



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

“Asociación de parámetros salivales, recuento de levaduras del género *Candida* y bacterias del género *Lactobacillus* en pacientes portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica”

Fernanda A. Díaz Guerrero

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Carla Lozano Moraga

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Ximena Lee Muñoz

Prof. Dr. Cristian Vergara Núñez

Prof. Dr. Juan Pablo Aitken Saavedra

Adscrito a Proyecto FONIS SA13I10116

Santiago – Chile

2015



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

“Asociación de parámetros salivales, recuento de levaduras del género *Candida* y bacterias del género *Lactobacillus* en pacientes portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica”

Fernanda A. Díaz Guerrero

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Carla Lozano Moraga

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Ximena Lee Muñoz

Prof. Dr. Cristian Vergara Núñez

Prof. Dr. Juan Pablo Aitken Saavedra

Adscrito a Proyecto FONIS SA13I10116

Santiago – Chile

2015

AGRADECIMIENTOS

El camino recorrido hasta escribir estas palabras no fue fácil, seis años de dedicación culminan en estas páginas, sin embargo, hoy me encuentro inmensamente feliz. Mirando atrás sé que nunca estuve sola, esta Universidad me entregó amistades invaluable, que espero me acompañen por mucho tiempo.

Francisca Ayala, Varsovia Cereño, Carolina Barahona y Fabiana Llanos, el cierre de esta etapa se lo dedico a ustedes, que sin duda han sido un pilar fundamental en estos años, estaré siempre inmensamente agradecida de su incondicionalidad, apoyo y cariño.

Dra. Carla Lozano, más que ser mi tutora es para mí una guía y mentora, muchas gracias por hacer del desarrollo de mi tesis una gran experiencia tanto personal como profesional, gracias por su entrega, dedicación y comprensión, por su cariño y paciencia. Siempre llevaré sus enseñanzas conmigo.

Dr. Cristian Vergara, por su participación en los análisis estadísticos de esta investigación, muchas gracias por sus consejos y apoyo. Dra. Ximena Lee, por permitirme participar de este gran proyecto y a todo el equipo del laboratorio de Bioquímica FOUCH, por incorporarme a su área de trabajo, por los lindos momentos en este periodo, muchas gracias.

Gracias a todos quienes fueron participes de este proceso, me despido de esta facultad con la fuerte convicción de que solo querer, no es poder, más querer es el primer paso para abrir las puertas hacia el éxito, es el esfuerzo, disciplina y pasión que permitirán a cada uno alcanzar sus metas.

INDICE

RESUMEN.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.2 TRATAMIENTO REHABILITADOR	4
1.3 CANDIDIASIS ORAL	6
Levaduras del género <i>Candida</i>	6
Levaduras no- <i>Candida albicans</i>	8
1.4 ESTOMATITIS PROTÉSICA	10
Diagnóstico.....	10
Etiología, patogenia y factores de riesgo.....	13
Saliva y Estomatitis protésica	15
Tratamiento	16
Bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	17
2. HIPOTESIS	19
3. OBJETIVO GENERAL.....	19
3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
3.1.1 Objetivo específico 1	19
3.1.2 Objetivo específico 2	19
3.1.3 Objetivo específico 3	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Tipo de estudio	20
4.2 Población Objetivo.....	20
4.3 Criterios de Inclusión y Exclusión	20
4.3.1 Criterios de Inclusión	20
4.3.2 Criterios de Exclusión.....	20

4.4	Técnicas de recolección de la información	21
4.4.1	Exámenes clínicos.....	21
4.4.2	Evaluación de Xerostomía.....	21
4.4.3	Métodos microbiológicos	22
4.4.3.1	Toma de muestra	22
4.4.3.2	Saliva no estimulada	22
4.5	Procesamiento de las muestras.....	22
4.5.1	Determinación VFS no estimulado	22
4.5.2	Medición del pH salival.....	23
4.5.3	Recuento y aislamiento de levaduras del género <i>Candida</i>	23
4.5.4	Identificación de especies de <i>Candida</i> mediante medio de cultivo cromogénico, test bioquímico y/o PCR.....	24
4.5.5	Recuento de bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	26
4.6	Plan de análisis de datos	26
5.	RESULTADOS	28
6.	DISCUSIÓN	38
7.	CONCLUSIONES.....	44
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
9.	ANEXOS y APÉNDICES	51
9.1	Anexo1: Consentimiento informado	51
	52
9.2	Anexo 2: Ficha clínica.....	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fotografías clínicas de Estomatitis protésica según estadios de Newton y en condiciones normales.	11
Figura 2: Flujograma diagnóstico de EP.	12
Figura 3: Placas de agar Sabouraud tras 48h de incubación de siembra de muestra salival.....	30
Figura 4: Cultivo de colonias del género <i>Candida</i> en medio cromogénico tras 48h de incubación.....	32
Figura 5: Identificación de levaduras <i>C. albicans</i> y <i>C. dublinensis</i> mediante técnica de PCR.	32

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribución de la portación de levaduras del género <i>Candida</i>	30
Gráfico 2: Recuento de levaduras <i>Candida</i> en ambos grupos.....	31
Gráfico 3: Distribución de las diversas especies de levaduras identificadas mediante técnicas bioquímicas y moleculares en el total de sujetos.	33
Gráfico 4: Recuento de bacterias del género <i>Lactobacillus</i> en ambos grupos.	34
Gráfico 5: Correlación de VFS (ml/min) y recuento de <i>Candida</i> (UFC/ml) en sujetos con estomatitis protésica	35
Gráfico 6: Correlación de VFS (ml /min) y recuento de <i>Candida</i> (UFC/ml) en sujetos sin estomatitis protésica.	35
Gráfico 7: Correlación de pH y recuento de <i>Candida</i> (UFC/ml) en sujetos con estomatitis protésica.	36
Gráfico 8: Correlación de pH y recuento de <i>Candida</i> (UFC/ml) en sujetos sin estomatitis protésica.	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales Especies de <i>Candida</i> en la cavidad oral.....	9
Tabla 2: Estadíos clínicos de estomatitis protésica según Newton.....	10
Tabla 3: Test estadísticos y clasificación de variables utilizadas en este estudio.....	27
Tabla 4: Rango y mediana de VFS de sujetos portadores de PR con y sin estomatitis protésica.	28
Tabla 5: Frecuencia de Xerostomía en pacientes portadores de PR con y sin EP y correlación Xerostomía-VFS en ambos grupos.	29
Tabla 6: Rango y promedio de pH salival de sujetos portadores de PR con y sin EP.	29
Tabla 7: Identificación de levaduras mediante PCR y/o test bioquímico en ambos grupos de estudio.	33
Tabla 8: Correlación de recuentos de <i>Lactobacillus</i> y pH en sujetos con y sin EP.....	37

ABREVIACIONES

EP	Estomatitis protésica
PR	Prótesis removible
ENS	Encuesta nacional de salud
CNA	<i>Candida no albicans</i>
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
API	Analitycal Profile Index
VFS	Velocidad de Flujo salival
UFC	Unidades formadoras de Colonias

RESUMEN

Introducción: La estomatitis protésica (EP) es una patología frecuente que afecta a sujetos portadores de prótesis removible (PR). Ésta se caracteriza por la inflamación y eritema de la mucosa adyacente a la PR y su etiología ha sido relacionada a múltiples factores. El principal de ellos es la presencia de recuentos elevados de levaduras del género *Candida*, sin embargo, el aumento de este microorganismo sería determinado por otras variables, las cuales dependen del hospedero, de la misma levadura, así como del microambiente oral. Esto a su vez, determina mayor complejidad en su tratamiento, el cual ha sido objeto de múltiples investigaciones en los últimos años. El objetivo de esta investigación es determinar las características microbiológicas y salivales de adultos mayores portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica, al inicio del proyecto al cual este estudio está adscrito, denominado “Efecto del consumo de bebidas lácteas enriquecidas con probióticos en la reducción de incidencia de candidiasis oral asociada a estomatitis protésica, en adultos mayores portadores de prótesis removibles”.

Materiales y métodos: Este estudio se realizó con 63 adultos mayores portadores de PR, pertenecientes a una institución de cuidados continuos y a la clínica de Prótesis Totales de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Previa firma de consentimiento informado, a cada sujeto se le realizó una ficha clínica diseñada y validada para el estudio, tras lo cual fueron tomadas muestras de saliva no estimulada para su procesamiento y análisis. Las variables en estudio corresponden a Xerostomía, velocidad de flujo salival (VFS), pH, portación, recuento e identificación de *Candida* y recuento de *Lactobacillus*. Los datos se analizaron con los test X^2 , correlación lineal de Pearson, Test de Wilcoxon y T-test, considerando un valor de $p < 0,05$.

Resultados: De las características salivales analizadas, solo el pH exhibió diferencias estadísticas entre ambos grupos ($p=0,0$), no así Xerostomía y VFS. Adultos mayores con EP presentaron mayor portación y recuento de levaduras del género *Candida* ($p=0,0$), siendo *C. albicans* la especie más frecuentemente aislada en ambos grupos de estudio. En cuanto a los recuentos de *Lactobacillus*, estos fueron mayores en los sujetos sin EP ($p=0,02$). No hubo asociación entre los distintos parámetros salivales y recuentos de *Candida* o *Lactobacillus*.

Conclusiones: Las características salivales carecen de un rol importante en la variación de los recuentos salivales de *Candida* y *Lactobacillus* en adultos mayores portadores de PR con y sin EP. Los recuentos elevados de *C. albicans*, representan un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en estudio, no así Xerostomía.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 INTRODUCCIÓN

Hoy en día es ampliamente reconocido el proceso de envejecimiento demográfico por el que está atravesando la población Chilena. El departamento de estudios y desarrollo de la superintendencia de Salud, en su documento emitido el año 2006 (Olivares, 2006), menciona que hasta el año 1970, el porcentaje de personas que superaban los 60 años era solo el 8% de la población. Ya para el censo llevado a cabo en 2002, dicha cifra se elevó a un 11,4% y en los próximos 20 años se estima una tasa de crecimiento de 3,7 % anual para este grupo etario. Por tanto, para el año 2025, un total de 3.825.000 personas serían adultos mayores en nuestro país, correspondientes a un 20% de la población total.

Con el aumento de la esperanza de vida, en términos de salud, el avance de la edad es responsable de cambios tanto morfológicos como funcionales. Dichos cambios se traducen entre otros, en el deterioro de la piel, sistema digestivo, respiratorio, sistema inmunológico y aparato locomotor, además de ser influenciados por la presencia de enfermedades crónicas como la osteoporosis, diabetes, hipertensión, artritis, problemas emocionales y patologías orales (Morales, 2001).

Según la Encuesta nacional de salud (ENS) del año 2003, la salud oral ha mejorado con el transcurso del tiempo, sin embargo, aún es alta la prevalencia de trastornos orales. En dicho estudio, se evaluó el estado de salud oral de los adultos de 65 años, dilucidándose que únicamente un 0,7% mantiene todos sus dientes y un 33,4% son desdentados totales.

La pérdida dentaria en Chile, es tratada en el sistema público mediante la confección de prótesis removible (PR), dispositivo mecánico confeccionado a base de resinas acrílicas y/o aleaciones metálicas dependiendo de cada caso y cuyo diseño busca devolver las estructuras orales perdidas, teniendo como principal objetivo restaurar la función, estética y preservar el remanente biológico (McCracken, 2005). Un total de 63,2% de los adultos mayores de 65 años utiliza este tipo de aparato (Ministerio de salud, 2003) sin embargo y a pesar de que la rehabilitación de estos pacientes representa una significativa mejora en la eficiencia masticatoria, alimentación, capacidad de comunicación y autoestima, el uso de prótesis altera las condiciones de la mucosa, lo cual sumado a la atrofia y disminución de la producción de colágeno propia del envejecimiento, genera que la PR aumente las posibilidades de aparición de diversas patologías orales, esto, principalmente cuando los requisitos funcionales protésicos no se cumplen (Huomonen y cols., 2012).

1.2 TRATAMIENTO REHABILITADOR

Es clara la relación existente entre la pérdida dentaria y el avance de la edad. El perder dientes tiene consecuencias funcionales, lo cual se ve reflejado en la disminución considerable de la eficiencia masticatoria y por tanto la alimentación se dificulta, así como también la fonación y deglución sufren variaciones. Otra consecuencia no menor es el impacto estético, el cuál puede alcanzar un gran significado, más aún cuando actualmente la sociedad percibe la ausencia de dientes visibles como un estigma. Cambios faciales secundarios a la pérdida dentaria y reborde alveolar, como la pérdida de soporte labial, disminución de la altura facial y adelantamiento del mentón, afectan la calidad de vida de los pacientes con ausencia de piezas dentarias (McCracken, 2005).

Para devolver estas funciones y estética respetando el remanente biológico, la rehabilitación de las zonas edéntulas mediante PR es ampliamente utilizada. La ENS realizada el año 2003, describe que menos del 1% del total de la población mayor de 65 años tiene todos sus dientes, 37,1% utiliza prótesis en ambos maxilares, 25,3% sólo usa prótesis en el maxilar superior y 0,8% en el maxilar inferior, lo que devela la alta necesidad de tratamiento en este grupo. Las PR en Chile representa una opción costo-efectiva y de corto tiempo clínico de realización, siendo favorable para los pacientes.

En conjunto, los diversos elementos de las PR deben cumplir con requisitos funcionales específicos, los que permitirán armonía con los diversos tejidos orales. Estos son, retención, soporte y estabilidad, en otras palabras, el aditamento debe ser capaz de resistir fuerzas verticales que lo desalojen de su posición, evitar comprimir en exceso los tejidos de sostén ante fuerzas intrusivas y mantener su posición frente a movimientos horizontales (Loza y cols., 2006).

La pérdida de función de una PR puede tener diversas causas, deterioro de la estructura base, pérdida de piezas dentarias remanentes, sobrecompresión de la mucosa subyacente, desgaste de dientes protésicos y aumento en la reabsorción del reborde óseo residual entre otras, sin embargo, cada una de estas razones conlleva a la falta de uno o todos los requisitos funcionales.

Además, factores como la higienización deficiente, irregularidades en la superficie, desajustes y presión negativa en la zona de contacto entre la prótesis y mucosa, llevan a la acumulación de detritus, facilitando la formación de la placa bacteriana en la superficie protésica. Esto permite la acción de los microorganismos en la mucosa adyacente, lo que puede generar irritación de los tejidos y la consecuente aparición de gran variedad de patologías relacionadas con procesos inflamatorios, infecciosos, traumáticos y/o alérgicos

1.3 CANDIDIASIS ORAL

Una de las patologías de mayor frecuencia en la cavidad oral de los sujetos adultos mayores es la candidiasis o candidiasis oral. Ésta es ocasionada específicamente por levaduras del género *Candida*, las cuales se encuentran presentes en un 50-60% de la población general como un organismo comensal de la microbiota oral normal (Coronado-Castellote y cols., 2013) y puede manifestarse clínicamente de diversas formas, entre ellas, candidiasis pseudomembranosa, candidiasis eritematosa, glositis romboidal, queilitis angular y estomatitis protésica (EP) (Krishnan, 2012).

