



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PRÓTESIS
ÁREA DE PRÓTESIS REMOVIBLE**

“Asociación de parámetros salivales, recuento e identificación de levaduras del género *Candida* en sujetos portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica, luego de consumir leche con probiótico durante tres meses.”

Pablo Andrés Saavedra Órdenes

**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

Dr. Cristian Vergara Núñez

Adscrito a Proyecto FONIS SA13I10116

Santiago – Chile

2015

Agradecimientos

A mis padres Graciela y Pablo y a mis tíos Rosalba y Omar, por su apoyo incondicional y sacrificios durante toda mi vida.

A la Dra. Carla Lozano, por su paciencia, dedicación y ayuda durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Ximena lee y Dr. Cristian Vergara, por su ayuda durante toda esta investigación.

Índice

| | |
|---------------------|----|
| RESUMEN | 4 |
| MARCO TEÓRICO | 6 |
| HIPÓTESIS | 18 |
| OBJETIVOS | 18 |
| METODOLOGÍA | 19 |
| RESULTADOS | 27 |
| DISCUSIÓN | 36 |
| CONCLUSIONES | 43 |
| BIBLIOGRAFIA | 45 |
| ANEXOS | 52 |
| ANEXO 1 | 52 |
| ANEXO 2 | 58 |

Introducción: La población de adultos mayores en Chile (AM) ha experimentado un aumento gradual en las últimas décadas. La enfermedad oral más prevalente en este segmento de la población es la estomatitis protésica (EP), siendo el mayor factor de riesgo el uso de Prótesis Removible (PR), lo que genera disminución del pH y la velocidad flujo salival (VFS), favoreciendo la proliferación de levaduras del género *Candida* (LGC) en la cavidad oral. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del consumo de leche con probiótico durante tres meses en las características salivales y en el recuento y diversidad de LGC en portadores de PR con EP asociada a candidiasis oral.

Metodología: La población objetivo corresponde a 40 AM con PR y EP, 20 recibieron leche con probiótico (EP Probiótico) y 20 recibieron leche sin probiótico (placebo) (EP Placebo) y, 26 AM con PR Sanos, (20 Sano Placebo y 6 Sano Probiótico). Los AM fueron examinados intraoralmente y se recolectó muestra de saliva para análisis bioquímico (pH, VFS) y portación/recuento y diversidad de *Candida*, al inicio del estudio (T_0) y luego de 3 meses de consumo del lácteo con o sin probiótico (T_3). Para el recuento microbiológico, diluciones de la saliva se sembraron en medio Sabouraud-agar. La identificación de especies se realizó mediante CHROMagar, test bioquímico y/o PCR. Se utilizaron los test estadísticos T-test y Wilcoxon considerando significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados: Al comparar las variables en T_0 y T_3 se observó un descenso significativo en las variables pH salival y VFS ($p < 0,05$) en los grupos EP Placebo y Sano Placebo. Para los grupos EP Probiótico y Sano Probiótico no se observaron diferencias significativas. La portación/recuento de *Candida* presentó diferencias significativas inter-grupo. Las especies de *Candida* más frecuentes en todos los grupos fueron *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. glabrata*.

Conclusiones: Los parámetros químicos (pH y VFS) y microbiológicos (recuento y portación de LGC) salivales analizados luego de 3 meses de tratamiento, se mantuvieron similares a los valores obtenidos al inicio de éste, tanto en los pacientes que consumieron el lácteo con probiótico como los que consumieron el

placebo, por lo cual no podemos asignar el efecto benéfico del probiótico sobre la variables analizadas en las condiciones estipuladas de este estudio. En cuanto a la identificación de LGC, la especie más frecuentemente aislada de los grupos estudiados fue *C. albicans*.

1. MARCO TEÓRICO

Introducción

Desde la década de los 80, Chile ha estado experimentando un cambio en el perfil demográfico-epidemiológico. Como consecuencia de esto, la esperanza de vida de los chilenos ha aumentado exponencialmente (CASEN, 2013). Según los datos recopilados por el Instituto Nacional de Estadísticas (2013) y CASEN (2013), en 1990 los adultos mayores alcanzaban el 10,1% de la población total, en el año 2011 esta cifra aumentó al 16,7% y se estima que para el año 2025 este grupo etáreo alcanzará el 20,1% del total de la población, lo que sugiere el envejecimiento de la población chilena, tomando relevancia de esta manera las enfermedades más prevalentes de este segmento de la población.

Junto con el aumento de la esperanza de vida de los chilenos, en términos de salud, las causas de morbilidad y mortalidad de la población han cambiado, pasando de enfermedades infecto-contagiosas a enfermedades crónicas no transmisibles, accidentes, problemas de salud mental, enfermedades respiratorias, cardiovasculares, dentales, entre otras (Encuesta Nacional de salud 2009-2010), por lo cual, los adultos mayores representan un grupo de especial interés debido a su vulnerabilidad en temas de salud general y oral específicamente (Misrachi y cols., 1997).

Respecto a lo anterior, los adultos mayores son el grupo etario que presenta mayor morbilidad oral, esto generalmente como consecuencia de no haber recibido en su vida medidas de prevención de enfermedades orales, tratamientos adecuados o simplemente atención dental oportuna, lo que ha dejado diferentes secuelas en este grupo, tales como: desdentamiento, caries dental, enfermedades periodontales e infecciones de la mucosa oral (MINSAL, 2010).

Las Encuestas Nacionales de Salud (2003 y 2009-2010) nos entregan importante información respecto de la condición bucodental del adulto mayor, señalando que

el 75% de estos son desdentados parciales, de los cuales 37,1% porta prótesis removible en ambos maxilares, 25,3% en maxilar superior y 0,8% en el inferior. A pesar de que la rehabilitación oral en los adultos mayores significa una recuperación en sus funciones masticatorias, capacidad de comunicación y autoestima, el uso de prótesis puede alterar las condiciones de salud de la mucosa oral adyacente (Huumonen y cols., 2012). Lo anterior, sumado al envejecimiento natural de los tejidos, propicia la prevalencia de lesiones en estos, ya que el epitelio oral se atrofia y disminuye la síntesis colágena (Huumonen y cols., 2012). Espinoza y cols. (2003) determinaron, mediante una muestra de 889 individuos mayores de 60 años de edad seleccionados aleatoriamente por edad, sexo y nivel socio-económico, que existe una prevalencia de un 53% de una o más lesiones de la mucosa oral, siendo la más prevalente la estomatitis protésica (EP), que afecta al 34% de sujetos portadores de prótesis removible (PR), evidenciando de esta forma que la PR aumenta las posibilidades de aparición de diversas patologías orales, principalmente cuando los requisitos funcionales no se cumplen (Williams y cols., 2011; Gendreau y cols., 2011).

Estomatitis Protésica

La EP se define como un proceso inflamatorio de diversa extensión y severidad que se presenta en la mucosa de soporte, en sujetos parcial o totalmente desdentados portadores de prótesis removibles (Koeck y cols., 2007; Budtz-Jorgensen, 2000).

Epidemiología

Estudios epidemiológicos indican que existe entre un 15 a un 75% de prevalencia de EP en sujetos portadores de prótesis, especialmente en adultos mayores del género femenino, siendo su localización más habitual en el maxilar que en la mandíbula, con frecuencias de 35 y 18%, respectivamente (Figueiral y cols., 2007; Gendreau y cols., 2011).

Diagnóstico

En esta patología la sintomatología varía desde asintomática hasta dolor y/o ardor de diversa intensidad (Felton y cols., 2011), lo que determina que su diagnóstico sea eminentemente clínico y se basa en el reconocimiento de las lesiones. De acuerdo a esto podemos clasificar la EP según el aspecto clínico de la mucosa afectada bajo la zona de soporte de la prótesis (Koeck y cols., 2007), obteniendo así tres grupos, de acuerdo a su severidad, en estomatitis tipo I, II y III:

Tipo I: Signos inflamatorios mínimos, generalmente asintomáticos, representados por áreas hiperémicas localizadas o en forma de pequeños puntos eritematosos.

Tipo II: Eritema difuso en que se observa el dibujo de los contornos de la prótesis. La superficie mucosa es color rojo brillante, aparecen áreas eritematosas difusas que pueden cubrir total o parcialmente por exudado blanco-grisáceo.

Tipo III: Hiperplasia papilar del paladar. Está constituida por mucosa gruesa, con gránulos irregulares.

Etiología, patogenia y factores de riesgo

La EP es una patología multifactorial y se proponen factores predisponentes del hospedero de tipo locales y sistémicos que estarían relacionados a esta condición (Emami y cols., 2012). Dentro de los factores locales, los más relevantes son los de origen mecánico-traumático, generalmente por el uso de prótesis removible, la cual produce lesiones microtraumáticas en la mucosa. Así también, hay disminución del flujo y el pH salival, lo cual dificulta la llegada de anticuerpos salivales y el barrido mecánico lingual, propiciando así la aparición de un microambiente ácido anaerobio, que permite la proliferación de bacterias y hongos oportunistas, tales como levaduras del género *Candida* (LGC) (Gendreau y cols., 2011; Salerno y cols., 2011).

El otro factor local es el higiénico-infeccioso, el cual consiste principalmente en una pobre higiene oral y protésica, lo que aumenta el riesgo de EP (Gendreau y cols., 2011; Rocha y cols., 2011), ya que permite un rápido desarrollo y acúmulo de una bio-película o *biofilms* sobre la superficie protésica (Thein y cols., 2007). Los *biofilms* pueden ser definidos como comunidades de microorganismos unidos generalmente a una superficie dentro de una matriz extracelular, constituida fundamentalmente de polisacáridos y proteínas, producidas por dichos microorganismos (Alem y cols., 2006; Williams y cols., 2011).

