



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

“Efecto de leche suplementada con probiótico en el recuento y diversidad de levaduras del género *Candida* asociado a pH y velocidad de flujo salival, en adultos mayores portadores de prótesis removible con estomatitis protésica”

Daniela Camila Rojas Sánchez

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

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan Pablo Aitken Saavedra

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Carla Lozano Moraga
Dra. Ximena Lee Muñoz

TUTOR EXPERTO

Dr. Cristian Vergara Núñez

Adscrito a Proyecto FONIS SA13I20116

Santiago – Chile

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

“Efecto de leche suplementada con probiótico en el recuento y diversidad de levaduras del género *Candida* asociado a pH y velocidad de flujo salival, en adultos mayores portadores de prótesis removible con estomatitis protésica”

Daniela Camila Rojas Sánchez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan Pablo Aitken Saavedra

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Carla Lozano Moraga

Dra. Ximena Lee Muñoz

TUTOR EXPERTO

Dr. Cristian Vergara Núñez

Adscrito a Proyecto FONIS SA13I20116

Santiago – Chile

2016

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carla Lozano y Dr. Juan Pablo Aitken por su tiempo, excelente disposición, dedicación, enseñanzas, paciencia y apoyo fundamental para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Ximena Lee por permitirme participar de este proyecto, por su consejo y ayuda cada vez que lo necesite. Al Dr. Cristián Vergara por su participación en los análisis estadísticos de esta investigación, gracias por su paciencia y sus enseñanzas.

A la gente del Laboratorio de Bioquímica, en especial a Andrea por su buena disposición y ayudarme a resolver mis dudas cuando no estaba la profe Carla en el laboratorio.

A mis padres, Betsabé y Adolfo, por su entrega e inmenso apoyo y cariño durante toda mi vida, a mi hermana Betsy que siempre me dio ánimo en los momentos difíciles, y a mi hermano Rodrigo que también me entregó todo su apoyo. A Nicolás por su comprensión, cariño y apoyo incondicional; y a mis amigos que me acompañaron y me mandaron buenas vibras en todo momento.

Al proyecto FONIS SA13I20116 y a todos los que forman parte de este gran proyecto.

INDICE

RESUMEN.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.2 ESTOMATITIS PROTÉSICA.....	5
Epidemiología.....	5
Diagnóstico y Clasificación.....	5
Etiología y Factores predisponentes.....	6
1.3 LEVADURAS DEL GÉNERO <i>CANDIDA</i>	8
Patogénesis y Mecanismos de virulencia.....	9
<i>Candida albicans</i>	10
<i>Candida no Candida albicans</i>	11
1.4 ROL DE LA SALIVA EN EL MANTENIMIENTO DE LA SALUD ORAL.....	13
Relación de velocidad de flujo salival con levaduras del género <i>Candida</i>	14
Relación de pH salival con levaduras del género <i>Candida</i>	15
1.5 TRATAMIENTO DE ESTOMATITIS PROTÉSICA.....	16
Tratamiento convencional.....	16
Tratamiento complementario- Uso de probióticos.....	17
1.6 RELACIÓN DE PROBIÓTICOS CON PARAMETROS SALIVALES.....	19
1.7 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
2. HIPÓTESIS.....	22
3. OBJETIVO GENERAL.....	22

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1 Tipo de estudio.....	23
4.2 Población objetivo y Muestra.....	23
4.3 Criterios de inclusión y exclusión.....	24
4.4 Preparación de las bebidas lácteas.....	25
4.5 Técnicas de recolección de la información.....	25
4.6 Procesamiento de las muestras.....	26
4.7 Plan de análisis de datos.....	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Caracterización de la Muestra.....	31
5.2 Análisis de características salivales por grupo, a Tiempo 0 y 6 meses del consumo del lácteo.....	32
5.3 Análisis de recuento de LGC (UFC/ml) por grupo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.....	38
5.4 Análisis de identificación de especies de LGC por grupo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.....	41
5.5 Asociación de pH con especies de LGC por grupo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.....	45
5.6 Asociación de VFS con especies de LGC (UFC/ml) por grupo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.....	50
6. DISCUSIÓN.....	56
7. CONCLUSIONES.....	66
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

9. ANEXOS.....	77
9.1 Anexo1: Consentimiento informado.....	77
9.2 Anexo 2: Ficha clínica.....	83

ABREVIACIONES

EP	Estomatitis protésica
AM	Adultos mayores
PR	Prótesis removible
LGC	Levaduras del género <i>Candida</i>
CNCA	<i>Candida no Candida albicans</i>
ELEAM	Establecimientos de larga estadía para adultos mayores
FOUCH	Facultad de Odontología, Universidad de Chile
SENAMA	Servicio Nacional del adulto mayor
ENS	Encuesta nacional de salud
FAO/WHO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization</i>
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
API	<i>Analytical Profile Index</i>
VFS	Velocidad de flujo salival
SD	Desviación estándar

RESUMEN

Introducción: La estomatitis protésica (EP) es una de las lesiones orales más frecuentes en adultos mayores (AM) portadores de prótesis removible (PR). Alteraciones salivales asociadas al envejecimiento, como acidificación y disminución de velocidad de flujo salival (VFS), favorecería la proliferación de levaduras del género *Candida* (LGC), microorganismos generalmente asociados a EP. Los probióticos, microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas brindan beneficios a la salud del hospedero, podrían modificar parámetros salivales y consecuentemente, el recuento y diversidad de especies del género *Candida*. El objetivo de esta investigación es determinar el efecto del consumo de leche suplementada con probiótico, durante 6 meses, en el recuento y diversidad de especies del género *Candida* asociado a cambios en el pH y VFS de AM, portadores de PR con EP.

Materiales y métodos: 53 AM portadores de PR, con y sin EP, consumieron diariamente y durante 6 meses leche suplementada con cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG o con placebo. Se tomó y procesó muestras de saliva no estimulada al inicio del estudio (T0) y a los 6 meses después del consumo del lácteo (T6). Las variables estudiadas fueron pH, VFS, recuento y especies del género *Candida*. Se utilizaron los test estadísticos Wilcoxon y t-test, considerando una significancia del 95%. Las especies de LGC y su asociación con parámetros salivales se analizaron descriptivamente.

Resultados: El consumo de leche con probiótico disminuyó el recuento de LGC en los AM con EP, con diferencia estadística. *C. albicans* disminuyó pero siguió siendo la especie más prevalente, independiente del tipo de leche consumida. El perfil de *Candida* no *Candida albicans* (CNCA) fue modificado en todos los grupos de estudio. En T0, *C. albicans* fue la especie más prevalente a pH<6,5 y en AM con hiposialia. CNCA presentó mayor diversidad a un pH cercano a la neutralidad o alcalino (pH>7,1) y a flujos salivales normales, en AM con EP. En T6, la asociación entre diversidad de especies del género *Candida* y parámetros salivales sufrió una modificación, independiente del tipo de leche consumida. Se observó una

disminución con diferencia estadística en las variables pH y VFS solo en el grupo con EP que consumió leche con placebo.

Conclusiones: En nuestro estudio, el consumo de leche suplementada con cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus GG* fue eficaz en la reducción del recuento de levaduras del género *Candida* en la cavidad oral, de AM portadores de PR con EP. No fue posible comprobar su efecto en el pH salival, VFS, diversidad de especies del género *Candida* y en su asociación con alteraciones salivales.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 INTRODUCCIÓN

Nuestro país está viviendo una etapa de transición al envejecimiento demográfico de su población, al igual que los países desarrollados. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, en el año 2002 existían en el mundo 600 millones de personas mayores de 60 años, cifra que se duplicaría en el año 2025 y que llegaría a los 2 billones de personas para el año 2050. Internacionalmente, se ha definido que adulto mayor es toda persona que ha cumplido 60 años, sin diferencia entre hombres y mujeres (MINSAL, 2010).

En Chile, la distribución etaria de la población ha variado significativamente desde mediados del siglo pasado hasta la actualidad. En 1960 la población adulta mayor alcanzaba el 7,4% y en el año 2000 esta cifra aumentó a un 10,2% del total de la población. De acuerdo al censo de 2002, el 11,4% de la población chilena tenía 60 o más años, sin embargo, en los próximos 20 años se estima una tasa de crecimiento de 3,7% anual para este grupo etario. En consecuencia, para el año 2020 se proyecta que la población adulta representará el 17,3% del total país (Olivares, 2006). En 2006, en la región Metropolitana, los adultos mayores (AM) correspondían al 12,2% de la población, aumentando a un 16,5% en el año 2013 (Encuesta CASEN, 2013). Así mismo, se ha descrito que nuestras expectativas de vida han aumentado más de lo proyectado y bordean los ochenta años, en promedio para ambos sexos, siendo mayor esta cifra en mujeres (SENAMA, tercera encuesta nacional de calidad de vida en la vejez, 2013).

El envejecimiento es un complejo fenómeno biológico que deriva de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Este proceso afecta a todos los tejidos y órganos del cuerpo; los tejidos orales y periodontales no son la excepción. Los AM son el grupo más afectado en su salud oral, fenómeno que habitualmente ocurre por no haber recibido de manera oportuna medidas de prevención y tratamientos adecuados, lo que se ve reflejado en el aumento de patologías orales como caries dental, enfermedades gingivales y periodontales, e incluso pérdidas dentarias (Petersen y Yamamoto, 2005). Además, en este grupo etario se observan diversos

cambios debido al propio envejecimiento, tales como el adelgazamiento y reducción de la vascularización en los tejidos de revestimientos de la mucosa oral, así como la disminución de la altura del hueso alveolar. Esto último, por predominio de los procesos de reabsorción por sobre la reparación. Finalmente, también se aprecian cambios cualitativos y cuantitativos en la función salival, debido a la atrofia de los acinos glandulares o al efecto secundario de algún medicamento (MINSAL, 2010).