Levaduras del género *Candida*

Candida es una levadura de forma oval de 3-30 μm de diámetro. Se reproduce asexualmente mediante el proceso de gemación, en el cuál un botón o vesícula emerge de la célula madre y crece hasta liberarse de ésta formando una nueva levadura. Ocasionalmente, la célula hija no se desprende y forma cadenas celulares, que pueden ser confundidas con hifas. Esta última estructura corresponde a una cadena de células recubierta por una pared celular y puede ser encontrada en algunas especies. Las especies del género *Candida* son oportunistas y se encuentran como comensales en cavidad bucal, intestino, vagina, secreción bronquial y piel del hombre y de ciertos animales. Ahora bien, en la cavidad bucal la colonización es significativamente distinta de sitio a sitio (Webb y cols., 1998). En medio de cultivo, las levaduras crecen dando origen a colonias compactas macroscópicamente visibles tras 24-48h de incubación en condiciones específicas (Coronado-Castellote y cols., 2013).

Ciento cincuenta especies del género *Candida* han sido aisladas de la cavidad oral, dentro de este grupo, encontramos a *Candida albicans* (Meurman y cols., 2007), la más patogénica de su género y que ha sido ampliamente relacionada con las micosis orales en humanos (Samarayake y cols., 1990).

Además, *C. albicans* es la más comúnmente estudiada e identificada, comprendiendo entre 60% y 70% de los aislamientos de la cavidad oral tanto en individuos sanos como en aquellos con Candidiasis (Coronado-Castellote y cols., 2013). La capacidad de transformarse morfogénicamente de su estado levaduriforme a filamentosa, la secreción de enzimas extracelulares como las proteasas y fosfolipasas y la producción de adhesinas representan algunos de sus factores de virulencia (Panizo y cols., 2001).

C. albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme, sin embargo en tejidos infectados también han identificado formas filamentosas o hifas, morfología que ha sido descrita como la característica que le confiere mayor facilidad de adhesión e invasividad (Bilhan y cols., 2009). Akdeniz y cols. (2000) determinaron cambios fenotípicos en distintas cepas de esta especie, las cuales fueron aisladas de la cavidad bucal de pacientes con trasplante renal. Se ha sugerido que las cepas en las que se observaron los cambios fenotípicos, serían capaces de adaptarse a diversas condiciones ambientales debido a variaciones en sus propiedades bioquímicas, físicas y fisiológicas.

El desarrollo de Candidiasis oral en sus etapas iniciales ha sido asociado a la colonización por parte de *C. albicans*, proceso que implica la adquisición, adherencia y posterior mantención de una población constante de levaduras. En el ambiente bucal existen gran cantidad de sitios para la colonización por parte de esta especie, entre ellos, las células epiteliales, prótesis dental y células bacterianas de la microbiota bucal residente (Pardi y cols., 2002).

Otras especies de *Candida* responsables de infecciones en la cavidad oral han sido identificadas. Todas ellas causantes de la misma clase de mucositis, sin embargo, existen diferencias en sus factores de virulencia, tales como la invasividad, y susceptibilidad a agentes antifúngicos (Meurman y cols., 2007).

Levaduras no-*Candida albicans*

Las especies de *Candida no-albicans* (CNA), son un grupo de organismos heterogéneos, diferentes entre sí, y de *C. albicans*. El desarrollo de nuevas terapias médicas, tratamientos para el cáncer y el uso de antibióticos de amplio espectro entre otras, ha llevado al incremento de muchas especies causantes de infecciones de la mucosa (Moran y cols., 2002).

Las especies CNA, son conocidas por causar candidiasis de menor virulencia, lo cual se explican por el hecho de que carecen total o parcialmente de algunos factores de virulencia que posee *C. albicans*. Estos son por ejemplo, la habilidad de formar hifas y de cambiar fenotípicamente. Además tienen menor capacidad de adherencia a superficies epiteliales y menor secreción de proteinasas (Moran y cols., 2002). Las principales especies de este género en nomenclatura actual se encuentran descritas en la Tabla 1.

Dentro del género, algunas de las especies más frecuentemente identificadas en la cavidad oral son *C. tropicalis* y *C. glabrata* representando un 7%, mientras que *C. krusei* y *C. guilliermondii* son aisladas con mucha menor frecuencia (Aguirre, 2002).

Candida dubliniensis fue descrita por primera vez en 1995 en Dublín, Irlanda, en individuos portadores del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) con candidiasis oral recurrente, presentando ésta características fenotípicas similares a *C. albicans* (Sullivan y cols., 1998). En la actualidad ha sido descrito que un 3,5% de la población sana es portadora de esta especie (Pinjon y cols., 2005).

Tabla 1: Principales Especies de *Candida* en la cavidad oral. (Meurman y cols., 2007).

Especies de <i>Candida</i>
<i>Candida dubliniensis</i>
<i>Candida famata</i>
<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Candida inconspicua</i>
<i>Candida kefyr</i>
<i>Candida krusei</i>
<i>Candida lusitanae</i>
<i>Candida norvegensis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida rugosa</i>
<i>Candida tropicalis</i>
<i>Candida albicans</i>

El rol de *Candida* en el desarrollo de EP es aún controversial. Algunas especies, específicamente los tipos que producen hifas, son más comúnmente encontradas en las infecciones de mucosa y parecen ser virulentas debido a que son capaces de unirse, interrumpir e invadir la barrera epitelial (Salerno y cols., 2010).

Si bien el sobrecrecimiento de *Candida* en EP es un hallazgo frecuente, las características ambientales que ocasionan este fenómeno, y su participación en la patogénesis en individuos sanos no ha sido dilucidada a cabalidad.

1.4 ESTOMATITIS PROTÉSICA

La EP es una patología muy común, caracterizada por la presencia de eritema e inflamación de diversa extensión y severidad en la mucosa de soporte cubierta por PR, sea esta total o parcial. Gran cantidad de estudios sugieren que hasta dos tercios o más de los individuos que utilizan PR completas pueden padecer de la patología, representando la lesión de mucosa oral más prevalente (Ramage y cols., 2004; Espinoza y cols., 2003).

Diagnóstico

La EP es en la mayor parte de los casos asintomático; únicamente la minoría de los individuos que la padecen experimenta dolor, picazón, o sensación de ardor, lo que determina que su diagnóstico sea esencialmente clínico (Coronado-Castellote y cols., 2013). Dicho diagnóstico se basa en el reconocimiento de las lesiones de la mucosa oral, existiendo tres estadios identificables según lo propuesto por Newton (Ayuso y cols., 2004; Marinoski y cols., 2014), clasificación ampliamente utilizada para hacer referencia a los diferentes tipos de EP (Tabla 2, Fig. 1).

Tabla 2: Estadios clínicos de estomatitis protésica según Newton.

TIPO ESTOMATITIS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
Tipo I	Mucosa con inflamación localizada puntiforme
Tipo II	Mucosa de aspecto liso, atrófico y eritematoso, con inflamación difusa y amplia en relación a la zona de contacto de la prótesis.
Tipo III	Lesión inflamatoria de carácter crónico y caracterizada por una hiperplasia papilar

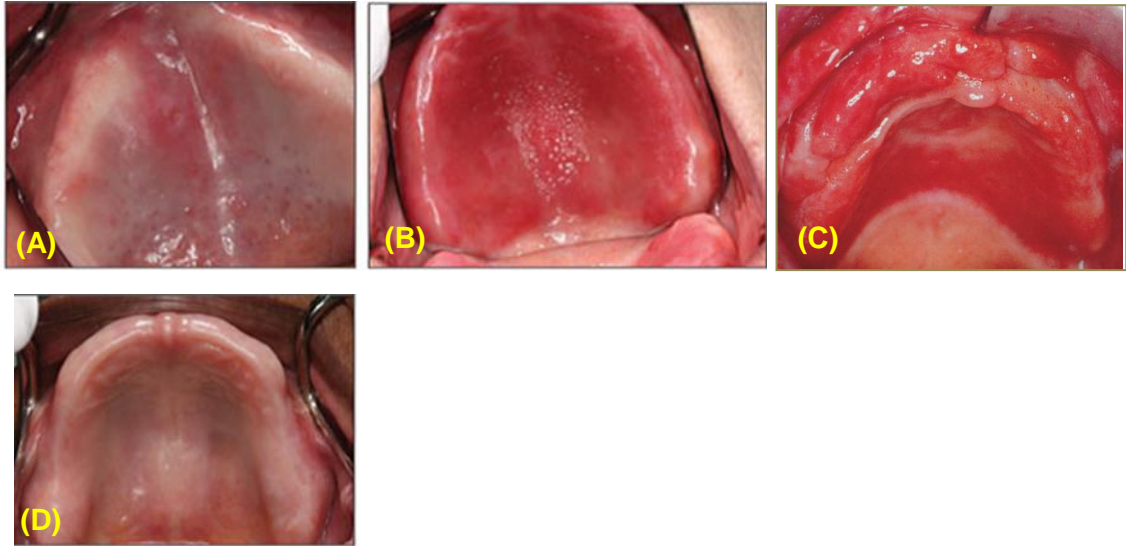


Figura 1: Fotografías clínicas de Estomatitis protésica según estadios de Newton y en condiciones normales. (A): Tipo I; (B): Tipo II; (C): Tipo III; (D): Sano. Adaptado de Gendreau y cols., 2011.

En casos en que el diagnóstico es dudoso, el cuadro clínico no remita ante los tratamientos entregados o sea de características severas, es solicitado un estudio microbiológico. Además de este método, en los casos en que se ha desarrollado hiperplasia de la mucosa, puede ser solicitada una biopsia del tejido afectado, con el fin de descartar la existencia de displasia epitelial.

En cuanto al estudio microbiológico, la identificación de levaduras puede ser realizada a través de la observación microscópica de una muestra tomada desde la lesión, o macroscópica a partir de cultivos.

En particular, el utilizar cultivos permitirá aislar levaduras *Candida* e identificar especies, esto mediante técnicas moleculares y bioquímicas incluyendo técnicas enzimáticas. Para efectos de este estudio serán utilizadas la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica bioquímica Analytical Profile Index (API), basado en reconocimiento de carbohidratos (Coronado-Castellote y cols, 2013). La figura 2 resume el flujograma diagnóstico de EP, aplicable para otras candidiasis orales.

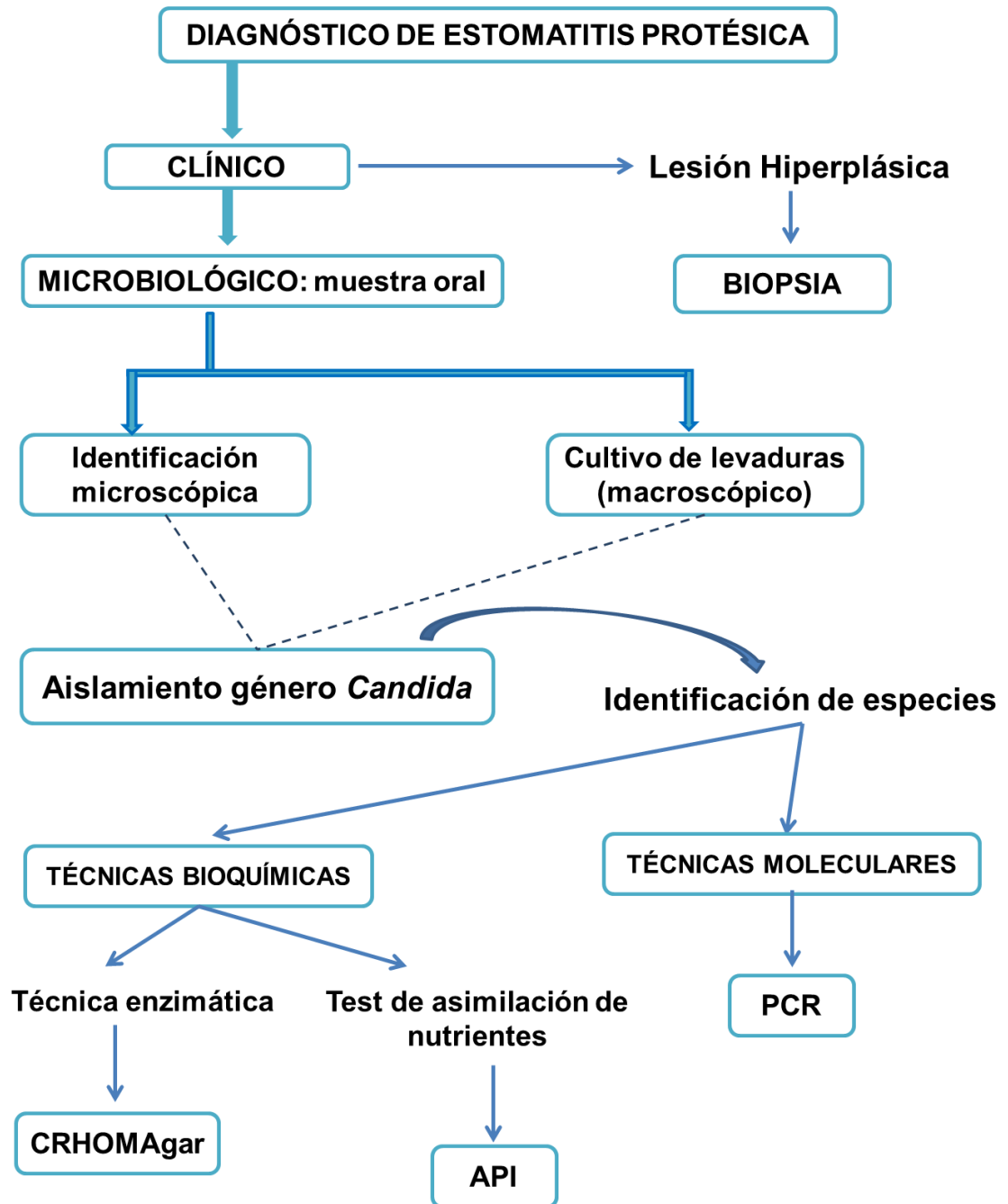


Figura 2: Flujograma diagnóstico de EP. Adaptado de (Coronado-Castellote y cols, 2013).

La técnica enzimática es una técnica bioquímica basada en la utilización de medios cromogénicos, disponibles en el comercio en gran variedad. Este sistema detecta la actividad de ciertas enzimas de las levaduras a través de la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador. Si bien existe gran variedad de kits en el comercio, el más frecuentemente utilizado es CHROMAgar *Candida*, en que *C. albicans* y *C. dublinensis* se desarrolla formando colonias verde claro y oscuro respectivamente, *C. tropicalis* se observa de color azul y, *C. krusei* se observa de color rosado. Este sistema es simple, fácil de usar y ofrece buena especificidad y sensibilidad comparado a otros kit (Rodrigues y cols., 2004).