En relación a los factores sistémicos predisponentes, condiciones tales como diabetes y xerostomía propician el sobrecrecimiento y la colonización de las LGC (Salerno y cols., 2011). Diferentes estudios plantean que el control de la glicemia parece ser más importante que la presencia de la enfermedad propiamente tal, ya que los pacientes con un pobre control de la enfermedad presentan altos niveles de glucosa en saliva junto con una disminución del pH salival, lo que favorece el crecimiento y la adhesión de LGC (Farah y cols., 2010). Situación similar ocurre con la condición de xerostomía, en donde alteraciones tanto de cantidad como de calidad de la saliva en adultos mayores, asociadas generalmente a consumo de fármacos, son factores predisponentes para la virulencia de estos microorganismos (Salerno y cols., 2011).

Parámetros salivales

La saliva cumple un rol fundamental en la mantención de la salud oral. Es por esto que la disminución de su flujo, producto de diversas condiciones sistémicas y terapias farmacológicas, aumenta el riesgo de enfermedades tales como caries dental e infecciones por *Candida* (Laurence, 2007).

Beiro y cols. (2002), plantean que existe una alta prevalencia de candidiasis en sujetos con hiposalivación y xerostomía. Esto puede ser explicado porque la saliva tiene un efecto de limpieza mecánica, junto con múltiples moléculas del sistema inmune innato, tales como lisozima, histatina, lactoferrina e inmunoglobulina A

(IgA), que interactúan con las diferentes especies de *Candida*, interfiriendo en la adhesión y colonización de ésta en la mucosa oral.

En relación a lo anterior, se ha descrito que la susceptibilidad a infección por una de estas levaduras, como *Candida albicans*, podría ser predicha por la velocidad del flujo salival (VFS) (Kalaskar y cols., 2010), en donde los valores normales de la saliva no estimulada varían de 0,3 a 0,4 ml/min y que su disminución a valores menores a 0,15 ml/min es considerado patológico (Sreebny y cols., 1992). De igual manera ocurre en los desórdenes inmunológicos, en donde el uso prolongado de antibióticos o inmunosupresores, reduce la microbiota comensal permitiendo, por ejemplo, la proliferación de LGC (Farah y cols., 2010).

Con respecto a los niveles de pH salival, estos varían normalmente entre un rango de 5,6 a 7,8, por lo que una disminución de éste a niveles menores a 4, se asocian a una mayor incidencia de levaduras, propiciando así la colonización y proliferación de estos microorganismos (Williams y cols., 2011; Farah y cols., 2010). Cabe destacar que la adherencia de las levaduras a superficies inertes y/o epiteliales, junto con su proliferación y actividad de sus enzimas extracelulares (como factores de virulencia), se ve favorecida al presentarse la disminución del pH salival (Beiro y cols., 2002; Webb y cols., 1998).

Si bien es cierto, no existe en la literatura una asociación directa entre las características salivales y EP, sí existe una amplia evidencia que respalda la relación entre hiposalivación, disminución del pH salival y el aumento de la presencia de LGC. Debido a que *C. albicans* es el principal factor infeccioso en el desarrollo de la EP (Gendreau y cols., 2011; Salerno y cols., 2011), estos factores juegan un papel importante en la predisposición a esta patología (Figueiral y cols., 2007; Gendreau y cols., 2011).

Levaduras del género *Candida*

El género *Candida* presenta más de 350 especies, pero solo unas pocas (alrededor de 14) se relacionan con enfermedades humanas. Las especies del género *Candida* se presentan de manera comensal en la microbiota normal de la piel, mucosas y en el aparato gastrointestinal (Williams y cols., 2011).

Ciento cincuenta especies del género *Candida* han sido aisladas de la cavidad oral, de las cuales la más prevalente es *C. albicans*, frecuentemente aislada tanto desde individuos sanos como enfermos (Meurman y cols., 2007; Williams y cols., 2011). *C. albicans* es un organismo comensal inocuo en la cavidad oral, que bajo ciertos factores locales y sistémicos del hospedero, tiende a volverse patógeno oportunista, causando de esta manera micosis orales o candidiasis (Williams y cols., 2011; Salerno y cols., 2011).

La especie *C. albicans* es la más patógena del género, puesto que ésta expresa los niveles más altos de virulencia comparada con otras especies del mismo género. Se han propuesto como factores de virulencia fundamentales para el inicio y desarrollo de la enfermedad, la adhesión a superficies del hospedero, la secreción de proteinasas y la formación de hifas, siendo esta última aparentemente la más importante (Williams y cols., 2011; Bilham y cols., 2009). Bilham y cols. (2009) observaron que existe una cantidad significativamente mayor de hifas de *C. albicans* en pacientes que presentan EP, en comparación a pacientes portadores de prótesis removible sanos.

El cambio en la morfología de la levadura, pasando del estado levaduriforme a hifa, está acompañado por secreción de proteínas hidrolíticas tales como lipasas, fosfolipasas, proteinasas, hexosaminidasas y fosfomonoesterasas, las que incrementan la virulencia y aumentan la capacidad de invasión tisular. Estas características le otorgan a *C. albicans* mayor capacidad de adherencia, crecimiento, resistencia a la fagocitosis y capacidad de degradar sustratos del hospedero como albúmina, colágeno e inmunoglobulinas como IgG e IgA (Williams y cols., 2011; Gendreau y cols., 2011).

La probabilidad de desarrollar alguna infección oral por *Candida* se ve favorecida a medida que aumentan las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de saliva analizada. Se ha comprobado que la aparición de signos y síntomas asociados a la infección ocurre cuando los recuentos de levadura sobrepasan las 400 UFC/ml de saliva (Shimizu y cols., 2008; Murray y cols., 2009). Pese a esto, existen sujetos con altos recuentos de levaduras que no presentan signos clínicos y viceversa, es decir, que no solamente el recuento de este microorganismo indica la aparición de la enfermedad, si no que también existen factores locales y/o sistémicos involucrados en la etiopatogenia de la infección oral por *Candida* (Shimizu y cols., 2008; Murray y cols., 2009; Gendreau y cols., 2011).

Cabe destacar que un porcentaje menor de sujetos es afectado además por especies de *Candida no-albicans*, lo que repercute significativamente en el tratamiento de esta patología, dada la resistencia a tratamientos antifúngicos utilizados convencionalmente, por lo que se requieren métodos diagnósticos más específicos de reconocimiento (Williams y cols., 2011; Farah y cols., 2010; Brooks y cols., 2002).

Levaduras no- *C. albicans*

Las especies de *Candida no-albicans* (CNA) son un grupo de microorganismos heterogéneos, diferentes entre sí y de *C. albicans*. El desarrollo de nuevas terapias médicas, tratamientos para el cáncer, la aparición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y SIDA, el uso de antibióticos de amplio espectro, entre otros, han llevado al aumento de especies de CNA causantes de infecciones de la mucosa oral (Meurman y cols., 2007).

A diferencia de *C. albicans*, las especies de CNA carecen parcial o totalmente de algunos factores de virulencia, tales como la habilidad de formar hifas y cambiar fenotípicamente. Además, tienen una menor capacidad de adherencia a las superficies orales epiteliales y menor secreción de proteinasas, razones por las cuales producen candidiasis de menor virulencia (Meurman y cols., 2007). Cabe destacar que dentro del grupo de CNA, se han identificado como responsables de

infecciones orales, junto con *C. albicans*, especies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* y *C. guilliermondii* (Meurman y cols., 2007).

Por último, la incidencia de especies de CNA en adultos mayores es cada vez mayor en la cavidad oral (Meurman y cols., 2007). Por ejemplo, en el estudio de Grimoud y cols. (2005), se obtuvo que de un grupo de 110 ancianos hospitalizados, *C. glabrata* representó el 24% de las levaduras aisladas de las micosis orales.

Tratamiento de la estomatitis protésica asociada a *Candida*

El tratamiento de la EP asociada a *Candida*, sugerido en la “Guía Clínica Salud Oral Integral para Adultos de 60 años” (MINSAL 2010), es:

1. Controlar factores irritativos.
2. Reforzar medidas de higiene oral y protésica.
3. Indicar antimicóticos tópicos y sistémicos frente a sospecha de infección fúngica.

En relación a todos los factores locales mencionados, las medidas más usadas son el rebasado, reparación o renovación de la prótesis removible. También se indica realizar instrucción de higiene oral y protésica. Para llevar a cabo esto, el MINSAL recomienda utilizar métodos mecánicos y químicos para disminuir la carga microbiana. Por lo que el tratamiento debe estar enfocado en las necesidades del paciente y las mejoras de éste.

De la misma forma, la evaluación de la presencia y el control de trastornos sistémicos tales como: inmunosupresión, diabetes, desórdenes endocrinos, entre otros, son parte importante del tratamiento de la EP, ya que estos predisponen la colonización de las LGC, además de exacerbar el cuadro clínico (Williams y cols., 2011; Salerno y cols., 2011).

La problemática se encuentra cuando la EP asociada a *Candida* es de mayor severidad y el tratamiento local no es efectivo. El MINSAL recomienda el uso de antimicóticos tópicos específicos, ya sea de la familia de polienos (nistatina, anfotericina B) o de los azoles (miconazol, clotrimazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol). Dentro de las terapias sistémicas, los fármacos poliénicos e imidazoles, entre otros, actúan inhibiendo el crecimiento de *C. albicans* con la desaparición de signos y síntomas entre 12 y 14 días de consumo de ellos. El problema que conlleva este tipo de terapia es la toxicidad farmacológica que representa para los pacientes, ya que la levadura al ser una célula eucarionte, los fármacos también interfieren en las rutas metabólicas de células humanas, aumentando la toxicidad y generando mayor daño a nivel hepático, de modo que se debe evaluar a quién se prescriben estos medicamentos (Williams y cols., 2011).