Las actuales tasas de edentulismo de la población adulta internacional han sido estimadas entre un 7 y 69% (Gleiznys y cols., 2015). En la encuesta nacional de salud (ENS) del año 2003, se evaluó el estado de salud oral de las personas, estableciendo que el 25% de la población total usaba prótesis dental, en mayor medida las mujeres (30%) que los hombres (19%), siendo más frecuente la prótesis de maxilar superior (15%) que la del inferior (<1%). Respecto a los adultos de 65 años o más, se evidenció una gran cantidad de individuos edéntulos, estableciendo que solamente un 0,7% de la población adulta mantuvo todos sus dientes, un 33,4% correspondieron a desdentados totales y un 75% a desdentados parciales. De estos últimos, un 37,1% eran portador de PR en ambos maxilares, 25,3% en maxilar superior y 0,8% en inferior. También se observó que las mujeres fueron consistente y significativamente más desdentadas que los hombres. Además, se reportó que entre los AM solo el 7,5% visita al dentista regularmente y que el 50,9% de ellos consulta para confeccionar prótesis dental por razones estéticas. Según la ENS de 2009-2010, la prevalencia de la percepción de necesidad de uso de prótesis dental, en el grupo de 65 o más años, correspondió a un 55,3%. Los datos mencionados anteriormente revelan el gran daño a nivel oral de este grupo etario, a esto hay que agregar, que gran parte de los AM carecen de la destreza manual apropiada para eliminar la placa dental de los aparatos protésicos y dientes, lo cual favorecería el desarrollo de infecciones oportunistas de la mucosa oral, particularmente bacterianas y fúngicas (Gleiznys y cols., 2015).

En nuestro país existe una alta prevalencia de trastornos orales, principalmente en este grupo etario. Espinoza y cols. (2003) determinaron que la prevalencia de lesiones en la mucosa oral en AM de la región Metropolitana, correspondió a un

53%, siendo la estomatitis protésica (EP) la lesión más común con un 22,3%, seguida por hiperplasia irritativa (9,4%) y varicosidades de la mucosa oral (9%). Adicionalmente, establecieron que el 34% de los sujetos con EP eran portadores de PR.

1.2 ESTOMATITIS PROTÉSICA

La EP corresponde a un proceso inflamatorio de la mucosa de soporte de diversa extensión y severidad, en sujetos parcial o totalmente desdentados, portadores de PR generalmente en mal estado (Figueiral y cols., 2007).

Epidemiología

Esta lesión es considerada una de las patologías más prevalentes a nivel oral, la cual varía entre el 6,5 al 75% de acuerdo a la población estudiada (Emami y cols., 2012), afectando alrededor del 60 al 75% de los portadores de prótesis (Salerno y cols., 2011). En general, se ha descrito una mayor prevalencia de EP en individuos de edad avanzada y de género femenino (Gendreau y Loewy, 2011; Marinovski y cols., 2014). Múltiples estudios han evaluado la prevalencia de la EP en individuos de edad avanzada, la cual varía entre un 15 a 71% (Gendreau y Loewy, 2011). Por otra parte, existen estudios que han demostrado que esta patología se puede presentar en maxilar y en mandíbula; sin embargo, se asocia más frecuentemente con el maxilar, afectando específicamente al paladar duro (Figueiral y cols., 2007; Gleiznys y cols., 2015). En un estudio realizado en nuestro país, se estableció que un 68% de los pacientes portadores de PR presentaba alteraciones en la mucosa palatina compatibles con EP (Gutiérrez y cols., 2013).

Diagnóstico y Clasificación

Habitualmente la EP es asintomática, presentándose en una minoría de los pacientes con dolor, prurito o sensación de ardor, alteraciones de gusto y disfagia (Gendreau y Loewy, 2011; Gleiznys y cols., 2015). El diagnóstico de esta

patología es fundamentalmente clínico, las características varían desde pequeñas áreas hiperémicas localizadas, hasta lesiones hiperplásicas que dibujan el contorno de la base de la prótesis. De acuerdo con la severidad de la lesión el aspecto clínico se puede modificar, lo cual ha originado clasificaciones clínicas particulares. La clasificación más utilizada corresponde a la descrita por Newton (Tabla 1) (Ayuso y cols., 2004; Marinoski y cols., 2014).

Tabla 1: Clasificación propuesta por Newton de EP según severidad y características clínicas.

SEVERIDAD	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
Tipo I	Inflamación localizada puntiforme.
Tipo II	Mucosa eritematosa con inflamación difusa y amplia en relación con la zona de contacto protésico.
Tipo III	Lesión inflamatoria crónica con hiperplasia papilar.

Etiología y Factores predisponentes

Diversos estudios indican que la etiología de la EP es multifactorial, siendo asociada a factores locales (protésicos e infecciosos) y factores sistémicos del hospedero (Figueiral y cols., 2007; Bilhan y cols., 2009; Gendreau y Loewy, 2011). Respecto a los factores locales, se ha descrito que desajustes protésicos provocarían lesiones traumáticas e irritación en las mucosas adyacentes a las prótesis. La EP también se ha relacionado a oclusión inestable, reducción de la dimensión vertical y antigüedad protésica (Figueiral y cols., 2007). Sumado a esto, el uso protésico continuo y el uso de aparatos protésicos durante la noche pueden producir lesiones microtraumáticas (Gendreau y Loewy, 2011; Marinoski y cols., 2014). Otros factores predisponentes corresponden a cambios cuantitativos y cualitativos salivales, como disminución del pH salival y del flujo salival. Así también, esta patología se ha asociado a reacciones de hipersensibilidad a componentes del acrílico de las prótesis (Figueiral y cols., 2007; Bilhan y cols., 2009).

Por otra parte, entre los factores predisponentes una higiene dental y protésica deficiente podrían contribuir al desarrollo de EP (Figueiral y cols., 2007; Bilhan y cols., 2009). Cuando la prótesis removible no es higienizada de forma correcta se desarrolla rápidamente en su superficie un *biofilm* (comunidades de microorganismos inmersos dentro de una matriz extracelular), compuesto por hongos y bacterias, capaces de colonizar la mucosa oral y jugar un rol importante en la inflamación producida durante la EP (Gendreau y Loewy, 2011). Se ha propuesto que bacterias del género *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Klebsiella*, presentes en la cavidad oral, podrían participar en el desarrollo de esta patología (Pardi y Cardozo, 2003). Respecto a los hongos, diversos estudios han demostrado que existe asociación entre la presencia de levaduras del género *Candida* (LGC) y EP (Lee y cols., 2013).

En relación a los factores predisponentes sistémicos, se ha descrito que deficiencias nutricionales, medicamentos inmunodepresores, antibióticos de amplio espectro y patologías sistémicas tales como, diabetes mellitus, VIH, cáncer, entre otras, favorecen la colonización de LGC y por consiguiente podrían afectar al desarrollo de EP (Figueiral y cols., 2007; Salerno y cols., 2011; Emami y cols., 2012). También se ha asociado esta patología a tabaquismo y dieta rica en hidratos de carbonos. Respecto a esto último, se ha descrito que LGC adheridas al acrílico de prótesis dentales, proliferan en mayor grado en medios suplementados con altas concentraciones de carbohidratos (Hernández y cols., 2009; Salerno y cols., 2011).

Entre todos los factores asociados con su etiología, el que se encuentra más directamente relacionado con EP es la presencia de LGC (Figueiral y cols., 2007; Zoromodiam y cols., 2011). Múltiples estudios han descrito una fuerte asociación entre LGC y características inflamatorias en sujetos con EP (Gendreau y Loewy, 2011). Respecto a esto, Gutiérrez y cols. (2013) aislaron al menos una especie de LGC en un 74,6% de los individuos con EP, portadores de estas levaduras. Por otra parte, se ha observado que cuando el recuento de estas levaduras en saliva es mayor o igual a 400 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), hay

un aumento en la incidencia de EP, la especie más aislada del género es *Candida albicans* (Abaci y cols., 2010). El rol de LGC y específicamente de *C. albicans* en el desarrollo de EP se asocia con el crecimiento excesivo de estas levaduras en las superficies de los aparatos protésicos y en la mucosa oral (Dar-Odeh y cols., 2012).

1.3 LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA*

Las levaduras del género *Candida* (LGC) corresponden a hongos pertenecientes al reino fungi, división *Ascomycota* (Kurtzman y cols., 2011). Son microorganismos eucariontes que se reproducen asexualmente por gemación. Corresponden a células levaduriformes redondeadas u ovaladas de 2 a 4 μm , capaces de experimentar cambios fenotípicos reversibles desde levaduras a pseudohifas o hifas bajo ciertas condiciones ambientales, sin embargo, no todas las especies del género pueden experimentar esta transición morfológica (Webb y cols., 1988; Mata de Henning y Perrone, 2001). La forma filamentosa de las LGC (hifas) es una estructura microscópica tubular, que contiene múltiples unidades celulares divididas por septos, las cuales pueden surgir a partir de levaduras o de hifas preexistentes (Pardi y Cardozo, 2002).

Las especies de LGC pueden crecer en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. En agar Sabouraud las colonias son lisas, suaves, húmedas, de color y aspecto cremoso, cuyo tamaño oscila entre 1,5 y 2 mm de diámetro (Pardi y Cardozo, 2002). Estas levaduras crecen *in vitro* en condiciones de aerobiosis a un pH entre 2,5 y 7,5 y a temperaturas que oscilan entre 20°C y 38°C (Webb y cols., 1988).

Se han identificado más de 350 especies diferentes de levaduras dentro del género *Candida*, no obstante, solo una minoría tiene el potencial de afectar al ser humano (Tabla 2) (Williams y cols., 2011).

Tabla 2: Principales especies de LGC asociadas a infecciones humanas.

Especies de <i>Candida</i>	
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida guilliermondi</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida lipolytica</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida famata</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Candida haemulonii</i>
<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida rugosa</i>

Estos microorganismos comensales forman parte de la microbiota normal de la cavidad oral, piel, tracto respiratorio alto, sistema gastrointestinal y tracto genitourinario (López y cols., 2004). Aun así, bajo ciertas condiciones, puede pasar de ser un microorganismo inofensivo a convertirse en un patógeno capaz de producir enfermedades. Las infecciones fúngicas pueden ser locales o sistémicas, estas últimas ocurren principalmente en personas inmunodeprimidas. A nivel local, se estima que el 50% de los individuos sanos portan LGC en la cavidad oral, sin embargo, cuando existe una pérdida del equilibrio ecológico, ya sea por factores del hospedero, del microambiente, o de la propia levadura, se da lugar a la candidiasis oral, considerada una de las infecciones orales más comunes (William y cols., 2011). Se ha observado que la prevalencia de LGC aumenta entre un 60 a 100% en pacientes portadores de prótesis (Gleiznys y cols., 2015).