Etiología, patogenia y factores de riesgo

Para que la EP se desarrolle es necesario romper el equilibrio ecológico de la microbiota oral, esto produce que *Candida* pase de su estado comensal a un estado patógeno. Es en este punto donde participan gran variedad de factores dependientes del hospedero, de la propia levadura y del microambiente (Scully y cols., 1994).

Con respecto a los factores dependientes del hospedero, a nivel sistémico, se ha descrito el déficit nutricional, uso de medicamentos inmunosupresores y/o causantes de xerostomía, patologías sistémicas tales como diabetes mellitus, hipotiroidismo, síndrome de Sjögren y neoplasias malignas (Pereira-Cenci y cols., 2008; Budtz-Jorgensen, 2000; Belazi y cols., 2005). Por otra parte, a nivel local, la presencia de EP se ha visto asociada con pérdida de continuidad de la mucosa por trauma continuo de prótesis mucosoportadas, atrofia epitelial, cambios cuantitativos y cualitativos salivales, dieta rica en hidratos de carbono, tabaquismo, reacciones de hipersensibilidad, deficiente higiene bucal y protésica (Samaranayake y cols., 2009).

La patogénesis de EP es entonces un proceso multifactorial. Las variables antes mencionadas, en conjunto, serían las responsables de condicionar un microambiente favorable para el aumento de recuento de levaduras del género *Candida*, principal factor asociado a la enfermedad (Salerno y cols., 2010). Esta afirmación, descrita por una serie de estudios, menciona la existencia de una alta prevalencia de *C. albicans* en la saliva de sujetos con EP en comparación con grupos control (Bilhan y cols., 2009).

La mayor prevalencia de *C. albicans* ha sido explicada por su alta capacidad de adherirse a superficies mucosas, fenómeno considerado el primer paso en la patogénesis de EP. *C. albicans* forma complejos biofilms consistentes en una capa basal de blastosporas cubierta por una matriz compuesta por material extracelular y elementos de las hifas de la levadura, que son más densos que los de otras especies menos frecuentes como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* (Kuhn y cols., 2002).

Sin embargo, *Candida* es inicialmente encontrada en la placa acumulada en las áreas protésicas que enfrentan la mucosa oral y no en los tejidos inflamados. Las PR pueden servir de hábitat para biofilms de gran densidad que mantendrían alta cantidad de bacterias y levaduras, donde esta última inicia la producción de toxinas que actúan como agentes irritantes (Bilhan y cols., 2009; Sachdeo y cols., 2008; Ramage y cols., 2004).

La adhesión de *Candida* a la PR, depende de la microporosidad de su superficie. Dichas irregularidades hacen posible que las levaduras colonicen fácilmente y dificultan su eliminación de forma mecánica, es por esto, que en presencia de una deficiente higiene oral, la levadura puede penetrar, adherirse y coagregar con diversas comunidades bacterianas, entre ellas, *Streptococcus spp* mediante interacciones químicas (Webb y cols., 1998).

A pesar de los eventos antes mencionados, una cantidad importante de sujetos sin síntomas o signos de EP presentan recuentos de *Candida*, lo que corrobora la existencia de otros factores importantes en el desarrollo de EP además de la presencia de la levadura (Bilhan y cols., 2009).

Por otra parte, dentro de los factores locales que han sido asociados a EP, se ha sugerido que, la composición alterada de la saliva y la disminución de la velocidad de flujo salival (VFS), que puede o no estar asociado con xerostomía, llevaría a alteraciones en las características de la microbiota oral normal favoreciendo el sobrecrecimiento fúngico (Altarawneh, 2011)

Saliva y Estomatitis protésica

La saliva tiene múltiples funciones, y su importancia en el mantenimiento de la salud oral se hace evidente cuando su flujo se ve disminuido. Las variaciones en la secreción salival y alteraciones en su composición, que pueden ser ocasionados por diversas condiciones y terapias farmacológicas, aumenta el riesgo de enfermedades como la caries dental, erosión dental e infecciones por *Candida* (Laurence, 2007). Además, la sensación de boca seca o xerostomía, puede tener un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes (Lynge, 2007).

Dentro de sus funciones, la saliva tiene un efecto de limpieza mecánica y presenta múltiples moléculas del sistema inmune innato, incluyendo la lisozima, histatina, lactoferrina e inmunoglobulina A (IgA), que interactúan con las diferentes especies de *Candida*. Esto, explicaría su baja adhesión y colonización en la mucosa oral en condiciones de salud oral (Pereira-Cenci y cols., 2008). La importancia de la saliva en la mantención de la salud oral queda demostrada con la alta prevalencia de candidiasis en sujetos con xerostomía e hiposalivación (Beiro y cols., 2002). Sreebny y cols. (1992), elaboraron un reporte relacionado al funcionamiento de las glándulas salivales, donde mencionan que el flujo salival no estimulado tiene un valor normal de 0,3 a 0,4 ml/min y que su disminución a valores menores a 0,15 ml/min es considerado anómalo. En relación a lo anterior, se ha descrito que la susceptibilidad a infección por *C. albicans*, podría incluso ser predicha por la VFS (Kalaskar, 2010). Además, cambios cualitativos como aumento de la concentración salival de glucosa, se relacionan con mayor número y frecuencia de *Candida* (Panizo y cols., 2001).

Así mismo, la disminución del pH salival a niveles entre 2-4 (normalmente en rango de 5,6- 7,8) se asocia a mayor incidencia de este microorganismo, el cual se ve beneficiado por su naturaleza acidófila. Específicamente, favorece la adherencia de las levaduras a las superficies acrílicas y epiteliales, estimula su proliferación y representa el pH óptimo para la actividad de las enzimas extracelulares, que constituyen uno de los factores de virulencia más importantes de estas levaduras (Beiro y cols., 2002; Webb y cols., 1998).

La asociación de los factores antes mencionados con la EP se basa en que estos causarían un aumento en el recuento de organismos comensales, especialmente de levaduras *Candida* y anaerobios Gram negativos. En particular, la aparición de signos clínicos ha sido relacionada con recuentos de levaduras mayores a 400 UFC/ml de saliva (Epstein y cols., 1980).

A pesar de su frecuencia, la etiología de la EP es poco entendida. No han sido demostradas relaciones de causa-efecto claras para la mayor parte de los factores etiológicos asociados, reforzando que la etiología de EP sería multifactorial (Webb y cols., 1998; Jeganathan y cols., 1992). Esto se ve reflejado en la amplia variedad de tratamientos descritos a la fecha, que van desde el uso de antifúngicos, antimicrobianos, antisépticos y materiales de rebasado o bien rehacer las prótesis del paciente.

Tratamiento

El manejo tradicional de la EP se basa en el control de los factores asociados al desarrollo de la patología, a modo de normalizar los tejidos alterados. El tratamiento implica la educación al paciente en términos de higiene bucal y protésica, eliminación de agentes irritantes y utilización de materiales de rebasado (Salerno y cols., 2010).

Así mismo, son parte de la terapia, el evaluar la presencia de trastornos sistémicos y otros factores locales que puedan estar agravando el cuadro clínico, e indicar antimicóticos tópicos o sistémicos, cuando las primeras medidas no resuelvan la patología. Estos pueden ser polienos (nistatina, anfotericina B) o azoles (miconazol, ketoconazol, itraconazol), presentes en el comercio como cremas, suspensión oral, gel, o comprimidos (Ministerio de Salud, 2010), sin embargo, otras formas de abarcar esta enfermedad han sido propuestas.

Es el caso de la bacterioterapia, que nace como una alternativa prometedora al momento de combatir diversas infecciones, esto, mediante el uso de bacterias inofensivas para desplazar microorganismos patógenos. El concepto de “cambio en la ecología microbiana” como un mecanismo para prevenir enfermedades dentales es fundamental, y contrarresta al concepto de “microbiota alterada” que conduce a la aparición de patologías (Kaur y cols., 2011).

Por otro lado, también se ha propuesto el uso de probióticos, definidos por The Food Agricultural Organization y World Health Organization en 2001 como “*Microorganismos vivos que, al ser administrados en las cantidades adecuadas (en la comida como un suplemento) confieren un beneficio para la salud del hospedero*” (FAO/WHO, 2001). Entre ellos encontramos bacterias como los *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Streptococcus spp.*, y también levaduras tales como *Candida pintolopesii* (Anuradha y cols., 2005).

Bacterias del género *Lactobacillus*

Las bacterias del grupo *Lactobacillus* se encuentran presentes desde temprana edad en la microbiota oral normal y pueden ser detectados en diversa cantidad en saliva, dorso lingual, membranas mucosas, paladar duro, placa dental y superficie dentaria (Badet y cols., 2008), estas bacterias esencialmente no son patógenas, a excepción de lo descrito en actividad de caries (Mailänder y cols., 2011).

Para Saotome y cols. (2006), la medición del recuento de estas bacterias en saliva de adultos mayores, podría ser útil en la determinación de salud oral, afirmación consistente con lo descrito en otras investigaciones, siendo el caso de Mailänder y cols. (2001), quienes describieron que los *Lactobacillus* podrían ser responsables de la inhibición del crecimiento de *C. albicans*, y que la presencia de ciertas cepas de *Lactobacillus*, entre ellas, *L. paracasei*, disminuiría la adhesión de la levadura a células de la mucosa oral.

En cuanto a su relación con las variaciones en el microambiente bucal, se ha demostrado que variaciones en los parámetros salivales afectan los recuentos de *Lactobacillus*. Bardow y cols. (2001), mencionan que sujetos con baja VFS ($\leq 0,15\text{ml/min}$) presentan un recuento de alrededor 20 veces más de *Lactobacillus/ml* de saliva que aquellos con flujo normal.

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados, es que en esta investigación será analizado el recuento de *Candida* y *Lactobacillus*, se identificarán las diversas especies de *Candida*, así como también se determinarán parámetros salivales (VFS y pH) y presencia de Xerostomía en sujetos portadores de PR con y sin EP (sanos). El presente estudio busca caracterizar a la población adulta mayor en tiempo cero, es decir, al inicio del proyecto al cual está adscrito, proyecto denominado “Efecto del consumo de bebidas lácteas enriquecidas con probióticos en la reducción de incidencia de candidiasis oral asociada a estomatitis protésica, en adultos mayores portadores de prótesis removibles”.

2. HIPOTESIS

La portación y recuento de levaduras del género *Candida* y bacterias del grupo *Lactobacillus*, velocidad de flujo salival, valores de pH y presencia de Xerostomía presentan diferencias entre pacientes adultos mayores portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen diferencias en la portación y recuento de *Candida* y *Lactobacillus*, parámetros salivales (pH y VFS) y presencia de xerostomía, entre adultos mayores portadores de PR, con y sin estomatitis protésica.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.1.1 Objetivo específico 1

Determinar presencia de xerostomía, parámetros salivales (pH y VFS), y microbiológicas (portación y recuento de *Candida* y *Lactobacillus*) en portadores de PR, con y sin estomatitis protésica.

3.1.2 Objetivo específico 2

Identificar a nivel de especie los distintos aislados clínicos de levaduras *Candida* obtenidas desde ambos grupos de estudio.

3.1.3 Objetivo específico 3

Comparar los resultados obtenidos en adultos mayores portadores de PR con y sin estomatitis protésica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tipo de estudio

Esta investigación corresponde a un estudio de tipo descriptivo transversal.

4.2 Población Objetivo

La población objetivo corresponde a 40 individuos residentes de una fundación de cuidados continuos de la ciudad de Santiago y 23 pertenecientes a la clínica de prótesis totales de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, reclutados por conveniencia.

4.3 Criterios de Inclusión y Exclusión

4.3.1 Criterios de Inclusión

Adultos mayores (≥ 60 años) sanos, o con enfermedades de base controladas por el médico tratante, que porten prótesis removibles tanto de bases metálicas y/o acrílicas, con y sin signos clínicos de EP y que acepten participar vía consentimiento informado (Anexo 1).

4.3.2 Criterios de Exclusión

Adultos mayores con enfermedades de base no controladas, no portadores de prótesis removibles, o que no cuenten con el permiso del médico tratante. También aquellos sujetos que requieran tratamiento odontológico urgente y los que no deseen participar en el estudio.

4.4 Técnicas de recolección de la información

4.4.1 Exámenes clínicos

A cada sujeto se le realizó una ficha clínica diseñada y validada para el estudio (Anexo 2), con el objetivo de diagnosticarlos y clasificarlos. Los exámenes clínicos se realizaron y fueron llevados a cabo por dos equipos de odontólogos docente-clínicos, de las áreas de Rehabilitación Oral y Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, con experiencia, capacitados y calibrados en diagnosticar lesiones de mucosa oral y determinar tipo de EP asociado al uso de prótesis parcial removible. Para medir concordancia entre los examinadores se realizó una calibración de acuerdo a los criterios de la OMS para el diagnóstico de lesiones de la mucosa oral, aceptándose al inicio de los exámenes, al menos un índice de Kappa de 0,7.

Los exámenes fueron realizados utilizando un espejo dental y luz artificial tipo LED. Las lesiones compatibles con diagnóstico clínico de EP se registraron siguiendo los criterios clínicos desarrollados, establecidos y validados en las áreas docente asistenciales involucradas en este estudio, dependientes de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Los casos que requerían recambio de aparatos, fueron invitados a ser atendidos en nuestra facultad en el inicio del curso de prótesis totales una vez terminado el estudio.

4.4.2 Evaluación de Xerostomía

Para evaluar la sensación de boca seca, se aplicó el test validado de Fox (Fox, 1987), el cual consta de 5 preguntas incluidas en la ficha clínica, que fueron realizadas por el examinador (Anexo 2).

4.4.3 Métodos microbiológicos

4.4.3.1 Toma de muestra

El día de la toma de muestras, el sujeto debió estar en ayunas mínimo 2h, no fumar, ni realizar procedimientos de higiene oral previo a la toma de muestra. Se corroboró que no hubiese estado bajo tratamiento antibiótico, antifúngico o esteroideal por cualquier vía de administración de acuerdo a las indicaciones que fueron entregadas oportunamente por escrito. Se solicitó además la suspensión del uso de colutorios orales 15 días antes de la recolección.

4.4.3.2 Saliva no estimulada

A cada individuo se le solicitó asumir la posición de cochero descrita por Shultz y utilizada por Navazesh y depositar saliva durante 5 minutos en un tubo plástico estéril previamente pesado y rotulado, el cual fue sellado para su traslado. Las muestras obtenidas fueron llevadas en medio refrigerado (4°C) al Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, para ser procesadas en menos de 4 horas.