En esto radica la complejidad del tratamiento de la EP asociada a *Candida*, ya que es necesario reconocer, corregir y/o eliminar factores predisponentes locales y sistémicos (Salerno y cols., 2011), para así controlar eficientemente la enfermedad.

Tratamiento complementario de EP

En la búsqueda de una terapia complementaria, que no vaya en desmedro de la salud de las personas, se encuentra el consumo de probióticos como un tratamiento alternativo y/o complementario al tratamiento convencional.

Los probióticos se definen según la Food and Agriculture Organization and the World Health Organization (FAO/WHO, 2001) como “*microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios al hospedero*”.

La efectividad de los probióticos es dependiente de la cepa que se utiliza, por ello se estudian cepas bacterianas individuales para observar los beneficios que confieren a la salud de las personas (Haukioja y cols., 2010). Las bacterias más estudiadas en medicina, por estimular la inmunomodulación e inmunidad general, son: *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, y la levadura *Saccharomyces*

boulardii (Sazawal y cols., 2006). En especial cepas particulares de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* pueden actuar en la cavidad oral inhibiendo la actividad cariogénica de algunos streptococci y también de levaduras (Meurman y cols., 2005).

El uso de probióticos constituye un intento de modificar la relación inmediata del ambiente microbiano de forma que otorgue beneficios en la salud general del hospedero (Golledge y Riley, 1996). También los probióticos han demostrado tener influencia sobre la respuesta inmune a través de variados mecanismos moleculares como la producción de sustancias antimicrobianas, competencia por sitios de unión con microorganismos patógenos, adhesión y colonización de los tejidos, entre otros (Gibson y cols., 1998; Stamatova y cols., 2009). En la literatura científica existen suficientes evidencias de los efectos positivos que produce el consumo de estos microorganismos probióticos, tales como: aumento en la resistencia a infecciones (Perdigon y cols., 1995), prevención de enfermedades intestinales (Naidu y cols., 1999), gastritis (Elmer y cols., 1996), infecciones gastrointestinales y urogenitales (Hilton y cols., 1992), reducción de la presión sanguínea, regulación de la hipertensión y del colesterol en la sangre (Fuller y cols., 1997). También reducción de alergias (Bengmark y cols., 2000) y de infecciones respiratorias (Hatakka y cols., 2001), entre otras.

Bacterias del género *Lactobacillus* y su uso como probiótico

Se ha descrito que varias especies de *Lactobacillus* habitan en la cavidad oral como microorganismos comensales, tales como *L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. crispatus* y *L. rhamnosus* (Caglar y cols., 2005), pero solo algunas de ellas son utilizadas como probiótico, como es el caso de *L. rhamnosus*. Se encuentran comúnmente asociadas al tracto gastrointestinal humano, sin embargo, también juegan un rol importante en la ecología de la cavidad oral (Caglar y cols., 2005; Gupta, 2011). En relación a los posibles efectos de los probióticos en la salud oral, *Lactobacillus* ha sido el más estudiado durante décadas. A pesar de no ser una bacteria esencialmente patógena, especies tales

como *L. casei*, *L. fermentum*, *L. salivarius* y *L. acidophilus*, se ha asociado con la aparición del proceso carioso (Badet y cols., 2008).

Dentro de sus mecanismos de acción podemos decir que estos microorganismos disminuyen la adhesión de la levadura a las células de la mucosa oral (Köhler, 2012; Gupta, 2011), además de producir una disminución de la expresión de genes involucrados en la resistencia a fluconazol por parte de la levadura (Köhler y cols., 2012). Noverr y cols. (2004) plantean que ácidos grasos de cadena corta presentes en el sobrenadante de los cultivos de *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, interfieren significativamente en la germinación de *C. albicans*. Por último, Hattaka y cols. (2007) realizaron un ensayo clínico en adultos mayores, utilizando queso enriquecido en probiótico, obteniendo una disminución del recuento de levaduras del género *Candida* en un 75%.

La EP como condición común en adultos mayores portadores de PR puede ser mejorada mediante el uso regular de probióticos, ya que ésta podría ser considerada como una terapia profiláctica o terapéutica para dicha patología.

El consumo de probióticos está lejos de tener efectos adversos como los hay al utilizar los tratamientos convencionales, los cuales repercuten en la salud general de los pacientes. En esto último radica la importancia de este estudio, que busca evaluar una terapia costo efectiva en el tratamiento de la estomatitis protésica asociada a *Candida* en adultos mayores portadores de prótesis removibles.

Debido a lo anterior es que en esta investigación será analizada la portación, recuento e identificación de levaduras *Candida* en adultos mayores portadores de PR con y sin EP, además de los parámetros salivales pH y VFS luego de consumir leche enriquecida con probiótico durante un periodo de tres meses. Esto con el fin de determinar, si el consumo de leche con probiótico tiene un efecto positivo en reducir los valores de las variables microbiológicas y aumentar aquellos de las variables salivales, y comparar los parámetros mencionados con aquellos registrados al comienzo del estudio (tiempo 0). Este posible efecto benéfico del probiótico en las variables mencionadas anteriormente, podría ayudar a la

remision de los signos y sintomas clínicos de la EP, la lesión oral más prevalente de la población adulta mayor portadora de PR.

2. HIPÓTESIS.

La portación y el recuento salival de levaduras del género *Candida*, parámetros salivales como velocidad de flujo y pH, en pacientes adultos mayores portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica, luego del consumo durante tres meses de leche enriquecida con probiótico, presentan diferencias con dichos parámetros evaluados al comienzo del estudio.

3. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar portación, recuento, identificación de especies de *Candida* y parámetros salivales (VFS y pH) en sujetos portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica, luego de consumir leche enriquecida con probiótico durante tres meses, y determinar si existen diferencias de estos parámetros con los medidos al comienzo del estudio.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

3.1.1. Establecer la portación y recuento de levaduras del género *Candida* en saliva, junto con pH y velocidad de flujo salival (VFS) de sujetos portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica, luego del consumo de leche enriquecida con probiótico o placebo durante 3 meses.

3.1.2. Identificar especies de levaduras del género *Candida* en saliva de sujetos portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica, después de 3 meses de consumo de leche enriquecida con probiótico o placebo.

3.1.3. Comparar los resultados obtenidos luego de tres meses de consumo de leche enriquecida con probiótico o placebo con los resultados obtenidos al comienzo del estudio en sujetos portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica.

4. METODOLOGÍA.

4.1 Tipo de estudio

Este estudio es un ensayo clínico controlado aleatorizado triple ciego de 3 meses de duración.

a) Procedimiento de aleatorización

La muestra se dividió en dos grupos por conveniencia; sujetos portadores de PR con EP y sin EP, formando de esta manera un grupo experimental y uno control, respectivamente. Dichos grupos se subdividirán aleatoriamente de acuerdo a si los sujetos consumen la bebida láctea enriquecida con probiótico o sin probiótico (placebo). Se asignarán códigos de colores para identificar cada cohorte y los examinadores desconocerán a quién corresponde cada código. Un monitor independiente develará el significado del código durante la fase de análisis de datos. Ante posibles pérdidas de seguimiento, se estableció un 20% de sobre-muestreo y poder de 80%.

b) Definición de ciego

Tanto los clínicos examinadores, investigadores, encargados de los hogares, adultos mayores y quienes analicen los datos, no sabrán al grupo de estudio al cual serán asignados.

c) Preparación de las bebidas lácteas

Los adultos mayores que conformaron el *grupo experimental*, recibieron 1 porción de 200 ml de leche diaria con 10^7 UFC/G *Lactobacillus rhamnosus* GG, durante 3 meses. Se estableció contacto con la empresa proveedora de los lácteos a la institución beneficiaria, con el objetivo de no alterar las formulaciones que ingieren regularmente los residentes. Las bebidas lácteas enriquecidas con probiótico tuvieron la misma fórmula en polvo desarrollada con leche al 18% de materia grasa, bajo poder higroscópico, fácil disolución y reconstitución. La información

nutricional para una porción es: Energía 130 Kcal; Proteínas 6,5g; Lípidos 6,5g; Hidratos de carbono 9,3g. Los adultos mayores que conformaron el grupo control recibieron 1 porción de 200 ml de leche sin probiótico (placebo) durante 3 meses. Es importante destacar que ambas bebidas lácteas tenían iguales características organolépticas y nutricionales, para de esta manera evitar sesgos. Para mantener un buen control de entrega del lácteo, se mantuvieron libros de registro, que además sirvieron para medir el grado de adherencia del proyecto.

4.2 Población objetivo y Muestra

La población objetivo correspondió a 40 adultos mayores institucionalizados, portadores de prótesis removibles que presentan EP, provenientes de un ELEAM en la comuna de Independencia de la ciudad de Santiago y 26 portadores de prótesis removibles sin EP, pertenecientes a la clínica de prótesis totales de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, reclutados por conveniencia. De los 40 adultos mayores con EP, 20 de ellos recibieron leche con probiótico y los otros 20 el placebo. Con respecto al grupo de adultos mayores sin EP se procedió de la misma manera. Cabe destacar, que el bajo número de sujetos presentes en el grupo sano consumiendo probiótico se debe a la escasa adherencia de estos pacientes al estudio, por lo cuál no fue utilizado con fines estadísticos, si no que solo descriptivos.

4.3 Criterios de inclusión y exclusión

4.3.1 Criterios de inclusión:

- 1.- Adultos mayores cuya edad sea mayor o igual a 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.
- 2.- Aceptar participar del estudio, previa firma del consentimiento informado (anexo 1).