Patogénesis y Mecanismos de virulencia

Diversos factores de virulencia han sido propuestos en la patogénesis de estas levaduras, como adhesión a superficies celulares del hospedero, secreción de enzimas hidrolíticas (proteinasas, fosfolipasas y hemolisinas), capacidad de evasión de la respuesta inmune, transición fenotípica y formación de pseudohifas e hifas (Li y cols., 2007; Williams y cols., 2011; Silva y cols., 2012). Múltiples factores pueden influir en la adherencia, incluyendo proteínas de la pared celular y propiedades físico-químicas de la superficie celular. Proteínas de la superficie celular, como las adhesinas, están involucrados en la adherencia específica (Silva

y cols., 2012). Estudios clínicos han evidenciado que las levaduras no solo tienen la capacidad de adherirse a mucosas orales, sino además a superficies acrílicas de prótesis dentales. La adhesión de las especies del género *Candida* a las superficies protésicas ocurre por la interacción de fuerzas electrostáticas e hidrófobas mediante fuerzas de Van Der Waals (Webb y cols., 1998). Adicionalmente, el *biofilm* acumulado en las prótesis y la pobre higiene dental contribuyen a la virulencia de LGC (Salerno y cols., 2011). El *biofilm* le confiere a las células fúngicas resistencia frente a la terapia antimicótica limitando la penetración de los fármacos y otorgando protección frente a la respuesta inmune del hospedero (Donlan y Costerton, 2002; Mukherjee y Chandra, 2004).

Candida albicans

Candida albicans es una levadura oportunista dimórfica (Mata de Henning y Perrone, 2001). Estudios micológicos han demostrado que representa más del 80% de los aislados de todas las formas de candidiasis humana. Por otra parte, estudios *in vitro* indican que esta levadura expresa niveles más altos de virulencia en comparación con otras especies del género (Williams y cols., 2011). La alta prevalencia de esta especie se explica por su elevada capacidad de adhesión a superficies orales. Asimismo, es capaz de expresar adhesinas, las cuales pueden unirse a diversos ligandos peptídicos y permitir la coagregación con otros microorganismos contribuyendo a la formación de *biofilms* (Calderone y Fonzi, 2001). Se ha descrito que *C. albicans* forma parte de un complejo *biofilm* constituido por una capa basal de blastosporas cubierta por una matriz compuesta por material extracelular y elementos de las hifas, la cual es más densa que en otras especies del género como *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (Bilhan y cols., 2009). Con respecto a su capacidad de secretar proteinasas, Williams y cols. (2011) reportaron que es capaz de secretar nueve tipos distintos de proteinasas aspárticas, mucho más que otras especies del género. Por otra parte, su capacidad de experimentar cambios morfológicos del estado de levadura a pseudohifas o hifas incrementa su capacidad de adhesión e invasión a tejidos del hospedero. Se ha descrito que la presencia de hifas de *C. albicans* en sujetos con

EP es significativamente mayor comparado con sujetos portadores de PR sanos y que portan esta levadura (Bilhan y cols., 2009).

Candida no Candida albicans

Estudios recientes sugieren que las especies *Candida* no *Candida albicans* (CNCA) cumplen un rol importante en el desarrollo de infecciones fúngicas en la cavidad oral. Dentro del género, algunas de las especies más frecuentemente identificadas a nivel oral son *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* (Pardi y cols., 2002; Gendreau y Loewy, 2011). Se puede explicar el incremento de estas especies por el mejoramiento de los métodos de diagnóstico, al uso permanente de antibiótico de amplio espectro y al aumento de resistencia a distintos agentes antifúngicos (Williams y cols., 2011). Actualmente, se ha descrito que *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* poseen elevada resistencia a antifúngicos del tipo azoles como fluconazol, itraconazol, entre otros (Tobar y cols., 2011; Tay y cols., 2014).

CNCA son un grupo de microorganismos heterogéneos, conocidos por causar infecciones de menor virulencia, comparadas con las provocadas por *C. albicans*, debido a que carecen parcial o totalmente de alguno de los mecanismos de virulencia de *C. albicans*. Estudios *in vitro* han demostrado que la mayoría de las CNCA no forman hifas, con una menor capacidad para invadir tejidos, en comparación con *C. albicans*, como es el caso de *C. glabrata* (Moran y cols., 2002; Williams y cols., 2011). También se ha observado que tienen menor capacidad de adhesión a superficies epiteliales y menor secreción de proteinasas (Moran y cols., 2002). Respecto a esto último, se ha observado que *C. glabrata* posee menor capacidad de adherencia a las células del epitelio gingival oral, en comparación con *C. albicans* y *C. tropicalis* (Nikawa y cols., 1995; Biasoli y cols., 2002). También se ha observado que *C. glabrata* desencadena una menor respuesta proinflamatoria de citoquinas en las células epiteliales orales (Li y cols., 2007).

Actualmente se ha observado que dependiendo del sitio de infección, *C. glabrata* se ubica como la segunda o tercera especie del género *Candida* más frecuentemente aislada de todos los casos reportados de candidiasis (Li y cols., 2007). Esta especie ha sido aislada de distintos sitios orales incluyendo mucosa

oral y palatal, lengua, microbiota subgingival, placa dental y prótesis removibles. Es aislada frecuentemente con otras especies del género *Candida*, la combinación más habitual en mucosa oral es con *C. albicans*. Ambas se han encontrado en aproximadamente el 70% de los individuos con candidiasis oral (Redding y cols., 2002).

Diversos estudios demuestran que la colonización de la cavidad oral por *C. glabrata* aumenta con la edad (Li y cols., 2007). Lockhart y cols. (1999) evidenciaron que *C. glabrata* fue la segunda especie más frecuentemente aislada después de *C. albicans* en AM con y sin prótesis. Además, un 36% de los aislados fue *C. glabrata* en AM de 70-79 años y en individuos mayores de 80 años aumentó a un 58%.

Existe una especie del género *Candida* que posee características fenotípicas y genotípicas similares a *C. albicans*, lo que ha dificultado su diferenciación. Esta corresponde a *C. dubliniensis*, la cual es capaz de formar tubos germinativos e hifas verdaderas, al igual que *C. albicans*. Sin embargo, la dinámica de formación de hifas en ambas especies difiere dependiendo de las condiciones de cultivo utilizadas (Sullivan y cols., 2004). Al intentar identificar estas dos especies en medios cromogénicos, *C. albicans* produce colonias verde esmeralda y *C. dubliniensis* verde oscuro. Por otra parte, *C. albicans* es capaz de crecer a 45°C a diferencia de *C. dubliniensis* que no es capaz de crecer a esta temperatura (Pinjon y cols., 1998; Estrada y cols., 2011). Además, se ha demostrado que *C. dubliniensis* posee la capacidad de generar resistencia más rápidamente a terapias antifúngicas (principalmente a fluconazol), en especial en individuos con factores predisponentes como SIDA o VIH positivo (Quesada y cols., 2007).

En cuanto a las características bioquímicas de las levaduras CNCA, *C. glabrata* fermenta y asimila solamente glucosa y trehalosa, lo que contrasta con *C. albicans*, que fermenta y/o asimila una gran cantidad de azúcares con la excepción de sacarosa. Por otra parte, *C. tropicalis* tiene la capacidad de fermentar y asimilar sacarosa y maltosa; en contraste a *C. parapsilosis* que es incapaz de fermentar maltosa (Silva y cols., 2012).

Zoromodiam y cols. (2011) identificaron especies del género *Candida* en individuos portadores de prótesis totales, las levaduras más frecuentemente aisladas correspondieron a *C. albicans* con un 41,5%, también fueron identificadas otras especies como *C. glabrata* (18,4%), *C. tropicalis* (12,9%), *C. dubliniensis* (10,9%), *C. parapsilosis* (6,1%), *C. krusei* (3,4%), *C. guilliermondii* (1,4%) y *C. lipolytica* (0,7%). A pesar que diversos estudios reportan que las especies de CNCA se encuentran en una menor proporción en la cavidad oral, se ha observado que la presencia simultánea de *C. albicans* y CNCA está relacionada con un aumento de la severidad de EP (Lee y cols., 2013).

1.4 ROL DE LA SALIVA EN EL MANTENIMIENTO DE LA SALUD ORAL

La saliva y sus componentes tienen un rol fundamental en el mantenimiento de la salud oral y en el equilibrio ecológico. Dentro de sus funciones podemos mencionar lubricación del bolo alimenticio, lavado de superficies, capacidad amortiguadora, remineralización, actividad antibacteriana y antifúngica (Hibino y cols., 2009). Estas funciones permiten mantener la integridad de las mucosas orales, por esta razón es de gran importancia que la cantidad y calidad de la saliva se encuentren en rangos aceptables, de lo contrario no solo habrá un deterioro de la salud oral, sino que también se verá afectada la calidad de vida de las personas. Es importante destacar que se ha evidenciado que individuos de mayor edad presentan un flujo salival significativamente menor, probablemente por los procesos fisiológicos normales del envejecimiento, como la atrofia del parénquima de las glándulas salivales (Fenoll-Palomares y cols., 2004).

La reducción del flujo salival afecta la masticación, deglución de los alimentos, neutralización de ácidos, protección inmunológica frente a potenciales patógenos, retención de prótesis y provoca alteraciones gustativas (Morales y Aldape, 2013).

Relación de velocidad de flujo salival con levaduras del género *Candida*

Glazar y cols. (2010), establecieron como flujo salival normal valores mayores a 0,4 ml/min, flujo salival reducido entre 0,2 a 0,4 ml/min e hiposialia cuando el flujo es menor a 0,2 ml/min. Muchos factores han sido identificados como posibles causas de la reducción de la tasa del flujo salival, incluyendo consumo permanente de medicamentos, enfermedades sistémicas, envejecimiento, estado de salud nutricional o general, número de dientes remanentes, estado periodontal y fuerza de mordida. Se ha reportado que los AM con diabetes e hipertensión, presentan niveles más bajos de flujo salival y una tasa más alta de xerostomía o sensación de boca seca, en comparación con sujetos sanos, lo que sugiere que la secreción salival y la prevalencia de xerostomía son afectadas por la condición médica de los sujetos (Morales y Aldapes, 2013).

Existen estudios sobre el rol de la saliva en la colonización de *C. albicans*, se ha observado que hay un mayor recuento de esta levadura en la saliva de sujetos con velocidad de flujo salival (VFS) disminuida, comparado con sujetos que presentan flujo salival normal (Torres y cols., 2002; Figueiral y cols., 2007; Pereira-Cenci y cols., 2008). En otro estudio se observó que la saliva en cantidades adecuadas previene la adhesión de *C. albicans* a superficies acrílicas (Abaci y cols., 2010). Esto podría explicarse porque la saliva presenta moléculas defensivas como lisozimas, lactoferrina, histatina, inmunoglobulina A (IgA) entre otras, que disminuyen la adherencia de LGC a las superficies orales. Sin embargo, en otras investigaciones se ha demostrado que proteínas salivales como mucinas, estaterinas y proteínas ricas en prolina pueden actuar como receptores de adhesión utilizados por las especies del género *Candida* (Pereira-Cenci y cols., 2008). También se ha reportado que cuando hay un menor flujo salival, habría una mayor prevalencia de distintas especies de levaduras del género *Candida* (Epstein y cols., 1993).

