hipótesis.	18
3	Objetivo General.	19
4	Objetivos Específicos.	19
5	Materiales y Métodos:	19
5.1	Diseño.	19
5.2	Preparación de los sustitutos salivales.	19
5.3	Individuos participantes en el estudio.	20
5.4	Procedimiento de aleatorización.	21
5.5	Definición de ciegos.	21
5.6	Diseño del estudio.	22
5.7	Determinación del flujo salival (Sialometría).	22
5.8	Procesamiento de las muestras y siembra.	23
5.9	Identificación de levaduras.	24
5.10	Análisis estadístico.	26
6	Resultados.	26
6.1	Descripción de la muestra.	26
6.1.1	<i>Edad y género de la muestra.</i>	26
6.1.2	<i>Patologías y factores asociados a xerostomía.</i>	26
6.1.3	<i>Farmacoterapia asociada a Xerostomía.</i>	28
6.1.4	<i>Sintomatología asociada a xerostomía en la muestra estudiada.</i>	29
6.1.5	<i>Flujo salival e hiposialia en los voluntarios incluidos en el estudio.</i>	30
6.2	Análisis de portación de levaduras del género <i>Candida</i> en medio AST y CRM al usar los sustitutos salivales.	31

6.2.1	<i>Estatus de portación de levaduras del género Candida en medio AST Y CRM, antes y después de usar ambos sustitutos salivales.</i>	31
6.2.2	<i>Efecto de la secuencia en el uso de ambos sustitutos salivales en el estatus de portación de levaduras del género Candida en medio AST y CRM.</i>	32
6.2.3	<i>Cantidad y porcentaje de individuos que aumentaron o disminuyeron el estatus de portación de levaduras del género Cándida en medio AST y CRM, después de usar los sustitutos salivales.</i>	33
6.2.4	<i>Estatus de portación de levaduras del género Candida en medio AST y CRM después de utilizar ambos sustitutos salivales en individuos con o sin hiposialia.</i>	34
6.2.5	<i>Efecto del sustituto salival convencional y experimental en el estatus de portación de levaduras del género Candida en medio AST en individuos con o sin hiposialia.</i>	35
6.2.6	<i>Efecto de los sustitutos salivales en el estatus de portación de levaduras del género Candida en medio CRM en individuos con y sin hiposialia.</i>	36
6.2.7	<i>Cantidad y porcentaje de individuos hiposialicos y no hiposialicos que aumentaron o disminuyeron el estatus de portación de levaduras del género Candida en medio AST.</i>	38
6.3	<i>Identificación presuntiva y variabilidad de especies del género Candida.</i>	39
6.3.1	<i>Frecuencia de aislación de las distintas especies presuntivas según color de colonia en los individuos de la muestra antes y después de usar los sustitutos salivales en medio CRM.</i>	39
6.3.2	<i>Recuento UFC/ml de color rosado (C. krusei) en medio CRM.</i>	41
6.3.3	<i>Recuento UFC/ml de color verde (C.albicans) en medio CRM.</i>	41
6.3.4	<i>Recuento UFC/ml de color verde oscuro (C.dublinskiensis) en medio CRM.</i>	42
6.3.5	<i>Recuento UFC/ml de color morado (C.glabrata) en medio CRM.</i>	43
6.3.6	<i>Recuento UFC/ml de color blanco (C.parapsilosis) en medio CRM.</i>	43
7	Discusión	45
8	Conclusiones	50
9	Referencias Bibliográficas	51
10	Anexos	65
10.1	Anexo 1: Encuesta de Xerostomia (Fox, Busch y Baum, 1987).	65
10.2	Anexo 2: Consentimiento informado.	66
10.3	Anexo 3: Encuesta previa.	69

Resumen

Introducción: La xerostomía es una condición muy frecuente principalmente en adultos mayores, asociado a variadas causas tales como el envejecimiento, enfermedades, condiciones o consumo de fármacos, generando problemas funcionales y sensación de ardor con dolor permanente e infecciones oportunistas como Candidiasis que impactan en la calidad de vida los individuos que lo padecen. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de una terapia paliativa para la sensación de boca seca, utilizando un sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) sobre la portación de levaduras del género *Candida* en adultos con xerostomía.

Material y métodos: Mediante un ensayo clínico, doble ciego, aleatorizado cruzado con blanqueamiento, se tomaron muestras de saliva de 39 voluntarios con xerostomía, antes y después del uso por una semana del sustituto salival experimental y el convencional. Estas muestras fueron sembradas en placas agar Dextrosa Sabouraud-Tetraciclina y en placas de CHROMagar™ *Candida*. Se realizó recuento e identificación presuntiva de levaduras del género *Candida*. La presencia de hiposialia se determinó mediante el test de “Saliva total no estimulada”. Los recuentos de levaduras se analizaron mediante el Test de la prueba de rango con signo de Wilcoxon y la hiposialia con el Test exacto de Fisher. Se relacionó el estatus de portación y variedad de especies de levaduras con: la condición de hiposialia mediante una prueba de regresión logística. Se utilizó el software STATA 9.1.

Resultados: El sustituto experimental en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) no generó una variación significativa en la portación de levaduras del género *Candida* en los individuos del estudio, a

diferencia del sustituto convencional que aumentó de manera significativa esta variable.

De los individuos participantes en el estudio un 48,7% presentó hiposialia acompañada de un mayor recuento inicial de levaduras del género *Candida*, lo que no fue observado en los individuos sin esta condición.

De acuerdo a la identificación presuntiva de levaduras del género *Candida* en medio CHROMagar™ *Candida*; la especie aislada con mayor frecuencia fue *Candida albicans* seguida de *Candida glabrata*.

Conclusiones: El sustituto salival en base a manzanilla y linaza no modificó la portación de levaduras del género *Candida* en los voluntarios del estudio, a diferencia del sustituto convencional, por lo que presenta una ventaja frente al único producto disponible en el mercado nacional. Se requiere de investigaciones adicionales sobre el efecto de la manzanilla y linaza y sus mecanismos de acción sobre levaduras del género *Candida*, de modo de generar mayor evidencia sobre la interacción de estos productos naturales con la microbiota oral. Evidencia que sería fundamental para la toma de decisiones en el tratamiento paliativo de la sequedad bucal de los pacientes xerostómicos, que permita efectivamente mejorar su calidad de vida.

1 Marco teórico.

La población de Adultos Mayores actualmente en Chile va cada vez en aumento. Según información del Instituto Nacional de Estadísticas (INE), en el 2010, los adultos mayores sobrepasaron los dos millones de personas y representan alrededor del 13 % de la población del país y se espera que para el 2020, ésta cifra aumente a 3, 2 millones representando el 20% de la población. De acuerdo a la información entregada en la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010 del MINSAL, de la población chilena mayor de 65 años, el 13 % es fumador, el 75 % es hipertenso, el 26 % es diabético, el 11 % sufre de depresión. La misma encuesta reporta que de los adultos mayores de 65 años, un porcentaje importante requiere de soluciones a la problemática de la sensación de boca seca generada por diferentes causas. Éstas son variadas, asociadas al propio envejecimiento, a distintas enfermedades, condiciones o consumo de fármacos y es por esto que se presenta en una alta prevalencia en individuos de mayor edad, generando problemas, ya sea funcional (habla, masticación, deglución, percepción gustativa), como sensación de ardor y dolor permanente, junto con infecciones oportunistas como Candidiasis que impactan en la calidad de vida de este grupo etario.

1.1 Sensación de boca seca.

La saliva es una solución fundamental para la adecuada función del sistema estomatognático, al recubrir y lubricar las estructuras bucales (Dawes, 2004; Dawes y Odum, 2004). Mucinas salivales sulfatadas y sialiladas junto a otras proteínas salivales, retienen gran cantidad de agua y así, contribuyen a generar un gel hidrofílico esencial para la lubricación del epitelio oral (Amerongen y cols., 1995). Este gel forma un biofilm protector que permite el desplazamiento de la mucosa bucal y dientes durante la masticación, deglución y fonoarticulación (Berg

y cols., 2003). Además, la saliva mantiene la integridad de las estructuras duras y blandas de la cavidad oral, aportando componentes antimicrobianos y otros sistemas de protección para evitar el desarrollo de patologías como caries, enfermedad periodontal y lesiones de la mucosa oral (Pedersen y cols., 2002; Doods y cols., 2005).

La xerostomía o sensación de boca seca es la sensación subjetiva de sequedad en la boca, se produce cuando la tasa de flujo salival es menor que la tasa de pérdida de fluidos de la boca por evaporación y por absorción de agua a través de la mucosa oral. (Dawes, 2004). También se puede deber a una disminución de la cantidad de la saliva secretada y/o a la alteración de su composición, impidiendo la formación apropiada del biofilm oral (Dawes, 2004; Dawes y Odlum, 2004; Brosky, 2007). En individuos xerostómicos se ha descrito una disminución de las mucinas salivales o las del epitelio bucal, asociada a una disminución de las sulfataciones que éstas glicoproteínas presentan (Alliende y cols., 2008; Chang y cols., 2011). Un estudio (Dawes, 2004) sugiere que los individuos que refieren xerostomía, pueden no presentar una completa falta de saliva en la boca. Más bien, puede haber zonas de sequedad localizadas, sobre todo en el paladar duro, donde la película salival es particularmente fina, se encuentra sujeta a la evaporación por la respiración bucal y por la absorción de agua por parte de la mucosa. Situación que puede estar asociada además a una reducción de la secreción de las glándulas menores del paladar blando que contribuyen a la formación de esta película.

Cuando la secreción salival disminuye observándose tasas de flujo salival por debajo de 0,1-0,2 ml/min en la saliva total de reposo y por debajo de 0,4-0,7 ml/min en la saliva total estimulada hablamos de hiposialia o hiposecreción salival. Esta sería una de las causas más importantes de la sensación de boca seca (Silvestre-Donat y cols., 2004).

Los individuos xerostómicos pueden presentar hiposialia, una reducción en la secreción salival que no alcanza a afectar la tasa de flujo salival normal o los

síntomas de boca seca pueden ocurrir sin una reducción en la producción de la salival. (Guggenheimer y Moore, 2003; Gómez-Moreno y cols., 2012).

Como consecuencia de la sensación de boca seca, se produce: a) Dificultad significativa en las funciones de masticación, deglución, fonación y percepción del gusto; b) Mayor susceptibilidad a caries y a enfermedades periodontales, menor tolerancia y retención de prótesis dentales en el caso de pacientes desdentados totales o parciales; c) Mayor predisposición a infecciones bucales oportunistas; d) Malestar bucal generalizado como sensación de boca urente, labios secos, ulceración de las mucosas, menor tolerancia a irritantes como ácidos, condimentos y temperaturas extremas de los alimentos (Dawes, 2004). Y por último, la persistencia de la sensación de boca seca a lo largo del tiempo, provoca un estado de irritación permanente de la mucosa bucal (Cassolato y Turnbull, 2003; Guggenheimer y Moore, 2003; Atkinson, 2005; Napeñas y cols., 2009).

1.2 Factores causales de la sensación de boca seca.

Se ha descrito la participación de múltiples factores en la etiopatogénesis de ésta condición: a) Diversas patologías locales o sistémicas afectan la secreción salival produciendo sensación de boca seca. Entre ellas se describen: Diabetes mellitus, hipertensión arterial, artritis reumatoídea, depresión, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, cirrosis biliar primaria, deshidratación, etc.; b) Factores como tabaquismo, respiración bucal, radioterapia local en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, entre otros, también se asocian a xerostomía; c) Una amplia variedad de fármacos xerostomizantes producen como un efecto colateral, disminución del flujo salival. Entre estos se describen: antidepresivos, antihistamínicos, diuréticos, expectorantes, antihipertensivos, antieméticos, antiparkinsonianos, anticonvulsionantes, antiespasmódicos, anorexígenos, broncodilatadores, descongestionantes, relajantes musculares, etc. (Pajukoski y cols., 2001; Orellana y cols., 2006; Pedersen y cols., 2005; Atkinson y cols., 2005; Brosky, 2007; Von Bültzingslöwen

y cols., 2007; Pijpe y cols., 2007; Porter y cols., 2004; Thelin y cols., 2008; Liu y cols., 2012).

1.3 Sensación de boca seca en adultos mayores.

La sensación de boca seca se presenta con mayor frecuencia en adultos mayores, debido a que producen menor cantidad de saliva como parte del proceso de envejecimiento (Gupta y cols., 2006; Sevón y cols., 2008). Se describe también, una disminución en la expresión de mucinas en las células epiteliales de la mucosa oral (Chang y cols., 2011). Además, a la mayor frecuencia de sensación de boca seca en adultos mayores, contribuye en forma significativa, el hecho de que en este grupo etario se observa un aumento en la prevalencia de patologías crónicas asociadas a xerostomía, con el consecuente consumo de fármacos hiposalivantes en forma sostenida en el tiempo (Hopcraft y Tan, 2010; Johansson y cols., 2012; Morales-Bozo y cols., 2012). Así, en adultos mayores, la xerostomía se presenta como una condición permanente y progresiva.

En nuestro país, son escasos los estudios sobre la prevalencia de sensación de boca seca en la población general y en el adulto mayor. Un estudio indica que el 60% de los adultos mayores desdentados y el 42% de los no desdentados presentan sequedad bucal, siendo la prevalencia del 54% en mujeres y de 28% en hombres (Soto y cols., 2007). La literatura mundial, reporta rangos de xerostomía entre 10 y 50%; con un 20% en la población general, un 30% en mujeres y un 50% en adultos mayores (Orellana y cols., 2006; Hopcraft y Tan, 2010; Villa y Abati, 2011).

Una revisión sistemática de la literatura reciente, en que se incluyen estudios publicados entre 1989 y 2010, sobre prevalencia y causas de xerostomía en adultos mayores, reporta una prevalencia de 17% a 40% en adultos mayores no institucionalizados, de 20% a 72% en adultos mayores institucionalizados y de 55% en adultos mayores con enfermedades sistémicas (Liu y cols., 2012). Puesto que la sensación de boca seca altera funciones fundamentales como el habla, la

masticación, la deglución, la percepción gustativa, la retención de prótesis dentales, etc.; afecta significativamente la calidad de vida de los adultos mayores (Gerdin y cols., 2005; Ikebe y cols., 2006). Incluso, existe evidencia de que la sensación de boca seca en el adulto mayor, además de generar las alteraciones mencionadas se asocia a desnutrición (Dormenval y cols., 1998; Cassolato y Turnbull, 2003; Samnieng y cols., 2012).