4.5 Procesamiento de las muestras

4.5.1 Determinación VFS no estimulado

Mediante el protocolo descrito por Heintze (1983), el tubo con la muestra fue pesado por gravimetría asignando un peso específico de 1,005 g/ml al fluido y el volumen total fue determinado. El resultado fue expresado en ml/min.

4.5.2 Medición del pH salival

Se determinó el pH salival de las muestras de cada individuo contenida en el mismo tubo en que se midió VFS. Se utilizó un pH-metro digital (Modelo PL-600 EZDO-OMEGA). Todas las mediciones se realizaron con la misma metodología: a) calibración del pH-metro; b) inmersión del electrodo en el tubo colector de saliva; c) lectura del valor del pH de la muestra 5 segundos d) lavado del electrodo con agua destilada, y e) conservación del electrodo en una solución tampón.

4.5.3 Recuento y aislamiento de levaduras del género *Candida*

Se realizó el método de recuento viable en medio selectivo sólido (placa agar). Para ello cada muestra de saliva fue agitada en un Vortex (Thermolyne Maxi Mix II) durante 30 seg., con el fin de homogenizar la muestra para luego realizar una dilución de 1/10 v/v en buffer salino fosfato (1x PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4 estéril. Posteriormente, fueron sembrados 100 μl de la muestra de saliva directa (sin diluir) y 100 μl de la dilución, por duplicado, en agar Sabouraud suplementados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. Las placas se incubaron en estufa a 30°C durante 48 h en condiciones de aerobiosis (Fig. 3). Una vez finalizado el tiempo de incubación, se procedió a contabilizar las colonias crecidas que resultaron compatibles con levaduras del género *Candida*. Se promediaron los recuentos de las diluciones, cuyo resultado se multiplicó por el factor de dilución y por el volumen de la muestra, obteniendo de esta forma las unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml).

4.5.4 Identificación de especies de *Candida* mediante medio de cultivo cromogénico, test bioquímico y/o PCR.

A cada aislado obtenido en agar Sabouraud se les realizó las siguientes pruebas de laboratorio:

a) Identificación presuntiva de especies *C. albicans*/*C. dubliniensis* y *Candida no-albicans* mediante medio cromogénico CHROMagar *Candida* (Paris, France), el cual permite diferenciar algunas especies de *Candida* de acuerdo al color de las colonias producido por reacciones enzimáticas especie-específicas ante un sustrato cromógeno contenido en el medio (Linares y cols, 2001). Por lo tanto, una vez obtenidas colonias en la placa de agar Sabouraud, éstas se sembraron en el medio cromogénico. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48h en aerobiosis (Fig. 4). Las levaduras fueron identificadas presuntivamente, de acuerdo al color, según las instrucciones del fabricante.

Para todos aquellos aislados de levaduras que se sembraron en este medio, y que sus colonias presentaron color verde claro o verde oscuro (que corresponderían a *C. albicans* y *C. dubliniensis*, respectivamente), se les realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para corroborar y discriminar entre ellas. Para obtener el DNA templado, se aplicó el método del uso de papel filtro y lavado con NaOH descrito por Lefimil y cols. (2013).

b) Identificación de *C. albicans*/*C. dubliniensis* por PCR: En esta reacción se amplificó el gen que codifica para la proteína 1 hifal de pared (HWP1) presente en ambas especies. La diferencia es el tamaño del amplificado, siendo éste de 1.180 pb para *C. albicans* y 930 pb para *C. dubliniensis* (Romeo y cols, 2006). Los partidores que se utilizaron fueron: Wall F: 5´- GTTTTTGCAACTTCTCTTTGTA- 3´ y Wall R: 5´- ACAGTTGTATCATGTTTCAGT - 3´.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla de reacción de PCR, en un volumen final de 25 μ l, incluyó: 2 U de *Taq* polimerasa (Biolase), ADN molde (obtenido como ya se mencionó anteriormente), 1 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ l de cada uno de los partidores a una concentración de 25 μ M, 0,5 μ l dNTP's 10 mM, 2,5 μ l de tampón de PCR 10X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM) y agua estéril. La amplificación del ADN correspondiente se realizó en un termociclador DNA Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineación de los partidores a 50 °C por 60 s y elongación a 72 °C por 45 s. Finalmente, las reacciones se dejaron para una extensión final a 72 °C por 10 min y luego se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis.

Electroforesis de ADN

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Para su visualización, los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 μ g/ml. Los geles se prepararon en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM pH 8,0) con una concentración de agarosa al 1%. Como estándar de peso molecular se utilizó 100 bp plus ADN Ladder (Thermo Scientific). El ADN se visualizó con luz U.V. en un transiluminador y la fotografía se obtuvo a través de un sistema de captura de imagen (Carestream).

Criopreservación de los aislados: Las colonias de *Candida* obtenidas de las placas de medio CHROMagar *Candida* que no presentaran color verde claro o verde oscuro, se cultivaron e incubaron en 3 ml de medio Sabouraud-dextrosa a 30°C durante 24h en condiciones de aerobiosis. Luego se envasaron en viales con glicerol estéril a una concentración final de 20%. Los viales se almacenaron a -80°C hasta realizar la identificación de especie por medio de test bioquímicos.

c) Test bioquímico: Se aplicó para identificar aquellas levaduras del género *Candida* que no presentaron color verde. Para este análisis se utilizó el sistema bioquímico estándar API ID32C levaduras (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Las muestras se procesaron según las instrucciones del proveedor.

4.5.5 Recuento de bacterias del género *Lactobacillus*

Alícuotas de saliva total fueron homogeneizadas y posteriormente diluidas a 1/1000 y 1/10000 \forall_v en tampón PBS 1x. Para la obtención de bacterias del género *Lactobacillus*, 100 μ l de las diluciones se sembraron, por duplicado, en medio MRS agar para realizar el recuento de *Lactobacillus* totales.

Las placas fueron incubadas durante 24h a 37°C y a una atmósfera de 5% CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las colonias presentes en las distintas placas fueron fenotípicamente identificadas, cuantificadas y expresadas como UFC/ml.

4.6 Plan de análisis de datos

Los datos obtenidos fueron tabulados en una planilla Excel 2010® y procesados con el *software* estadístico Stata® versión 12. Las variables fueron comparadas con las categorías “paciente con EP y sin EP” (Tabla 3), estas variables son:

- 1) Características salivales: se reconocieron Xerostomía, pH y VFS
- 2) Recuento de *Candida* y *Lactobacillus*: se reconocieron recuento de *Lactobacillus* y, portación, recuento e identificación de *Candida*.

Posteriormente, fueron analizadas dependiendo de su tipo de distribución, para lo cual fue aplicado el test Shapiro Wilk. Si la distribución es normal, para las variables pH, VFS, Xerostomía, recuento de *Candida* y *Lactobacillus*, se compararon con T- test en ambos grupos de estudio. Por otro lado, si la distribución no fue normal, se aplicó el test de Wilcoxon. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ al aplicar los test estadísticos.

Tabla 3: Test estadísticos y clasificación de variables utilizadas en este estudio.

Variable (s)	Tipo/ Distribución	Test estadístico
VFS	Continua/ no normal	Wilcoxon
pH	Continua/ normal	T-test
Recuento de <i>Candida</i>	Continua/ no normal	Wilcoxon
Recuento de <i>Lactobacillus</i>	Continua/ no normal	Wilcoxon
Xerostomía	Nominal, dicotómica	χ^2
VFS/ recuento de <i>Candida</i>	-	Coefficiente de correlación lineal de Pearson
pH/ recuento de <i>Candida</i>	-	Coefficiente de correlación lineal de Pearson
Xerostomía/ VFS	-	Coefficiente de correlación lineal de Pearson

5. RESULTADOS

Esta investigación comprendió 63 sujetos portadores de prótesis removible, 40 de ellos con EP (63,5%) y 23 sin EP (36,5%) provenientes de una institución de cuidados continuos y de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

En cuanto a las características salivales en estudio, tras el pesaje de las muestras obtenidas, el análisis de la variable VFS indica que los individuos con EP presentan una mediana menor que el grupo sin EP, sin embargo, no existe diferencia estadística (tabla 4).

Tabla 4: Rango y mediana de VFS de sujetos portadores de PR con y sin estomatitis protésica.

		Con EP	Sin EP
	<i>n</i>	40	23
VFS (ml/min)	Rango	0,043 – 1,227	0,117 – 1,224
	Med.	0,408	0,468
<i>p</i> = 0,2			

Med: mediana; n: número de sujetos.

Con respecto al análisis de la prevalencia de Xerostomía en los grupos de estudio, se observó que no hubo diferencia significativa en la comparación de la frecuencia de sensación de boca seca en los individuos analizados. Solo un 14,3% fue positivo para el test de Fox. Así mismo, al correlacionar VFS con Xerostomía no se detectó asociación estadística en ninguno de los grupos (Tabla 5).

Por otra parte, al realizar la lectura de las muestras con el pH-metro digital, se determinó que los sujetos que presentan EP poseen un pH más ácido que los sin EP, con diferencia estadística entre los grupos ($p=0,0$) (Tabla 6).

Tabla 5: Frecuencia de Xerostomía en pacientes portadores de PR con y sin EP y correlación Xerostomía-VFS en ambos grupos.

	Con EP	Sin EP
Test Fox (+)	8 (20,5%)	1 (4,3%)
	$p= 0,08$	
Xeros. vs VFS	R= -0,048 $p=0,7$	R= -0,93 $p= 0,6$

(+): Sujetos positivos para el test de Fox; Xeros.: Xerostomía; VFS: velocidad de flujo salival; n: N° de sujetos

Tabla 6: Rango y promedio de pH salival de sujetos portadores de PR con y sin EP.

	Con EP	Sin EP
	<i>n</i> 40	23
pH	Rango	5,75 - 8,72
	Prom.	7,29
	Dev. Std.	0,67 $p= 0,0$

Prom: promedio; Dev. Std.: desviación estándar

Una vez realizado el análisis microbiológico de las muestras salivales provenientes de 40 sujetos con estomatitis protésica, fue detectada la presencia de levaduras del género *Candida* en un 97,5% (n= 39), mientras que en el grupo sin la patología (23 sujetos) fue detectado un 47% (n= 11) de portadores de este microorganismo (Gráfico1, Fig. 3).

En cuanto a la mediana del recuento de levaduras *Candida* detectadas en las placas analizadas, los sujetos portadores de prótesis removibles con EP presentaron mayor cantidad de UFC/ml de saliva que su contraparte sin EP, con diferencia estadística ($p=0,0$) (Gráfico 2).

Figura 3: Placas de agar Sabouraud tras 48h de incubación de siembra de muestra salival.

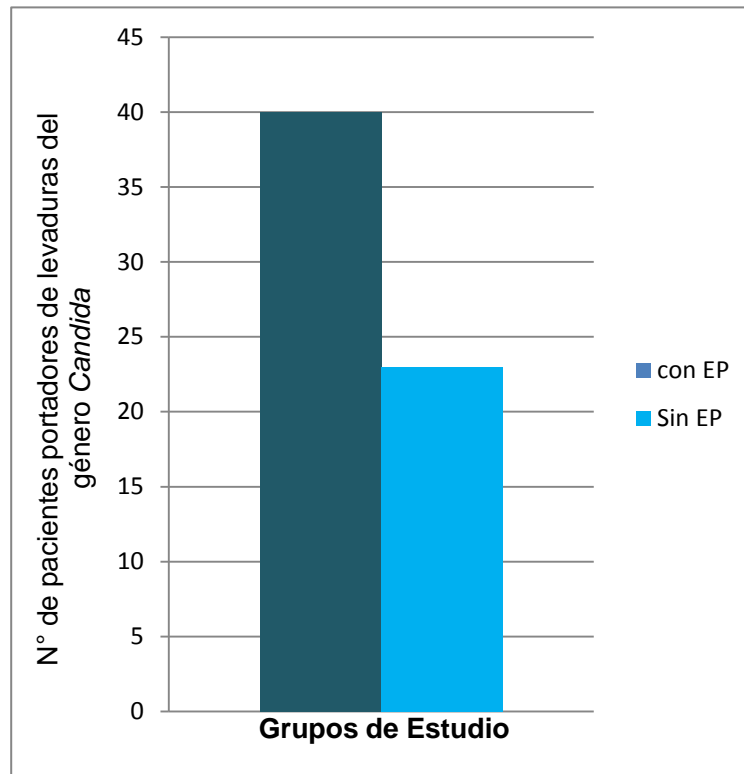
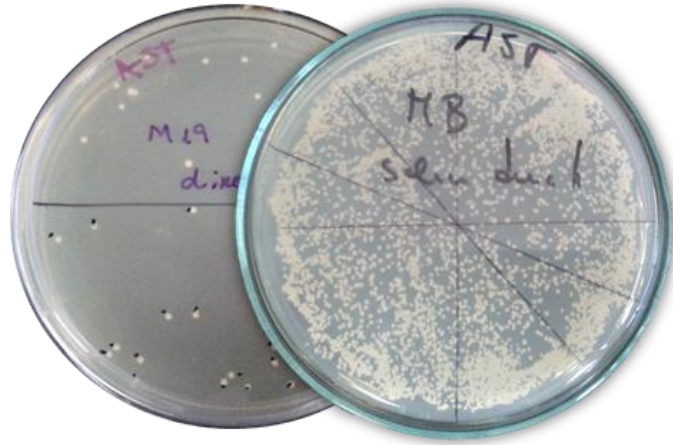


Gráfico 1: Distribución de la portación de levaduras del género *Candida* en sujetos portadores de prótesis removible con y sin EP.