4.3.2 Criterios de exclusión:

- 1.- Adultos mayores no portadores de prótesis removibles.
- 2.- Adultos mayores con enfermedades de base no controladas.
- 3.- Intolerancia a bebidas lácteas o alergia a alguno de sus componentes.
- 4.- No contar con el permiso del médico tratante para participar en el estudio.
- 5.- Pacientes que requieran tratamiento odontológico urgente.
- 6.- No aceptar participar en el estudio.

4.4 Técnicas de recolección de la información

4.4.1 Exámenes clínicos

Los exámenes clínicos se realizaron al inicio del estudio (tiempo 0). Estos 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. Los exámenes fueron realizados utilizando un espejo dental y luz artificial tipo LED. Las lesiones compatibles con EP y candidiasis, fueron registradas siguiendo los criterios clínicos desarrollados. Los casos que requerían recambio de aparatos para la mejora de su salud, fueron invitados a ser atendidos en nuestra facultad en el inicio del curso de Prótesis Totales una vez terminado el estudio. Como existieron varios examinadores, se evaluó la concordancia de diagnósticos clínicos entre ellos al inicio del estudio. Para medir concordancia se aceptó al menos un valor 0,7 índice de Kappa al inicio de los exámenes.

4.4.2 Saliva y parámetros químicos salivales

Toma de muestra: En el día de la visita, el sujeto debía estar en ayunas mínimo 2h, no fumar, ni realizar procedimientos de higiene oral previo a la toma de muestra. Se corroboró que éste 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. Además, se le solicitó que suspenda el uso de colutorios orales 15 días antes de la recolección.

Muestras de saliva no estimulada: A cada individuo se le solicitó depositar saliva no estimulada durante 5 minutos en un frasco plástico estéril, que posterior a la toma de muestra fue debidamente sellado y rotulado. Las muestras fueron trasladadas refrigeradas al Laboratorio de Bioquímica y Biología oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, siendo procesadas en menos de 4 h.

Determinación VFS

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.

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 Métodos microbiológicos

4.5.1 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 (PBS 1x): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4 estéril. Posteriormente, fueron sembrados 100 μ l de la muestra de saliva directa (sin diluir) y 100 μ l de la dilución, por duplicado, en placas agar Sabouraud suplementados con 5 μ g/ml de tetraciclina. Las placas se incubaron en estufa a 30°C durante 48 h en condiciones de aerobiosis. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se contabilizaron las colonias crecidas que resultaron compatibles con levaduras del género *Candida*. Se promediaron los recuentos de las diluciones, cuyo resultado fue multiplicado por el factor de dilución y por el volumen de la muestra, obteniendo de esta forma las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

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

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*: Se realizó mediante medio cromogénico CHROMagar *Candida*, el cual permite diferenciar algunas especies de LGC mediante la coloración de colonias, producto de reacciones enzimáticas específicas ante el sustrato cromogénico presente en este medio (Odds y cols., 1994; Daef y cols., 2014). Una vez obtenidas las colonias en medio agar Sabouraud tetraciclina (AST), los aislados fueron sembrados en CHROMagar *Candida*, los cuales se

incubaron a 30°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis. Las levaduras fueron identificadas visualmente según las instrucciones del fabricante.

Para todos aquellos aislados de levaduras sembradas en el medio CHROMagar *Candida* 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 confirmar y diferenciar las especies. Para la obtención de ADN como templado para esta reacción, 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 fueron utilizados son: 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 µl, incluyó: 2 U de *Taq* polimerasa (Biolase), ADN molde, 1 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de cada uno de los partidores a una concentración de 25 µM, 0,5 µl dNTP's 10 mM, 2,5 µl 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 (Romeo y cols., 2006).

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 µg/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).

c) Criopreservación de los aislados: Las colonias de *Candida* obtenidas de las placas de medio CHROMagar *Candida* que no presentaron 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.

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

5. 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, con y sin consumo de leche con probiótico”, estas variables son:

- 1) Variable microbiológica: se reconocieron portación, recuento e identificación de LGC.
- 2) Características salivales: se reconocieron pH y VFS.

Posteriormente, fueron analizadas dependiendo de su tipo de distribución, para lo cual se aplicó el test Shapiro Wilk. Para la distribución no normal, se aplicó el test de Wilcoxon. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ (Tabla 1).

Tabla 1: Test estadísticos y clasificación de variables utilizadas en este estudio.

| Variable (s) | Tipo/ Distribución | Test estadístico |
|---------------------------------|---------------------|--|
| pH | Continua/ normal | Wilcoxon |
| VFS | Continua/ no normal | Wilcoxon |
| Portación de <i>Candida</i> | Continua/ normal | Wilcoxon |
| Recuento de <i>Candida</i> | Continua/ no normal | Wilcoxon |
| VFS/ recuento de <i>Candida</i> | - | Coeficiente de correlación lineal de Pearson |
| pH/ recuento de <i>Candida</i> | - | Coeficiente de correlación lineal de Pearson |

5. Resultados

Este estudio comprendió 66 sujetos portadores de prótesis removible, 40 de ellos (60,6%) con EP y 26 de ellos (39,4%) sin EP, provenientes de un ELEAM y de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, respectivamente.

VARIABLES SALIVALES ANALIZADAS

a) pH

Al comparar esta variable en los grupos de estudio a tiempo 0 y a los tres meses, se determinó que no existe diferencia estadística en la variación del pH de las muestras obtenidas de los sujetos con y sin EP, que consumieron probiótico durante tres meses. Situación diferente ocurrió en los grupos que no consumieron probiótico (placebo), en donde se observó un descenso del pH a los tres meses del consumo del placebo, siendo esta variación significativa (Tabla 2).

Tabla 2: Valor estadístico de la variable pH (se indica la mediana) en los grupos de estudio en T₀ y T₃.

| Grupos | pH (Rango) T ₀ | pH (Rango) T ₃ | Valor de p |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|------------|
| EP Probiótico | 7,26 (2,62) | 6,72 (3,53) | 0,13 |
| EP Placebo | 7,57 (2,55) | 6,8 (3,08) | 0,003* |
| Sano Probiótico | 7,12 (1,92) | 6,94 (1,14) | 0,82 |
| Sano Placebo | 8,12 (1,38) | 7,27 (2,07) | 0,0003* |

Test no paramétrico Wilcoxon, *p<0,05 significativo

b) VFS

Por otra parte, el análisis de la variable VFS indicó que los sujetos que consumieron probiótico (con y sin EP) presentan una tendencia a una menor VFS, sin diferencia estadística, a los tres meses del consumo del lácteo. Similares resultados podemos apreciar en los grupos que consumieron placebo, en donde se observó una disminución de la VFS a los tres meses del consumo del lácteo, existiendo diferencia estadística sólo en el grupo con EP (Tabla 3).

Tabla 3: Valor estadístico de la variable VFS (se indica la mediana) en los grupos de estudio en T₀ y T₃.

| Grupos | VFS (Rango) T ₀ (ml/min) | VFS (Rango) T ₃ (ml/min) | Valor de p |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------|
| EP Probiótico | 0,44 (1,18) | 0,39 (0,85) | 0,41 |
| EP Placebo | 0,52 (1,18) | 0,33 (0,89) | 0,014* |
| Sano Probiótico | 0,42 (1,02) | 0,31 (0,44) | 1,0 |
| Sano Placebo | 0,49 (2,37) | 0,46 (1,56) | 0,08 |

Test no paramétrico Wilcoxon, *p<0,05 significativo

c) Análisis microbiológico

Portación de levaduras

Al realizar el análisis microbiológico de las muestras salivales provenientes de 40 sujetos con EP a T₀, se detectó que un 100% de estos portaban levaduras del género *Candida*, mientras que en el grupo sin la patología (26 sujetos) fue detectado un 57,7% de portadores de estos microorganismos. Por otra parte, se evidenció una diferencia estadística al comparar la portación de levaduras *Candida* de los grupos EP contra los grupos sanos a tiempo 0 meses (Tabla 4).

Tabla 4: Portación de levaduras del género *Candida* en el tiempo 0 meses.

| Grupos | Porta (n) | No Porta (n) | Total (n) | Valor de p |
|---|-----------|--------------|-----------|--------------------|
| EP Placebo | 20 | 0 | 20 | EP/Sanos 0,001* |
| EP Probiótico | 20 | 0 | 20 | |
| Sano Placebo | 12 | 8 | 20 | |
| Sano Probiótico | 3 | 3 | 6 | |
| Total Portación <i>Candida</i> | 55 | 11 | 66 | |

Test no paramétrico Wilcoxon, *p<0,05 significativo

El análisis microbiológico en T₃, muestra que existe un 100% de portación de levaduras *Candida* en sujetos con EP (n=40), mientras que en el grupo sin la patología (n=26) la portación de estos microorganismos fue de 57,7%. Cabe destacar que se evidenció una diferencia estadística en los resultados al comparar la portación de LGC de los grupos con EP contra los grupos sanos a tiempo 3 meses (Tabla 5).

Tabla 5: Portación de levaduras del género *Candida* en el tiempo 3 meses.

| Grupo | Porta (n) | No Porta (n) | Total (n) | Valor de p |
|---|-----------|--------------|-----------|--------------------|
| EP Placebo | 20 | 0 | 20 | EP/Sanos 0,001* |
| EP Probiótico | 20 | 0 | 20 | |
| Sano Placebo | 12 | 8 | 20 | |
| Sano Probiótico | 3 | 3 | 6 | |
| Total Portación <i>Candida</i> | 55 | 11 | 66 | |

Test no paramétrico Wilcoxon, *p<0,05 significativo

Recuento de Levaduras *Candida*

Los resultados de la comparación del recuento de LGC a los 0 y 3 meses del grupo con EP que consumía probiótico (mediana $T_0= 497$ (rango: 2037) UFC/ml y $T_3= 723,5$ (rango: 2349,75) UFC/ml), así como los de el grupo EP que consumió el lácteo placebo a los 0 y 3 meses (mediana $T_0= 933,2$ (rango: 1749,5) UFC/ml y $T_3= 704$ (rango: 2296) UFC/ml), presentaron valores de $p=0,17$ y $p=0,47$, respectivamente, no existiendo variaciones significativas de esta variable a lo largo del tiempo (Gráficos 1 y 2). Resultados similares se aprecian al comparar el grupo sano, a los 0 y 3 meses del estudio (mediana $T_0= 4,3$ (rango: 1857) UFC/ml y $T_3= 20,5$ (rango: 523) UFC/ml) en donde tampoco existe significancia en los resultados ($p=0,95$), (Gráfico 3).