Otros estudios evidencian que existe una correlación positiva entre la disminución del flujo salival y la capacidad tampón de la saliva. Una disminución en la VFS

muchas veces con lleva a una menor capacidad tampón, y con ello, un pH salival más ácido (Fenoll-Palomares y cols., 2004).

Relación de pH salival con levaduras del género *Candida*

En estado de salud oral, el pH salival se mantiene en un estrecho rango entre 6,7 y 7,4, variaciones en él tendrá como consecuencias cambios en la microbiota oral. Un mayor pH salival disminuirá el crecimiento de microorganismos acidúricos como *Streptococcus mutans* y *C. albicans* (Walsh, 2008). Además, cuando existe colonización por *Staphylococcus aureus*, *S. mutans* y *C. albicans* se incrementa la acidez del microambiente oral (Monroy y cols., 2005). Por otra parte, se ha observado que generalmente el pH de la mucosa oral de AM es más ácido que el pH de personas más jóvenes, lo cual favorecería el desarrollo de EP (Gleiznys y cols., 2015). Actualmente existen estudios que indican que el pH es más ácido en individuos portadores de prótesis totales en comparación a quienes no utilizan prótesis (Gleiznys y cols., 2015). Marinoski y cols. (2014), determinaron que un pH menor a 6,5 en lengua y mucosa palatal contribuyen al desarrollo de EP. Por otra parte, se ha descrito que entre más ácido el pH se requiere mayor concentración de fluconazol para lograr su actividad antifúngica (Araújo y cols., 2014).

Los bajos niveles de pH salival pueden favorecer la adhesión y proliferación de bacterias y LGC. Un pH ácido favorece la adherencia de *C. albicans* tanto a materiales acrílicos como a la mucosa oral. Esto puede explicarse por la naturaleza acidúrica y acidofílica de las diferentes especies del género *Candida*. Además, se ha descrito que la IgA es eficaz frente a *C. albicans* y otros patógenos orales cuando el pH está entre 5,9 y 7,5 y que su eficacia es abolida frente a pH más ácidos o más alcalinos (Monroy y cols., 2005).

Se ha observado que un pH=3 es óptimo no solo para la adhesión de las levaduras, sino también para la actividad enzimática de proteinasas, que junto con lipasas, son algunos de los factores de virulencia más importantes de LGC debido a sus efectos citotóxicos y citolíticos. Por otra parte, los altos niveles de hidratos de carbono presentes en la saliva pueden actuar como una fuente nutritiva adicional para estas levaduras, la metabolización de estos azúcares

genera productos ácidos, los cuales contribuyen a mantener el pH bajo (Salerno y cols., 2011). Se ha descrito que los carbohidratos de la dieta favorecen la formación de *biofilms* compuestos por *C. albicans* en las superficies de materiales acrílicos (Gleiznys y cols., 2015).

Existen estudios que evidencian que el pH del microambiente oral puede influir en el comportamiento de *C. albicans* en cuanto a su estructura y virulencia. Con respecto a esto, se ha demostrado que un microambiente ácido favorece el desarrollo de levaduras, mientras que uno alcalino influye en la formación de hifas (Araújo y cols., 2014). Nadeem y cols. (2013) sugirieron que el pH puede favorecer selectivamente la forma de levadura o de hifas, estableciendo que un pH de 5,4 induce baja filamentación, en contraste a pH de 6,4 y 7,4, los cuales inducen mayor filamentación, siendo este último el más adecuado para la inducción de tubos germinativos.

Por otra parte, pueden existir cambios temporales de pH en sitios específicos, por ejemplo, bajo las prótesis maxilares (Williams y cols., 2011; Araujo y cols., 2014). Se ha planteado que el uso nocturno de prótesis no permite una adecuada oxigenación de la mucosa, disminuye el flujo y el pH salival (Webb y cols., 1988). El microambiente ácido generado bajo las prótesis proporciona las condiciones ideales para la producción y actividad de proteinasas aspárticas, las cuales ejercen su actividad proteolítica sólo en condiciones ácidas (pH<4) (Williams y cols., 2011). Samaranayake (1986), reportó que especies del género *Candida* frente a pH bajo también activan la producción de fosfolipasas extracelulares.

1.5 TRATAMIENTO DE ESTOMATITIS PROTÉSICA

Tratamiento convencional

El tratamiento de EP asociada a LGC es complejo debido a su etiología multifactorial. Por esto es fundamental controlar cada uno de los factores causales de esta patología. La primera estrategia terapéutica consiste en la higienización de las prótesis y de las mucosas adyacentes (MINSAL, 2010). También se han propuesto medicamentos antifúngicos de uso local y sistémico. Los antifúngicos más comunes utilizados en el tratamiento de la candidiasis oral son nistatina,

anfotericina B, miconazol y clotrimazol (Tay y cols., 2014). Otras medidas para controlar la EP son el uso de antisépticos y desinfectantes tópicos, acondicionadores de tejidos, irradiación de las prótesis con microondas, entre otros (MINSAL, 2010; Salerno y cols., 2011). Actualmente, con el aumento de la resistencia a los antifúngicos, ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento (Tay y cols., 2014).

Tratamiento complementario - Uso de Probióticos

En las últimas décadas ha surgido la bacterioterapia mediante el uso de probióticos como una alternativa para promover la salud oral. El efecto del tratamiento con probióticos ha sido estudiado extensamente para una diversidad de indicaciones sistémicas y desórdenes médicos, como es el caso de trastornos gastrointestinales (Muñoz y cols., 2010). Si bien sus primeros usos fueron en el ámbito de la medicina, actualmente está siendo utilizado en la prevención y tratamiento de infecciones orales, incluyendo caries dental, enfermedades periodontales, halitosis y candidiasis oral (Flichy y cols., 2010).

En el año 2001, la FAO/WHO definió a los probióticos como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas brindan beneficios en la salud del hospedero” (Muñoz y cols., 2010).

Se han propuesto diversos mecanismos de acción para los probióticos, entre ellos destacan (Stamatova y Meurman, 2009; Muñoz y cols., 2010; Sudhakar y cols., 2011; Nangia y cols., 2014):

- Competencia con los patógenos por sitios de unión, nutrientes y sustratos disponibles.
- Secretan diversas sustancias antimicrobianas, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.
- Previenen la adhesión e invasión de bacterias patógenas.
- Modifican el medio ambiente circundante mediante la modulación del pH y / o del potencial de oxidación y reducción, lo cual puede comprometer la capacidad de los patógenos para establecerse.
- Interfieren con factores de virulencia de microorganismos.

- Alteran la actividad metabólica de la microbiota.
- Regulan la permeabilidad y favorecen el desarrollo de especies menos patógenas en la microbiota oral.
- Modulan la inmunidad natural y la respuesta inmune adaptativa.

Los probióticos más comúnmente usados y estudiados son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, ambos géneros se consideran como parte de la microbiota normal humana (Nangia y cols., 2014). Los *Lactobacillus* son bacterias altamente acidogénicas y acidúricas, y crecen de manera óptima bajo condiciones ligeramente ácidas (Twetman y Keller, 2012). En la cavidad oral, los *Lactobacillus* generalmente comprenden menos del 1% de la microbiota total cultivable, siendo las especies más frecuentemente aisladas en saliva *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. salivarius* (Nangia y cols., 2014). Gorbach y Goldin (1985) aislaron *Lactobacillus rhamnosus* GG del intestino humano, bacteria probiótica más ampliamente estudiada (Muñoz y cols., 2010). El uso de suplementos de *Lactobacillus rhamnosus* GG para aplicaciones médicas ha sido considerado seguro para todos los grupos de edad e incluso en inmunocomprometidos (Snydman, 2008). A pesar de que existen diversas cepas que pueden utilizarse con efectos benéficos, no todas tienen la misma eficacia, cada cepa confiere distintos beneficios al hospedero, incluso se ha visto que la combinación de éstas pueden potenciar algunos efectos y comportarse de manera sinérgica (Meurman, 2005).

La capacidad de estas bacterias de colonizar la cavidad oral depende de la cepa probiótica, la forma de administración y la respuesta del hospedero (Haukioja, 2010). Los probióticos se pueden administrar por vía oral en cuatro formas básicas: concentrados agregados a una bebida o a un alimento, inoculados en fibras prebióticas que promueven el crecimiento de bacterias probióticas, inoculados en productos lácteos (bebidas lácteas, yogur o queso) y como células liofilizadas envasadas como suplementos dietéticos (polvo o comprimidos) (Caglar y cols., 2005). Las bacterias probióticas administradas en productos lácteos fermentados constituyen la fuente más importante de probióticos para los seres

humanos, la ventaja de incorporar cepas probióticas en productos lácteos radica en su capacidad para neutralizar condiciones ácidas (Nangia y cols., 2014).

Actualmente, se han realizado estudios de probióticos enfocados en la prevención de caries, especialmente en la reducción del recuento de *S. mutans* (Muñoz y cols., 2010). Varios estudios clínicos han demostrado que el consumo regular de yogurt, leche o queso suplementado con probióticos conducen a una disminución del número de *Streptococcus* cariogénicos en la saliva y a una reducción de la placa dental (Ahola y cols., 2002; Nikawa y cols., 2004; Caglar y cols., 2007). También se han investigado otras posibles aplicaciones, como la reducción de los recuentos de LGC. Hatakka y cols. (2007) realizaron un estudio de dieciséis semanas de duración en individuos de edad avanzada, quienes consumieron queso enriquecido con probióticos (*L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS), presentando una disminución de LGC en un 75%. Por otra parte, Mendoca y cols. (2012) también realizaron un estudio en AM quienes utilizaron dos cepas probióticas (*Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium breve*) durante un mes, teniendo como resultados una disminución en el recuento de LGC en la cavidad oral y un incremento en la respuesta inmune secretora específica en contra de estas levaduras, sugiriendo que es una posible alternativa para controlar la candidiasis oral.

1.6 RELACIÓN DE PROBIÓTICOS CON PARAMETROS SALIVALES

Existen estudios que reportan una modificación en el pH y flujo salival al consumir productos suplementados con probióticos. Hattaka y cols. (2007) evaluaron la capacidad tampón salival y la tasa de secreción salival estimulada y no estimulada. Si bien no encontraron diferencias significativas respecto a la capacidad tampón, se estableció que la hiposialia disminuyó en el grupo que consumió queso suplementado con probióticos en un 56%. Respecto a esto último, el flujo salival no estimulado aumentó de 0,18 ml/min a 0,22 ml/min sugiriendo que el uso de bacterias probióticas es eficaz en el control de la hiposialia en AM.