1.4 Sustitutos salivales como paliativos de la sensación de boca seca.

La terapia para la sensación de boca seca permanente y progresiva, se encuentra restringida a medidas paliativas, sobre todo cuando la función de las glándulas salivales se encuentra afectada de un modo significativo, de tal forma que no es posible estimular la secreción salival, se indica el uso de sustitutos salivales. Los sustitutos salivales alivian la sensación de boca seca y sus síntomas asociados, por medio de la lubricación transitoria de las estructuras bucales. Estos elementos se aplican sobre la mucosa oral varias veces al día, ya sea en forma de líquido, gel o spray. (Amerongen y cols., 2003; Shiboski y cols., 2007; Hahnel y cols., 2009). Los sustitutos salivales comerciales introducidos en el mercado internacional, difieren en su composición, viscosidad y presentación. Entre los componentes lubricantes incorporados en ellos se encuentran: mucina, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, goma xantana, semillas de linaza o polietilenglicol. (Shiboski y cols., 2007; Hahnel y cols., 2009). Recientemente, se ha publicado una revisión sistemática sobre los estudios reportados entre 1950 y octubre de 2011, sobre la efectividad de las terapias tópicas en el alivio de los síntomas de boca seca. En esta revisión se incluyeron 32 ensayos clínicos, en que se testeaban sustitutos salivales aplicados a la mucosa oral en todas sus presentaciones (Furness y cols., 2011). De ellos, 9 ensayos comparaban la efectividad de sustitutos salivales contra placebo, 5 ensayos comparaban sustitutos salivales con estimulantes de la secreción salival y 18 ensayos comparaban la efectividad de 2 sustitutos salivales entre sí. Los autores concluyen

que no existe evidencia que avale la efectividad de ninguna de las terapias analizadas en el alivio de los síntomas de xerostomía (Furness y cols., 2011; Chiappelli, 2012). En contraste, un estudio reciente, comprueba el alivio de los síntomas de la xerostomía (boca seca, necesidad de tomar líquido para comer y tragar, sensación de boca urente) de dos sustitutos salivales en pacientes con xerostomía de distinto origen (Morales-Bozo y cols., 2012).

1.5 Propiedades de la Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y evidencia en el alivio de trastornos de la mucosa oral.

Las flores secas de *Matricaria chamomilla* (fig. 1), planta herbácea de la familia *Asteraceae* es una de las plantas medicinales más utilizadas en el mundo. Contienen aceite esencial y flavonoides con efectos sedantes, antiespasmódicos, antiinflamatorios, antimicrobianos y antifúngicos (Jamalian y cols., 2012; Singh Ompal y cols., 2011). Aproximadamente 120 metabolitos secundarios se han identificado en manzanilla, incluyendo 28 terpenoides y 36 flavonoides. Los principales componentes del aceite esencial extraído de las flores de manzanilla son los terpenoides alfa-bisabolol y sus óxidos (bisabolóxidos A, B, C y bisabonolóxidos), azulenos (como camazuleno), cumarinas (dioxicumarina, herniarina, umbeliferona), espiroéteres y polisacáridos. Además de los flavonoides apigenina, quercetina y luteolina, entre otros, que constituyen el grupo hidrofílico de la planta (McKay y Blumberg, 2006; Orav y cols., 2010; Srivastava y cols., 2010). Estos compuestos son solubles en agua caliente y las cantidades obtenidas en infusiones son significativas (Barene y cols., 2003).

Figura 1. Flores de *Matricaria chamomilla*



(Fuente: Anne McIntyre *Chamomilla recutita* - German Chamomile: Western and Ayurvedic Perspectives. Herbal medicine. Originally published in issue 202 - January 2013).

Varios estudios avalan el efecto antimicrobiano del aceite esencial de la manzanilla. Bisht y cols. (2011) en su estudio afirma que el aceite esencial de manzanilla tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias. Sugiere que el aceite esencial es una gran fuente de alfa - bisabolol y camazuleno, moléculas que serían las responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial. Otro estudio *in vitro* avala su efecto antimicrobiano sobre especies como *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus camorum*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas Aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella Dysenteria*, *Listeria innocua*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Abdoul-Latif y cols., 2011). Otros estudios describen el efecto antibacteriano de la manzanilla sobre *S. Aureus*, *E.coli* y *Streptococcus pneumoniae* (Munir y cols., 2014; Darvishi y cols., 2013). Un estudio clínico más reciente realizado en pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos con ventilación mecánica, sostiene que enjuagues en base a extractos de manzanillas presentan efectos antibacterianos significativos en el recuento de *S. pneumoniae* y *S. aureus* (Darvishi y cols., 2013). Debido a su efecto antibacteriano, Saderi y cols. (2005)

sugiere el uso de enjuagues naturales en base a manzanilla para el control de *Porphyromonas gingivalis* en individuos con periodontitis

Uno de los estudios que avala el efecto antifúngico de la manzanilla, es el estudio *in vitro* de Jamalian (2012), en el que se describe que el aceite esencial de manzanilla actuó como un potente inhibidor del crecimiento en 10 tipos distintos de hongos de importancia clínica. En este mismo estudio se describe que camazulenos serían los principales componentes de este aceite (61,3%) y se sugiere que la propiedad antifúngica contra los dermatófitos y saprófitos observada puede atribuirse a estos componentes. Por otro lado, Pauli y Schilcher (2004) evaluaron los efectos terapéuticos del aceite esencial de la manzanilla y de su componente α - bisabolol para el tratamiento oral de dermatofitosis en modelos de rata y ratón. El efecto de α - bisabolol fue comparable con antifúngicos conocidos como nistatina, griseofulvina, fluconazol, itraconazol y ketoconazol. Un estudio *in vitro* de Abdoul-Latif (2011), afirma que el aceite esencial de manzanilla y su extracto de metanol tuvieron un efecto antifúngico para *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Otro estudio *in vitro* sugiere un efecto antifúngico sobre especies de *C. albicans* obtenidas de individuos con otitis aguda externa (Nogueira, 2008).

Adicionalmente, debido a sus propiedades, el extracto de manzanilla ha sido evaluado en la protección o reparación de lesiones de mucosa. Un estudio experimental realizado en ratones, reporta un efecto protector de alfa-bisabolol administrado por vía oral, en la aparición de úlceras en la mucosa gástrica inducidas por fármacos o etanol (Rocha y cols., 2010). El mismo resultado se obtuvo al utilizar el extracto acuoso de manzanilla (Al-Hashem, 2010). Otro estudio evalúa el efecto del extracto de manzanilla, en la reparación de úlceras inducidas quirúrgicamente en la lengua de animales de experimentación. En este estudio se observó una estimulación de la re-epitelización y del contenido de fibras colágenas producidas en la herida, a los 10 días de tratamiento (Duarte y cols., 2011). También se ha estudiado el efecto de los derivados de las flores de manzanilla en lesiones de la mucosa oral en humanos. Un estudio determina el efecto del uso de

un enjuagatorio bucal conteniendo extracto de manzanilla, aplicado a 32 pacientes con cáncer de cabeza y cuello sometidos a radiación o quimioterapia y que presentaban irritación de la mucosa oral. En estos pacientes se produjo alivio del malestar bucal y los signos clínicos de mucositis desaparecieron en la primera semana de aplicación del enjuague. (Carl y Emrich 1991). También se reporta un caso en que se utiliza un enjuague con infusión de manzanilla, para el alivio de la mucositis inducida por terapia con metotrexato en un paciente con artritis reumatoídea (Mazokopakis y cols., 2005). Un estudio clínico evalúa el efecto del extracto de manzanilla en el alivio del dolor en pacientes con úlceras recurrentes orales, en donde se observó un efecto analgésico significativo en los individuos del estudio (Ramos-e-Silva y cols., 2006). En pacientes xerostómicos es frecuente la aparición de lesiones traumáticas e irritativas de la mucosa oral ya que la presencia inadecuada de la saliva debilita el epitelio y su ulceración es más frecuente, debido a que la mucosa seca es más vulnerable a trauma. Es por lo anterior que, los individuos con sensación de boca seca, podrían verse beneficiados por estas propiedades reparativas de la manzanilla (Pinna y cols., 2015).

1.6 Evidencia del uso de semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) en el alivio de trastornos de mucosa y de sensación de boca seca.

Las semillas del lino (*Linum usitatissimum*), planta herbácea de la familia *linaceae*, son ricas en proteínas, aceites insaturados, fibras insolubles y fibras solubles o mucílagos (Singh KK y cols., 2011). Cuando las semillas de linaza se humedecen, las células de la cubierta de la semilla liberan grandes cantidades de mucílago que forman una cápsula gelatinosa que las rodea (Naran y cols., 2008). Este mucílago soluble en agua, contiene una mezcla de los polímeros de alto peso molecular galacto-arabino-xilano y rhamno-galacturonano (Warrand y cols., 2005a; Naran y cols., 2008). Estos polímeros se unen a través de interacciones

intermoleculares, lo que les otorga propiedades viscoelásticas (Warrand y cols., 2005b), similares a las que presentan las mucinas salivales encargadas de mantener hidratada a la mucosa oral (Van der Reiden y cols., 1994; Park y cols., 2007).

En un estudio experimental realizado en ratas, se evaluó el efecto del mucílago de semillas de linaza, en la prevención de la generación de lesiones en la mucosa gástrica inducidas por etanol. Los resultados indicaron que el mucílago redujo en forma significativa, el número y tamaño de las úlceras gástricas inducidas por el irritante (Dugani y cols., 2008). Otro estudio realizado también en ratas, evalúa el uso del mucílago de semillas de linaza como un agente mucoadhesivo, con la intención de crear microesferas que optimicen la absorción de fármacos por la mucosa oral. El análisis *in vitro*, indica que las microesferas que contenían mayor porcentaje de mucílago en su composición, presentaban también mayor adhesividad a las mucosas (Nerkar y cols., 2011).

En relación a su uso en humanos, en un estudio piloto realizado en el año 1994, un sustituto salival comercial en base a extractos de semilla de linaza, fue evaluado en el alivio de la sensación de boca seca de 37 individuos. Los resultados indicaron que los individuos con sintomatología más severa, presentaban mayor alivio al usar el sustituto salival (Johansson y cols., 1994). Este mismo producto fue evaluado en el alivio de la sensación de boca seca de 20 individuos con xerostomía consecutiva a radiación terapéutica por cáncer de cabeza y cuello, contrastado con un sustituto salival en base a carboximetilcelulosa. El sustituto salival en base a semillas de linaza, produjo mayor alivio a la sintomatología de boca seca (Andersson y cols., 1995). El mismo grupo de investigadores, analiza el efecto de ambos sustitutos salivales en la composición de la microbiota bucal en 19 individuos con hiposalivación consecutiva a radioterapia por cáncer de cabeza y cuello. Los resultados indicaron que ninguno de los sustitutos salivales utilizados provocaron modificación de la microbiota oral (Johansson y cols., 2000). En un estudio posterior, un enjuagatorio

bucal conteniendo mucílago de semilla de linaza con o sin adición de clorhexidina, fue evaluado en el tratamiento paliativo de la sensación de boca seca en pacientes con síndrome de Sjögren. Los resultados indicaron que ambos enjuagatorios, disminuyeron significativamente los síntomas de sequedad bucal, la sensación de boca urente y los problemas al hablar (Johansson y cols., 2001).

Aunque los resultados de estos estudios no fueron avalados como significativos en la revisión sistemática reciente de Furness y cols. (2011), constituyen evidencia de su uso en la cavidad oral de seres humanos con disfunción salival.

1.7 Antecedentes generales de *Candida*.

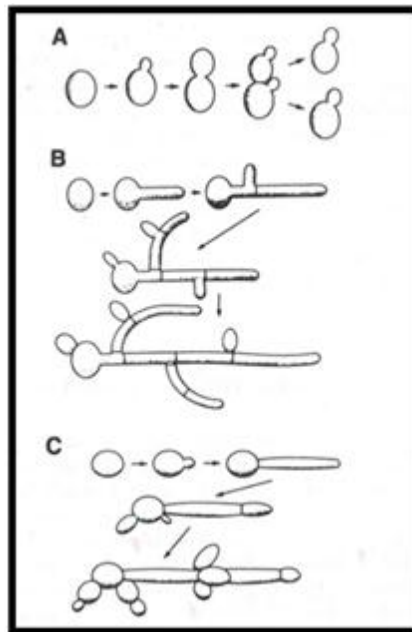
Las levaduras son organismos eucariotas aeróbicos, también se consideran anaerobios facultativos, son heterótrofos y no presentan clorofila. Son considerados como organismos comensales, pero frente a determinadas condiciones de desequilibrio entre el hospedero y el patógeno pueden comportarse como oportunistas generando infecciones (Akpan y Morgan, 2014; Salas y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2002).

Las levaduras del género *Candida* se encuentran presentes en tracto gastrointestinal, piel, tracto vaginal y cavidad oral como parte de la microbiota normal, sin embargo en determinadas condiciones pueden generar una patología llamada Candidiasis. (Olorode y Okpokwasli, 2012; Akpan y Morgan, 2014, Salas y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2002). Este género corresponde al *Phylum Ascomycota*, clase *Hemiascomycetes*, orden *Saccharomycetales* y familia *Candidaceae* (Calderone, 2002).

Las levaduras son microorganismos saprofitos, que se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación, sin embargo también puede ser mediante fisión. (Liebana, 2002). Todas las especies del género *Candida* se desarrollan como células levaduriformes ovaladas, (también llamadas blastosporas) de 3 a 5 μm y son capaces además de experimentar cambios morfológicos desde levaduras a pseudohifas

(células hijas a partir de gemaciones alargadas que no se separan de la célula madre) o hifas (estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos), con excepción de *Candida glabrata*, pues es la única especie de este género que se presenta sólo como levadura (Pardi y Cardozo, 2002; Liébana , 2002; Dumitru y cols., 2004, Coutinho, 2009) (Figura 2).

Figura 2. Forma de crecimiento de las especies *Candida*



Crecimiento en forma de levadura. **B)** Crecimiento en forma de hifa. **C)** Crecimiento en forma de pseudohifa.

(Fuente: Calderone, R. A. (2002) *Candida* and Candidiasis. Ed. ASM press.)

En la revisión de Akpan y Morgan (2002) se refiere a la Candidiasis como una infección oportunista de la cavidad oral, que se presenta principalmente en los primeros años de vida y en los adultos mayores, causada por un crecimiento excesivo de las especies *Candida*. Estos organismos se encuentran en mayor cantidad sobre la superficie de la lengua, seguida el paladar y la mucosa oral (Jaimes y cols., 2008).