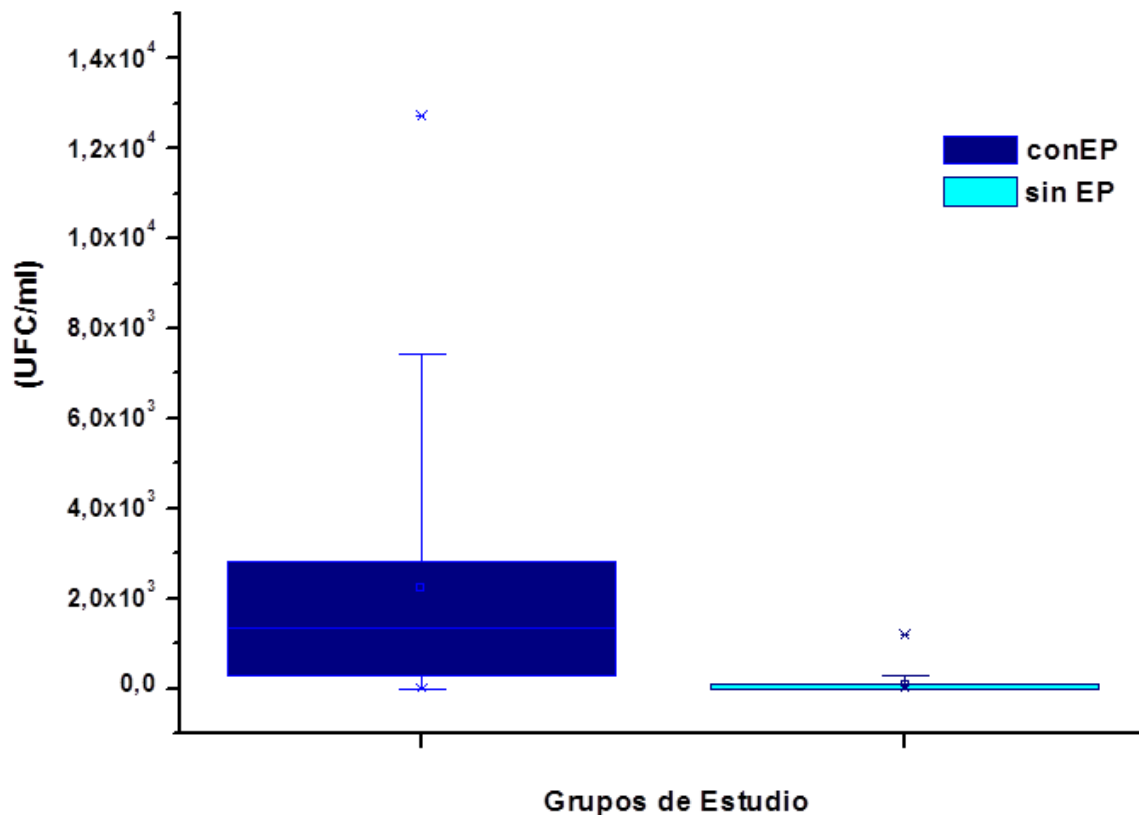


Gráfico 2: Recuento de levaduras *Candida* en ambos grupos.

Por otra parte, los resultados de la identificación de especies de *Candida* mediante medio de cultivo cromogénico (Fig.4) y posterior corroboración mediante test bioquímico y/o PCR, indican la presencia de 4 especies distintas de este género, siendo además detectada la presencia de levaduras del género *Saccharomyces*, específicamente *S. cerevisiae* y *S. kluyverii*. La figura 5 muestra una de las imágenes obtenidas de la visualización de PCR. La distribución de las especies identificadas presentes en ambos grupos de estudio, se observa en la tabla 7 y el gráfico 3 representa la diversidad de las levaduras presentes en la muestra total analizada. Cabe destacar que fue mayor la diversidad de levaduras presentes en el grupo con EP, así como también las especies de *Candida* identificadas, comparado con el grupo sin EP.

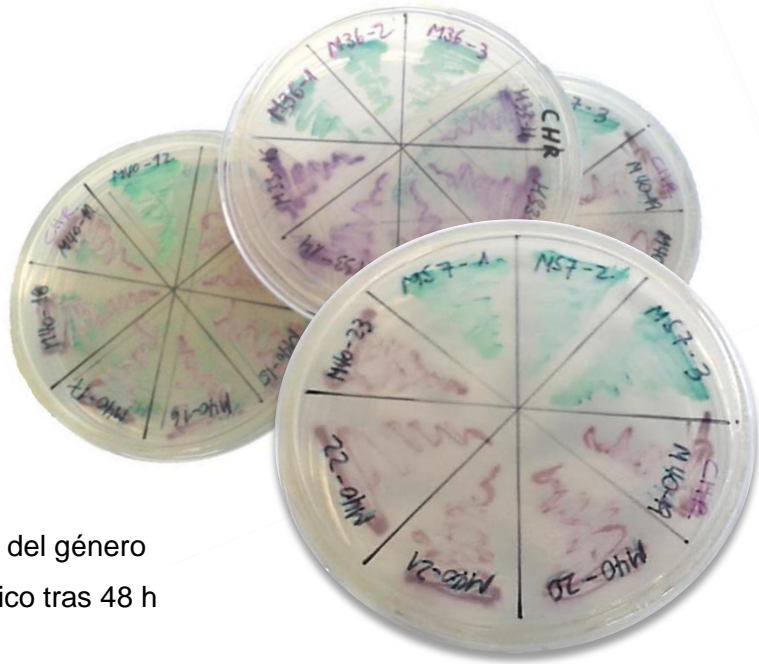


Figura 4: Cultivo de colonias del género *Candida* en medio cromogénico tras 48 h de incubación.

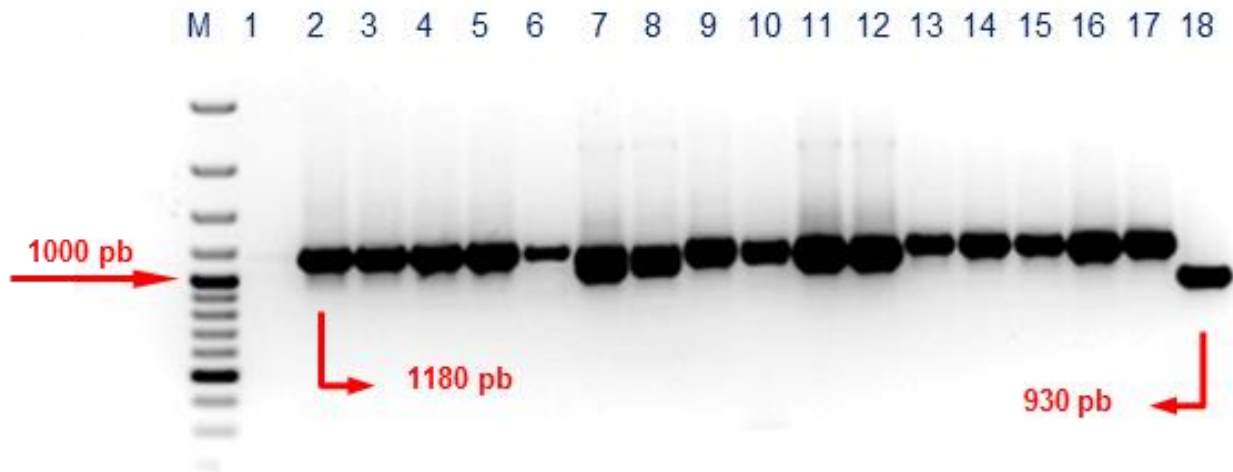


Figura 5: Identificación de levaduras *C. albicans* y *C. dublinensis* mediante técnica de PCR. Se distinguen el tamaño de los amplificadores de *C. albicans* (1.180 pb) y *C. dublinensis* (930 pb). Carril M: marcador de peso molecular (100 pb); carril 1: control negativo; carriles 2-17: *C. albicans*; carril 18: Control positivo (*C. dublinensis*).

Tabla 7: Identificación de levaduras mediante PCR y/o test bioquímico en ambos grupos de estudio.

Especie de levadura	Con EP <i>n</i> = 108	Sin EP <i>n</i> = 28
<i>C. albicans</i>	101 (93,5%)	23 (82,1%)
<i>C. dublinensis</i>	2 (1,8%)	1 (3,5%)
<i>C. tropicalis</i>	1 (0,9%)	-
<i>C. lusitaneae</i>	2 (1,8%)	3 (10,7%)
<i>S. cerevisiae</i>	1 (0,9%)	1 (3,5%)
<i>S. kluyverii</i>	1 (0,9%)	-

n: número de colonias analizadas

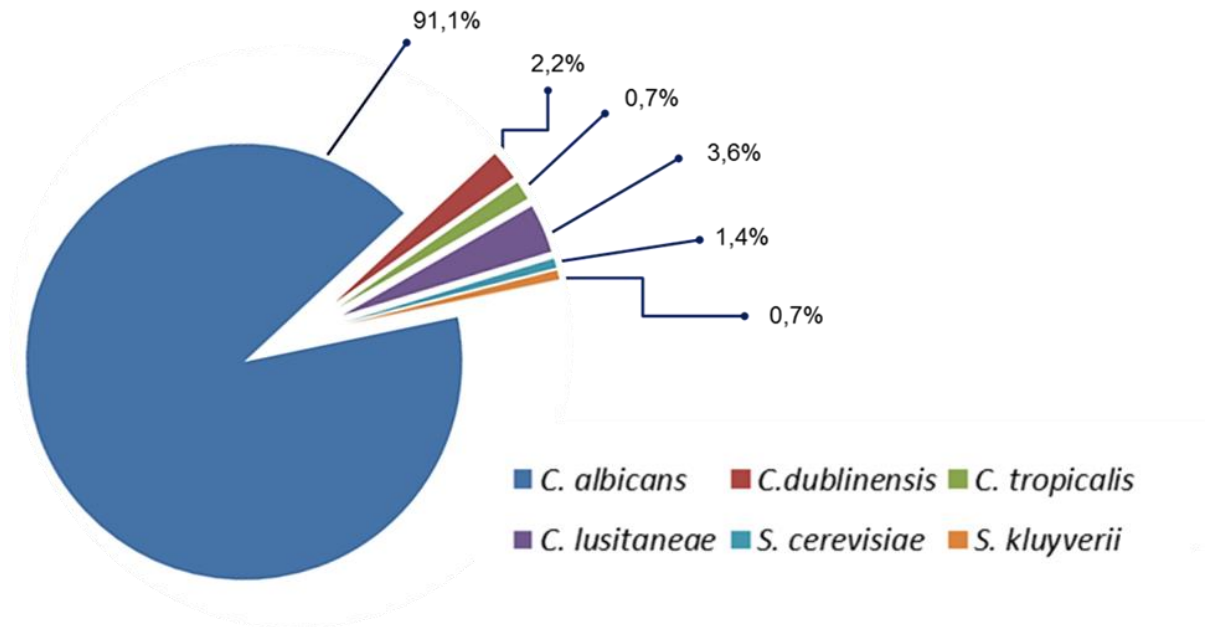


Gráfico 3: Distribución de las diversas especies de levaduras identificadas mediante técnicas bioquímicas y moleculares en el total de sujetos.

En relación a la evaluación de los recuentos del género bacteriano *Lactobacillus*, estos indican que las muestras provenientes del grupo sin EP presentan mayor cantidad de este género comparado con las muestras analizadas del grupo con EP, con diferencia estadística. ($p=0,02$) (Gráfico 4).

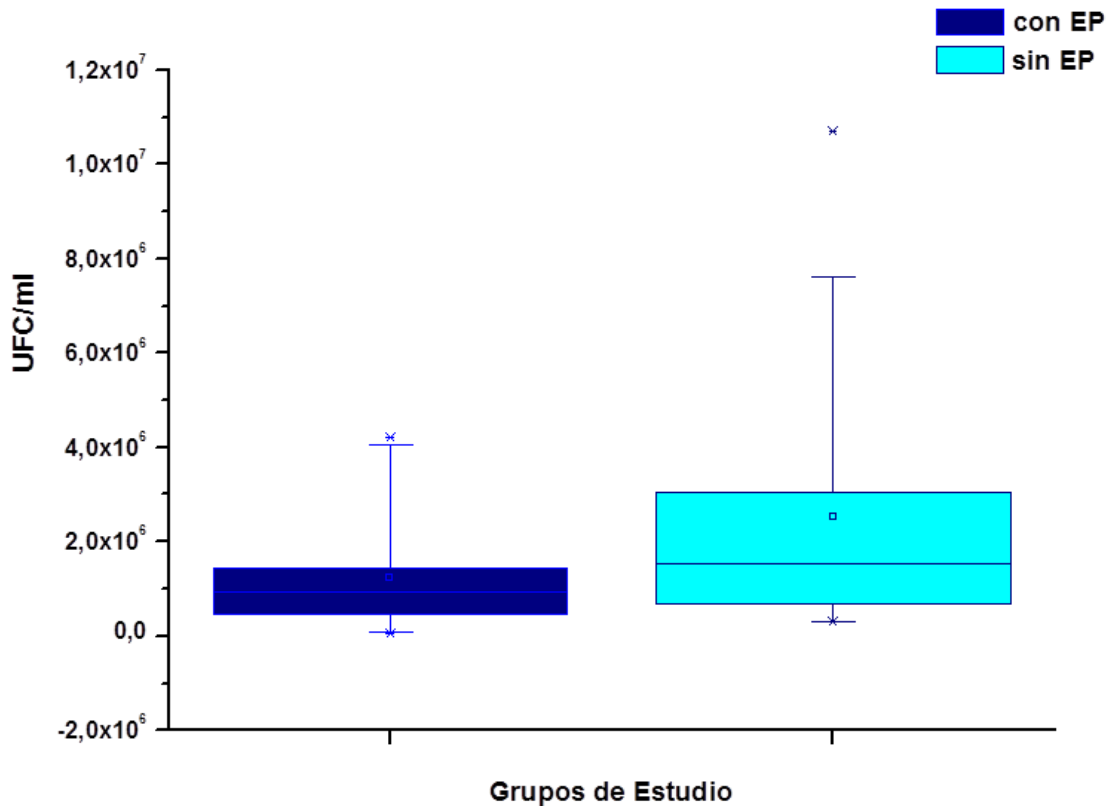


Gráfico 4: Recuento de bacterias del género *Lactobacillus* en ambos grupos.

Con respecto a la comparación de las variables microbiológicas y salivales, los resultados de la asociación entre velocidad de flujo salival y recuento de *Candida* en los individuos con EP no muestra diferencia estadística, al igual que los sujetos sin EP, sin embargo, se observó la presencia de una correlación negativa débil entre las variables en ambos grupos ($R= -0,26$ / $p= 0,1$; $R= - 0,2$ / $p= 0,2$, respectivamente) (Gráfico 5 y 6).

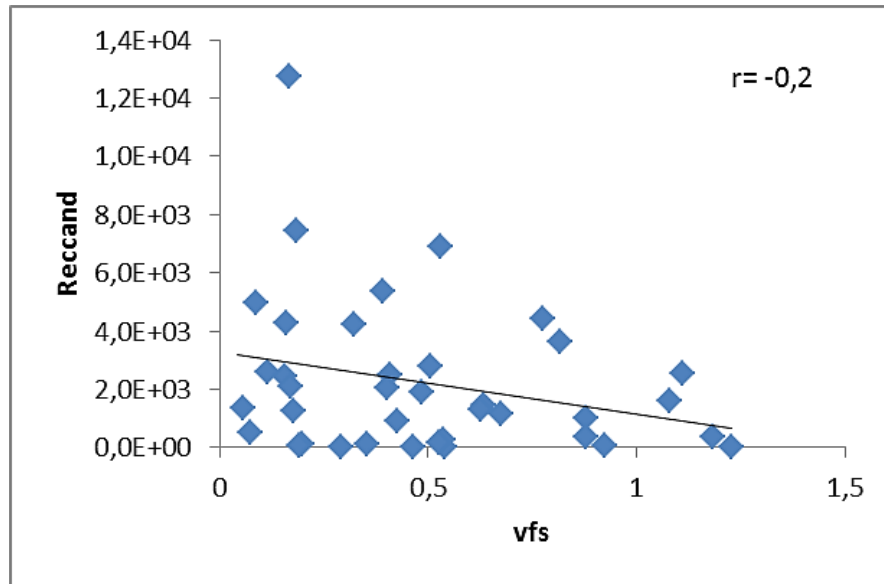


Gráfico 6: Correlación de VFS (ml/min) y recuento de *Candida* (UFC/ml) en sujetos con estomatitis protésica.