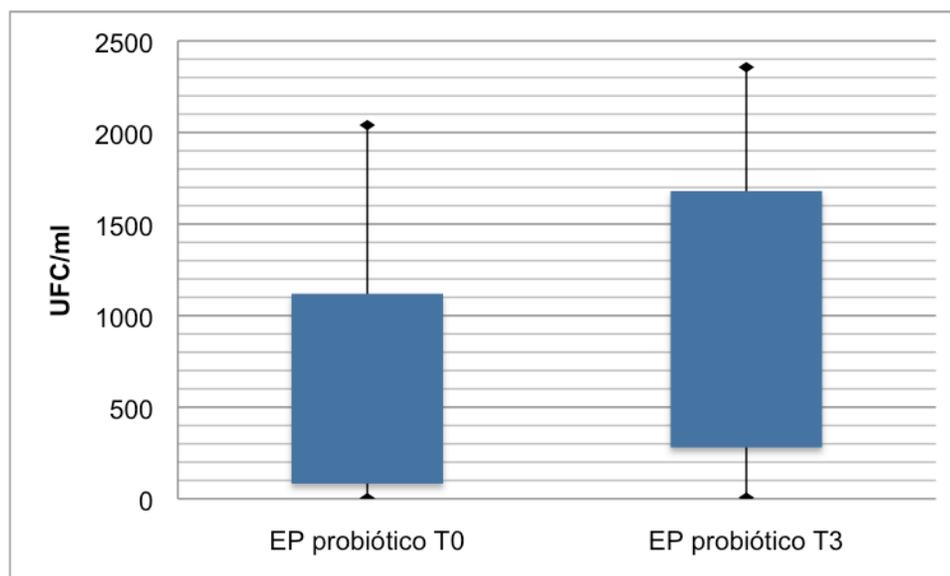


Gráfico 1: Recuento de LGC (UFC/ml) en sujetos con EP que consumieron lácteo con probiótico a tiempo 0 y 3 meses.

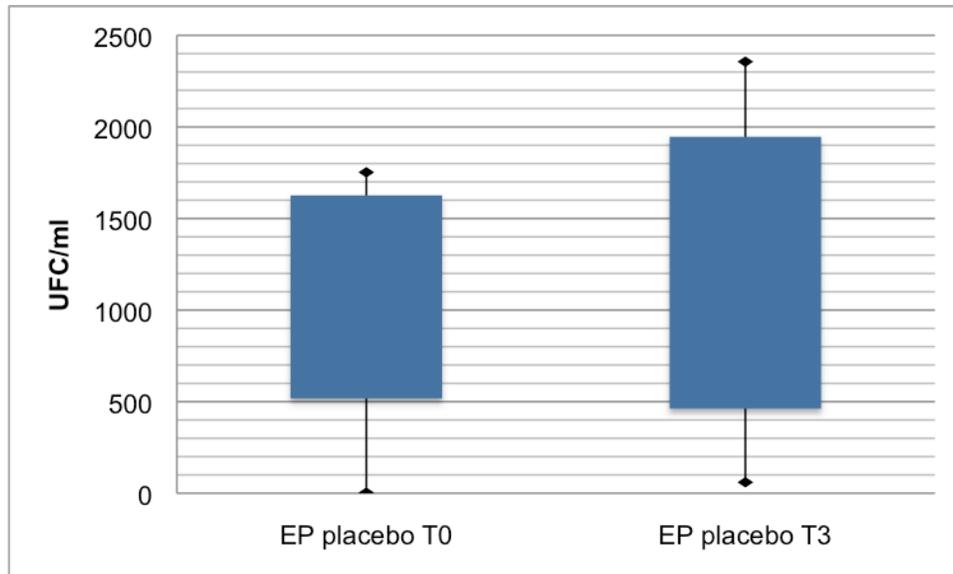


Gráfico 2: Recuento de LGC (UFC/ml) en sujetos con EP que consumieron lácteo sin probiótico a tiempo 0 y 3 meses.

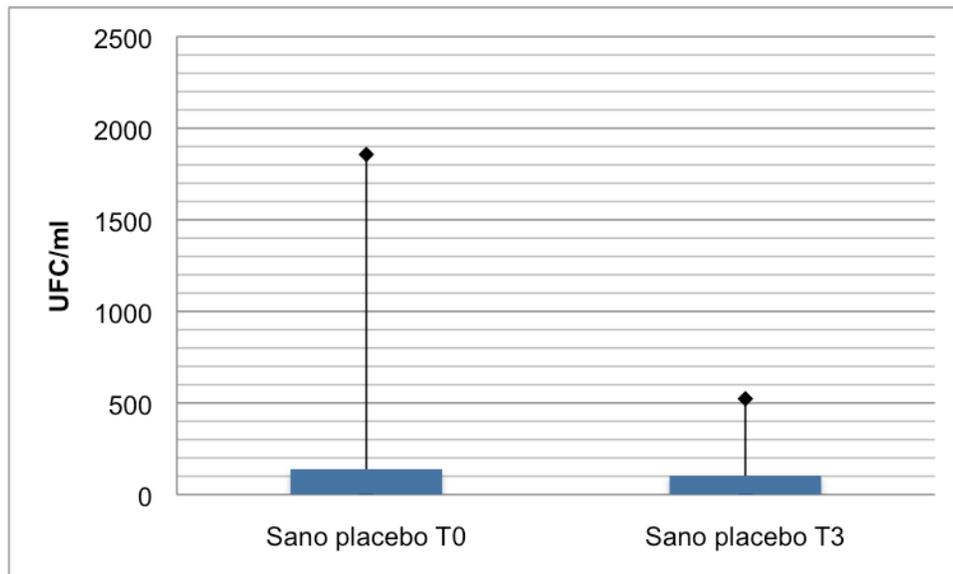


Gráfico 3: Recuento de LGC (UFC/ml) en sujetos sin EP que consumieron lácteo sin probiótico a tiempo 0 y 3 meses.

Identificación de levaduras

Los resultados de la identificación de especies de *Candida* mediante test bioquímico y/o PCR, muestran la presencia de 6 especies distintas de este género en los grupos analizados. La distribución de las especies identificadas en cada grupo de estudio, presentes al comienzo y a los tres meses de la aplicación del lácteo con probiótico o placebo, se observan en los gráficos 4 y 5, respectivamente. Cabe destacar que las especies *Candida* más prevalentes en los grupos de estudio antes de la aplicación del lácteo son *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis*, condición que se mantiene a los tres meses del estudio. También se puede observar que existe una mayor diversidad de especies en T₃, específicamente en el grupo EP placebo, en el cual aparece *C. membranifaciens* (Gráfico 5).

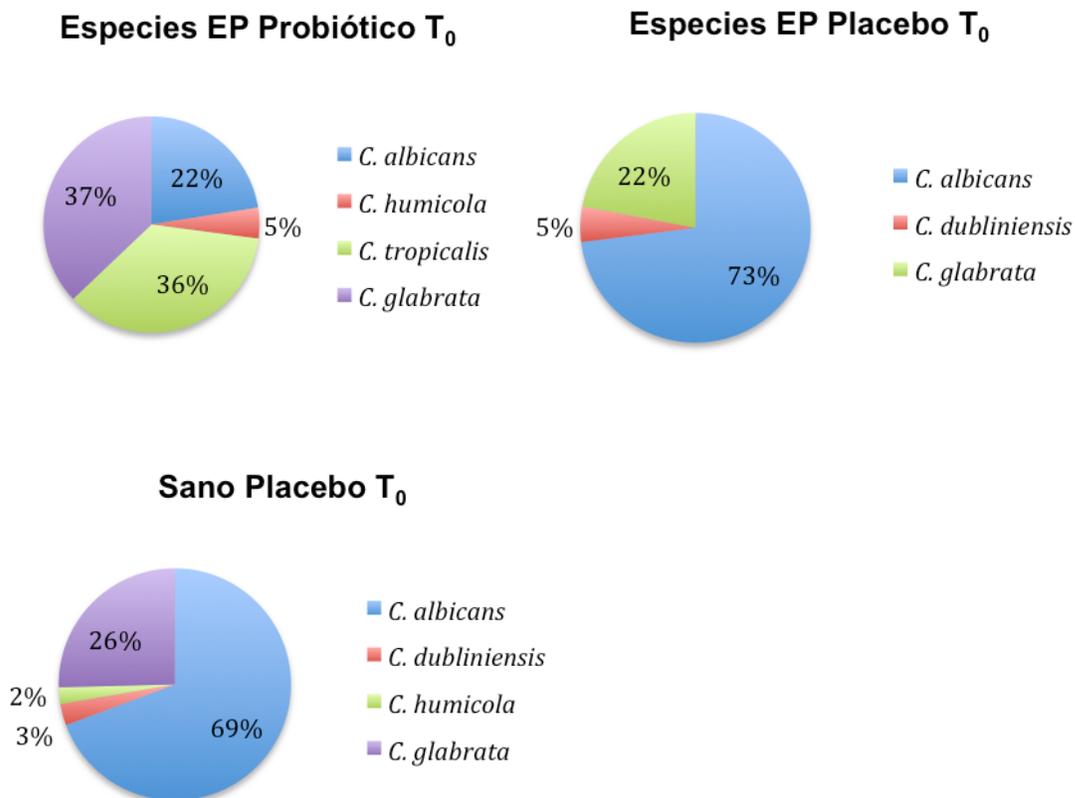
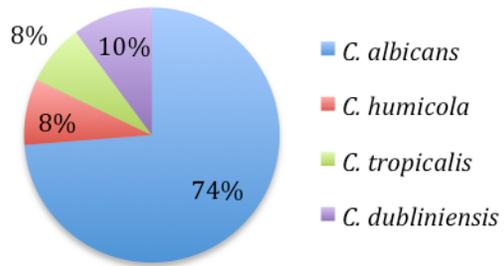
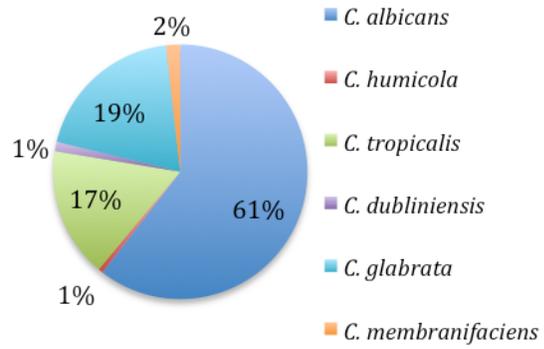


Gráfico 4: Distribución de las especies de levaduras *Candida* por grupos de estudio, a tiempo 0 meses.