Se describe también que la Candidiasis oral es una infección oportunista causada por un crecimiento excesivo o infección de la cavidad oral principalmente causada por *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, las que representan más del 80% de los aislados a partir de infecciones orales. Otros aislados en menor proporción corresponden a *Candida pseudotropicalis*, *Candida guillierimondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis* y *Candida stellatoidea* (Rodríguez y cols., 2002). Recientemente se ha aislado *Candida dubliniensis*, descrita por primera vez en 1995. Esta especie se asocia con lesiones orales de individuos infectados por VIH. Está estrechamente relacionada con *C. albicans* tanto fenotípicamente y genotípicamente y es importante ya que está involucrada en los casos de resistencia a los antifúngicos frecuentemente utilizados (Sullivan y cols., 1995; Aguirre, 2002; Coleman y cols., 1997; Pinjon y cols., 2005.).

La transformación de *Candida spp* a patógeno depende de la combinación de los factores del hospedero, modificación del microambiente de la cavidad oral y factores de patogenicidad del hongo. Dentro de los factores dependientes del microorganismo, la virulencia de levaduras del género *Candida* y principalmente de *C. albicans* se debe a un conjunto de factores relacionados con su capacidad para evadir los mecanismos de defensa del hospedero y tratamiento antifúngico junto con su capacidad de lesionar las células y tejidos (Aguirre, 2002). El principal factor de virulencia parece ser la capacidad para persistir e invadir el epitelio oral a lo que contribuyen variados mecanismos (Salas y cols., 2000), tales como:

Switch fenotípico: característica muy estudiada en *C. albicans* que consiste en el cambio morfológico de levaduras a hifas. Esta capacidad de transformación a forma micelial está asociado a un cambio de estado comensal a parasitario por parte del hongo y mayor capacidad patógena de adhesión, invasión y penetración de la superficie epitelial. Éste estado también muestra una mayor resistencia a la fagocitosis en comparación con la levadura (Williams y cols., 2011; Salas y cols., 2000; Pardi, 2002; Rodríguez y cols., 2002; Budtz-Jorgensen, 2000).

Enzimas hidrolíticas: Proteasas ácidas que son activadas por una baja de PH a 4-5 en boca, degradan la queratina y colágeno del epitelio y otras proteínas de la matriz extracelular. También destruyen moléculas del sistema inmune del hospedero como IgA1, IgA2 del exudado seroso o IgA secretora, la principal inmunoglobulina de las membranas mucosa. Esta gran capacidad proteolítica es principalmente presentada por *C. albicans*, seguido de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Lo anterior se debe a que la primera puede secretar nueve aspartil-proteasas distintas y en niveles mucho más altos en comparación con las otras especies (Budtz-Jorgensen, 2000; Rodríguez, 2002; Williams y cols., 2011).

Fosfolipasas y lisofosfolipasas: Enzimas activadas por una disminución del pH, favorecen la lisis de membranas que normalmente actúan como barreras mecánicas, ya que son capaces de catalizar la hidrólisis de fosfolípidos, el mayor componente de las membranas celulares, por lo que facilita el daño tisular del hongo y la subsecuente invasión a los tejidos. (Salas y cols., 2000; Pardi, 2002). Se ha identificado la producción de estas enzimas en varias *Candida spp*, como: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* y *C. dubliniensis* (Castrillón y cols., 2005).

Adhesinas: La adherencia de *Candida spp*, es necesaria para la colonización en la mucosa y la formación de biofilm junto con la persistencia en el organismo. Ésta ocurre mediante procesos de adhesión específicos y no específicos. La adhesión

no específica corresponde a la atracción hidrofóbica de las moléculas de superficie de la levadura *Candida* al sitio previsto en el tejido. Los mecanismos específicos se producen mediante la unión adhesina- ligando (receptor) a células hospederas, como células epiteliales, endoteliales y células fagocíticas, además de a otras levaduras, como también la coagregación con otros microorganismos como bacterias lo que determina su participación en infecciones polimicrobianas (Williams y cols., 2011; Panizo y Reviákina ,2001).

1.8 Candidiasis en pacientes con xerostomía.

El crecimiento excesivo de *Candida*, puede conducir a malestar local, sensación de alteración del gusto, disfagia. Su crecimiento excesivo en el esófago puede llevar a una mala nutrición. En pacientes inmunodeprimidos/inmunosuprimidos, la infección puede propagarse a través del torrente sanguíneo o tracto gastrointestinal superior lo que conduce a una infección sistémica severa con una morbilidad y mortalidad significativas (tasa de mortalidad del 71% al 79%) (Akpan y Morgan, 2014). Sin embargo, para que este hongo exprese sus factores de virulencia y se transforme en patógeno en la cavidad bucal, tienen que coincidir factores tanto locales como sistémicos que se describen en la tabla 1 (Gonsalves y cols., 2008; Aguirre, 2002; Budtz-Jorgensen, 2000):

Tabla 1. Factores locales y sistémicos del hospedero que participan en el desarrollo de Candidiasis.

Factores locales	Factores sistémicos
Tabaco	Diabetes mellitus,
Prótesis	Inmunodeficiencias
Uso de inhalador de esteroides	Inmunosupresión
Dieta rica en carbohidratos	Corticoesteroides
Leucoplasia	Antibióticos
Cáncer bucal	Quimioterapia / Radioterapia
Xerostomía	Desórdenes hormonales y trastornos nutricionales: Deficiencias en Fe, folatos y Vit B12
Hiposalivación	Infancia, Vejez
Síndrome de Sjögren	Embarazo

La alteración de la función de las glándulas salivales también puede predisponer el desarrollo de Candidiasis, debido a que la saliva provoca un efecto de dilución y elimina los organismos de la mucosa. Proteínas antimicrobianas de la saliva tales como lactoferrina y peroxidasas inhiben el crecimiento de bacterias y hongos. Además, la lisozima produce hidrólisis en la capa de peptidoglicano de la pared celular de bacterias y en *C. albicans* reduce la secreción de aspartil proteinasa a una baja concentración. Se ha identificado en estudios *in vitro* que polipéptidos ricos en histidina, son capaces de inhibir el crecimiento de *C. albicans*, y que anticuerpos específicos interactúan con la mucosa oral evitando el crecimiento excesivo de *Candida spp* (Akpan y Morgan, 2014; Budtz-Jorgensen, 2000).

Estudios revelan una relación inversa entre el flujo salival y los recuentos de colonias de *Candida spp* en la saliva de los pacientes con xerostomía, siendo *C. albicans* la especie aislada con mayor frecuencia, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Torres y cols.; 2002). Lo anterior se hace más evidente en sujetos adultos mayores que presentan reducidas tasas de flujo salival y cuyos recuentos de levaduras orales son significativamente mayores (Budtz-Jorgensen, 2000.). Por lo tanto, las condiciones como el Síndrome de Sjögren, la radioterapia de cabeza y cuello o fármacos que reducen la secreción salival pueden conducir a

un aumento del riesgo de la candidiasis oral (Akpan y Morgan, 2014).

1.9 Planteamiento del problema.

El individuo con xerostomía, debe lubricar su mucosa oral al menos 4 veces al día, durante todos los días de su vida, razón por la cual requiere de la adquisición de los sustitutos salivales a permanencia. Esta situación conlleva una carga económica adicional a la ya existente en individuos adultos mayores.

Los sustitutos salivales comerciales, utilizados en los estudios descritos en la literatura, no se encuentran disponibles en el mercado farmacéutico nacional. En Chile, hay disponible un único sustituto salival en base a metilcelulosa, que puede ser adquirido sólo en algunas farmacias, mediante receta y que no ha sido testeado en su efectividad para reducir la sensación de boca seca. A la fecha, existe un estudio nacional de dos sustitutos salivales con efecto paliativo demostrado sobre la sensación de boca seca, sin embargo, éstos no existen en el mercado nacional (Morales-Bozo y cols., 2012).

Por lo anterior descrito, Chile no presenta un sustituto salival disponible que sea de bajo costo, que pueda ser adquirido sin la prescripción de un profesional y que sus efectos en la microbiota oral se hayan evaluado científicamente.

Tratando de buscar una solución a esta problemática, en este estudio hemos implementado una terapia paliativa de la sensación de boca seca, en base al uso de un sustituto salival casero formulado en base a una infusión de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de linaza (*Linum usitatissimum*). En un ensayo clínico aleatorizado preliminar realizado en nuestro laboratorio, se ha observado que la efectividad de este sustituto en el alivio de la sensación de boca seca en adultos mayores, es significativamente mayor a la presentada por el único sustituto salival disponible en nuestro país (resultados no publicados); y esperamos corroborar su efecto en levaduras del género *Candida*.

Esta investigación mediante un ensayo clínico permitirá evaluar el efecto de un sustituto salival casero en base a manzanilla y semillas de linaza, en el estatus de

portación y variedad de especies de levaduras del género *Candida* en pacientes con xerostomía de diversos orígenes.

Se pretende ofrecer a la población con disfunción salival, un sustituto con eficacia comprobada y efecto fungistático para levaduras del género *Candida*, de preparación casera, formulado en base a componentes naturales de fácil adquisición en el territorio nacional y posible de ser usado diariamente.

Por medio de la realización de nuestro estudio, pretendemos cooperar al logro del objetivo estratégico 4.8 de “Mejorar el estado de salud funcional de los adultos mayores” planteado en las Metas 2011-2020 del MINSAL. Al disponer de este sustituto salival experimental propuesto en esta investigación, adultos mayores verían mejoradas por sus propios medios, las funciones básicas del sistema estomatognático alteradas por la condición de sensación de boca seca, aportando además a su condición de salud mediante un sustituto que no altere la portación de levaduras de género *Candida*. Pretendemos generar evidencia que permita seleccionar un sustituto sobre otro, tanto por el valor económico como antimicótico, con el fin de aportar en el tratamiento y prevenir esta enfermedad oportunista con gran prevalencia en la población de adultos mayores.

La pregunta de Investigación es: ¿Cuál es el efecto de un sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de linaza (*Linum usitatissimum*), en la portación y variedad de especies de levaduras del género *Candida* en pacientes con xerostomía de diverso origen?

2 Hipótesis.

“El uso del sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) no afecta el estatus de portación y variedad de especies de levaduras del género *Candida* en pacientes con xerostomía de diverso origen versus un sustituto salival convencional.”

3 Objetivo General.

Determinar el efecto de un sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de aceite de linaza (*Linum usitatissimum*) en el estatus de portación y variedad de especies de levaduras del género *Candida* en pacientes con xerostomía de diverso origen.

4 Objetivos Específicos.

1. Determinar el estatus de portación de levaduras del género *Candida* en individuos con xerostomía de diverso origen, antes y después de usar el sustituto salival casero y el convencional.
2. Identificar de manera presuntiva las diferentes especies de levaduras del género *Candida* en individuos con xerostomía de diversos origen, antes y después de usar el sustituto salival casero y el convencional.
3. Comparar el efecto de ambos sustitutos salivales en la variedad de especies y estatus de portación de levaduras del género *Candida* en pacientes con xerostomía de diversos orígenes.

5 Materiales y Métodos:

5.1 Diseño.

El estudio corresponde a un ensayo clínico aleatorizado cruzado con blanqueamiento, con una modalidad de análisis “por intención de tratar”.

5.2 Preparación de los sustitutos salivales.

El sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y

semillas de aceite de linaza (*Linum usitatissimum*) definido como sustituto experimental (SE), correspondió a una infusión a partir de 30 g de semilla de linaza y 20 g de manzanilla para un litro de agua. Para su preparación, a 20 g de flores secas de manzanilla, se le agregaron 500 ml de agua en ebullición, se agitó durante 10 minutos y se separó la infusión por filtración. Para obtener el mucílago de la semilla de linaza, 30 g de semillas se incubaron en 500 ml de agua estéril a 4°C y se mantuvieron en agitación durante 8 h. Se descartaron las semillas y la parte líquida fue esterilizada por filtración. El mucílago de linaza y la infusión de manzanilla obtenida previamente, fueron mezclados en partes iguales, dando origen al sustituto salival casero.

El sustituto salival convencional (SC) correspondió a un preparado conocido como “Saliva artificial” elaborado bajo receta médica por Farmacias Ahumada en base a metilcelulosa 4% p/v, glicerina 10% p/v y suero fisiológico cantidad suficiente para el volumen final.

Ambos sustitutos, fueron alicuotados, con la dosis necesaria para un día de tratamiento (10 ml) y almacenados en envases estériles idénticos, opacos y herméticos; los que fueron rotulados según aleatorización y almacenados a 4°C. Todos ellos fueron etiquetados con las instrucciones para su uso y entregados en la secuencia descrita en diseño experimental. Ambos sustitutos fueron utilizados en una dosificación de 2 ml, 4 veces al día por un período de 1 semanas cada uno.

5.3 Individuos participantes en el estudio.

Se consideró un grupo de 39 individuos, reclutados en el Servicio de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión y exclusión descritos en la tabla 2:

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión para ser considerados en el estudio.

Criterio	Detalle
Criterios de inclusión	Adultos de ambos géneros.
	Presentar sensación de boca seca de cualquier origen, determinada por responder afirmativamente a la pregunta N° 1 de la encuesta de Fox y cols. (Anexo 1).
	Que puedan realizar el procedimiento de recolección de saliva.
	Haber firmado el Consentimiento Informado del estudio (Anexo 2).
Criterios de exclusión	Presencia de lesiones de la mucosa bucal evidenciables a la inspección clínica.
	Individuos con trastornos motores a nivel bucal.
	Individuos con deterioro cognitivo severo.
	Individuos que estén en tratamiento que estimule la secreción salival.
	Individuos que requieran tratamiento dental quirúrgico.

Los individuos fueron debidamente informados del tipo de investigación y del protocolo metodológico del estudio aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, mediante el consentimiento informado.

5.4 Procedimiento de aleatorización.

Se generó una lista de aleatorización mediante el software Random Allocation. La cual correspondió a una aleatorización simple que identificó secuencialmente los sujetos que fueron asignados primero con el sustituto salival casero y luego el convencional y viceversa. Se realizó el ocultamiento de la secuencia de aleatorización al equipo de investigadores a cargo de la evaluación clínica. Para permitir este ocultamiento, los frascos que contenían el sustituto salival casero o el convencional fueron identificados por un código que fue conocido sólo por el investigador que generó la secuencia.

5.5 Definición de ciegos.

Fueron ciegos, los sujetos voluntarios, los miembros del equipo de investigación que tuvieron comunicación con los sujetos voluntarios, los miembros del equipo de

investigación que actuaron como asignadores de eventos y quienes analizaron los datos.