En otro estudio se observó el efecto de la bacteria probiótica *Lactobacillus salivarius*, en pacientes con riesgo de caries. En cuanto al flujo y pH salival no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, tanto el flujo como el pH salival mostraron tendencia al incremento en aquellos que tomaron comprimidos con *Lactobacillus salivarius* TI 2711. Por otra parte, la capacidad tampón salival aumentó significativamente en quienes tomaron comprimidos que contenían el probiótico (Nishihara y cols., 2014). En una investigación anterior, se observó que el flujo salival incrementó significativamente por la administración oral de productos suplementados con *L. salivarius* WB21 (Suzuki y cols., 2012).

Respecto al efecto de probióticos en el pH salival, Sudhir y cols. (2012) evaluaron el efecto de un producto lácteo suplementado con probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) en el recuento de *S. mutans* y en el pH salival, evidenciando una disminución en la cantidad de estos patógenos orales y una ligera reducción en el pH salival, sin embargo, esta reducción fue por encima del pH crítico (5,2-5,5) de disolución de la hidroxiapatita presente en el esmalte dental.

En un estudio *in vitro* se planteó que es probable que el ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por cepas probióticas de *Lactobacillus* causen una disminución sustancial en el pH. Si bien existen antecedentes que indican que la disminución del pH podría favorecer el desarrollo de LGC, esta investigación da indicios de lo contrario. En este estudio se planteó que el ácido láctico producido por las bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *Lactobacillus reuteri* RC-14 juegan un papel importante en la inhibición del crecimiento de *C. albicans*, lo cual podría ser más eficiente a pH bajo (Köhler y cols., 2012).

1.7 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen antecedentes, que evidencian que los cambios salivales en el flujo y pH salival podrían alterar el crecimiento y diversidad de LGC. Por otra parte, existe evidencia que el consumo regular de productos con probióticos podría modificar estos parámetros salivales y consecuentemente, la candidiasis oral. Dado los antecedentes, se podría esperar que el consumo de leche suplementada con probiótico, tendría un efecto positivo en el control de la EP, ya sea disminuyendo su severidad o permitiendo la remisión de la patología.

En la actualidad, existen pocos estudios sobre todo en nuestro país que establezcan la relación entre el uso de probióticos, parámetros salivales, recuento y diversidad de LGC en AM portadores de PR con EP asociada a candidiasis oral. Esta investigación tiene como objetivo entonces, evaluar el efecto del consumo de leche suplementada con probiótico, durante un período de seis meses, en el recuento y diversidad de especies del género *Candida*, velocidad de flujo salival, pH y su posible asociación en la población mencionada anteriormente. Los resultados de esta investigación, podrían significar un aporte para el mejoramiento del enfoque de medidas terapéuticas en AM con esta patología, que podrían ser definidas en lo sucesivo, en virtud de los cambios en las características salivales y microbiológicas que experimentan los sujetos que consumen probióticos.

2. HIPÓTESIS

El consumo de leche suplementada con probiótico, durante un periodo de seis meses, modifica el pH y velocidad de flujo salival, disminuye el recuento y altera la diversidad de especies de levaduras del género *Candida*, en adultos mayores portadores de prótesis removible con estomatitis protésica.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del consumo de leche suplementada con probiótico, durante un periodo de seis meses, en el recuento y diversidad de levaduras del género *Candida* asociado a cambios en el pH y velocidad de flujo salival, en adultos mayores portadores de prótesis removible con estomatitis protésica.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Determinar pH y velocidad de flujo salival en adultos mayores portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica, que consumen leche suplementada con probiótico o leche sin probiótico (placebo) al inicio del estudio y a los seis meses de consumo.

3.1.2 Determinar recuento e identificación de especies de levaduras del género *Candida* en saliva de adultos mayores portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica, que consumen leche suplementada con probiótico o leche sin probiótico (placebo) al inicio del estudio y a los seis meses de consumo.

3.1.3 Asociar pH y velocidad de flujo salival con diversidad de especies de levaduras del género *Candida* presentes en saliva de adultos mayores portadores de prótesis removible con y sin estomatitis protésica, que consumen leche suplementada con probiótico o leche sin probiótico (placebo) al inicio del estudio y a los seis meses de consumo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tipo de estudio

Ensayo clínico controlado aleatorizado triple ciego de seis meses de duración.

a) Procedimiento de aleatorización

La muestra total se dividió aleatoriamente en 4 grupos equivalentes (20 individuos por grupo), a través del *Software Random Allocation* (www.random.org). Se asignaron códigos de colores para identificarlos y los examinadores desconocieron a quién correspondió cada código. Un monitor independiente develó el significado del código durante la fase de análisis de datos. Se estableció un 20% de sobremuestreo, ante posibles pérdidas de seguimiento y poder de 80%.

b) Definición de ciego

Tanto los clínicos examinadores, investigadores, encargados de los hogares, adultos mayores (AM) y quienes analizaron los datos, desconocieron a cual grupo de estudio fueron asignados.

4.2 Población objetivo y Muestra

La muestra inicial estuvo conformada por un grupo de 129 AM, hombres y mujeres, institucionalizados y no institucionalizados, portadores de PR, con y sin EP. Los AM institucionalizados correspondieron a 76 sujetos pertenecientes a establecimientos de larga estadía para adultos mayores (ELEAM) de la ciudad de Santiago. Por otra parte, los AM no institucionalizados correspondieron a 53 sujetos pertenecientes a la clínica de prótesis totales de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (FOUCH), reclutados por conveniencia. La muestra final estuvo conformada por 53 AM, que consumieron leche suplementada con probiótico o placebo durante 6 meses, de los cuales 35 sujetos pertenecieron a ELEAM y 18 sujetos asistieron a la clínica de prótesis totales de la FOUCH. La fracción faltante abandonó el estudio por diversas razones: AM fueron trasladados a otro ELEAM, se negaron a seguir participando, fallecieron o dejaron de asistir a la clínica de la FOUCH. La Muestra se dividió en 4 grupos de estudio (Figura 1).

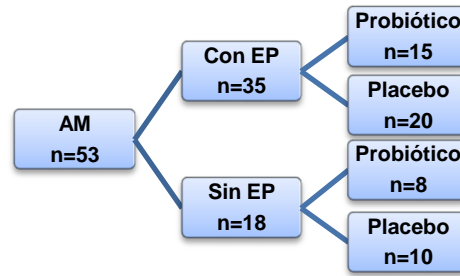


Figura 1: Distribución de la muestra en los 4 grupos de estudio

Los adultos mayores invitados a participar en este estudio firmaron un consentimiento informado (anexo 1), el cual fue aprobado previamente por el comité de ética humana de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

4.3 Criterios de inclusión y exclusión

4.3.1 Criterios de inclusión:

- a) Adultos mayores cuya edad sea mayor o igual a 60 años, sanos, o con enfermedades de base controladas por el médico tratante, que porten PR tanto de bases metálicas y/o acrílicas, con y sin signos clínicos de EP.
- b) Aceptar participar del estudio, previa firma del consentimiento informado.

4.3.2 Criterios de exclusión:

- a) Adultos mayores no portadores de PR.
- b) Adultos mayores con enfermedades de base no controladas.
- c) Adultos mayores que hayan utilizado antimicóticos en los últimos seis meses.
- e) Intolerancia a bebidas lácteas o alergia a alguno de sus componentes.
- f) No contar con el permiso del médico tratante para participar en el estudio.
- g) Adultos mayores que requieran tratamiento odontológico urgente.
- h) No aceptar participar en el estudio.

4.4 Preparación de las bebidas lácteas

Los adultos mayores que conformaron los grupos que consumieron leche suplementada con probiótico recibieron una porción de 200 ml de leche diaria con 10^7 UFC/G *Lactobacillus rhamnosus*, durante seis meses. Por otra parte, los adultos mayores que conformaron los grupos que consumieron leche sin probiótico recibieron diariamente una porción de 200 ml de leche con placebo, durante el mismo período. 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 participantes. Las leches con y sin probiótico (placebo) 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. Es importante destacar que ambas bebidas lácteas tienen iguales características organolépticas y nutricionales, así de esta manera se evitaron 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.

4.5 Técnicas de recolección de la información

4.5.1 Exámenes clínicos

Los exámenes clínicos se realizaron al inicio del estudio. Estos fueron llevados a cabo por dos equipos de odontólogos docente-clínicos, de las áreas de Rehabilitación Oral y Patología, 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, establecidos y validados en las áreas docentes asistenciales involucradas en este estudio, dependientes de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Los AM que requirieron recambio de aparatos protésicos, fueron invitados a ser atendidos en nuestra facultad en el inicio del curso de Prótesis Totales una vez terminado el estudio. Como los examinadores eran varios, 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.

4.5.2 Métodos microbiológicos

a) Toma de muestra: En el día de la visita, el sujeto debió estar en ayunas mínimo dos horas, 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 suspendiera el uso de colutorios orales 15 días antes de la recolección de la muestra.

b) Muestras de saliva no estimulada: A cada individuo se le solicitó depositar saliva no estimulada durante cinco minutos en un frasco plástico estéril (previamente pesado y rotulado), que posterior a la toma de muestra fue debidamente sellado. 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 cuatro horas.

4.6 Procesamiento de las muestras

4.6.1 Determinación de VFS no estimulada

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, de esta forma se determinó el volumen total, expresado en ml/min.

4.6.2 Determinación del pH salival.

La medición del pH de las muestras salivales se llevó a cabo a temperatura ambiente, mediante el uso de un pH-metro digital (Modelo PL-600 EZDO-OMEGA), que de forma automatizada ofrece el valor de pH con dos decimales. Todas las mediciones se realizaron por el mismo operador y con la misma metodología, directamente a la muestra y sin centrifugar.

4.6.3 Recuento y aislamiento de levaduras del género *Candida*

Se realizó el método de recuento viable en medio de cultivo selectivo sólido agar Sabouraud suplementado con tetraciclina (5 µg/ml) (AST). Para ello, cada muestra de saliva fue agitada en Vortex (Thermolyne Maxi Mix II) durante 30 s, 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 µl de la muestra de saliva sin diluir y 100 µl de la dilución, por duplicado, en placas AST. 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 compatibles con levaduras del género *Candida*. Se promediaron los recuentos obtenidos en las placas sembradas con saliva diluida, 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).