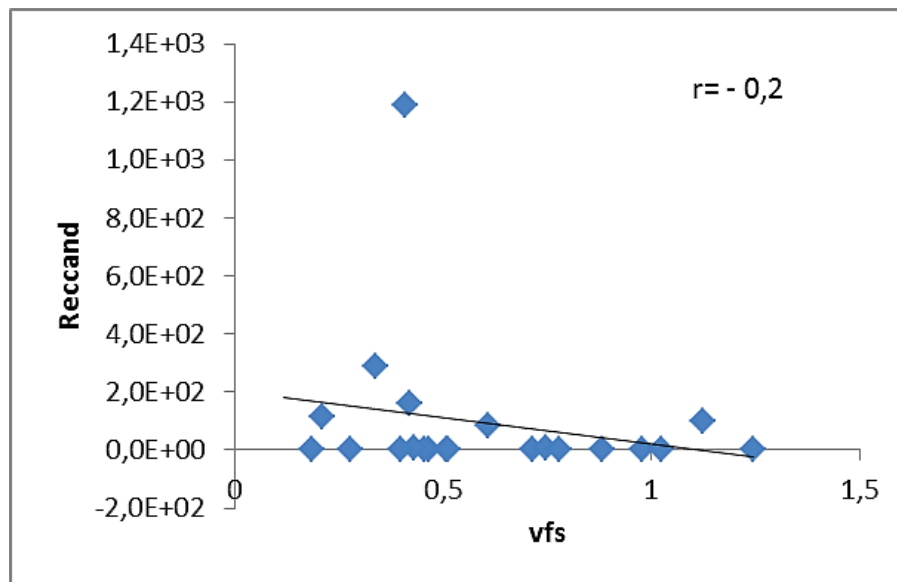


Gráfico 5: Correlación de VFS (ml /min) y recuento de *Candida* (UFC/ml) en sujetos sin estomatitis protésica.

Por otra parte, al asociar la variable pH a los recuentos obtenidos para las levaduras del género *Candida*, tanto en el grupo con la patología como en el grupo sano, fue obtenido un resultado similar al caso de VFS, en que se observa una correlación negativa sin diferencia estadística (Gráfico 7 y 8).

En el caso de las bacterias del género *Lactobacillus*, al realizar la correlación con el pH salival en ambos grupos de estudio, fue encontrado el mismo fenómeno descrito anteriormente, es decir, una asociación negativa débil, sin diferencia estadística, tal como muestran los antecedentes expuestos en la tabla 8.

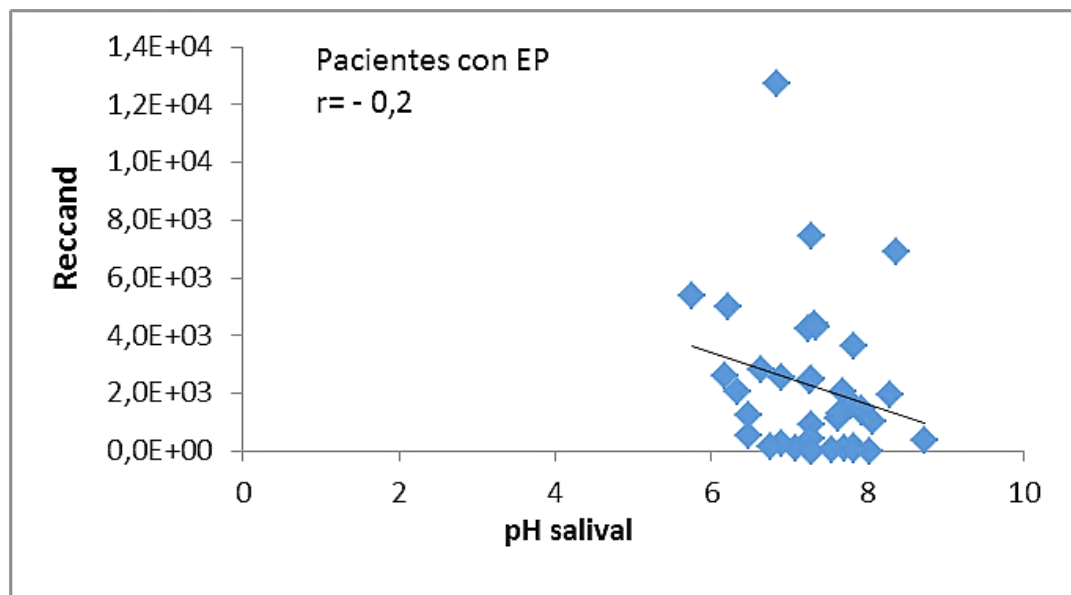


Gráfico 7: Correlación de pH y recuento de *Candida* (UFC/ml) en sujetos con estomatitis protésica.

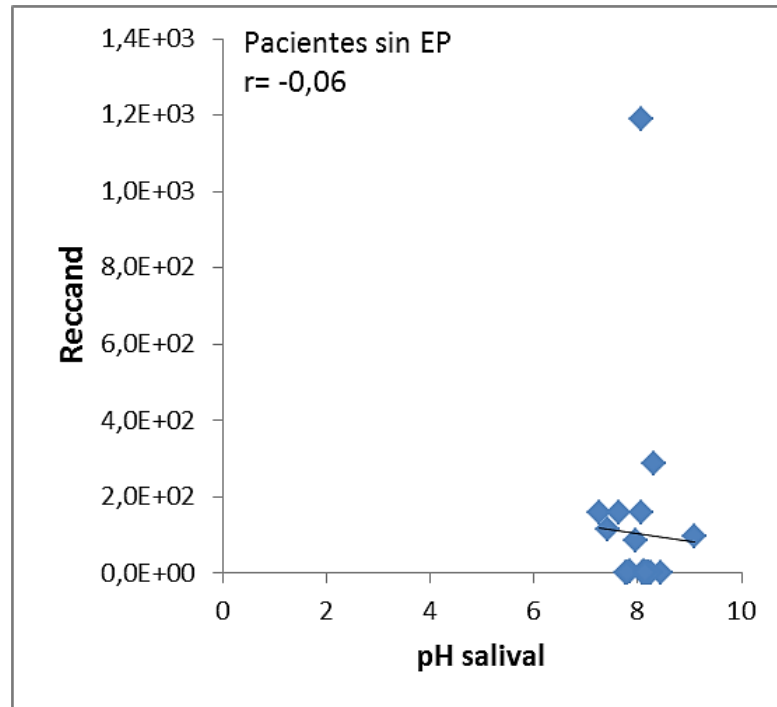


Gráfico 8: Correlación de pH y recuento de *Candida* (UFC/ml) en sujetos sin estomatitis protésica.

Tabla 8: Correlación de recuentos de *Lactobacillus* y pH en sujetos con y sin EP.

Variable		Con EP	Sin EP
<i>Lactobacillus</i> (UFC/ml)	Rango recuento	4,55E+04 - 4,22E+06	3,04E+05 -1,07E+07
	Prom.	1,23E+06	2,44E+06
pH	Rango de pH	5,75 - 8,72	7,25 – 9,09
	Prom.	7,29	8,019
	<i>R</i>	-0,1	-0,09
	<i>p</i>	0,5	0,6

6. DISCUSIÓN

Hoy en día, si bien el acceso a cuidados en el área dental en nuestro país ha mejorado, y las personas mantienen su dentición natural por más tiempo, la prevalencia de edentulismo sigue siendo significativa. La necesidad del uso de prótesis por largos periodos se mantendrá en el futuro, teniendo como consecuencia la persistencia de una población de riesgo de padecer estomatitis protésica.

Ante esta situación es entonces que debemos preocuparnos de cómo podemos lograr que la mayor longevidad alcanzada por los habitantes del país, se desarrolle en las mejores condiciones de salud y calidad de vida posibles, permitiendo a los adultos mayores continuar siendo independientes. En este contexto, es fundamental conocer los posibles factores involucrados en el desarrollo de esta patología y que afectan particularmente a la población chilena, obteniendo así información valiosa para el enfoque de las terapias en este grupo etario.

Durante el desarrollo de este estudio fueron reclutados 63 adultos mayores por conveniencia, en particular, de los individuos examinados, un 100% de los sujetos portadores de PR pertenecientes a la institución de cuidados continuos, presentaron estomatitis protésica, de modo tal que fue necesario buscar individuos sin esta patología en otra institución, en este caso los sujetos atendidos en la clínica de Odontología de la Universidad de Chile.

Este hallazgo supera lo descrito por otros autores, es el caso del estudio de Espinoza y cols (2003), que tras realizar la evaluación de más de ochocientos individuos habitantes de la región metropolitana, detectaron que un 53% presentaba lesiones de la mucosa oral, siendo estomatitis protésica la más prevalente de ellas, representando el 22,3% de las lesiones. En dicho estudio, se describió la falta de higiene protésica, uso nocturno, antigüedad protésica y presencia de enfermedades crónicas como algunos de los factores de riesgo de desarrollo de esta enfermedad, los cuales se encuentran presentes en gran parte de los sujetos evaluados en esta investigación.

Otro de los factores que han sido asociados al desarrollo de esta enfermedad, es la presencia de levaduras del género *Candida*. Se ha descrito que este microorganismo comensal, se encuentra en un 30-60% de la población sana, concordando con el porcentaje encontrado para los individuos del grupo sin EP (47%).

Por otra parte, existe vasta evidencia que indica la capacidad de esta levadura de adherirse a superficies no solo mucosas, sino que también a materiales acrílicos, siendo este paso uno de los primeros en el desarrollo de la infección (Ramage, 2004). Esto determina que el uso protésico sea otra de las razones de la mayor preponderancia de padecer EP, teniendo como principal justificación que en aquellos individuos no portadores de PR, los microorganismos son en su mayoría removidos de la cavidad oral cuando la saliva o comida es deglutida (Pereira-Cenci, 2008). Sin embargo, y a pesar que esta investigación reclutó únicamente sujetos portadores de PR, no todos los sujetos que resultaron presentar *Candida* en las muestras salivales, mostraron signos clínicos de EP, reforzando el carácter multifactorial descrito por diversos autores respecto de la patogénesis de esta enfermedad (Beiro, 2002; Gendreau, 2011; Krishnan, 2012).

Con respecto a lo anterior, del total de sujetos, un 71,4% son portadores de *Candida* (n= 45), distinguiéndose un 97,5% para el grupo con EP (n=39) y un 47% para el grupo sin EP (n=11) como fue mencionado anteriormente. Estos datos concuerdan con la información existente actualizada e incluso supera lo descrito por otros investigadores, los cuales observaron una prevalencia del 53% de infección por *Candida* en sujetos con EP y de un 38,9% de los sujetos sanos (Mravak-Stipetic, 2000).

Por otro lado, en relación a los recuentos de levaduras *Candida*, del total de los sujetos que resultaron ser portadores, solo un 47,6% supera las 400 UFC/ml (67,5% con EP y 13% sin EP), cifra que ha sido asociada a la aparición de signos clínicos de EP (Epstein, 1980).

Los resultados del presente estudio además indican que los recuentos de *Candida* son mayores en los sujetos con EP en comparación a sin EP, concordando con los hallazgos de otros autores (Bilhan, 2009; Lee, 2013; Marinovski, 2014).

En relación a la identificación de especies, *C. albicans* presentó una prevalencia de un 91% en el total de sujetos analizados, mientras que las especies CNA (*C. tropicalis*, *C. dublinensis*, *C. lusitanae*) fueron solo un 9%. *C. albicans* ha sido descrita como la especie más comúnmente asociada a lesiones de la mucosa oral (Meurman, 2007), sin embargo, recientemente las especies CNA también han sido aisladas con una alta frecuencia en tejidos afectados por estomatitis protésica, siendo el aumento del uso de antifúngicos a nivel mundial una de las posibles causas de esta situación (Pereira-Cenci, 2008). Es más, levaduras no pertenecientes al género *Candida* tales como *Rhodotorula glutinis* y *Saccharomyces cerevisiae* han sido aisladas en ocasiones desde la cavidad oral, pero no se caracterizan por producir infecciones bucales (Meurman JH., 2007), este es el caso de 2 de las especies identificadas en los sujetos participantes de esta investigación (*S. cerevisiae* y *S. Kluyverii*).

Las especies CNA son conocidas por causar candidiasis de menor virulencia, lo que se explica por el hecho que carecen total o parcialmente de ciertos factores de virulencia que *C. albicans* si posee, entre ellos la capacidad de formar hifas, cambiar fenotípicamente, producción de proteasas extracelulares, así como menor capacidad de adherencia al epitelio bucal (Moran y cols., 2002).

Otra de las aristas abarcadas en esta investigación fueron los parámetros salivales. El pH, VFS, xerostomía y su relación con EP han sido foco de múltiples estudios, los cuales en su mayoría describen diversos resultados, no obstante, es de acuerdo común que la saliva juega un rol fundamental en la mantención de la salud bucal.

Se ha descrito que moléculas del sistema inmune presentes en saliva, interactuarían con las diferentes especies de *Candida*, impidiendo parcialmente su adhesión y colonización en la mucosa oral (Pereira-Cenci, 2008), por tanto un flujo salival disminuido se relacionaría con recuentos aumentados de la levadura.

Los resultados para la población en estudio muestran un promedio de VFS de 0,408 ml/min para el grupo con EP y de 0,468 ml/min para el grupo sin EP. Del primer grupo, solo 5 sujetos presentaron VFS bajo lo normal, mientras que en el segundo no existieron casos. Si bien existe una diferencia numérica, no hay diferencias estadísticas observables, concordando con Mravak y cols. (2010) quienes tras analizar 70 sujetos, tanto sanos como con EP, un 53,1% presentó salivación normal y solo un 5,7% presentó hiposalivación. De los que presentaron esta última condición, el mayor porcentaje correspondía al grupo control y por otro lado, no hubo diferencias estadísticas para las variaciones de flujo salival entre los grupos.

Budtz y cols. (2000) mencionan que la VFS en reposo es significativamente menor en sujetos mayores que en aquellos más jóvenes, lo que puede representar una condición predisponente importante para la colonización de levaduras y posteriormente EP. Junto con esto, la retención de glucosa en la cavidad oral se ve aumentada cuando el flujo salival disminuye, y por tanto aumentan las posibilidades de adherencia y colonización de la levadura a la superficie protésica que enfrenta a la mucosa oral. Nuestros análisis respecto de la asociación entre VFS y recuento de *Candida* en ambos grupos no presentaron diferencias estadísticas, sin embargo, se observó una asociación negativa débil, indicando que los recuentos de este microorganismo tienden a aumentar en la medida que el flujo salival disminuye. En ese aspecto, es probable que el uso protésico nocturno esté influyendo en los resultados.