5.6 Diseño del estudio.

Al grupo de individuos de los cuales se seleccionó la muestra, que aceptaron su participación informada y voluntaria, un equipo de odontólogos clínicos calibrados, les realizó una anamnesis y un examen clínico. Se aplicó la encuesta de Fox y cols., (1987) para seleccionar a los individuos con sensación de boca seca. A los individuos se les informó del estado de su salud bucal y en caso de ser necesario se les orientó sobre cómo proceder para su posterior atención y tratamiento.

Los individuos que cumplieron con los criterios de inclusión comenzaron el estudio utilizando, durante 1 semana y en condiciones estandarizadas (como se describió en la sección “sustitutos salivales”), el sustituto salival asignado de manera aleatoria (experimental o convencional) y otra semana el sustituto salival faltante (los individuos asignados inicialmente a utilizar el sustituto salival convencional, utilizarán el sustituto salival experimental y viceversa), separados por una “fase de blanqueamiento” donde no se utilizó sustituto durante una semana. A cada individuo, se le entregó la cantidad de frascos de sustitutos salivales necesarios para 7 días. Al inicio del estudio, se graduó la sensación de boca seca, mediante la “Encuesta previa” (Anexo 3) y se determinó el flujo salival mediante el test de “Saliva total no estimulada”.

5.7 Determinación del flujo salival (Sialometría).

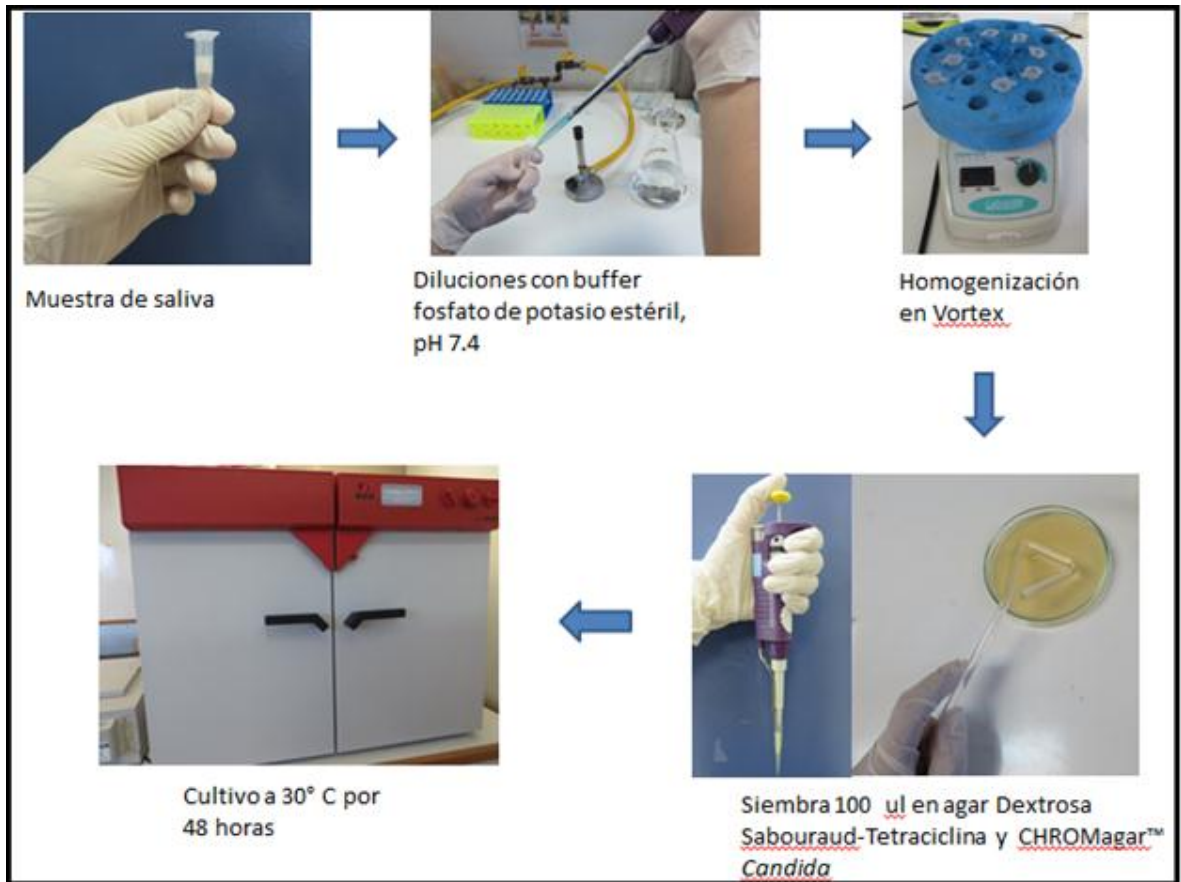
Para determinar la presencia o ausencia de Hiposialia, a los individuos participantes en el estudio se les determinó el flujo salival mediante el test de “Saliva total no estimulada” (Márton y cols., 2008) además, se definió la condición de hiposialia como una tasa de flujo salival menor o igual a 0,2 ml/min (Silvestre-Donat y cols., 2004). El flujo salival se determinó entre las 8 y 11 horas A.M. y con

el individuo en reposo. Se solicitó a los individuos que laven su boca con agua y cepillo dental y se abstengan de consumir alimentos durante una hora. Luego se solicitó que depositen en un recipiente, previamente pesado, la saliva que producen durante cinco minutos. La saliva recolectada, fue pesada y los valores obtenidos se expresaron en ml/min, asumiendo un valor de densidad igual a 1 para la saliva.

5.8 Procesamiento de las muestras y siembra.

Un odontólogo investigador calibrado, tomó las muestras de saliva para el cultivo de levaduras de los individuos con xerostomía, antes y después del uso de cada sustituto salival. Las Unidades formadoras de colonias de levaduras por mililitro de saliva (UFC/ml) fueron obtenidas a partir de saliva donada por los sujetos participantes en el estudio. Para ello, 100 ul de saliva fueron sembradas directamente en las placas y se realizaron diluciones seriadas en buffer fosfato de potasio estéril, pH 7.4 Cada muestra de saliva y/o dilución fueron agitados en un Vortex (Thermolyne Maxi Mix II) durante 30 segundos con el fin de homogenizar la muestra. Se tomaron 100 ul de saliva directa y de las diluciones y se sembraron con asa de vidrio en placas agar Dextrosa Sabouraud-Tetraciclina (50 mg/ml) (medio AST) y en placas de CHROMagar™ Candida (medio CRM) e incubadas en estufa Pasteur durante 48 horas a 30 °C en ambiente de aerobiosis (Figura 3).

Figura 3. Procesamiento de las muestras y cultivo.



Fuente: Laboratorio de Bioquímica

5.9 Identificación de levaduras.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, para obtener las UFC/ml de levaduras de género *Candida* se observó el desarrollo de colonias en las placas de medio AST y se realizó el recuento de éstas. De acuerdo a la densidad de colonias, se contó de manera individual aquellas placas cuya densidad de colonias permitían su enumeración y en aquellas más densas se determinó el cuadrante más representativo, se contaron las colonias y se multiplicó por 4 para obtener el valor de las UFC/ml de cada placa. En el caso que correspondió, el resultado de cada recuento se multiplicó por el factor de dilución obteniendo de esta forma las

UFC/ml finales de cada placa.

Para la identificación presuntiva obtenida mediante la siembra en medio CHROMagar™ Candida, las especies de *Candida* se determinaron por observación colorimétrica de las colonias. Este medio contiene un sistema bioquímico basado en la detección de determinadas reacciones enzimáticas especie-específicas por parte de las levaduras del género *Candida* mediante hidrólisis de un sustrato con propiedades cromogénicas. (Kamikawa y cols., 2014; CHROMagar™ Candida, Odds y Bernaerts, 1994). Este medio muestra una especificidad y sensibilidad de un 99% para 3 especies de *Candida* a la vez: *C. albicans* con colonias de color verde claro, *C. tropicalis* con colonias de color azul metálico y *C. krusei* con colonias de color rosadas (Figura 4).

Figura 4: Imagen correspondiente a el instructivo del medio CHROMagar™ Candida.



Fuente: <http://www.chromagar.com/>

Con menor seguridad, las colonias de color morado corresponderían a *C. glabrata*, verde oscuro a *C. dubliniensis* y las de color blanco a *C. parapsilosis* (CHROMagar™ Candida, Odds y Bernaerts, 1994; Schoofs y cols., 1998).

5.10 Análisis estadístico.

Con el fin de evaluar la presencia de una distribución normal en los datos, se utilizó el Test de Shapiro–Wilk. Éstos resultaron con distribución no normal por lo que se utilizó el Test de la prueba de rango con signo de Wilcoxon para el análisis de los resultados de estatus de portación y variedad de especies de levaduras se determinó rangos, mediana y promedio. Para la presencia de hiposialia se utilizó el test exacto de Fisher y además se relacionó el estatus de portación y variedad de especies de levaduras con esta la condición. Se utilizó el software STATA 9.1. Se aceptaron diferencias estadísticamente significativas con un error alfa igual o menor a 0.05% y un intervalo de confianza del 95%.

6 Resultados

6.1 Descripción de la muestra.

6.1.1 Edad y género de la muestra.

La muestra estudiada estaba constituida por 39 voluntarios con xerostomía de diverso origen, con una edad promedio de $68,5 \pm 11,12$ años, de los cuales 36 (92,31%) fueron mujeres (sólo 8 menores de 65 años) y 3 (7,69%) fueron hombres (sólo uno menor de 65 años).

6.1.2 Patologías y factores asociados a xerostomía.

La tabla 3 muestra el número y porcentaje de individuos afectados por diferentes

patologías o factores asociados a Xerostomía. Las 3 patologías más prevalentes en la muestra fueron: hipertensión arterial, síntomas depresivos y diabetes. De la muestra estudiada 5 (12,82%) individuos fumaban tabaco y 34 (87,18%) no. Adicionalmente, el 87,17% de los voluntarios presentaban otra patología distinta a las consultadas (tabla 3). En la tabla 4 se puede observar que 10 (25,64%) de los individuos no presentaban patologías y/o factores asociados especificados en la tabla en forma simultánea, 10 (25,64%) de los individuos presentaron sólo 1 patología; 13 (33,33%) participantes presentaron 2 patologías y/o factor asociado; 5 (12,82%) presentaron 3 patologías y/o factor asociado simultáneamente y sólo uno (2,56%) presentó 4 condiciones al mismo tiempo.

Tabla 3. *Patologías o factores asociados a Xerostomía presentes en los individuos de la muestra estudiada.*

Patología o factor asociado	Cantidad de Individuos	Porcentaje de Individuos (%)
Hipertensión arterial	22	56,41
Síntomas depresivos	20	51,28
Artritis Reumatoídea	7	17,95
Síndrome de Sjögren	1	12,82
Diabetes	10	25,64
Terapia radiación	6	15,28
Tabaquismo	5	12,82
Lupus	2	5,13
Otros	34	87,17

Tabla 4. Cantidad de patologías y/o factores asociados a xerostomía que presentan los individuos simultáneamente.

Cantidad de patologías y/o factor presentados simultáneamente	Cantidad de Individuos	Porcentaje de Individuos (%)
0	10	25,64
1	10	25,64
2	13	33,33
3	5	12,82
4	1	2,56

6.1.3 Farmacoterapia asociada a Xerostomía.

La tabla 5 muestra la diversidad, frecuencia y porcentaje de fármacos que consumían los sujetos analizados en el estudio. Los fármacos consumidos con más frecuencia fueron los antihipertensivos y antidepresivos. Al analizar el número de fármacos consumidos por un mismo individuo, se pudo observar que 12 (30,76%) sujetos no consumían fármacos, 12 (30,76%) consumían 2 fármacos en forma simultánea; 9 (23,07%) individuos consumían 3 fármacos simultáneamente y sólo 1 (2,56%) sujeto de la muestra consumía 4 fármacos al mismo tiempo (tabla 6).

Tabla 5. *Fármacos asociados a Xerostomía consumidos por los individuos de la muestra estudiada.*

Fármaco consumido	Cantidad de Individuos	Porcentaje de Individuos (%)
Antihipertensivos	22	56,41
Antidepresivos	10	25,64
Ansiolíticos	9	23,08
Diuréticos	6	15,38
Anticonvulsivantes	0	0,00
Otros fármacos	33	84,62

Tabla 6. *Cantidad de fármacos enumerados que consumen los individuos simultáneamente.*

Cantidad de fármacos consumidos en forma simultánea	Cantidad de Individuos	Porcentaje de Individuos (%)
0	12	30,77
1	9	23,08
2	12	30,77
3	5	12,82
4	1	2,56

6.1.4 Sintomatología asociada a xerostomía en la muestra estudiada.

En la tabla 7 se detallan los parámetros considerados como sintomatología asociada a xerostomía, basado en la encuesta descrita por Fox y cols. Debido a que, uno de los criterios de inclusión de voluntarios para el estudio, era presentar sensación de boca seca, el 100% de ellos presentaba esta sintomatología. En contraste, 25,64% de los voluntarios (n=10) presentaron sintomatología de ardor lingual y aproximadamente un 50 % presentaron sensación de saliva espesa (n=20; 51,28%), necesidad de tomar líquidos para deglutir alimentos (n=19; 48,72%) y sensación de dificultad para deglutir (n=18; 46,15%).

Al analizar en detalle las frecuencias de estas sintomatologías, se pudo observar que 7 individuos (17,95) presentaron sólo un síntoma de la encuesta de Fox y cols, 11 individuos (20,28%) presentaban 2 síntomas asociados; 9 sujetos (23,07%) presentaban 3 síntomas al mismo tiempo; 10 individuos (25,64%) relataron la presencia de 4 síntomas simultáneamente; y 2 sujetos (5,12%) evidenciaron la totalidad de los síntomas (tabla 8).

Tabla 7. *Sintomatología asociada a xerostomía según encuesta de Fox y cols. en individuos de la muestra.*

Sintomatología	Cantidad de Individuos	Porcentaje de Individuos (%)
Sensación de boca seca	39	100,00
Sensación de saliva espesa	20	51,28
Sensación de ardor lingual	10	25,64
Necesidad de tomar líquidos para deglutir alimentos	19	48,72
Sensación de dificultad para deglutir	18	46,50

Tabla 8. *Síntomas simultáneos de la encuesta de Fox y cols. presentes en individuos de la muestra.*

Cantidad de síntomas simultáneos presentado en los individuos	Cantidad de Individuos	Porcentaje de Individuos (%)
1	7	17,95
2	11	28,20
3	9	23,07
4	10	25,64
5	2	5,12

6.1.5 Flujo salival e hiposialia en los voluntarios incluidos en el estudio.

El flujo salival cuantificado en la muestra estudiada, presentaba una mediana de 0,117 ml/min con un rango de 0,007 a 1,401 ml/min. 48,72% (n= 19) de los sujetos

presentaban hiposialia, es decir un flujo salival igual o inferior a 0,2 ml/min. En estos voluntarios hiposialicos, el flujo salival presento una mediana de 0,049 ml/min con un rango de 0,007 a 0,154ml/min. En los sujetos no hiposialicos (n= 20) la mediana de flujo salival fue de 0,396 ml/min con un rango de 0,210 a 1,401 ml/min.