Especies EP Probiótico T₃



Especies EP Placebo T₃



Sano Placebo T₃

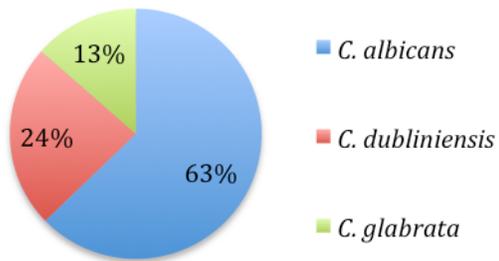


Gráfico 5: Distribución de las especies de levaduras *Candida* por grupos de estudio, a tiempo 3 meses.

Análisis de la asociación de las variables salivales y microbiológicas analizadas

Con respecto a la asociación de las variables microbiológicas y salivales, los resultados de la correlación de las variables pH con el recuento de LGC en los grupos EP probiótico y EP placebo, a los 0 y tres meses de la aplicación del lácteo, no muestran una correlación significativa, como se puede apreciar en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6: Correlación de pH con el recuento de LGC en los grupos EP Probiótico y EP Placebo a tiempo 0 meses.

| Variable | EP Probiótico T ₀ | EP Placebo T ₀ |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| pH/Recuento LGC T ₀ | r= 0,18 p= 0,43 | r= 0,35 p= 0,12 |

Coefficiente de correlación lineal de Pearson, $p < 0,05$ significativo.

Tabla 7: Correlación de pH con el recuento de LGC en los grupos EP Probiótico y EP Placebo a tiempo 3 meses.

| Variable | EP Probiótico T ₃ | EP Placebo T ₃ |
|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| pH/ Recuento LGC T ₃ | r= -0,2 p= 0,14 | r= 0,1 p= 0,66 |

Coefficiente de correlación lineal de Pearson, $p < 0,05$ significativo.

Resultados similares se observaron al relacionar la variable VFS con el recuento de LGC en los grupos EP probiótico y EP placebo a los 0 y 3 meses, en donde no existe una correlación significativa entre las variables antes mencionadas (Tablas 8 y 9).

Tabla 8: Correlación de VFS con el recuento de LGC en los grupos EP Probiótico y EP Placebo a tiempo 0 meses.

| Variable | EP Probiótico T ₀ | EP Placebo T ₀ |
|------------------|------------------------------|---------------------------|
| VFS/Recuento LGC | r= -0,34 | r= 0,29 |
| T ₀ | p= 0,13 | p= 0,21 |

Coefficiente de correlación lineal de Pearson, $p < 0,05$ significativo.

Tabla 9: Correlación de VFS con el recuento de LGC en los grupos EP Probiótico y EP Placebo a tiempo 3 meses.

| Variable | EP Probiótico T ₃ | EP Placebo T ₃ |
|------------------|------------------------------|---------------------------|
| VFS/Recuento LGC | r= 0,08 | r= -0,1 |
| T ₃ | p= 0,7 | p= 0,05 |

Coefficiente de correlación lineal de Pearson, $p < 0,05$ significativo.

6. Discusión

Este estudio se realizó para evaluar la eficacia del tratamiento probiótico sobre la portación, recuento, identificación de *Candida* y parámetros salivales en sujetos adultos mayores portadores de prótesis removible con EP asociado a candidiasis. Dicho estudio comprendió 66 sujetos portadores de prótesis removible, 40 de ellos (60,6%) con EP y 26 de ellos (39,4%) sin EP. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Espinoza y cols. (2003) y Salerno y cols. (2011), en donde se evidenció que la lesión oral más prevalente en los adultos mayores chilenos es la EP, la cual se ha encontrado entre un 60 a un 65% de los sujetos portadores de PR.

Con respecto a los parámetros salivales analizados en este estudio, los resultados de la medición del pH salival muestran que existe un descenso, sin diferencia significativa de esta variable, en los grupos con y sin EP, luego de tres meses de la aplicación del lácteo enriquecido con probiótico, a diferencia de los grupos control, en donde se evidenció una disminución significativa del pH, luego de tres meses de la aplicación del lácteo.

Se plantea que las alteraciones del pH salival aumentan el riesgo de infecciones favoreciendo el crecimiento y la adhesión de LGC (Farah y cols., 2010; Williams y cols., 2011; Kalaskar y cols., 2010; Chopde y cols., 2012). En relación a esto, la literatura muestra que existe una amplia relación entre una dieta rica en carbohidratos y un descenso del pH (Samaranayake y cols., 1985, 1986; Olsen y cols., 1976; Farah y cols., 2010). Por otra parte, la alta prevalencia de caries dental activas en adultos mayores (Murray, 2014), propicia una caída en los valores del pH salival, debido a las bacterias acidogénicas presentes en los *biofilms* de estas lesiones tanto en esmalte como en dentina (Selwitz y cols., 2007). Resultados similares se aprecian con el uso nocturno de las PR, que asociado a una mala higiene protésica, mantiene las condiciones anaerobias y un bajo pH salival, propiciando así el desarrollo de LGC (Gendreau y cols., 2011; Farah y cols., 2010).

De acuerdo a esto, es posible especular que la disminución de los valores del pH en los todos los grupos analizados, luego de tres meses de la aplicación del probiótico, podría relacionarse con las variables no controladas en este estudio, tales como la falta de higiene tanto oral como protésica, la dieta, la presencia de caries activas en los dientes remanentes y el uso nocturno de PR, las que enmascararan el real efecto del probiótico sobre el pH salival. Sin embargo, la disminución significativa de esta variable en los grupos control que consumieron el lácteo-placebo (EP placebo y Sano placebo), podría darnos una pista del efecto benéfico del lácteo enriquecido en la estabilización del pH salival de los grupos que consumieron el probiótico. Cabe destacar, que si bien existió una disminución del pH en todos los grupos, éste se mantuvo dentro de los rangos normales.

El segundo parámetro salival analizado en este estudio es la VFS, la cual cumple un rol fundamental en la mantención de la salud oral, por lo cual, una disminución en su flujo aumenta el riesgo de infecciones por *Candida* (Laurence, 2007). Esto puede ser explicado por que junto con el efecto de limpieza mecánica salival, las moléculas del sistema inmune presentes en saliva, interactuarían con las diferentes especies de *Candida*, interfiriendo en su adhesión y colonización en la mucosa oral (Pereira-Cenci y cols., 2008; Beiro y cols., 2002).

Hatakka y cols. (2007), al estudiar la efectividad del tratamiento con probióticos en la candidiasis oral en adultos mayores, observaron que el flujo de saliva no estimulada aumentó en el grupo que consumió probiótico y disminuyó en el grupo control, concluyendo que el uso regular de probióticos como medio profiláctico o terapéutico disminuye el riesgo de hiposalivación y boca seca. Nuestros resultados muestran que el análisis de la variable VFS en los sujetos con y sin EP, que consumieron el lácteo enriquecido con probiótico, presentan una menor VFS, sin diferencia estadística, a los tres meses de la aplicación del lácteo, a diferencia de los resultados obtenidos por los autores mencionados anteriormente. Resultados similares se observaron en el grupo de sujetos sanos que consumieron el probiótico. A pesar de esto, los valores de VFS de los grupos antes mencionados,

se mantuvieron dentro de los rangos normales de saliva no estimulada descritos por Sreebny y cols. (1992).

Diferentes resultados se observaron en el grupo con EP que consumió el lácteo-placebo, en donde se evidenció una disminución significativa de VFS a los tres meses del consumo de este, resultado que concuerda con los obtenidos por Hatakka y cols. (2007), en donde se evidenció una disminución de la VFS en el grupo control a las 16 semanas de tratamiento con probiótico.

En relación a esto, suponemos que la escasa variación de la VFS desde el inicio del estudio a los tres meses de la aplicación de éste, puede deberse a una serie de variables presentes en los adultos mayores estudiados, que influyen en VFS, las cuales no fueron controladas en este estudio, tales como la polifarmacia, enfermedades de base no controladas y la presencia de xerostomía (Murray y cols., 2014).

Por otra parte, el que exista una disminución significativa de la VFS en el grupo que consumió el lácteo-placebo, podría darnos una pista del efecto benéfico del probiótico en la salud general del paciente, como lo plantea Golledge y Riley (1996). Sin embargo, es importante destacar que en nuestro estudio no podemos asociar la disminución de la VFS como factor de riesgo de EP, puesto que los pacientes sanos también presentaron una disminución en esta variable. Debido a lo anterior, proponemos que es necesario realizar estudios posteriores, con mayor tiempo de tratamiento, para poder dilucidar de mejor manera el real efecto del probiótico sobre esta variable.