Otro de los parámetros salivales analizados en esta investigación fue la medición de pH. Para esta variable, nuestros resultados indican que los individuos con EP presentaron un pH promedio más ácido que el grupo sano. Este resultado se asemeja a lo obtenido por Marinoski y cols. (2014), aunque no del todo comparable, ya que estos autores analizaron muestras provenientes de mucosa palatal y dorso lingual de 30 sujetos, obteniendo un pH disminuido ($\text{pH} < 6,5$) en un 66% de los pacientes con EP y en un 33% de los pacientes sanos, con diferencias estadísticas para los sitios mencionados.

Según dicho antecedente, se especula que la disminución de los valores de pH podría contribuir a la aparición y desarrollo de la inflamación clínicamente visible producto del sobrecrecimiento de *Candida*.

El pH ha sido descrito como otro de los mecanismos de patogénesis que explican el uso de PR como factor predisponente de EP. El uso continuo de PR determinaría una disminución del pH de la mucosa palatal en relación a la base protésica, esta acidificación del microambiente puede favorecer la colonización por *Candida* (Salerno, 2010). El análisis de asociación para las variables pH y recuento de *Candida* en esta investigación, presentó una asociación débil y negativa, existiendo una tendencia que indica que niveles de pH bajo lo normal se relacionarían con recuentos aumentados de este tipo de levaduras, concordando con lo descrito en la literatura.

Con respecto a la variable Xerostomía, un 20% de los sujetos que presentaron la enfermedad fueron positivos para el test de Fox, mientras que solo un 4,3% para el grupo sano. Nuestros resultados indican que la sensación de boca seca no sería un factor importante en el desarrollo de estomatitis protésica, ya que no se detectó diferencia estadística entre los grupos, así como tampoco se encontraron asociaciones a las variables microbiológicas en estudio. La literatura no es del todo concluyente en relación a este tópico, el uso no indistinto de los términos xerostomía e hiposalivación en la realización de las investigaciones, es una de las posibles razones. Aun así, existen autores que lo mencionan como una “queja” común, demostrando que la sensación de boca seca sería un predictor importante de deterioro de las glándulas salivales e inflamación de la mucosa oral (Mravak-Stipetic, 2000; Gallardo, 2008).

Para poder dilucidar la real importancia de las características salivales y su relación con EP, es necesaria la incorporación de un mayor número de sujetos en futuras investigaciones, además de homogeneizar la muestra en términos de salud general así como características demográficas.

En otro ámbito, en lo que respecta a los resultados de los análisis microbiológicos de las bacterias del género *Lactobacillus*, estos indican la presencia de un recuento significativamente superior en los sujetos pertenecientes al grupo sano al ser comparados con el grupo con EP. Sin embargo, al asociar estos hallazgos con el pH y VFS obtenido en ambos grupos, no fue encontrada una correlación estadística. Dicho resultado difiere de lo descrito por Bardow y cols (2001), quienes hallaron que sujetos cuya VFS resultó ser inferior a lo normal, presentaban recuentos de *Lactobacillus* alrededor de 20 veces mayores por ml de muestra salival en comparación a aquellos con flujo salival normal.

Solo pocos estudios se encuentran disponibles con respecto a *Lactobacillus* y su relación con estomatitis protésica. La mayor parte de las investigaciones que se refieren a este género bacteriano, se enmarcan en el uso de estos microorganismos como cepa probiótica en el tratamiento de enfermedades orales tales como la periodontitis, caries dental y halitosis (Mailänder, 2011; Meurman, 2005). Es por esto que las posibles interacciones con levaduras del género *Candida* y otros factores asociados al desarrollo de EP no son del todo conocidas. Ha sido descrito el efecto de estas cepas bacterianas al ser administradas en alimentos probióticos, mas no en el desarrollo del cuadro clínico de EP propiamente tal (Hatakka, 2007; Wagner, 2000), por lo que resultaría interesante profundizar más sobre la existencia o no de un rol de este tipo de bacterias en la patogénesis o resolución de la enfermedad.

En este aspecto, si bien los resultados obtenidos en esta investigación son preliminares, representan información novedosa en esta área, y su estudio más acabado durante el desarrollo del proyecto determinará un avance en el conocimiento de los factores que se relacionan con estomatitis protésica.

7. CONCLUSIONES

- Se observó una alta frecuencia de estomatitis protésica en pacientes portadores de prótesis removibles que presentan recuentos elevados de levaduras del género *Candida*.
- Las características salivales carecen de un rol importante en la variación de los recuentos salivales de *Candida* y *Lactobacillus*.
- La presencia de recuentos salivales de *C. albicans* elevados, representa un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en estudio.
- Las especies de levadura CNA no serían responsables del desarrollo de EP.
- La presencia de Xerostomía no parece ser un factor relevante en la patogénesis de EP.
- *C. albicans* fue la levadura más frecuentemente encontrada en muestras salivales, lo cual sería explicado por una serie de factores de virulencia presentes en esta especie y que no se encuentran en la especies CNA.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre J. (2002). Candidiasis Orales. *Rev Iberoam Micol.* 19: 17-21.

Akdeniz B., Sen B., Iglenlit T., Ates M., Denizci A., Atilla G. (2000). Analysis of *Candida albicans* phenotypes in the oral cavity of renal transplant patients. *J Clin Periodontol.* 27 (Suppl 1): 92.

Altarawneh S. (2011). Characterization of salivary, mucosal and denture surfaces role in denture stomatitis: an exploratory study. Chapel Hill: A thesis submitted to the Faculty of Dentistry of the University of North Carolina for the degree of master of science in the school of dentistry.

Anuradha S., Rajeshwari K. (2005). Probiotics in health and disease. *JIAACM.* 6(1): 67-72.

Ayuso R., Torrent J., Lopez J. (2004). Estomatitis protésica: puesta al día. *RCOE.* 657-662.

Badet C., Thebaud N. (2008). Ecology of Lactobacilli in the oral cavity: A review of literature. *Open Microbiol J.* 2, 38-48.

Bardow A., Nyvad B., Nauntofte B. (2001). Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow and composition, and the rate of tooth demineralization in situ. *Arch Oral Biol.* 46: 413-23.

Beiro R., Vidal I., Vidal M., Orgeira J. (2002). Factores predisponentes locales de la candidiasis oral. *Medicina general* 40: 24-27.

Belazi M, Velegaki A, Fleva A, Gidarakou I, Papanau L, Baka D. y cols. (2005). Candidal overgrowth in diabetic patients: Potencial predisposing factors. *Mycoses* 48: 192-6.

Bilhan H., Sulun T., Erkose G., et al. (2009). The role of candida hyphae and Lactobacillus en denture-related stomatitis. *Clin Oral Invest.* 13: 363- 368.

Budtz-Jorgensen E. (2000). Ecology of Candida- associated Denture Stomatitis. *Microb Ecol Health D.* 12: 170-185.

Coronado-Castellote L., Jiménez-Soriano Y. (2013). Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent.* 5(5): 279-86.

Epstein J., Pearsall N., Truelove E. (1980). Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. *J Clin Microbiol.* 12(3):475-476.

Espinoza I., Rojas R., Aranda W., Gamonal J. (2003). Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *J Oral Pathol Med.* 32(10): 571-575.

FAO/WHO, Joint. (2001). Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food. *FAO Food Nutr Pap.* 85: 5-20.

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

Gallardo J. (2008). Xerostomía: etiología, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med Inst Mex.* 46 (1): 109-116.

Gendreau L. (2011). Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J Prosthodont.* 20: 251-260.

Hatakka K., Ahola A., y cols. (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly. A randomized controlled trial. *J Dent Res.* 86: 125- 130.

Heintze U., Birkhed D., Bjornh D. (1983). Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as function of age and sex. *Swed Dent J.* 7: 227-238.

Huumonen S., Haioka B., Oikarinen K., y cols. (2012). Residual ridge resorption, lower denture stability and subjective complaints among edentulous individuals. *J Oral Rehabil.* 39: 384-390.

Jeganathan S., Lin C. (1992). Denture Stomatitis- a review of the etiology, diagnosis and management. *Aus Dent J.* 37: 107- 114.

Kalaskar A., Degwekar S. (2010). Prevalence of Candidal carriage in denture wearers and evaluation of the effect of whole unstimulated salivary flow rate and pH of saliva on their carriage rates. *JIACM*. 22(4): 177-180.

Kaur R., Bansal V., Veerasha K. (2011). Probiotics and oral health A review. *Streamdent*. 2(1).

Krishnan P. (2012). Fungal infections of the oral mucosa. *Indian J Dent Res*. 23: 650-9.

Kuhn D., Chandra J., Mukherjee P., et al. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 70(2): 878–888.

Laurence J. (2007). Aspectos clínicos de biología salival para el Clínico. *Int Dent S Afric*. 9: 22-41.

Lee X., Gómez L., Vergara C., Astorga E., Cajas N., Ivankovic M. (2013). Asociación entre presencia de Levaduras del género *Candida* y factores del paciente adulto mayor con y sin estomatitis protésica. *Int. J. Odontostomat*. 7(2): 279-285.

Lefimil C., Lozano C., Morales-Bozo I., Plaza A., Maturana C., Urzúa B. (2013). DNA from oral bacteria by sodium hydroxide-paper method suitable for polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 433: 121-31.

Linares M., Solís F. (2001). Identificación de levaduras. Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica (1era ed.). *Rev Iberoam Micol*. 11: 1-18.

Loza D., Valverde H. (2006). Diseño de Prótesis Parcial Removible. *Editorial Médica Ripano*.

Lynge A. (2007). Saliva. Institute of Odontology, University of Copenhagen: *Zendium*.

Mailänder D., Wagener J., Schaller M. (2011). Potential role of probiotic bacteria in the treatment and prevention of localised candidosis. *Mycoses* 55: 17-26.

Marinoski J., Bokor-Bratic M., Cankovic M. (2014). Is denture stomatitis always related with candida infection?. A case control study. *Med Glas.* 11(2).

McCracken. (2005). Prótesis Parcial Removible. 11ªEd. *Elsevier Mosby*.

Meurman J. (2005). Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci.* 113: 188-196.

Meurman J., Siikala E., Richardson M., Rautemaa R. (2007). Non-Candida albicans yeast of the oral cavity. En M. V. A., *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Formatex Publishing.

Ministerio de salud, Gobierno de Chile. (2003). Encuesta nacional de salud.

Ministerio de salud, Gobierno de Chile. (2010). Guía clínica: Salud oral integral para adultos de 60 años. Santiago: Subsecretaría de Salud Pública.

Morales M. (2001). Los adultos mayores Chilenos del siglo XXI: un enfoque politológico. *Acta Bioeth.* 7(1): 71-95.

Moran G., Sullivan D., Coleman D. (2002). Emergence of non-Candida albicans Candida species as pathogens. *Candida and candidiasis 4th Edition*. Págs. Chap. 4, pp. 37-53. Washington: *ASM Press*.

Mravak-Stipetic M., Hemerich L., Jurcic I., Jerolimov V. (2000). Stimulating local factors in the development of denture stomatitis. *Acta stomatol croal.* (34): 133-136.

Olivares P. (2006). Perfil epidemiológico del adulto mayor en Chile. Santiago: Departamento de Estudios y Desarrollo, Superintendencia de Salud, Gobierno de Chile.

Panizo M., Reviákina V., y cols. (2001). Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev Soc Ven Microbiol.* (21): 2.

Pardi G., Cardozo E. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. Recuperado el 22 de octubre de 2014, de *Acta odontológica venezolana*: http://www.actaodontologica.com/ediciones/2002/1/algunas_consideraciones_candida_albicans.asp

Pereira-Cenci T., Del bel Cury A., Crielaard W., Ten J. (2008). Development of candida-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 16(2): 86-94.

Pinjon E., Moran G., Coleman D., Sullivan D. (2005). Azole susceptibility and resistance in *Candida dublinensis*. *Biochem Soc Trans.* 33:1210

Ramage G., Tomsett K., Wickers B., (2004). Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol.* 98: 53-59.

Rodrigues J., Höfling J., Tavares F., Duarte K., Gonçalves R., Azevedo R. (2004). Evaluation of biochemical and serological methods to identify and clustering yeast cells of oral *Candida* species by CHROMagar test, SDS-PAGE and ELISA. *Braz Oral Biol.* 64: 317-26.

Romeo O., Racco C., Criseo G. (2006). Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 44: 2590-2592.

Sachdeo A., Haffajee A., Socransky S. (2008). Biofilms in the edentulous oral cavity. *J Prosthodont.* 17: 348-356.

Salerno C., Pascale M., Contaldo M., y cols. (2010). *Candida*- associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 16(2): 139-43.

Samaranayake L., Keung-Leung W., Jin L. (2009). Oral mucosal fungal infections. *Periodontology* 49: 39- 59.

Samarayake L., MacFarlane T. (1990). Oral Candidiasis. *London: Wright.*

Saotome Y., Tada A., Hanada N., y cols. (2006). Relationship of cariogenic bacteria levels with periodontal status and root surface caries in elderly Japanese. *Geriodontology* 23: 219-225.

Scully C., El-Kabir M., Samaranayake LP. (1994). Candida and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 5: 125-57.

Sreebny L., Banoczy J., Baum B., Edgar W., Epstein J., Fox C., y cols. (1992). Saliva: Its role in health and disease. *Int Dent J.* 42: 291-304.

Sullivan D., Coleman D. (1998). Candida dublinensis: Characteristics and Identification- review. *J Clin Microbiol.* 36(2): 329-334.

Wagner R., Pierson C., Warner T., y cols. (2000). Probiotic effects of feeding heat-killed Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei to Candida albicans-colonized immunodeficient mice. *J Food Prot.* 63: 638-644.

Webb B., Thomas C., Willcox M., y cols. (1998). Candida- associated denture stomatitis. A etiology manegement: a review. Part I. Factors influencing distribution of Candida Species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 43: 45- 50.