6.2 Análisis de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST y CRM al usar los sustitutos salivales.

6.2.1 Estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST y CRM, antes y después de usar ambos sustitutos salivales.

El recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva (UFC/ml) del género *Candida* en medio AST después de usar el SC aumento de manera significativa (p value = 0,0047), variando su promedio de 16.458 a 41.517 UFC/ml. Cuando los individuos usaron el SE, no hubo diferencia significativa en el recuento de levaduras después usar el producto (p value = 0,649) variando el promedio desde 52.716 a 76.963 UFC/ml (tabla 9).

En medio CRM, se observó una situación similar a la anteriormente descrita, en donde el análisis estadístico indica que hubo diferencia significativa en la portación de levaduras del género *Candida* en individuos que usaron el SC (p value = 0,0246) experimentando un aumento del promedio de 39.338 a 55.859 UFC/ml. Con respecto al SE, el promedio inicial de UFC/ml antes de usarlo fue de 37.432 y después que los individuos usaron el producto fue de 42.590 UFC/ml, siendo ésta variación no significativa (p value = 0,1162) (tabla 10).

Tabla 9. Estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST, antes y después de usar ambos sustitutos salivales.

UFC/ml	Antes de usar producto			Después de usar producto			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	16.458	1.895	0 – 186.700	41.517	2.000	0 – 639.000	0,0047
SE	52.716	3.000	0 – 861.500	76.963	1.105	0 – 1.002.450	0,649

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental.

Tabla 10. Estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio CRM, antes y después de usar ambos sustitutos salivales.

UFC/ml	Antes de usar producto			Después de usar producto			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	39.338	650	0 – 780.000	55.859	2.550	0 – 546.000	0,0246
SE	37.432	3.154	0 – 502.000	42.590	1.120	0 – 604.000	0,1162

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental.

6.2.2 Efecto de la secuencia en el uso de ambos sustitutos salivales en el estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST y CRM.

A inicio del estudio y con la finalidad de determinar si existía diferencia en el estatus de portación de levaduras del género *Cándida* entre los voluntarios; se determinó el recuento inicial de UFC/ml antes de usar cualquiera de los dos sustitutos salivales. Se pudo observar que no hubo diferencia significativa en esta variable antes de usar los sustitutos SC o SE (p value = 0,102 en medio AST y = 0,867 en medio CRM).

Para determinar el efecto de la secuencia en el uso de los sustitutos salivales en el

estatus de portación de levaduras del género *Candida*, se cuantificó las UFC/ml después de usar cualquiera de los dos sustitutos del estudio y se comparó con el estatus de portación inicial. El promedio de UFC/ml de levaduras del género *Candida* en medio AST después de usar el primer sustituto salival asignado aleatoriamente a cada individuo, varió desde 20.809 (rango 0 - 31.400) a 25.410 (rango 0 - 169.150) UFC/ml (p value=0,103). Cuando los individuos del estudio utilizaron el segundo sustituto salival asignado aleatoriamente se observó que el promedio varió desde 48.364 (rango 0-861.500) a de 93.069 (rango 0 - 1.002.450) UFC/ml (p value = 0,131). El análisis estadístico indica que no hubo diferencia significativa en el recuento de levadura después de usar el primer o segundo sustituto salival asignado aleatoriamente (p value = 0,133). Una situación similar se pudo observar en el medio CRM, pues después de usar el primer sustituto salival asignado aleatoriamente se observó una variación del promedio desde 48.585 (rango 0 - 780.000) a 45.907 (rango 0 - 467.000) UFC/ml (p value = 0,866). Al usar el segundo sustituto salival en forma aleatoria se observó que el promedio varió desde 28.185 (rango 0 - 225.400) a 52.541 (rango 0 - 604.000) UFC/ml (p value = 0,406).

6.2.3 Cantidad y porcentaje de individuos que aumentaron o disminuyeron el estatus de portación de levaduras del género *Cándida* en medio AST y CRM, después de usar los sustitutos salivales.

Al analizar la frecuencia de individuos que aumentaron o disminuyeron la cantidad de UFC/ml de levaduras del género *Candida*, se pudo observar que el comportamiento antes y después de usar los sustitutos salivales no es estadísticamente significativo tanto para medio AST (p value = 0,408) como para el medio CRM (p value= 0,249) (tabla 11).

Tabla 11. Cantidad y porcentaje de individuos que aumentaron o disminuyeron el estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST y CRM.

Sustituto	AST*				CRM*			
	Baja		Sube		Baja		Sube	
	n	%	n	%	n	%	n	%
SC	14	35,89	25	64,10	17	43,58	22	56,41
SE	16	44,44	23	58,97	21	53,84	18	46,15

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental, p value= 0,408 en medio AST y 0,249 en medio CRM

6.2.4 Estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST y CRM después de utilizar ambos sustitutos salivales en individuos con o sin hiposialia.

Se determinó el efecto del uso de cualquiera de los 2 sustitutos en individuos con o sin hiposialia mediante cuantificación de UFC/ml en ambos medios de cultivo. Para los individuos que presentaban hiposialia, hubo un aumento significativo del recuento de levaduras en medio AST, con un promedio de 64.271 (rango 0 - 861.500) UFC/ml antes de usar los sustitutos salivales y de 114.766 (rango 0 - 1.002.450) UFC/ml después de su uso (p value= 0,041). En los individuos sin condición de hiposialia, el recuento de levaduras luego de usar los sustitutos varió de un promedio de 6.386 (rango 0- 40.500) UFC/ml antes de usar los sustitutos a 6.488 (rango 0 - 83.700) UFC/ml después de usarlos, diferencia que no fue significativa (p value= 0,307). Distinto fue el resultado en medio CRM, en donde los sustitutos salivales no provocaron cambios significativos en los valores de recuentos de levaduras en ambas condiciones (p value de 0,343 para los individuos no hiposialicos y de 0,799 en individuos con hiposialia) (tabla 12).

Tabla 12. Estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST y CRM después de utilizar los sustitutos salivales en individuos con o sin hiposialia

Condición	UFC/ml AST			UFC/ml CRM		
	Antes	Después	p value	Antes	Después	p value
	Prom (rango)	Prom (rango)		Prom (rango)	Prom (rango)	
No hiposialia	6.386 (0-40.500)	6.488 (0-83.700)	0,307	6.151 (0-66.780)	5.132 (0-57.400)	0,343
Hiposialia	64.271 (0-861.500)	114.766 (0- 1.002.450)	0,041	72.315 (0-780.000)	95.638 (0-604.000)	0,799

Prom = promedio

6.2.5 Efecto del sustituto salival convencional y experimental en el estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST en individuos con o sin hiposialia.

La tabla 13 muestra el efecto de ambos sustitutos salivales sobre el estatus de portación de levaduras en los participantes no hiposialicos del estudio. Se observó que luego del uso del SC los individuos presentaron un aumento significativo del estatus de portación de levaduras del género *Candida* con un p value de 0.006, aumentando el promedio de 4.889 (rango 0 – 29.290) a 8.538 (rango 0 - 83.700) UFC/ml luego del uso de este sustituto.

El análisis estadístico indica que el uso del SE generó una disminución del recuento de colonias en los individuos no hiposialicos, con valores promedio de 7.884 (rango 0 - 40.500) antes y de 4.439 (rango 0 - 31.780) UFC/ml después del uso de este sustituto salival. Esta disminución en el recuento de UFC/ml no fue estadísticamente significativa (p value =0,217) (tabla 13).

Similar fue la situación para los individuos hiposialicos con el uso de ambos sustitutos; en donde al usar el SC se presentó un aumento en la portación de levaduras, cuyos promedios variaron de 39.960 (rango 0 - 186.700) a 164.028

(rango 0 - 1.002.450) UFC/ml, variación que resultó ser estadísticamente significativa con un p value de 0,001. Para estos mismos individuos cuando usaron el SE, el análisis estadístico indica que no hubo diferencia significativa en el recuento de levaduras antes y después de usar el producto (p value =0,672), a pesar de que se observó una disminución del promedio de 88.583 a 65.506 UFC/ml (tabla 14).

Tabla 13. Efecto de los sustitutos salivales en el estatus de portación en los individuos no hiposialicos en medio AST.

No Hiposialicos							
Sustituto	UFC/ml Antes			UFC/ml Después			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	4.889	940	0-29.290	8.538	1.143	0-83.700	0,0067
SE	7.884	1.560	0-40.500	4.439	708	0-31.780	0,2178

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental.

Tabla 14. Efecto de los sustitutos salivales en el estatus de portación en los individuos con condición de hiposialia en medio AST.

Hiposialicos							
Sustituto	UFC/ml Antes			UFC/ml Después			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	39.960	1.420	0-186.700	164.028	8.200	0-1.002.450	0,0014
SE	88.583	8.470	0-861.500	65.506	1.100	0-687.000	0,6725

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental.

6.2.6 Efecto de los sustitutos salivales en el estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio CRM en individuos con y sin hiposialia.

En medio CRM, para los individuos no hiposialicos, el uso del SC no generó una variación de los recuentos de levaduras del género *Candida*. Se presentó un promedio de UFC/ml de 6.449 (rango 0 - 66.780) antes y de 6.775 (rango 0-57.400) UFC/ml después de ser utilizado el sustituto. Al usar el SE, disminuyó el promedio

de 5.755 (rango 0-24.100) a 4.893 (rango 0-14.310) UFC/ml, sin diferencias estadísticas entre estos valores (p value = 0,2467) (tabla 15).

Por último, el análisis estadístico indica que hubo diferencia significativa en la portación de levaduras del género *Candida* en individuos hiposialicos que usaron el SC (p value = 0,0238) experimentando una variación en el promedio de 73.853 (rango 0 -780.000) a 107.526 (rango de 0 - 546.000) UFC/ml. Con respecto al SE, el promedio inicial antes de usarse fue de 70.777 UFC/ml (rango 0 - 502.000) y de 83.750 UFC/ml (rango 0 - 604.000) después, siendo esta variación no significativa (p value = 0,304) (tabla 16).

Tabla 15. Efecto de los sustitutos salivales en el estatus de portación (UFC/ml) en los individuos no hiposialicos en medio CRM.

No Hiposialicos							
Sustituto	UFC/ml Antes			UFC/ml Después			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	6.449	418	0-66.780	6.775	743	0-57.400	0,5378
SE	5.755	783	0-24.100	4.893	633	0-14.310	0,2467

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental

Tabla 16. Efecto de los sustitutos salivales en el estatus de portación (UFC/ml) en los individuos con condición de hiposialia en medio CRM.

Hiposialicos							
Sustituto	UFC/ml Antes			UFC/ml Después			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	73.853	1.545	0-780.000	107.526	6.100	0-546.000	0,0238
SE	70.777	8.980	0-502.000	83.750	1.900	0-604.000	0,3043

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental.

6.2.7 Cantidad y porcentaje de individuos hiposialicos y no hiposialicos que aumentaron o disminuyeron el estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST.

Al analizar la frecuencia de individuos hiposialicos que aumentaron o disminuyeron la cantidad de UFC/ml de levaduras del género *Candida*, se pudo observar que el comportamiento después de ambos sustitutos salivales es estadísticamente significativo (p value =0,009). Así, al usar el SC se puede apreciar que 16 (84,21%) de 19 individuos hiposialicos aumentan sus recuentos y sólo 3 (15,78%) lo disminuyen y que 11 (57,89 %) de 19 individuos no hiposialicos bajan sus recuentos al usar el SE y lo aumentan sólo 8 (42,10%).

Similar es la tendencia en los individuos no hiposialicos, los cuales al usar el SC aumentaron su portación de levaduras del género *Candida* en 15 (75%) de 20 individuos y bajaron sólo 5. Para el SE, 11 (55%) individuos no hiposialicos de 20 bajaron su recuento y 9 (45%) lo aumentaron. Sin embargo. La diferencia entre los individuos que suben y bajan sus recuentos no alcanzó a ser significativa con un p value de 0,053 (Tabla 17).

Tabla 17. Cantidad y porcentaje de individuos hiposialicos y no hiposialicos que aumentaron o disminuyeron el estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST.

Sustituto	Hiposialicos*				No hiposialicos*			
	Baja		Sube		Baja		Sube	
	n	%	n	%	n	%	n	%
SC	3	15,78	16	84,21	5	25	15	75
SE	11	57,89	8	42,10	11	55	9	45

* p value= 0,009 para individuos hiposialicos y 0,053 en individuos no hiposialicos.

6.3 Identificación presuntiva y variabilidad de especies del género *Candida*.

6.3.1 Frecuencia de aislación de las distintas especies presuntivas según color de colonia en los individuos de la muestra antes y después de usar los sustitutos salivales en medio CRM.

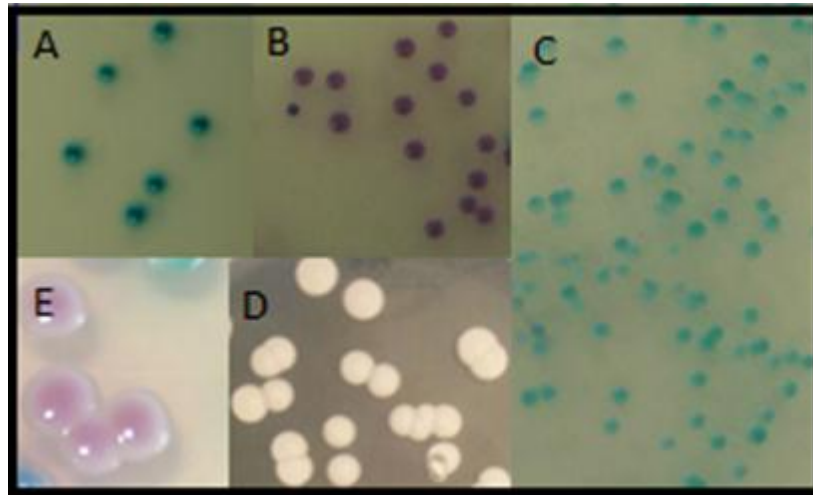
En la tabla 18 se puede observar que las colonias de color verde (*C. albicans*) fueron las de mayor frecuencia de aislación, presentes en 31 (79,48%) individuos antes de usar el SC y en 33 (84,61%) después de usarlo. De un modo similar con el SE, se aisló en 32 (82,05%) de los individuos antes de que usaran este sustituto y en 34 (87,17%) después de su uso.