Al realizar el análisis microbiológico de 40 sujetos portadores de PR con EP se detectó una portación de levaduras del 100% tanto al comienzo del estudio (T_0), como a los tres meses de la aplicación de éste. Dichos resultados son similares a lo descrito en la literatura, en donde se plantea que un sobre crecimiento LGC, asociado a factores predisponentes del hospedero, se relaciona con el desarrollo de EP (Figueiral y cols., 2007; Gendreau y cols., 2011; Williams y cols., 2011; Farah y cols., 2010). Por otra parte, la evidencia sugiere que la portación

comensal de especies de LGC se produce aproximadamente en el 30 al 50% de los individuos clínicamente sanos (Williams y cols., 2011; Farah y cols., 2010). Esto concuerda con lo evidenciado en este estudio, en donde para el grupo sin la patología, es decir, portadores de PR sin EP, se observó que un 57,7% de los sujetos examinados portaron LGC, tanto al comienzo como a los tres meses del estudio, concordando con los resultados obtenidos por Rocha y cols. (2011). La importancia de esto radica en que los aislados de LGC de la cavidad oral no son suficientes por si solos para realizar un diagnóstico de un estado de enfermedad, sino que deben ser usado en conjunto con signos y síntomas clínicos de EP para establecer un diagnóstico.

Cabe destacar que los resultados del presente estudio demuestran que los recuentos de *Candida* son mayores en los sujetos con EP en comparación a sin EP, concordando con los hallazgos de Bilhan y cols. (2009) y Lee y cols. (2013).

Por otra parte, Hatakka y cols. (2007) realizaron un estudio doble ciego, aleatorizado controlado, para investigar el efecto del queso enriquecido con probiótico sobre la prevalencia de candidiasis oral en sujetos adultos mayores. En este estudio evidenciaron que el recuento de LGC se redujo en un 75% luego de 16 semanas de la aplicación del probiótico. En nuestro estudio no existieron diferencias significativas en el recuento de *Candida*, tanto en sujetos con EP como en sanos, luego de la aplicación durante tres meses (12 semanas) del lácteo enriquecido con probiótico. Es importante destacar que estos dos estudios no son completamente comparables entre sí, puesto que existen diferencias tanto en el tiempo de uso del probiótico, como en el vehículo usado para la aplicación de éste. Dicho estudio tampoco define si los adultos mayores portaban o no PR, así como si estos presentaban o no EP.

La evidencia sugiere que la rugosidad superficial protésica facilita la adhesión y colonización de levaduras tipo *Candida* (Pereira-Cenci y cols., 2013; Rocha y cols., 2011; Luo y Samaranayake, 2002), esto sumado a un mal ajuste protésico que produce inflamación de la mucosa oral, lo que altera su barrera protectora

predisponiendo a los tejidos a una posterior infección (Gendreau y cols., 2011; Salerno y cols., 2011). Basado en lo anterior, especulamos que la falta de higiene y el mal ajuste de las PR, facilita la re-infección de LGC a la mucosa oral desde la superficie protésica, impidiendo de esta manera una disminución en el recuento de *Candida* a los tres meses de la aplicación del lácteo enriquecido con probiótico.

Proponemos que, para complementar el uso de probióticos como coadyuvante en el tratamiento de EP, es necesario realizar un asesoramiento dietético e instruir en higiene oral y protésica a los portadores PR, así como reemplazar las PR mal ajustadas y eliminar el uso nocturno, para de esta manera, evitar una recolonización de levaduras *Candida* (Pereira-Cenci y cols., 2013; Webb y cols., 2005; Gendreau y cols., 2011).

En relación a la identificación de especies *Candida*, se evidenció que *C. albicans* fue la especie más prevalente en todos los grupos analizados, seguida de las especies CNA, tales como: *C. glabrata* y *C. tropicalis*, resultados similares a los descritos en la literatura (Webb y cols., 2005; Rocha y cols., 2011; Grimoud y cols., 2005; Meurman y cols., 2007).

La literatura muestra que la especie más prevalente en las infecciones fúngicas orales por CNA es *C. glabrata* (Li y cols., 2007), concordando con los datos obtenidos en nuestro estudio. Luo y Samaranayake (2002) evidenciaron *in vitro*, que *C. glabrata*, en comparación con *C. albicans*, demostró una mayor tendencia a adherirse a superficies acrílicas presentes en las PR. También es importante mencionar que debido a la disminución de la susceptibilidad a fluconazol, la candidiasis oral asociada a *C. glabrata*, requiere de dosis más altas de este antifúngico para ser tratada con éxito (Redding y cols., 2004). Sin embargo, Köhler y cols. (2012), plantean que bacterias del género *Lactobacillus*, cuando son usadas como probióticos, producen una disminución de la expresión de genes involucrados en la resistencia a fluconazol por parte de la levadura.

Por otra parte, Moran y cols. (2002) plantean que *C. tropicalis* es la especie más virulenta de las levaduras CNA, esto debido a su capacidad de adherirse a las células epiteliales *in vitro* y su capacidad para secretar niveles moderados de proteinasas, debido a esto y a los demás factores de riesgo de infecciones por CNA expuestos anteriormente, no es sorprendente que *C. glabrata* y *C. tropicalis* hayan sido identificadas como las levaduras predominantes, luego de *C. albicans*, en las infecciones fúngicas de los adultos mayores de este estudio.

Basándonos en lo anterior, debido a la alta la incidencia de especies de CNA en la cavidad oral de adultos mayores, el tratamiento con probióticos como coadyuvante al tratamiento convencional de la EP, toma gran relevancia. En base a los resultados obtenidos en este estudio, podemos especular que las infecciones fúngicas orales asociadas a CNA, al ser más difíciles de tratar, podrían impedir una disminución en el recuento de *Candida* a los tres meses de la aplicación del lácteo enriquecido con probiótico, por lo cual se hacen necesarios nuevos estudios, con mayor tiempo de tratamiento, en donde se pueda evidenciar más claramente el real efecto del probiótico.

Con respecto al análisis de asociación para las variables pH y recuento de *Candida* en esta investigación, no presentó correlación significativa para los grupos EP probiótico y EP placebo, a los 0 y tres meses de la aplicación del lácteo, no concordando con lo descrito en la literatura. Resultados similares se obtuvieron al analizar la asociación entre VFS y recuento de *Candida* en los grupos antes mencionados. En ese aspecto, es probable que los factores predisponentes locales y/o sistémicos del hospedero estén influyendo en los resultados (Gendreau y cols., 2011; Williams y cols., 2011; Salerno y cols., 2011), puesto que dichos factores no fueron controlados antes del tratamiento con probiótico, por lo que podrían influir en las variables estudiadas.

Cabe destacar que 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, para disminuir el error tipo II, además de homogeneizar la muestra en términos de salud general.

Por último, es importante mencionar que los resultados obtenidos en esta investigación representan información nueva 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 asociada a candidiasis oral.

7. Conclusiones

- Se observó una alta frecuencia de EP en pacientes portadores de PR que presentaron recuentos elevados de LGC. Sin embargo, dichos recuentos de la cavidad oral no son suficientes por si solos para realizar un diagnóstico de enfermedad, si no que deben ser usados en conjunto con signos y síntomas clínicos de EP para establecer un correcto diagnóstico.
- Se evidenció que *C. albicans* fue la especie más prevalente encontrada en la cavidad oral, tanto en salud como en enfermedad, lo cual puede ser explicado por una serie de factores de virulencia presentes en esta especie, que no se encuentran en las especies CNA.
- La incidencia de CNA en el desarrollo de EP en adultos mayores es cada vez mayor, debido al desarrollo de nuevas terapias médicas, el uso de antibióticos de amplio espectro y la inmunosupresión, razón por la cual el tratamiento con probióticos, como coadyuvante al tratamiento convencional de EP, toma gran relevancia.
- En este estudio, no podemos asociar las características salivales, pH y VFS, al recuento y colonización de LGC, así como al desarrollo de EP en adultos mayores, puesto que los pacientes sanos también presentaban alteraciones en dichos parámetros.
- Existen variables que no fueron controladas antes del tratamiento con probiótico, tales como la higiene oral y protésica, la polifarmacia y las enfermedades de base presentes en los sujetos estudiados, que probablemente influyeron en los resultados obtenidos. Por lo cual, proponemos controlar dichas variables, en estudios posteriores, antes del tratamiento con probiótico, reduciendo de esta forma el sesgo en los resultados.
- A pesar de no obtener resultados significativos del efecto del probiótico sobre las variables analizadas, este estudio nos entregó pistas de su efecto

benéfico en la salud oral. Proponemos que se hacen necesarios estudios con mayor tiempo de tratamiento, para poder dilucidar de mejor manera sus efectos sobre dichas variables.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alem M, Fattani A, Douglas L.J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *C. tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 55:999–1008.
- Badet C, Thebaud N. (2008). Ecology of Lactobacilli in the oral cavity: A review of literature. *Open Microbiology Journal*. 2: 38-48.
- Beiro R, Vidal I, Vidal M, Orgeira J. (2002). Factores predisponentes locales de la candidiasis oral. *Medicina general*. 40: 24-27.
- Bengmark S. (2000). Bacteria for optimal health. *Nutrition*. 16: 611-615.
- Bilhan H, Sulun T, Erkose, G Kurt H, Erturan Z, Kutay O, Bilgin T.(2009). The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. *Clinical Oral Investigations*. 13:363-368.
- Brooks G, Butel J, Morse S. (2002). Microbiología médica. (17a ed). El Manual Moderno. 5: 661-96.
- Budtz-Jorgensen E. (2000). Ecology of *Candida*-associated denture stomatitis. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 12: 170-85.
- Caglar E, Kargul B, Tanboga I. (2005). Bacteriotherapy and probiotics role on oral health. *Oral Diseases*. 11: 131-137.
- Chopde N, Jawale B, Pharande B, Chaudhari L, Hiremath V, Redasani R. (2012). Microbial colonization and their relation with potential cofactors in patients with denture stomatitis. *Journal of Contemporary Dental Practice*. 13: 456-459.
- Daef E, Moharram A, Eldin S, Elsherbiny N, Mohammed M. (2014). Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45: 255-262.
- Elmer G, Surawicz C, McFarland L. (1996). Biotherapeutic agents. *Journal American of Microbiology Association*. 275: 870–876.
- Emami E, Taraf H, de Grandmont P, Gauthier G, de Koninck L, Lamarche C y cols. (2012). The association of denture stomatitis and partial removable dental