9. ANEXOS y APÉNDICES

9.1 Anexo1: Consentimiento informado



Fecha de edición: 20 de agosto de 2013

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROTOCOLO : EFECTO DEL CONSUMO DE BEBIDAS LÁCTEAS ENRIQUECIDAS CON PROBIÓTICOS EN LA REDUCCIÓN DE INCIDENCIA DE CANDIDIASIS ORAL ASOCIADA A ESTOMATITIS PROTÉSICA, EN ADULTOS MAYORES PORTADORES DE PRÓTESIS REMOVIBLES

INVESTIGADOR PRINCIPAL : PROF. DRA. XIMENA LEE MUÑOZ
SEDE DEL ESTUDIO : UNIVERSIDAD DE CHILE. FACULTAD DE ODONTOLÓGIA.
DIRECCIÓN : SERGIO LIVINGSTONE 943. SANTIAGO

NOMBRE DEL PACIENTE :
FECHA :

Yo Ximena Lee Muñoz, docente de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Departamento de Prótesis, estoy realizando una investigación acerca de una levadura (hongo), el cual produce una enfermedad muy frecuente en la población, especialmente en aquella que utiliza prótesis dental y que se llama Candidiasis. Por otro lado, las personas que usan prótesis, muy frecuentemente sufren de un enrojecimiento bajo ella, que se denomina estomatitis protésica. Le proporcionaré información y lo(a) invitaré a ser parte de ella. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de hacerlo puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido la investigación y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formulario. Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la investigación, objetivo de la investigación, tipo de intervención y procedimiento, beneficios y riesgos asociados a la investigación y aclaraciones.

Justificación de la investigación: La candidiasis es una de las enfermedades más frecuentes de la boca. La magnitud de la infección depende fundamentalmente de las condiciones del paciente, por ejemplo, si usa prótesis y cuál es su estado de mantención. Esta enfermedad se puede manifestar de diferentes formas: cuando se inspecciona la boca los signos principales son enrojecimiento y manchas blancas que se desprenden al raspado, como también podemos encontrar fisuras o boqueras en las comisuras. La sintomatología es variable y generalmente mínima o asintomática, hasta cuadros de ardor o quemazón de variada intensidad.

Objetivo de la investigación: El objetivo de este estudio es evaluar el efecto del consumo de bebidas lácteas enriquecidas con probióticos, en la incidencia de candidiasis oral asociada a estomatitis protésica en adultos chilenos. El estudio incluirá a un número total de 340 pacientes adultos mayores. Los pacientes seleccionados presentan un nivel de salud que se clasifica como "Pacientes ASA I y II", es decir sanos o con tratamiento médico controlado, sin contraindicación para el consumo de bebidas lácteas, portadores de prótesis removible y pacientes desdentados totales o parciales (sin dientes o con algunos dientes), con estomatitis protésica (enrojecimiento bajo la prótesis) y/o candidiasis oral.

Criterios de inclusión y exclusión: Una muestra de 340 adultos mayores institucionalizados, pertenecientes a Centros de la Fundación Las Rosas (promedio de edad 70 años) hombres y mujeres, serán invitados a participar en este estudio, previa firma del consentimiento informado.

Los criterios de inclusión serán adultos mayores sanos, o con enfermedades de base controladas, portadores de prótesis removibles tanto de bases metálicas y/o acrílicas con estomatitis protésica y los de exclusión serán aquellos enfermos, o con enfermedades de base no controladas, no portadores de prótesis removibles o portadores de prótesis sin estomatitis protésica y que manifiesten intolerancia a las bebidas lácteas o alergia a alguno de los componentes de las bebidas experimentales y placebos. Se solicitará autorización a los médicos tratantes encargados de cada hogar. Tanto los grupos control y experimental, se conformarán previa firma del consentimiento informado de los voluntarios.

Beneficio de la investigación. Usted tendrá el beneficio de un examen de salud bucal donde podrá conocer el estado actual de su boca, y evaluar así la necesidad de posibles tratamientos. El conocer la efectividad de los probióticos en el tratamiento del hongo, nos permitirá mejorar el pronóstico de su tratamiento protésico, estableciendo una terapia oportuna, segura y eficaz según su riesgo individual. Además se sumarán los beneficios a su salud que le aporta el consumo de bebidas lácteas, enriquecidas con probióticos. Los probióticos se definen como "microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios al consumidor. Los probióticos son ampliamente consumidos en alimentos como "Uno al día" ®, "Chamyto" ®, entre otros. Además, el grupo de académicos del área de Prótesis Totales se comprometen a recibir en la clínica los casos de estomatitis más severa, y que sería incorrecto darles solo el probiótico (en estudio), siendo lo indicado una terapia específica posterior al estudio. Esto no tendría costo para usted.

Tipo de intervención y procedimiento. Si usted acepta participar, se le proporcionará una fórmula láctea que contiene el probiótico en estudio. Para medir su efectividad, se le

realizarán exámenes cuatro veces, al principio, seis, doce meses y dieciocho meses de su tratamiento. Estos exámenes consisten en toma de muestras de saliva y torulado de un área de su boca. Un torulado se realiza con un cotonito especial, el cual se pasa suavemente por su paladar. Para la muestra de saliva se le pedirá que deposite una pequeña cantidad de ella dentro de un frasquito. Los adultos mayores que conforman el *grupo experimental*, recibirán 1 porción de leche con 10^7 UFC/G *Lactobacillus rhamnosus*. Cabe destacar que se ha establecido contacto con la empresa proveedora de los lácteos que consume la institución beneficiaria, con el objetivo de no alterar las formulaciones que ingiere regularmente. Las bebidas lácteas con y sin probiótico, tendrán la misma fórmula en polvo desarrollada con leche 26% materia grasa, bajo poder higroscópico, fácil disolución y reconstitución.

Antes del examen es necesario que se abstenga de utilizar colutorios (enjuagues bucales) 15 días antes de la toma de la muestra. El día de la citación deberá estar en ayunas de 2 horas, tampoco debe haber fumado ni realizado ningún procedimiento de higiene bucal. Estas instrucciones le serán entregadas y explicadas oportunamente por escrito

Lugar donde se realizará la intervención.

Los pacientes que serán incluidos en este estudio, son adultos mayores que residen en la Fundación las Rosas, Los hogares participantes se dividirán en dos grandes grupo equivalentes. Dependiendo del número de personas por hogar se hará la distribución. El primer grupo será el experimental y el segundo el control.

La aplicación de este examen no representa ningún peligro para usted, pero si necesita información, puede comunicarse al teléfono 978 18 35, con la secretaria del Departamento de Prótesis, Sra. Erika Vásquez, quien gestionará su consulta, con los responsables del Proyecto: Dra. Ximena Lee Muñoz (ximenalee@gmail.com), Dr. Cristian Vergara Núñez, Dra. Elizabeth Astorga Bustamante. El horario de atención telefónica es de 08:30 a 13:00 horas, y desde las 14:00 a 17:30 horas, de lunes a viernes.

Las técnicas en estudio serán aportados por la Facultad de Odontología, **sin costo alguno para usted**, durante el desarrollo de este proyecto.

Riesgo de la investigación. Usted no correrá ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que el cotonito sólo entrará en contacto con su paladar, el cual tampoco sufrirá daño alguno debido a que la presión ejercida es mínima y el material no es perjudicial para el mismo. Por otro lado, el consumo de los probióticos no le aportará ningún daño puesto que están autorizados por el ISP (Instituto de Salud Pública), para ser consumidos por la población.

Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio le traerá como beneficio el diagnóstico de una posible infección que usted padece, y el tratamiento oportuno, absolutamente gratuito, para que el pronóstico de la prótesis que se está realizando sea mejor. Esto incluye los controles periódicos hasta que se le otorgue el alta clínica.

Toda la información derivada de su participación en este estudio, será conservada en forma de **estricta confidencialidad**, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Cabe destacar que sus datos personales serán codificados, es decir, se les asignará un número. Bajo ninguna circunstancia la investigadora responsable o los coinvestigadores divulgarán estos antecedentes. Sólo se trabajará con el código asignado. Tampoco se le tomarán fotografías ni videos.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la **intervención**
- Si usted decide puede retirarse cuando **lo desee**.
- Las muestras obtenidas serán de exclusiva utilización para este estudio.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al **investigador responsable**.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será **mantenida con estricta confidencialidad** por los investigadores, para esto, no se utilizará su nombre sino un sistema de código que enumerará las muestras.

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento, y de haber podido aclarar todas mis dudas, puede, si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado del Proyecto: **EFFECTO DEL CONSUMO DE BEBIDAS LÁCTEAS ENRIQUECIDAS CON PROBIÓTICOS EN LA REDUCCIÓN DE INCIDENCIA DE CANDIDIASIS ORAL ASOCIADA A ESTOMATITIS PROTÉSICA, EN ADULTOS MAYORES PORTADORES DE PRÓTESIS REMOVIBLES**

Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado/a y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
6. Además de esta información que he recibido, seré informado/a en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
7. Autorizo a usar mi caso para investigación protegiendo mi identidad

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, **PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO BENEFICIO.**

Nombre del Paciente: _____

RUT: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente proporcionada por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____

En caso de cualquier duda puede acudir personalmente a Av. La Paz 750, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, los días martes de 09:00 a 13:15 horas, o comunicarse al teléfono 978 18 35, con la secretaria del Departamento de Prótesis, Sra. Erika Vásquez, quien gestionará su consulta, con los responsables del Proyecto: Dra. Ximena Lee Muñoz, Dr. Cristian Vergara Núñez, Dra. Elizabeth Astorga Bustamante o Dr. Danilo Ocaranza Tapia. El horario de atención telefónica es de 08:30 a 13:00 horas, y desde las 14:00 a 17:30 horas, de lunes a viernes.

Ante cualquier duda también puede preguntar al Comité de Ética de la Facultad de Odontología cuya Presidenta es la Dra. María Angélica Torres; teléfono: 9781702 y su dirección es Facultad de Odontología de la U. de Chile, Edificio Administrativo, Oficina Vicedecanato, 4º piso, Sergio Livingston P. 943, Comuna Independencia.

9.2 Anexo 2: Ficha clínica

Código: **FICHA CLÍNICA FONIS SA13I20113**

Nombre Revisor:.....

Fecha:.....

NOMBRE (s):

APELLIDOS:

GÉNERO EDAD (años) NIVEL EDUCACIONAL ESTADO CIVIL

1- Femenino

2- Masculino

1. Sin escolaridad

2. Primaria

3. Secundaria

4. Superior

1. Soltero(a)

2. Casado(a)

3. Viudo(a)

HOGAR:

I. Enfermedades crónicas no transmisibles. (Marque con una X)

1. Hipertensión	<input type="checkbox"/>	7. Colon irritable	<input type="checkbox"/>
2. Respiratorias crónicas	<input type="checkbox"/>	8. Arritmias y cardiopatías	<input type="checkbox"/>
3. Hipercolesterolemia	<input type="checkbox"/>	9. Úlcera péptica	<input type="checkbox"/>
4. Depresión	<input type="checkbox"/>	10. Artritis/ Artrosis	<input type="checkbox"/>
5. Sobrepeso/ obesidad	<input type="checkbox"/>	11. Osteoporosis	<input type="checkbox"/>
6. Diabetes Tipo II	<input type="checkbox"/>	12. Alergia(s): ¿Cuál?(es)	<input type="checkbox"/>
		Otra(s) (Especifique)	

II. Enfermedades agudas (menos de tres meses de evolución)

1		
2		
3		

III. Otras condiciones

	Sí	No
Intolerancia a la lactosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tabaquismo (frecuencia)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Consumo de alcohol (frecuencia)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

FICHA CLÍNICA FONIS SA13I20113**IV. Fármacos que consume: (especifique)**

	Fármaco	Dosis
1		
2		
3		

V. Higiene oral y protésica

Higiene de:	Sí	No	Frecuencia (veces al día) 1 vez; 2 veces	¿Qué utiliza?	Sí	No
1. Dientes				1. Cepillo de dientes		
				2. Hilo/ seda dental		
				3. Cepillo interdentario		
				4. Enjuague bucal		
				5. Otro ¿cuál?		
2. Mucosas				1. Cepillo suave		
				2. Gasas		
3. Lengua				1. Limpiador lingual		
				2. Cepillo dental		
4.- Prótesis				1.- Cepillo protésico		
				2.- Cepillo dental		
				3.- Pastillas de limpieza		
				5.- Cloro		
				4.- Otro		

FICHA CLÍNICA FONIS SA13I20113

VI. Xerostomía

	Sí	No
¿Tiene sensación de boca seca?		
¿Siente la saliva espesa?		
¿Tiene sensación de ardor en la lengua?		
¿Tiene dificultades para tragar?		
¿Tiene que tomar agua para tragar alimentos?		

VII. Patología Oral: Mucosa Oral

LESIONES		LOCALIZACIÓN		Lesión	Localización
0	Ningún estado anormal	0	Borde bermellón		
1	Leucoplasia	1	Comisuras		
2	Líquen plano	2	Labios		
3	Eritroplasia	3	Fondo de vestíbulo		
4	Estomatitis protésica	4	Mucosa oral		
5	Queilitis angular	5	Piso de la boca		
6	Glositis romboidal	6	Lengua		
7	Candidiasis pseudomembranosa	7	Paladar duro y/o blando		
8	Hiperplasia irritativa (éupulis)	8	Bordes alveolares/ encías		
9	Úlcera traumática	9	No registrado		
10	Úlcera no asociada a trauma				
11	Gingivitis necrotizante aguda				
12	Absceso (especificar origen)				
13	Máculas				
14	No registrado				
15	Herpes Labial				
16	Otro Trastorno (especificar)				

FICHA CLÍNICA FONIS SA13I20113

VIII. ESTOMATITIS PROTÉSICA: (Clasifique según Newton)

Si No

TIPO UBICACIÓN MAXILAR UBICACIÓN MANDIBULAR

1. Tipo I 1. Paladar duro 1. Reborde alveolar
 2. Tipo II 2. Paladar 2. Otra ubicación (especifique):
 3. Tipo III 3. Reborde alveolar

IX. Uso de prótesis

Tipo de prótesis	Sí		No		Antigüedad de la prótesis (años)	Frecuencia de uso		
	Maxilar	Mandibular	Maxilar	Mandibular		Día	Noche	Social
1. Removible acrílica								
2. Removible metal acrílica								
3. Implanto retenida								

X. Periodonto: enfermedad periodontal (consignar presencia o secuela, observable clínicamente)

1. Gingivitis

Ausente	<input type="checkbox"/>	Localizada	<input type="checkbox"/>	Generalizada	<input type="checkbox"/>
---------	--------------------------	------------	--------------------------	--------------	--------------------------

2. Periodontitis

Ausente	<input type="checkbox"/>	Localizada	<input type="checkbox"/>	Generalizada	<input type="checkbox"/>
---------	--------------------------	------------	--------------------------	--------------	--------------------------

Observaciones:

.....

FICHA CLÍNICA FONIS SA13I20113

XI. Lesiones de caries: (consignar lesiones de caries)

	Identifique		Actividad de caries
Número de dientes presentes		Inactiva	
Cavitada		Activa	
No cavitada		Observaciones:	

XII. Edentulismo: (Clasifique según Kennedy)

Maxilar		Mandíbula	
----------------	--	------------------	--

- | | |
|--------------|---------------------|
| 1. Clase I | 4. Clase IV |
| 2. Clase II | 5. Desdentado total |
| 3. Clase III | |

Notas del examinador