4.6.4 Identificación de especies de LGC por métodos fenotípicos

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

a) Identificación presuntiva de especies *C. albicans*/*C. dubliniensis* y CNCA mediante medio cromogénico CHROMagar *Candida*: Este método permite diferenciar algunas especies de LGC por medio de la coloración de colonias, producto de reacciones enzimáticas específicas ante el sustrato cromogénico presente en este medio (Odds y Bernaerts, 1994). Una vez obtenidas las colonias en medio AST, los aislados fueron sembrados en CHROMagar *Candida*, los cuales fueron incubados a 30°C durante 48 h en condiciones de aerobiosis. Las levaduras fueron identificadas visualmente según las instrucciones del fabricante.

b) Criopreservación de los aislados: Las colonias de LGC obtenidas del medio CHROMagar *Candida* que no presentaron color verde se cultivaron e incubaron en 3 ml de caldo Sabouraud a 37°C en agitación durante 24 h en condiciones de aerobiosis. Posteriormente, se envasaron en viales con glicerol estéril a una concentración final de 20%. Dichos viales se almacenaron a -80°C hasta realizar la identificación de especie por test bioquímicos.

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

4.6.5 Identificación de especies de LGC por métodos moleculares

A 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).

a) 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´- GTTTTGGCAACTTCTCTTTGTA-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 (obtenido como ya se mencionó anteriormente), 1 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de cada uno de los partidores a una concentración de

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

b) Electroforesis de ADN

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

4.7 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 a analizar fueron recuento y especies de LGC, pH y VFS, las cuales fueron comparadas en los grupos: “paciente con EP y sin EP, con consumo de leche suplementada con probiótico o leche sin probiótico (placebo)”.

Posteriormente, las variables fueron analizadas dependiendo de su tipo de distribución, para lo cual fue aplicado el test Shapiro Wilk. El recuento de LGC y la VFS presentaron una distribución no normal, por lo que se utilizó el test de Wilcoxon para su análisis. Por otra parte, la variable pH presentó una distribución normal, por lo que los datos fueron analizados con T-test. Se consideró una significancia del 95% ($p < 0,05$). Por otra parte, el análisis de las especies de LGC y su asociación con VFS y pH salival se realizó descriptivamente.

La clasificación de las variables en estudio y test estadísticos utilizados se resumen en Tabla 3

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

Variable (s)	Tipo	Distribución	Test estadístico
VFS	Continua	no normal	Wilcoxon pareado
pH	Continua	normal	T-Test pareado
Recuento de LGC	Continua	no normal	Wilcoxon pareado

5. RESULTADOS

Luego de 6 meses de consumo de leche suplementada con probiótico o placebo se analizó las características microbiológicas (recuento y diversidad de LGC) y salivales (pH y VFS). Posteriormente, se evaluó la asociación entre diversidad y parámetros salivales y se comparó con los datos obtenidos al inicio del estudio (tiempo 0).

La diferencia en el número de participantes de los grupos con y sin EP que consumieron leche suplementada con probiótico o placebo, se debió a la poca adherencia al estudio de los AM sin EP. En el caso de los AM con EP que consumieron leche suplementada con probiótico, existieron muestras que no pudieron ser estudiadas, puesto que no se pudo obtener el volumen necesario para su posterior procesamiento. Por lo tanto, para el análisis estadístico sólo se usaron los datos válidos, motivo por el cual el número de participantes disminuyó. Por otra parte, los AM sin EP que consumieron probiótico presentaron una baja adherencia al estudio, lo que no permitió utilizar los resultados con fines estadísticos, solo descriptivos.

5.1 Caracterización de la Muestra

Esta investigación comprendió 53 adultos mayores (AM) portadores de prótesis removible con EP (66,04%) y sin EP (33,96%), provenientes de ELEAM y de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

5.1.1 Edad

La muestra correspondió a AM que presentaban entre 60 y 104 años. La edad promedio total fue de 79,8 años; la edad promedio de cada grupo se encuentra descrita en la Tabla 4

Tabla 4: Edad promedio de AM con y sin EP que consumen probiótico o placebo.

Grupo en Estudio	Edad Promedio
Grupo 1: EP/Probiótico	83,4
Grupo 2: EP/Placebo	81,5
Grupo 3: Sin EP/ Probiótico	82
Grupo 4: Sin EP/ Placebo	70,3

5.1.2 Género

De los AM participantes un 74% fueron mujeres y un 26% fueron hombres. Cabe destacar que en todos los grupos de estudios predominó el género femenino

5.2 Análisis de características salivales por grupo, a tiempo 0 y 6 meses del consumo del lácteo.

5.2.1 Análisis de pH salival

El grupo con EP que consumió leche con probiótico presentó un pH promedio de $7,18 \pm 0,59$ al inicio del estudio. Luego de 6 meses de consumo, este disminuyó a $6,69 \pm 1,18$, sin diferencia estadística ($p=0,09$) (Gráfico 1).

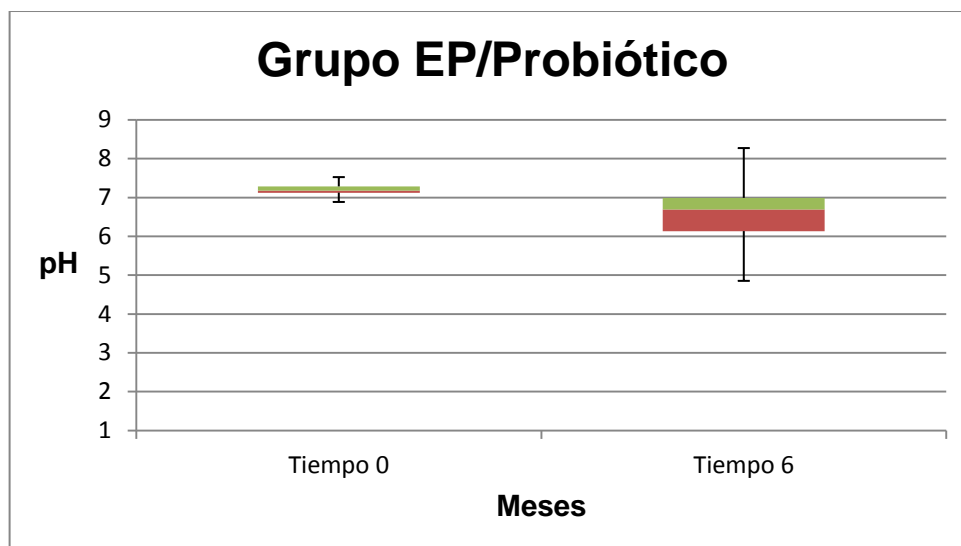


Gráfico 1: pH salival en grupo con EP que consumió leche con probiótico en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6). Se aplicó t-test, $p=0,09$.

Por otra parte, el grupo con EP que consumió leche con placebo presentó un pH promedio en tiempo cero de $7,51 \pm 0,55$, el cual disminuyó a $7,05 \pm 0,74$ luego de 6 meses de consumo, con diferencia estadística ($p=0,03$) (Gráfico 2).

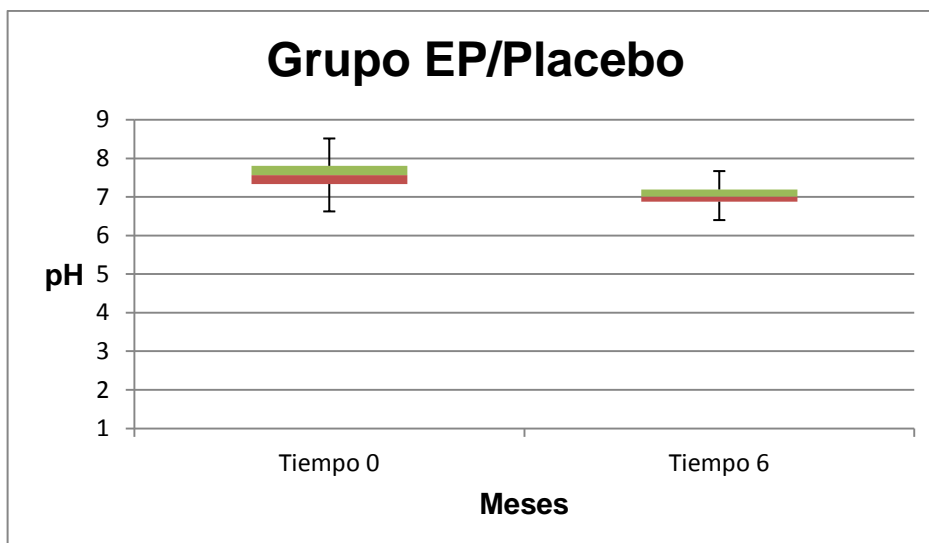


Gráfico 2: pH salival en grupo con EP que consumió leche con placebo en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6). Se aplicó t-test, $p=0,03$.

El grupo sin EP que consumió leche con probiótico presentó un pH promedio de $6,99 \pm 0,27$ en tiempo cero. Luego de 6 meses de consumo, este disminuyó a $6,75 \pm 1,10$ (Gráfico 3).

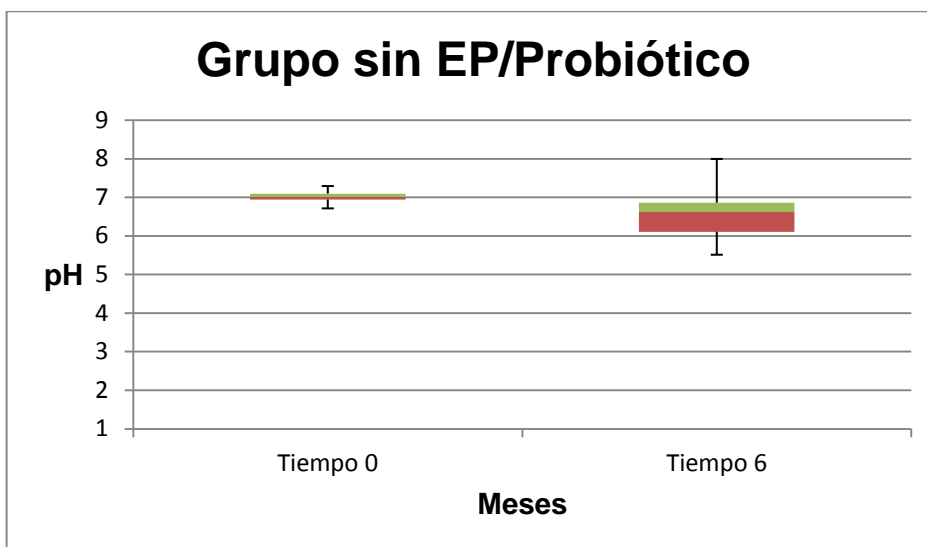


Gráfico 3: pH salival en grupo sin EP que consumió leche con probiótico en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6).