Las colonias de color moradas (*C. glabrata*) fueron las segundas en frecuencia de aislación en 10 (25,64%) individuos antes y 11(28,20%) después de usar el SC. En 13 (33,33%) de los individuos se aislaron estas colonias antes de usar el SE y en 11 (28,20%) después.

Las colonias de color blanco (*C. parapsilosis*) presentaron una menor frecuencia de aislación. Antes de usar el SC se aisló en 20,51 (n=8) de los individuos y en 2,56% (n=3) después de su uso. Sin embargo antes y después de usar el SE no hubo diferencia en los números de individuos (n=3; 7,69%) que presentaron colonias de este color.

En cuanto a las colonias de color rosadas, se mantuvo la frecuencia de aislación con un 7,69% (n=3) antes y después de utilizar los sustitutos salivales. Y por último, la presencia de colonias de color verde oscuro (*C. dubliniensis*) fueron aisladas en 2 (5,12%) individuos antes y después de usar el SC. Antes de usar el SE, se aislaron en 3 (7,69%) individuos y después de usarlo en 1 (2,56%) individuo (Figura 5).

Figura 5: Representación de colonias del género *Candida* en medio CR



Fuente: Muestras del estudio, Laboratorio de bioquímica.

A) Colonias de color verde oscuro compatible con *C. dubliniensis*. **B)** Colonias de color morado compatibles con *C. glabrata*. **C)** Colonias de color verde compatibles con *C. albicans*. **D)** Colonias de color blanco compatibles con *C. parapsilosis*. **E)** Colonias de color rosado compatible con *C. krusei*.

Tabla 18: Frecuencia de aislación de especies presuntivas según color antes y después de usar los sustitutos salivales en medio CRM.

Color Colonia	SC				SE			
	Antes		Después		Antes		Después	
	n	%	n	%	N	%	n	%
Rosado	3	7,69	3	7,69	3	7,69	3	7,69
Verde	31	79,48	33	84,61	32	82,05	34	87,17
Blanco	8	20,51	1	2,56	3	7,69	3	7,69
Morado	10	25,64	11	28,20	13	33,33	11	28,20
Verde oscuro	2	5,12	2	5,12	3	7,69	1	2,56

6.3.2 Recuento UFC/ml de color rosado (*C. krusei*) en medio CRM.

Al usar el SC no se identificó un aumento significativo en el recuento de UFC/ml rosadas en medio CRM (p value= 0.083). El promedio antes del SC fue de 1,35 UFC/ml (rango 0 - 50) y después se observó un promedio de 90,66 UFC/ml (rango 0 - 2.180). Antes de usar el SE se observó un promedio de 99,36 (rango 0 - 1.710) y un promedio de 19,02 (rango 0 - 655) después de ser utilizado; disminución que no fue estadísticamente significativa. (p value = 0,298) (Tabla 19).

Tabla 19. Recuento UFC/ml de color rosado (*C. krusei*) correspondiente a en medio CRM.

Sustituto	UFC/ml Antes de usar producto			UFC/ml Después de usar producto			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	1,35	0	0 – 50	90,66	15	0 – 2.180	0,083
SE	99,36	0	0 – 1.710	19,02	6	0 – 655	0,298

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental.

6.3.3 Recuento UFC/ml de color verde (*C. albicans*) en medio CRM.

En la tabla 20 se detalla el aumento significativo (p value = 0, 0387) de UFC/ml de color verde en los individuos al utilizar el SC, obteniéndose valores promedio de 14.079 (rango 0- 179.400) antes y de 26.801 UFC/ml (rango 0 – 223.860) después de usar el producto. Al usar el SE se observó un cambio no significativo (p value = 0,316) del promedio, desde 22.581 (rango 0 – 451.800) a 24.000 UFC/ml (rango 0 - 453.000) después de que los individuos lo usaron.

Tabla 20. Recuento UFC/ml de color verde (*C. albicans*) en medio CRM.

Sustituto	UFC/ml Antes de usar producto			UFC/ml Después de usar producto			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	14.079	340	0 – 179.400	26.801	1.410	0 – 223.860	0,0387
SE	22.581	1.985	0 – 451.800	24.000	675	0 – 453.000	0,316

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental

6.3.4 Recuento UFC/ml de color verde oscuro (*C. dubliniensis*) en medio CRM.

Al usar el SC se observó que hubo una disminución no significativa (p value = 0,9853) en el recuento de UFC/ml de color verde oscuro, variando su promedio de 8.982 (rango 0 – 343.200) a 4.152 UFC (rango 0 – 140.100).

Cuando los individuos usaron el SE, hubo una diferencia no significativa en el recuento después de usar el producto (p value = 0,985), aumentando su promedio de 747 (rango 0 – 24.794) a 1.597 UFC/ml (rango 0 - 62.300) (tabla 21).

Tabla 21. Recuento UFC/ml de color verde oscuro (*C. dubliniensis*) en medio CRM.

Sustituto	UFC/ml Antes de usar producto			UFC/ml Después de usar producto			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	8.982	0	0 - 343.200	4.152	0	0 – 140.100	0,9853
SE	747	0	0 – 24.794	1.597	0	0 – 62.300	0,9850

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental.

6.3.5 Recuento UFC/ml de color morado (*C. glabrata*) en medio CRM.

El UFC/ml de color morado en medio CRM después de usar el SC aumentó de manera no significativa (p value = 0,058), variando su promedio de 11.770 a 26.952 UFC/ml.

Cuando los individuos usaron el SE, no hubo variación significativa en el recuento de levaduras después usar el producto (p value = 0,7950) variando el promedio desde 16.550 a 17.729 UFC/ml (tabla 22).

Tabla 22. Recuento UFC/ml de color morado (*C. glabrata*) en medio CRM.

Sustituto	UFC/ml Antes de usar producto			UFC/ml Después de usar producto			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	11.770	0	0 – 181.800	26.952	0	0 – 300.300	0,0588
SE	16.550	0	0 – 280.350	17.729	0	0 – 281.400	0,7950

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental.

6.3.6 Recuento UFC/ml de color blanco (*C. parapsilosis*) en medio CRM.

El promedio de UFC/ml de levaduras de color blanco en medio CRM antes de usar el SE fue de 144 (con rango de 0 a 4.820), después de usarse se observó una disminución del recuento no significativo (p value= 0,637) con un promedio de 85 UFC/ml (rango 0 - 3.190).

Lo mismo ocurrió para la SC, la disminución de la portación de levaduras fue de un promedio de 6.593 UFC/ml (rango 0 - 241.800) a un promedio de sólo 9 UFC/ml (rango 0 - 356). Sin embargo, esta disminución en el recuento de UFC/ml no fue estadísticamente significativa (p value =0,623) (tabla 23).

Tabla 23. Recuento UFC/ml de color blanco (*C. parapsilosis*) en medio CRM.

Sustituto	UFC/ml Antes de usar producto			UFC/ml Después de usar producto			p value
	Promedio	Mediana	Rango	Promedio	Mediana	Rango	
SC	6.593	0	0 – 241.800	9	0	0 – 356	0,0623
SE	144	0	0 – 4.820	85	0	0 – 3.190	0,6371

SC: Sustituto Convencional, SE: Sustituto Experimental.

7 Discusión

El desarrollo del presente estudio permitió determinar que el estatus de portación de levaduras del género *Candida* en individuos xerostómicos se mantiene sin variaciones significativas después de utilizar el sustituto salival en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de linaza (*Linum usitatissimum*) (tablas 9 y 10). En contraste, el sustituto convencional produce un aumento significativo del estatus de portación de estas levaduras del género *Candida* en estos individuos (tablas 9 y 10). De este modo, el sustituto convencional en base a metilcelulosa y glicerina, tendría un efecto que favorecería el desarrollo de levaduras.

Probablemente, la presencia del extracto de manzanilla en el sustituto experimental produzca una detención del crecimiento de levaduras. Existe evidencia de la manzanilla y sus efectos en levaduras. Un estudio realizado por Kedzia en el año 1991, afirma que los compuestos aislados del aceite esencial de la *Matricaria chamomilla*: flavonoides y α - bisabolol tienen efecto antifúngico sobre el crecimiento de *Candida albicans*. Aggag y Youssef (1972) en su estudio afirman que el aceite de la manzanilla en determinadas concentraciones muestra una marcada actividad antifúngica contra *Candida albicans*.

Por otro lado, el sustituto convencional en base a metilcelulosa produjo un aumento en el recuento de levaduras. Un estudio *in vitro* de Cheng (1991) sugiere que la adición de metilcelulosa en sustratos solubles no afecta el crecimiento fúngico. Por lo anterior, es necesario realizar estudios *in vivo* para poder correlacionar con estudios realizados en laboratorio y así determinar el efecto de este compuesto y su interacción con la microbiota oral y otros factores como por ejemplo el pH. Sin embargo, sugerimos que la metilcelulosa al tener propiedad de formar geles en presencia de agua y mediante su capacidad adhesiva (Acofarma), podría formar una capa sobre la mucosa oral. Ésta pudiese servir como sustrato para el crecimiento de

microorganismos como *Candida*, lo que se vería favorecido por la alteración y/o disminución de la producción salival y sus elementos protectores.

En nuestro estudio determinamos recuentos de levaduras en 2 medios de cultivos diferentes, a saber AST y CRM. El efecto de aumento del estatus de portación de levaduras del género *Candida* producido por el sustituto convencional fue más evidente en el medio AST que en el medio CRM, probablemente debido a que este último tiene la función principal de permitir la identificación rápida y presuntiva de levaduras de este género. El medio CRM presenta sustratos colorimétricos sintéticos que cambian a cromógenos por enzimas propias de distintas especies de levaduras del género *Candida* (Kamikawa y cols., 2014). Evidencia empírica obtenida en nuestro laboratorio, indica que es posible recuperar mayor número de colonias de levaduras en medio AST que en CRM.

En la literatura se describe que la condición de xerostomía se asocia con varios trastornos en la función e hiposalivación presente en un 50% (Díaz y cols., 2008), lo cual coincide con la muestra analizada en nuestro estudio en donde el 48,7 % de los participantes presentó disminución del flujo salival. Estos individuos hiposialícos además, presentaron mayor recuento inicial de levaduras (Tabla 14 y 16). Resultados que coinciden con los de Shinozaki y cols. (2014) en donde incluso se establece una relación inversa entre la velocidad de flujo salival y el recuento de levaduras del género *Candida*. Estudios avalan que la Candidiasis oral se hace más invasiva y más persistente si la secreción salival disminuye, ya que la saliva contiene proteínas como lisozimas, lactoferrinas, peroxidasas, histidinas y anticuerpos específicos que retardan el crecimiento de bacterias y levaduras (Akpan y Morgan, 2014; Budtz-Jorgensen, 2000).

Al observar por separado el efecto producido por cada sustituto salival en el recuento de levaduras de individuos hiposialícos y no hiposialícos, se evidenció que el

sustituto convencional produjo un aumento significativo del estatus de portación de levaduras del género *Candida* en medio AST, tanto en los individuos hiposialicos como en los no hiposialicos (p value=0,0014 y p value=0,0067 respectivamente). A diferencia de éste, el sustituto experimental no produjo variación del estatus de portación en ninguno de los voluntarios (tabla 13 y 14). Esta tendencia se observó también al analizar la frecuencia de individuos que aumentan o disminuyen su recuento de levaduras al usar alguno de los dos sustitutos. El sustituto convencional produjo aumento del recuento de levaduras en mayor número de individuos hiposialicos y no hiposialicos que el experimental, lo que sugiere nuevamente algún efecto por parte de ambos sustitutos en la portación de estas levaduras (Tabla 17).

La sensación de boca seca (xerostomía) junto a la sequedad en otras mucosas se puede presentar con gran frecuencia en la población general, pero es en el estrato de mayores de 60 años donde aparece con mayor incidencia, especialmente debido a una mayor frecuencia de enfermedades sistémicas y a un mayor consumo de medicamentos hiposialivantes. Consistentemente con lo anterior, la muestra de nuestro estudio se compuso mayoritariamente de mujeres adultas mayores afectadas por patologías crónicas no transmisibles como diabetes, hipertensión, depresión y enfermedades autoinmunes, que por sus procesos fisiopatológicos provocan alteración de las glándulas salivales y/o requieren el consumo de fármacos que como efecto colateral alteran la producción salival (Silvestre- Donat y cols., 2004). Adicionalmente, se señala que el humo del tabaco puede alterar la mucosa oral al modificar el pH y afectar el potencial de óxido-reducción, lo que facilitaría la colonización por *Candida albicans*, aunque en nuestro estudio sólo 5 individuos presentaban hábito tabáquico (Jaimes, 2008).

Entre las especies observadas en este trabajo, mediante identificación presuntiva, se evidenció que *C. albicans* fue la especie aislada con mayor frecuencia (tabla 18). *C. albicans* tiene la capacidad de secretar distintas proteinasas y en niveles

mucho más altos que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Además posee mayor capacidad de secreción de fosfolipasas, lo que le confiere un alto grado de virulencia y resistencia a la respuesta inmune del hospedero, lo que podría explicar su mayor frecuencia en los voluntarios del estudio (Jaimes y cols., 2008; Budtz-Jorgensen, 2000). Siendo *Candida albicans* el patógeno principal de candidiasis oral, es relevante el hecho que el sustituto convencional aumente su recuento de manera significativa en voluntarios xerostómicos, pues el clearance microbiano se encuentra disminuido en los individuos hiposialicos (tabla 20) (Dawes, 2004). De acuerdo a la identificación presuntiva, la segunda especie con mayor presencia correspondió a *Candida glabrata*. Un estudio *in vitro* realizado en epitelio establece que ésta especie de *Candida*, en presencia de *C. albicans*, mejora su colonización, invasividad, y potencial de daño tisular (Silva y cols. 2011). Es probable que en nuestro estudio, el alto porcentaje de *Candida albicans* haya favorecido la presencia de *C. glabrata*. En menor porcentaje se encontraron las especies de color verde oscuro, blanco y rosadas, que corresponderían a *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* respectivamente. Para las otras especies de *Candida* identificadas presuntivamente, el cambio en la variabilidad de especie en medio CRM no fue significativa al usar ambos sustitutos salivales, lo que pudiese estar relacionado con el hecho de que éstas se encuentran en menor porcentaje en la cavidad oral o que se encuentran presentes en menor frecuencia en la muestra.