- prostheses: a systematic review. *International Journal of Prosthodontics*. 25: 113–119.
- Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J (2003). Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 32: 571–575.
 - FAO/WHO, Joint. (2001). Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food. *FAO Food Nutrition Paper*. 85: 5-20.
 - Farah C, Lynch N, McCullough M (2010). Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Australian Dental Journal* 55: 48–54.
 - Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S y cols. (2011). Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *Journal of Prosthodontics*. 20: 1–12.
 - Figueiral M, Azul A, Pinto E, Fonseca P, Branco F, Scully C. (2007). Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors a large cohort. *Journal of oral rehabilitation*. 34: 448-455.
 - Fuller R. (1997). Probiotics 2: Applications and practical aspects. Chapman & Hall. 1.
 - Gendreau L, Loewy Z. (2011). Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of Prosthodontics* 20: 251–260.
 - Gibson G. (1998). Dietary modulation of the human gut microflora using probiotics. *British Journal of Nutrition* 80: 209–212.
 - Golledge C, Riley T. (1996). Natural therapy for infectious diseases. *The Medical journal of Australia*. 164: 94-95.
 - Grimoud A, Lodter J, Marty N, Andrieu S, Bocquet H, Linas M y cols. (2005). Improved oral hygiene and *Candida* species colonization level in geriatric patients. *Oral Diseases*. 11: 163-169.
 - Gupta G (2011). Probiotics and periodontal health. *Journal of Medicine and Life*. 14: 387-94.
 - Hatakka K, Savilahti E, Ponka A (2001). Effect of long term consumption of

probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *British Medical Journal*. 2: 1318–1319.

- Hatakka K., Ahola A., y cols. (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly. A randomized controlled trial. *Journal of Dental Research*. 86: 125- 130.
- Haukioja A (2010). Probiotics and Oral Health. *European Journal of Dentistry*. 4: 348-355.
- Heintze U, Birkhed D, Bjornhd (1983). Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swedish Dental Journal*. 7: 227-238.
- Hilton E, Isenberg H, Alperstein P (1992). Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Annals of Internal Medicine*. 116: 353–357.
- Huuonen S, Haioka B, Oikarinen K, Söderholm AL, Remes-Lyly T, Sipilä K. (2012). Residual ridge resorption, lower denture stability and subjective complaints among edentulous individuals. *Journal of Oral Rehabilitation*. 39: 384-390.
- 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. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*. 22: 177-180.
- Koeck B. (2007) *Prótesis Completas*. (4a ed.) Urban and Fischer. 13: 344-346.
- Kôhler G, Assefa S, Reid G. (2012): Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infectious Diseases in Obstetric and Gynecology*. Vol. 2012, ID: 636474.
- Laurence J. (2007). Aspectos clínicos de biología salival para el Clínico. *International Dentistry South Africa*. 9: 22-41.
- Lee X, Gómez L, Vergara C, Astorga E, Cajas N, Ivankovic M. (2013). Association between presence of *Candida* yeasts and elderly patient factors with

and without denture stomatitis. *International Journal of Odontostomatology*. 7: 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. *Analytical Biochemistry*. 433: 121-31.
- Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. (2007). *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of Dental Research*. 86: 204-215.
- Luo G, Samaranayake L. (2002). *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 110: 601-610.
- Meurman J. (2005): Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry?. *European journal of Oral Sciences*. 113: 188- 196.
- Meurman J, Siikala E, Richardson M, Rautema R. (2007). Non-*Candida albicans* yeast of the oral cavity. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. 1: 719-731.
- Ministerio de Salud. (2010) Guía clínica salud oral integral para adultos de 60 años. Santiago. MINSAL.
- Ministerio de Desarrollo Social (2013). Encuesta de Caracterización Socioeconómica Nacional (CASEN), Resultados Adulto Mayor. Santiago, Chile.
- Misrachi C, Lamadrid S. (1997). Salud Oral y Conductas Asociadas en Adultos Mayores de Bajos Recursos. *Cuadernos Médico Sociales*. 38: 79-86.
- Moran G, Sullivan D, Coleman D. (2002). Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens. *Candida and candidiasis*. ASM Press. 37-53.
- Murray T. (2014). Epidemiology of oral health conditions in older people. *Gerodontology*. 31: 9-16.
- Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. (2009). Microbiología médica. (6a ed.) Elsevier. 7: 679-791.
- Naidu A, Bidlack W, Clemens R. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical reviews in food science and nutrition*. 39: 13–126.

- Noverr M, Huffnagle G. (2004). Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infection and Immunity*. 72: 6206–10.
- Odds F, Bernaerts R. (1994). CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:1923-1929.
- Olsen I, Bikkeland J. (1976). Initiation and aggravation of denture stomatitis by sucrose rinses. *Scandinavian Journal Dental Research*. 84: 94-97.
- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, et al (1995). Immune system stimulation by probiotics. *Journal of Dairy Science*. 78: 1597–1606.
- Pereira-Cenci T, Del bel Cury A, Crielaard W, Ten J. (2008). Development of candida associated denture stomatitis: new insights. *Journal Applied Oral Science*. 16: 86-94.
- Pereira-Cenci T, Fernandes F, Skupien J, Mesko M, Straioto F, Del Bel Cury A. (2012). Can new dentures decrease *Candida* levels?. *The International journal of prosthodontics*. 26: 470-477.
- Redding S, Dahiya M, Kirkpatrick W, Coco B, Patterson T, Fothergill A y cols. (2004). *Candida glabrata* is an emerging cause of oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation for head and neck cancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 97:47-52.
- Rocha J, Ferreira dos Santos S, Piero M, Jorge A, Cardoso A, Faria M. (2011). Correlation between factors associated with the removable partial dentures use and *Candida* spp. in saliva. *Gerodontology*. 28: 283–288.
- Romeo O, Racco C, Criseo G. (2006). Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *Journal Clinical Microbiology*. 44: 2590-2592.
- Salerno C, Pascale M, Contaldo M and cols. (2011). *Candida* asociada a estomatitis protésica. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 16: 139-43.
- Samaranayake L, MacFarlane T. (1985). On the role of dietary carbohydrates in the pathogenesis of oral candidosis. *FEMS microbiology letters*. 27: 1-5.

- Samaranayake L. (1986). Nutritional factors and oral candidosis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 15: 61-65.
- Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S, Black R (2006): Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhea: a meta-analysis of masked, randomized, placebo-controlled trials. *Lancet Infectious Diseases*. 6: 374-382.
- Selwitz R, Ismail A, Pitts N. (2007). Dental caries. *The Lancet*. 369: 51-59.
- Shimizu C, Kuriyama T, Williams D, Karasawa T, Inoue K, Nakagawa K, Yamamoto E (2008): Association of oral yeast carriage with specific host factors and altered mouth sensation. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology*. 105: 445–451.
- Sreebny L, Banoczy J, Baum B, Edgar W, Epstein J, Fox C, y cols. (1992). Saliva: Its role in health and disease. *International Dental Journal*. 42: 291-304.
- Stamatova I, Meurman J. (2009). Probiotics: health benefits in the mouth. *American Journal of Dentistry*. 22: 329-338.
- Thein Z, Samaranayake Y, Samaranayake L. (2007). Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Archives Oral Biology*. 52:1200-1208.
- Webb B, Thomas C, Willcox M, Harty D, Knox K. (1998). *Candida*- associated denture stomatitis. A etiology management: a review. Part I. Factors influencing distribution of *Candida* Species in the oral cavity. *Australian Dental Journal*. 43: 45- 50.
- Webb B, Thomas C, Whittle T. (2005). A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology*. 22:168-176.
- Williams D, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis M (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000*. 55: 250–265.

8.1 PAGINAS WEB VISITADAS

- ENS 2010: Encuesta Nacional de Salud 2009- 2010, Ministerio de Salud Chile. [URL <http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/99bbf09a908d3eb8e04001011f014b49.p> disponible:

df (acceso julio 2015)].

- ENS 2003: Encuesta Nacional de Salud 2003. [URL disponible en: <http://www.medicinadefamiliares.cl/Protocolos/encnacsalres.pdf> (acceso julio 2014)].
- INE: Instituto Nacional de Estadísticas, Compendio estadístico 2013. [URL disponible: http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/COMPENDIO_2013.pdf (acceso julio 2015)].

9 ANEXOS.

9.1 Anexo 1: Consentimiento informado



Fecha de edición: 20 de agosto de 2013

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROTOCOLO : **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**

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 porte, 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: **EFEECTO 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 3. Secundaria
2. Primaria 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 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

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

1. Tipo I
2. Tipo II
3. Tipo III

UBICACIÓN MAXILAR

1. Paladar duro
2. Paladar
3. Reborde alveolar

UBICACIÓN MANDIBULAR

1. Reborde alveolar
2. Otra ubicación (especifique):
.....

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