Por otra parte el grupo sin EP que consumió leche con placebo presentó un pH promedio en tiempo cero de $7,88 \pm 0,49$, el cual disminuyó a $7,58 \pm 0,66$ luego de 6 meses de consumo, sin diferencia estadística ($p=0,16$) (Gráfico 4).

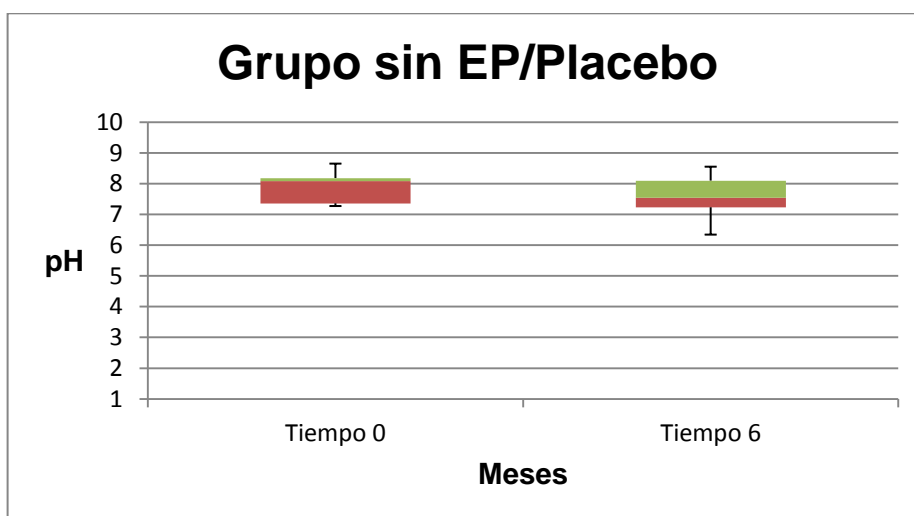


Gráfico 4: pH salival en grupo sin EP que consumió leche con placebo en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6). Se aplicó t-test, $p=0,16$.

Los resultados obtenidos de pH en los 4 grupos de estudio en tiempo 0 y a los 6 meses de consumo del lácteo se resumen en tabla 5.

Tabla 5: Resumen de pH salival de sujetos portadores de PR con y sin EP que consumieron probiótico o placebo (Promedio y desviación estándar).

Grupo de estudio	pH±SD tiempo 0	pH±SD tiempo 6	Valor de P
EP /Probiótico	7,18±0,59	6,69±1,18	0,09
EP/Placebo	7,51±0,55	7,05±0,74	0,03*
Sin EP/Probiótico	6,99±0,27	6,75±1,10	-
Sin EP/Placebo	7,88±0,49	7,58±0,66	0,16

*Diferencia estadística $p < 0,05$.
SD: Desviación estándar

5.2.2 Análisis de Velocidad de flujo salival (ml/min).

El grupo con EP que consumió leche con probiótico presentó una mediana de VFS en tiempo cero de 0,45 con rango de 0,12. Luego de 6 meses de consumo, esta disminuyó a 0,27 con rango de 0,42, sin diferencia estadística ($p=0,53$) (Gráfico 5).

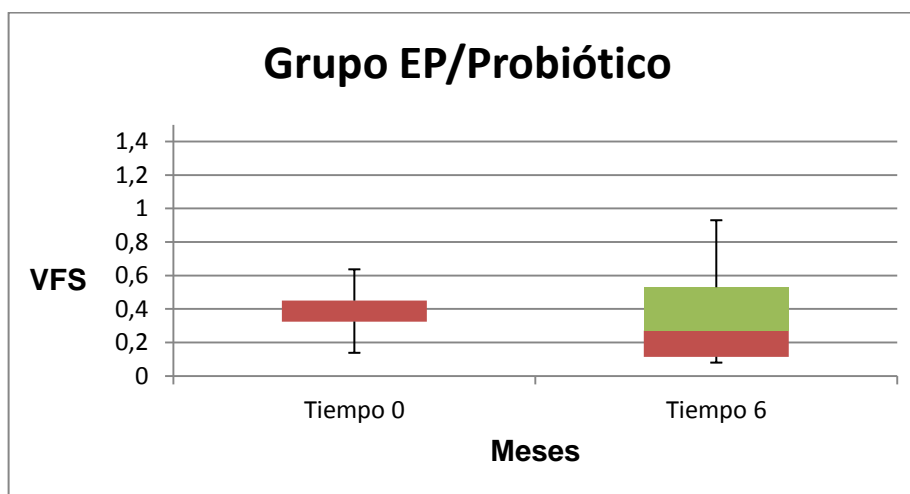


Gráfico 5: VFS (ml/min) en grupo con EP que consumió leche con probiótico, en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6). Se aplicó test de Wilcoxon, $p=0,53$.

Por otra parte el grupo con EP que consumió leche con placebo presentó una mediana de VFS en tiempo cero de 0,55 con rango de 0,43, la cual disminuyó luego de 6 meses de consumo de leche a 0,29 con rango de 0,26, con diferencia estadística ($p=0,04$) (Gráfico 6).

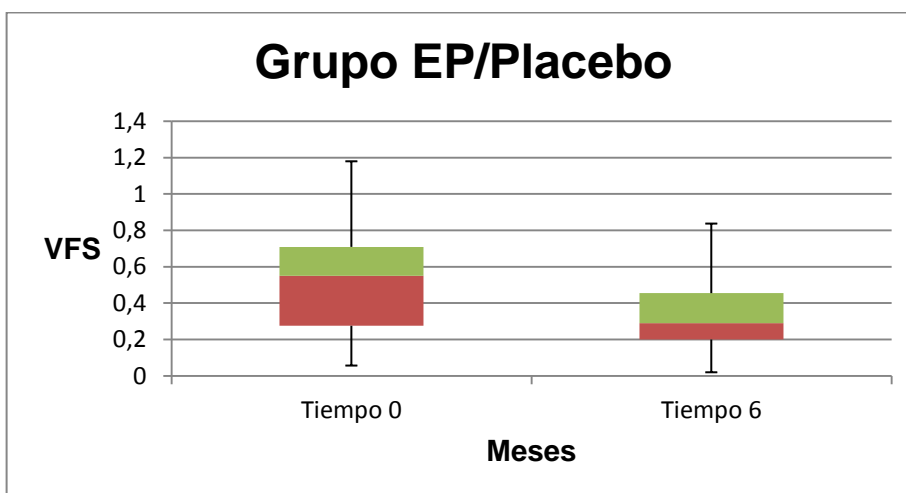


Gráfico 6: VFS (ml/min) en grupo con EP que consumió leche con placebo, en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6). Se aplicó test de Wilcoxon, $p=0,04$.

El grupo sin EP que consumió leche con probiótico presentó una mediana de VFS en tiempo cero de 0,41 con un rango de 0,12. Luego de 6 meses de consumo, esta disminuyó a 0,27 con un rango de 0,18 (Gráfico 7).

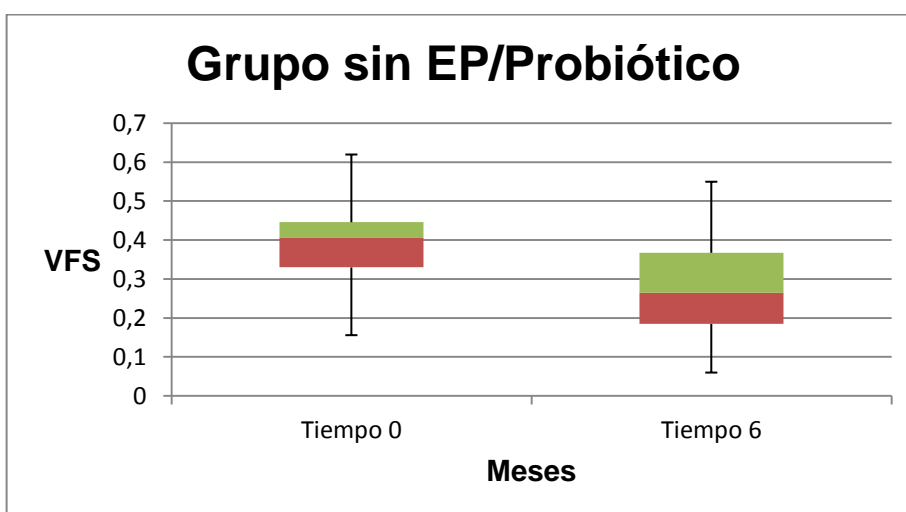


Gráfico 7: VFS (ml/min) en grupo sin EP que consumió leche con probiótico, en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo.

El grupo sin EP que consumió leche con placebo presentó una mediana de VFS en tiempo cero de 0,44 con un rango de 0,38. Luego de 6 meses de consumo aumentó a 0,63 con un rango de 0,39, sin diferencia estadística ($p=0,96$) (Gráfico 8).

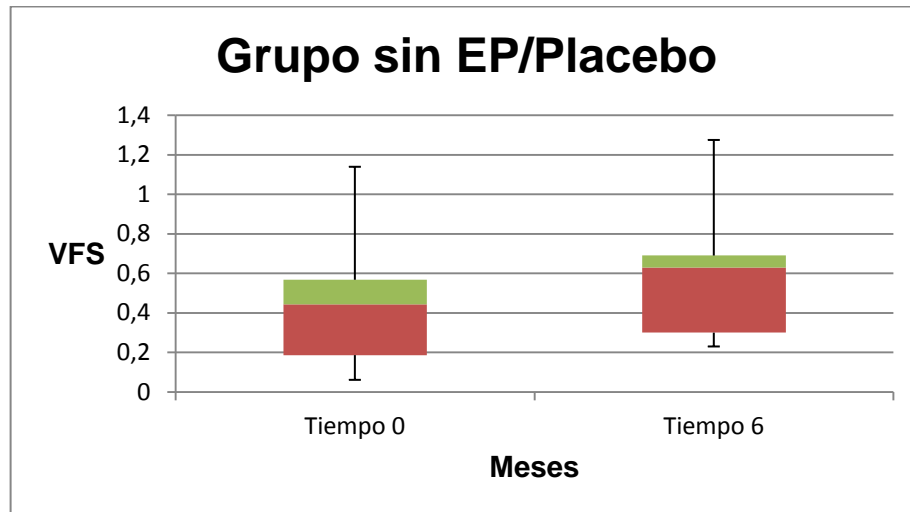


Gráfico 8: VFS (ml/min) en grupo sin EP que consumió leche con placebo, en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6). Se aplicó test de Wilcoxon, $p=0,96$.