En la muestra de individuos participantes de este estudio no se observó desarrollo de colonias de color azul metálico, situación que contrasta con los resultados reportados por Baradkar y Kumar (2009) en donde 5% de los individuos presentó desarrollo de *Candida tropicalis*.

A pesar de que la identificación de levaduras del género *Candida* en medio CHROMagar es sensible, específica, fácil y rápida (Jaimes y cols., 2008), sólo permite la identificación de 3 especies con un 99 % seguridad (CHROMagar™

Candida; Odds y Bernaerts, 1994) Por esta razón, cómo métodos adicionales de identificación de especies se sugiere el uso de PCR (reacción en cadena de polimerasa) y el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Shinozaki y cols., 2012).

Nuestro estudio deja en evidencia la importancia de evaluar los efectos adversos de los sustitutos salivales en poblaciones de individuos xerostómicos, puesto que pueden elevar el estatus de portación de levaduras en individuos susceptibles, aumentando el riesgo de Candidiasis. El sustituto salival en base a manzanilla y linaza no presentó el efecto anterior descrito, por lo que presenta una ventaja frente al único producto disponible en el mercado nacional. Se requiere de investigaciones adicionales sobre el efecto de la manzanilla y linaza y sus mecanismos de acción sobre levaduras del género *Candida*; de modo de generar mayor evidencia sobre la interacción de estos productos naturales con la microbiota oral. Evidencia que sería fundamental para la toma de decisiones en el tratamiento paliativo de la sequedad bucal de los pacientes xerostómicos, que permita efectivamente mejorar su calidad de vida.

8 Conclusiones

- El sustituto convencional aumentó los recuentos de levaduras del género *Candida* en medio AST y CRM de manera significativa en todos los individuos xerostómicos
- El sustituto experimental no generó variaciones significativas en la portación de levaduras del género *Candida*, tanto en medio AST como CRM, en los individuos xerostómicos del estudio.
- De los individuos participantes en el estudio, un 48,7% presentó hiposialia. Estos últimos presentaron mayor recuento inicial de levaduras del género *Candida* versus los individuos sin esta condición.
- Tanto en los individuos hiposialicos como no hiposialicos, el recuento de levaduras del género *Candida* en medio AST aumentó de manera significativa luego de usar el sustituto convencional.
- El uso de sustituto experimental no generó variaciones significativas en el recuento de levaduras del género *Candida* en medio AST en individuos hiposialicos y sin esta condición.
- De acuerdo a la identificación presuntiva de levaduras del género *Candida* mediante medio CRM; la especie aislada con mayor frecuencia fue *C. albicans* seguida de *C. glabrata*.

9 Referencias Bibliográficas

Abdoul-Latif Fatouma M., Mohamed Nabil, Prosper Edou, Adwa A. Ali, Samatar O. Djama, Louis-Clément Obame y cols. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of *Matricaria chamomilla L.* from Djibouti. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(9), pp. 1512-1517

Acofarma: <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4106-211d05a94d5f12d452f892eb24af8d0621675fdc/main/files/Metilcelulosa.pdf>.
(Fecha acceso 18/03/2015).

Aggag M. E. y Yousef R. T. (1972) .Study of antimicrobial activity of chamomile oil. *Planta Med* 1972; 22(6): 140-144

Aguirre J. (2002). “Candidiasis orales”. *Rev. Iberoam. Micol.*, 19: 17- 21.

Akpan A, Morgan R. (2002). Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 2002; 78:455–459.

Al-Hashem FH. (2010). Gastroprotective effects of aqueous extract of *Chamomilla recutita* against ethanol-induced gastric ulcers. *Saudi Med J.* 31(11): 1211-1216.

Alliende C, Kwon YJ, Brito M, Molina C, Aguilera S, Pérez P, y cols. (2008). Reduced sulfation of muc5b is linked to xerostomia in patients with Sjögren syndrome. *Ann Rheum Dis.* 67(10): 1480-1487.

Amerongen AV, Bolscher JG, Veerman EC. (1995). Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology.* 5(8): 733-740.

Andersson G, Johansson G, Attström R, Edwardsson S, Glantz PO, Larsson K. (1995). Comparison of the effect of the linseed extract *Salinum* and a methyl

- cellulose preparation on the symptoms of dry mouth. *Gerodontology*. 12(1): 12-17.
- Atkinson JC, Grisius M, Massey W. (2005). Salivary hypofunction and xerostomia: diagnosis and treatment. *Dent Clin North Am*.49 (2): 309-326.
- Baradkar VP, Kumar S. (2009). Species identification of *Candida* isolates obtained from oral lesions of HIV infected patients. *Indian J Dermatol*; 54(4):385-6. doi: 10.4103/0019-5154.57622
- Barene I, Daberte I, Zvirgzdina L, Iriste V. (2003). The complex technology on products of German chamomile. *Medicina (Kaunas)*. 39 Suppl 2: 127-131.
- Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T. (2003). Lubricating properties of the initial salivary pellicle--an AFM study. *Biofouling*. 19(6): 365-369.
- Bisht SPS, Mishra R, Kumari K. (2011). Antimicrobial and free radical scavenging activity of *Chammomile* flower essential oil. *Asian J Pharm Health Sci* 1, 283-285
- Brosky ME. (2007).The role of saliva in oral health: strategies for prevention and management of xerostomia. *J Support Oncol*. 5(5): 215-225.
- Budtz-Jørgensen E. (2000). Ecology of *Candida*-associated denture stomatitis. *Microb Ecol Health Dis*. 12: 170–185
- Calderone, R. A. (2002). *Candida* and Candidiasis. Ed. ASM press.
- Carl W, Emrich LS. (1991). Management of oral mucositis during local radiation and systemic chemotherapy: a study of 98 patients. *J Prosthet Dent*. 66(3): 361-369.

Cassolato SF, Turnbull RS. (2003). Xerostomia: clinical aspects and treatment. *Gerodontology.*, 20(2): 64-77.

Castrillón Rivera Laura Estela, Palma Ramos Alejandro, Padilla Desgarenes Carmen. (2005). Artículo de revisión Factores de virulencia en *Candida sp.* *Dermatología Rev Mex*; 49:12-27

Chang WI, Chang JY, Kim YY, Lee G, Kho HS. (2011). MUC1 expression in the oral mucosal epithelial cells of the elderly. *Arch Oral Biol.* 56(9): 885-890.

Chiappelli F. (2012). No strong evidence that any topical treatment is effective for relieving the sensation of dry mouth. *Evid Based Dent.* 13(1): 16-17.

CHROMagar™Candida: <http://www.chromagar.com/>

(Fecha acceso 07/01/2015).

Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. (1997). Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS.* Apr;11(5):557-67

Coutinho HDM. (2009). Factors influencing the virulence of *Candida spp.* *West Indian med. j.* v 58 (2): 160

Darvishi Khezri Hadi, Ali Haidari Gorji Mohammad, Morad Ali y Gorji Heidari. (2013). Comparación de los efectos antibacterianos de aseos bucales con matrica, Persica® y gluconato de clorhexidina en pacientes de UCI con ventilación mecánica: ensayo clínico doble ciego y aleatorio. *Rev Chilena Infectol* 30 (4): 361-367.

Dawes C. (2004). How much saliva is enough for avoidance of xerostomia? *Caries Res.* 38(3): 236-240.

Dawes C, Odlum O. (2004). Salivary status in patients treated for head and neck cancer. *J Can Dent Assoc.*70(6): 397-400.

Díaz Romero RosaMaría, Agami Gorinstein Clemente, Ovadía Rafael Rubén, Villegas Alvarez Fernando. (2008). Xerostomía, hiposalivación y diabetes. *Diabet Hoy Med Sal;* 9(4): 2061-2065.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. (2005). Health benefits of saliva: a review. *J Dent.* 33(3): 223-233.

Dormenval V, Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Bruyère A, Rapin CH. (1998). Associations between malnutrition, poor general health and oral dryness in hospitalized elderly patients. *Age Ageing.* 27(2): 123-128.

Duarte CM, Quirino MR, Patrocínio MC, Anbinder AL. (2011). Effects of *Chamomilla recutita* (L.) on oral wound healing in rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 16(6): e716-721.

Dugani A, Auzzi A, Naas F, Megwez S. (2008). Effects of the oil and mucilage from flaxseed (*linum usitatissimum*) on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Libyan J Med.*, 3(4): 166-169.

Dumitru R, Hornby JM, Nickerson KW. (2004). Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* Jul;48(7):2350-4.

ENS. (2010). Encuesta Nacional de Salud ENS 2009 - 2010. Ministerio de Salud. Tomo I.

Fox PC, Busch KA, Baum BJ. (1987). Subjective reports of xerostomia and objective measures of salivary gland performance. *J Am Dent Assoc.* 115(4): 581-584.

Furness S, Worthington HV, Bryan G, Birchenough S, McMillan R. (2011). Interventions for the management of dry mouth: topical therapies. *Cochrane Database Syst Rev.* (12):CD008934.

Gerdin EW, Einarson S, Jonsson M, Aronsson K, Johansson I. (2005). Impact of dry mouth conditions on oral health-related quality of life in older people. *Gerodontology.* 22(4): 219-226.

Gómez-Moreno G, Cabrera-Ayala M, Aguilar-Salvatierra A, Guardia J, Ramírez-Fernández MP, González-Jaranay M, y cols. (2014). Evaluation of the efficacy of a topical sialogogue spray containing malic acid 1% in elderly people with xerostomia: a double-blind, randomized clinical trial. *Gerodontology.* 31(4):274-80

Gonsalves Wanda C., Stevens Wrightson A, Henry Robert G. (2008). Common Oral Conditions in Older Persons. *Am Fam Physician.* 1;78(7):845-852.

Guggenheimer J, Moore PA. (2003). Xerostomia: etiology, recognition and treatment. *J Am Dent Assoc.* 134(1): 61-9; quiz 118-119.

Gupta A, Epstein JB, Sroussi H. (2006). Hyposalivation in elderly patients. *J Can Dent Assoc.* 72(9): 841-846

Hahnel S, Behr M, Handel G, Bürgers R. (2009). Saliva substitutes for the treatment of radiation-induced xerostomia--a review. *Support Care Cancer*. 17(11):1331-1343.

Hopcraft MS, Tan C. (2010) Xerostomia: an update for clinicians. *Aust Dent J*. 55(3):238-244; quiz 353.

Ikebe K, Matsuda K, Morii K, Wada M, Hazeyama T, Nokubi T y cols. (2007). Impact of dry mouth and hyposalivation on oral health-related quality of life of elderly Japanese. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 103(2): 216-222.

Instituto Nacional de Estadísticas. <http://www.ine.cl> (Fecha acceso: 26/02/2015).

Jaimes Aveldañez, Francisco Hernández Pérez, Erick Martínez Herrera, Alma Angélica Rodríguez Carreón, Roberto Arenas Guzmán. (2008). Portadores de *Candida* en la mucosa oral: tipificación de 35 cepas con CHROMagar *Candida* Med Int Mex 24(4):262-6

Jamalian A, Shams-Ghahfarokhi M, Jaimand K, Pashootan N, Amani A, Razzaghi-Abyaneh M. (2012). Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. *J Mycol Med*. Dec; 22(4):308-15.

Johansson AK, Johansson A, Unell L, Ekbäck G, Ordell S, Carlsson GE. (2012). Self-reported dry mouth in Swedish population samples aged 50, 65 and 75 years. *Gerodontology*. 29(2): e107-115.

Johansson G, Andersson G, Attström R, Glantz PO, Larsson K. (1994). The effect of Salinum on the symptoms of dry mouth: a pilot study. *Gerodontology*.11 (1): 46-49.

Johansson G, Andersson G, Attstöm R, Edwardsson S. (2000). Oral mucous membrane flora in patients using saliva substitutes. *Gerodontology*. 17(2): 87-90.

Johansson G, Andersson G, Edwardsson S, Björn AL, Manthorpe R, Attström R. (2001). Effects of mouthrinses with linseed extract Salinum without/with chlorhexidine on oral conditions in patients with Sjögren's syndrome. A double-blind crossover investigation. *Gerodontology*., 18(2): 87-94.

Kamikawa Y, Mori Y, Nagayama T, Fujisaki J, Hirabayashi D, Sakamoto R y cols. (2014). Frequency of clinically isolated strains of oral *Candida species* at Kagoshima University Hospital, Japan, and their susceptibility to antifungal drugs in 2006-2007 and 2012-2013. *BMC Oral Health*. 20;14:14.

Kedzia B. (1991). Antimicroorganisms activity of oil Chamomillae and its components. *Herba Polonica*;37:29-38

Liébana Ureña José. (2002), *Microbiología oral*, Segunda Edición, Editorial Mc graw hill.

Liu B, Dion MR, Jurassic MM, Gibson G, Jones JA. (2012). Xerostomia and salivary hypofunction in vulnerable elders: prevalence and etiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 114(1): 52-60.

Márton K., Madléna M., Bánóczy J., Varga G., Fejérdy P., Sreebny LM.y cols. (2008). Unstimulated whole saliva flow rate in relation to sicca symptoms in

Hungary. Oral Dis, Vol. 14, No.5, (jul), pp. (472-477), ISSN 1601-0825

Mazokopakis EE, Vrentzos GE, Papadakis JA, Babalis DE, Ganotakis ES. (2005). Wild chamomile (*Matricaria recutita* L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis. Phytomedicine. 2(1-2): 25-27.

McKay DL, Blumberg JB. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). Phytother Res. 20(7): 519-530.

Morales-Bozo I, Rojas G, Ortega-Pinto A, Espinoza I, Soto L, Plaza A, y cols. (2012). Evaluation of the efficacy of two mouthrinses formulated for the relief of xerostomia of diverse origin in adult subjects. Gerodontology. 29(2): e1103-1112.

Munir Neelma, Saleha Iqbal Ayesha, Altaf Imran, Bashir Rasheeda, Sharif Nadia , Saleem Faiza y cols. (2014). Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of two endangered plant species *Atropa belladonna* and *Matricaria chamomilla*. Complement Altern Med. 11(5):111-117

Napeñas JJ, Brennan MT, Fox PC. (2009). Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). Odontology. 97(2) 76-83.

Naran R, Chen G, Carpita NC. (2008). Novel rhamnogalacturonan 1 and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage. Plant Physiol,148: 132–141.

Nerkar PP, Gattani S. (2011). *In vivo, in vitro* evaluation of linseed mucilage based buccal mucoadhesive microspheres of venlafaxine. Drug Deliv. 18(2): 111-121.

Nogueira JC, Diniz Mde F, Lima EO. (2008). *In vitro* antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. Braz J Otorhinolaryngol. 74(1):118-24.

Odds F., Bernaerts R. (1994). ChromAgar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida species*. J Clin Microbiol. 32(8):1923-1929.

Olorode OA y Okpokwasli GC. (2012). The efficacy of disinfectants on abattoirs' *Candida albicans* isolates in Niger Delta region .F1000Research 2012, 1:20.

Orav A, Raal A, Arak. (2010). Content and composition of the essential oil of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert from some European countries. Nat Prod Res. 24(1): 48-55.

Orellana MF, Lagravère MO, Boychuk DG, Major PW, Flores-Mir C. (2006). Prevalence of xerostomia in population-based samples: a systematic review. J Public Health Dent. 66(2): 152-158.

Pajukoski H, Meurman J, Halonen P, Sulkava R. (2001). Prevalence of subjective dry mouth and burning mouth in hospitalized elderly patients and outpatients in relation to saliva, medication, and systemic diseases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 92: 641-649.

Panizo M. y Reviákina, V. (2001). Adhesinas y receptores involucrados en el fenómeno de adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales Rev. Soc. Ven. Microbiol., Caracas, v. 21, n. 1

Pardi Germán y Cardozo Elba Inés. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de Candidiasis bucal. Acta Odontológica Venezolana Vol 40 . N° 1.

Park MS, Chung JW, Kim YK, Chung SC, Kho HS. (2007). Viscosity and wettability of animal mucin solutions and human saliva. *Oral Dis.* 13(2): 181-186.

Pauli A, Schilcher H. (2004). Specific selection of essential oil compounds for treatment of children's infection disease. *Pharmaceuticals* 1:1—30.

Pedersen AM, Bardow A, Nauntofte B. (2005). Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjogren's syndrome. *BMC Clin Pathol.* 5(1): 4.

Pijpe J, Kalk WW, Bootsma H, Spijkervet FK, Kallenberg CG, Vissink A. (2007). Progression of salivary gland dysfunction in patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 66(1): 107-112.

Pinjon E, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. (2005). Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. *Biochem Soc Trans.*33(Pt 5):1210-4.

Pinna R, Campus G, Cumbo E, Mura I, Milia E. (2015). Xerostomia induced by radiotherapy: an overview of the physiopathology, clinical evidence, and management of the oral damage. *Ther Clin Risk Manag.* 4;11:171-88

Porter SR, Scully C, Hegarty AM. (2004). An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 97(1): 28-46.

Ramos-e-Silva M, Ferreira AF, Bibas R, Carneiro S. (2006). Clinical evaluation of fluid extract of *Chamomilla recutita* for oral aphthae. *J Drugs Dermatol.* 5(7): 612-617.

Rocha NF, Rios ER, Carvalho AM, Cerqueira GS, Lopes Ade A, Leal LK, y cols. (2011). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 384(6): 525-533.

Rodríguez Ortega Judy, Miranda Tarragó Josefa, Morejón Lugones Haydée y C. Santana Garay Julio. (2002). Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica *Rev Cubana Estomatol* v.39 n.2

Ruissen AL, Groenink J, Lommerse CH, Van't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. (2002). Effects of carbohydrate polymers applicable in saliva substitutes on the anti-*Candida* activity of a histatin-derived peptide..*Arch Oral Biol.* 47(11):749-56.

Saderi Horieh, Owlia Parviz Hosseini , Ashrafolsadat y Semiyari Hassan. (2005). Antimicrobial Effects of *Chamomile* Extract and Essential Oil on Clinically Isolated *Porphyromonas gingivalis* from Periodontitis. *Proc. WOCMAP III, Vol.6: Traditional Medicine & Nutraceuticals.* Eds. U.R. Palaniswamy, L.E. Craker and Z.E.Gardner.

Salas Ingrid, García Julio Miranda, Keyna. (2000). Factores de virulencia en cepas *Candida albicans*.*Rev. costarric. cienc. méd* vol.21 n.1-2

Samnieng P, Ueno M, Shinada K, Zaitso T, Wright FA, Kawaguchi Y. (2012). Association of hyposalivation with oral function, nutrition and oral health in community-dwelling elderly Thai. *Community Dent Health.* 29(1): 117-123.

Schoofs, A., F.C. Odds, R. Coleblunders, M. Ieven, and H. Goosens. (1997). Use of specialized isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*

16:296-300.

Sevón L, Laine MA, Karjalainen S y cols. (2008). Effect of age on flow-rate, protein and electrolyte composition of stimulated whole saliva in healthy, non-smoking women. *Open Dent J* 2: 89–92.

Shiboski CH, Hodgson TA, Ship JA, Schiødt M. (2007). Management of salivary hypofunction during and after radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 103 Suppl: S66.e1-19.

Shinozaki S, Moriyama M, Hayashida JN, Tanaka A, Maehara T, Ieda S, y cols. (2012). Close association between oral *Candida species* and oral mucosal disorders in patients with xerostomia. *Oral Dis.* 18(7):667-72

Silva S, Henriques M, Hayes A, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. (2011). *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an *in vitro* oral epithelium. *J Oral Pathol Med.* 40(5):421-7.

Silvestre-Donat FJ, Miralles-Jordá L, Martínez-Mihi V. (2004). Tratamiento de la boca seca: puesta al día. *Med Oral*;9:273-9.

Singh KK, Mridula D, Rehal J, Barnwal P. (2011). Flaxseed: a potential source of food, feed and fiber. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 51(3): 210-222.

Singh Ompal, Khanam Zakia,¹ Misra Neelam, y Srivastava Manoj Kumar (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacogn RevJa5(9):* 82–95

Soto J., Rojas G., Tirreau V., Franco ME., Lobos N. (2007). “Relación entre

Estructura Histológica de Glándulas Salivales menores Labiales y Capacidad Funcional Salival Total”. Trabajo de investigación para optar al título de cirujano-dentista. Departamento de Patología, facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Srivastava JK, Shankar E, Gupta S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Mol Med Report*. 3(6): 895-901.

Sullivan D., Westerneng T., Haynes K., Bennett D., Coleman D. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 141(7):1507-1521.

Thelin WR, Brennan MT, Lockhart PB, Singh ML, Fox PC, Papas AS y cols. (2008). The oral mucosa as a therapeutic target for xerostomia. *Oral Diseases*. 14(8): 683 -689.

Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Akiti T, Nucci M, y cols.(2002). Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 93(2):149-54.

Van der Reijden WA, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. (1994). Rheological properties of commercially available polysaccharides with potential use in saliva substitutes. *Biorheology*. 31(6): 631-642.

Villa A y Abati S. (2011). Risk factors and symptoms associated with xerostomia: a cross-sectional study. *Aust Dent J*56(3): 290-295.

Von Bültzingslöwen I, Sollecito TP, Fox PC, Daniels T, Jonsson R, Lockhart PB y

cols. (2007). Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 103 Suppl: S57.e1-15.

Warrand J, Michaud P, Picton L, Muller G, Courtois B, Ralainirina R y cols. (2005a). Structural investigation of the neutral polysaccharide of *Linum usitatissimum* L. seeds mucilage. *Int J Biol Macromol.* 35: 121–125.

Warrand J, Michaud P, Picton L, Muller G, Courtois B, Ralainirina R, y cols. (2005b). Contributions of intermolecular interactions between constitutive arabinoxylans to the flaxseed mucilage properties. *Biomacromolecules*, 9: 1871–1876.

Williams D., Kuriyama T., Silva S., Malic S., Lewis M. (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000.* 55(1):250–265.

10 Anexos.

10.1 Anexo 1: Encuesta de Xerostomia (Fox, Busch y Baum, 1987).

Encuesta de Xerostomía (Fox, Busch y Baum, 1987)		
Conteste las siguientes preguntas:	Si	No
¿Siente la boca seca usualmente?		
¿Siente la saliva espesa?		
¿Tiene sensación de ardor en la lengua?		
¿Necesita tomar líquidos para tragar la comida?		
¿Tiene dificultades para tragar?		

10.2 Anexo 2: Consentimiento informado.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL

Fon is
FONDO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO EN SALUD

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROYECTO DE INVESTIGACION

Esta acta de consentimiento tiene como fin entregar a Ud. toda la información necesaria y explicitar los compromisos suyos, como paciente y el de los investigadores, para que su participación en este estudio sea libre, informada y voluntaria.

INSTITUCIÓN PATROCINANTE: Fondo Nacional de Investigación y desarrollo en Salud (FONIS), Programa de CONICYT, Gobierno de Chile.

TÍTULO DEL ESTUDIO: "ENSAYO CLINICO ALEATORIZADO PARA EVALUAR LA EFICACIA DE UN SUSTITUTO SALIVAL CASERO, EN BASE A MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) Y SEMILLAS DE ACEITE DE LINAZA (*Linum usitatissimum*), EN EL ALIVIO DE LA SENSACIÓN DE BOCA SECA DE DISTINTO ORIGEN".

OBJETIVO DEL ESTUDIO: El principal objetivo de este estudio es determinar la eficacia de un sustituto salival casero en base a manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y semillas de aceite de linaza (*Linum usitatissimum*), en el alivio de la sensación de boca seca de cualquier origen en individuos adultos mayores.

MODALIDAD DE PARTICIPACIÓN DE LOS VOLUNTARIOS. Los sujetos seleccionados participarán en un ensayo clínico aleatorizado, cruzado, con blanqueamiento y con modalidad de análisis por intención de tratar. Se les realizará un examen clínico intra y extraoral por parte de Cirujanos-Dentistas calibrados. Posteriormente, serán seleccionados mediante el uso de una encuesta validada para xerostomía (Encuesta de Fox) y separados en dos grupos de tratamiento (aquellos tratados con el sustituto salival convencional y los individuos tratados con el sustituto salival casero). No se incluirán personas analfabetas. El estudio durará 14 semanas en total, que incluirán 2 semanas de fase de blanqueamiento. Los participantes del estudio deberán contestar dos encuestas; una encuesta previa y una encuesta posterior, con cada sustituto. Los sustitutos salivales serán entregados por los investigadores y los gastos de traslado serán por cuenta del proyecto. Durante el ensayo clínico, los participantes deberán entregar muestras de saliva para medir el flujo salival. A los individuos no seleccionados para participar en el ensayo se les informará del estado de su salud bucal y en caso de ser necesario se les orientará sobre como proceder para su posterior atención y tratamiento.

A continuación usted declara que:

1. Al firmar este documento, voluntariamente doy mi consentimiento para participar de una investigación cuyo profesional responsable es la Dra. Irene Morales, y que es realizado conjuntamente por la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, la Unidad Dental del Centro de Referencia de Salud de Peñalolén Cordillera Oriente y el Fondo Nacional para la Investigación y Desarrollo en Salud (FONIS).



Ed:12/09/2012

2. Estoy en conocimiento que esta investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de un sustituto salival casero, sobre la sensación de boca seca de individuos afectados con dicha condición.
3. Comprendo que se me realizarán tres entrevistas en que se me preguntarán antecedentes personales, antecedentes médicos, y opiniones. Además comprendo que se me realizará un examen clínico bucal y toma de muestra de saliva por parte de un Cirujano-Dentista al que autorizo expresamente para realizar dicho procedimiento.
4. Estoy en conocimiento de que por el hecho de participar en esta investigación, tendré que usar un producto bucal en forma diaria durante seis semanas, tiempo posterior al cual se me volverá a realizar una entrevista. Entiendo que después de 2 semanas, tendré que usar otro producto en forma diaria por seis semanas, tiempo posterior al cual se me volverá a realizar una entrevista.
5. Sé que ninguno de los procedimientos mencionados (examen clínico, entrevista y uso del producto bucal) tendrá costo para mi persona.
6. Declaro que mi participación en este estudio es libre y voluntaria, pudiendo incluso dejar de participar en él cuando lo desee. Sé que la información obtenida de mi persona será manejada de manera absolutamente confidencial, y únicamente utilizada para fines de investigación sin fines de lucro. Entiendo que mi nombre y mis datos personales no serán jamás identificados públicamente.
7. Por mi condición de voluntario, entiendo que no recibiré ningún pago de dinero y que mi participación en este estudio no obliga de manera alguna a los investigadores a hacerse cargo en forma gratuita del tratamiento de posibles enfermedades bucales. Entiendo sí, que se me entregará el dinero necesario para los gastos de movilización asociados al estudio.
8. Entiendo sí, que por el hecho de participar en el estudio, tengo derecho a que se me informe sobre los resultados de los exámenes que se me realicen y a realizar cualquier tipo de preguntas relacionadas con dudas que me surjan acerca de la investigación antes, durante y después del ensayo.
9. Comprendo que los beneficios para mi persona por el hecho de participar en esta investigación serán: 1) tener información de mi estado de salud bucal y de posibles infecciones bucales 2) que usar el producto bucal podría ayudar a tener mi boca en mejores condiciones de salud.
10. Me han informado que, el uso del producto bucal podría eventualmente provocar reacciones no deseables que en general son de muy baja ocurrencia, tales como alteración del gusto (sabor de los alimentos), irritación, ardor y reacción alérgica. En tal caso DEBO SUSPENDER SU USO y comunicarme con el equipo investigador lo antes posible, quienes obligatoriamente realizarán el diagnóstico y tratamiento de esas molestias con cargo al Equipo de investigadores de la Facultad de Odontología.
11. Me han informado que, en caso de sufrir algún daño relacionado directamente con el estudio, la compensación de estos daños estará a cargo del Equipo de investigadores de la Facultad de Odontología.



Ed:12/09/2012

12. Entiendo que si el producto en estudio resulta eficaz en aliviarme los síntomas de boca seca, la información de su preparación y uso estará disponible en los Centros de Atención Primaria del Servicio de Salud.
13. Si necesito cualquier aclaración o información adicional sobre esta investigación y de mi participación en él, debo dirigirme a la Dra. Irene Morales al teléfono 9781794 o al Dr. Gonzalo Rojas al teléfono 9781811.
14. Entiendo que si ocurriese cualquier evento fortuito o inesperado, relacionado o no con el estudio, debo comunicarlo al Médico del Equipo de investigadores Dr. José Manuel Manríquez, al teléfono 9781775 o al 9781712.
15. Para cualquier aclaración sobre mis derechos como voluntario para esta investigación, puedo tomar contacto con el Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Profesor Dr. Juan Cortés Araya. Dirección Sergio Livingstone Polhammer (exOlivos) 943, Independencia. Teléfono: 9781702.

Fecha de aplicación: _____

Nombre del Voluntario Participante en el Estudio	Firma
FONO: _____	RUT: _____

Nombre del Investigador que toma el Consentimiento Informado	Firma
---	-------

Nombre del Investigador Responsable del Proyecto	Firma
---	-------