Los resultados obtenidos de VFS en los 4 grupos de estudio en tiempo 0 y a los 6 meses de consumo del lácteo se resumen en tabla 6.

Tabla 6: Resumen de VFS (ml/min) de sujetos portadores de PR con y sin EP que consumieron probiótico o placebo (Mediana y rango).

Grupo de estudio	VFS (rango) Tiempo 0	VFS (rango) Tiempo 6	Valor de p
EP /probiótico	0,45(0,12)	0,27(0,42)	0,53
EP/placebo	0,55(0,43)	0,29(0,26)	0,04*
Sin EP/probiótico	0,41(0,12)	0,27(0,18)	-
Sin EP/placebo	0,44(0,38)	0,63(0,39)	0,96

*Diferencia estadística $p < 0,05$.

5.3 Análisis de recuento de LGC (UFC/ml) por grupo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.

El grupo con EP que consumió leche con probiótico presentó una mediana de 1987 UFC/ml con rango de 1734 en tiempo cero. Luego de 6 meses de consumo, ésta disminuyó a 981,50 UFC/ml con rango de 865,63, con diferencia estadística ($p=0,03$) (Gráfico 9).

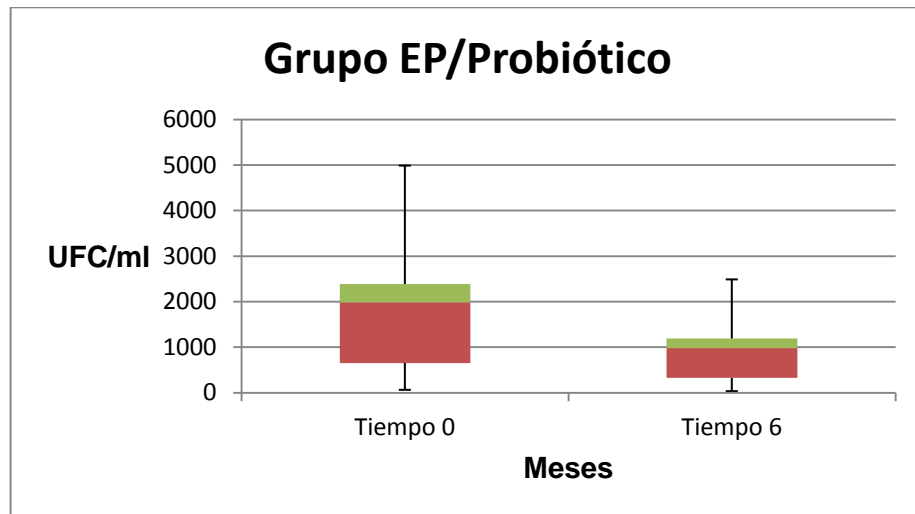


Gráfico 9: Recuento de LGC en grupo con EP que consumió leche con probiótico, en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6). Se aplicó test de Wilcoxon, $p=0,03$.

Por otra parte el grupo con EP que consumió leche con placebo presentó una mediana de 2048,44 UFC/ml en tiempo cero con rango de 1254,25, la cual aumentó luego de 6 meses de consumo de leche a 2403 UFC/ml con rango de 6114,25, sin diferencia estadística ($p=0,18$) (Gráfico 10).

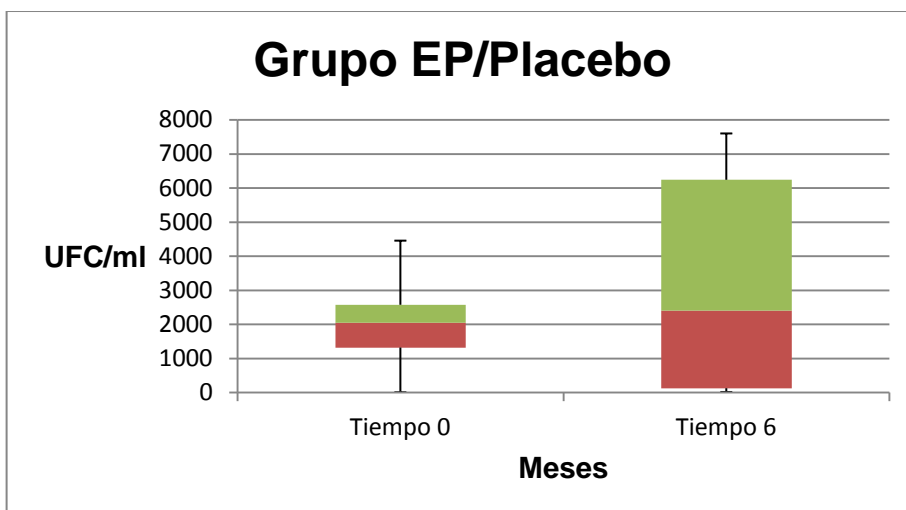


Gráfico 10: Recuento de LGC en grupo con EP que consumió leche con placebo, en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6). Se aplicó test de Wilcoxon, $p=0,18$.

El grupo sin EP que consumió leche con probiótico presentó una mediana de 118,50 UFC/ml con un rango de 86,75 en tiempo cero. Luego de 6 meses de consumo, ésta aumentó a 128 UFC/ml con rango de 219,62 (Gráfico 11).

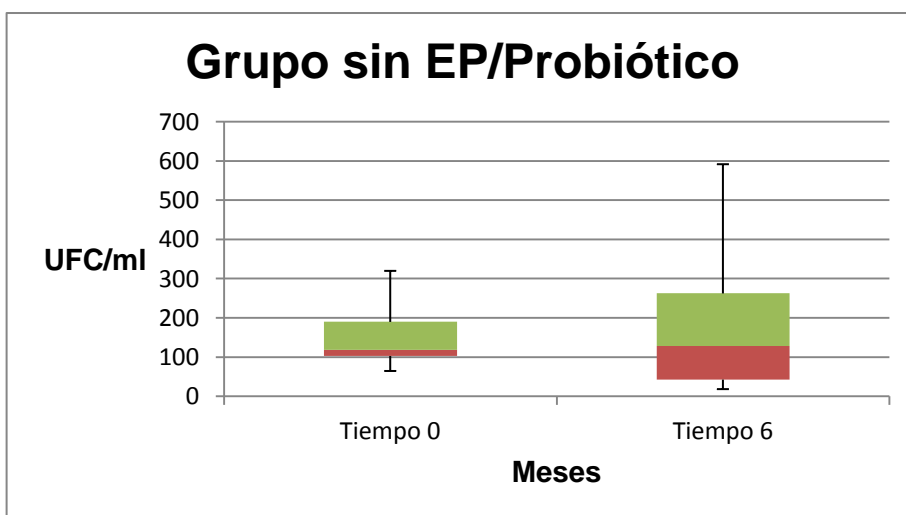


Gráfico 11: Recuento de LGC en grupo sin EP que consumió leche con probiótico, en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6).

Por otra parte el grupo sin EP que consumió leche con placebo presentó una mediana de 645 UFC/ml en tiempo cero con rango de 583, la cual disminuyó luego de 6 meses de consumo de leche a 345,50 UFC/ml con rango de 643, sin diferencia estadística ($p=0,96$) (Gráfico 12).

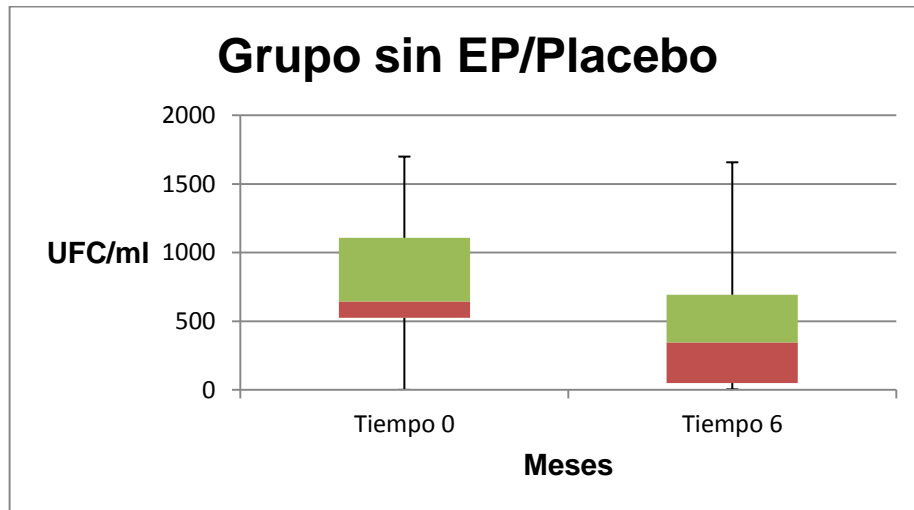


Gráfico 12: Recuento de LGC en grupo sin EP que consumió leche con placebo, en tiempo cero (Tiempo 0) y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6). Se aplicó test de Wilcoxon, $p=0,96$.

Los resultados obtenidos anteriormente se resumen en Tabla 7.

Tabla 7: Resumen de recuento de LGC (UFC/ml) de sujetos portadores de PR con y sin EP que consumieron probiótico o placebo (Mediana y rango).

Grupo de estudio	Recuento(rango) Tiempo 0	Recuento(rango) Tiempo 6	Valor de p
EP /Probiótico	1987,00 (1734)	981,50 (865,63)	0,03*
EP/Placebo	2048,44 (1254,25)	2403,00 (6114,25)	0,18
Sin EP/Probiótico	118,50 (86,75)	128,00 (219,62)	-
Sin EP/Placebo	645,00 (583)	345,50 (643)	0,96

*Diferencia estadística $p < 0,05$.

5.4 Análisis de identificación de especies de LGC por grupo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.

De todas las muestras estudiadas se observaron seis especies distintas de LGC. Se aisló un total de 454 colonias de LGC en el tiempo cero, de las cuales un 65,19% correspondió a *C. albicans*. Las especies de CNCA correspondieron a un 34,81%, de las cuales, las más prevalentes fueron *C. glabrata* (15,42%), *C. tropicalis* (12,78%), *C. lusitaneae* (2,86%), *C. humicola* (2,64%) y *C. dubliniensis* (1,10%). Luego de 6 meses, se aislaron 333 colonias, de las cuales *C. albicans* correspondió a un 60,06%. Las especies de CNCA correspondieron a un 39,94% siendo *C. humicola* (17,12%) la más prevalente, seguida por *C. tropicalis* (9,61%), *C. dubliniensis* (6,61%), *C. lusitaneae* (3,90%) y *C. glabrata* (2,70%). La distribución de cada especie en la muestra total al inicio y a los 6 meses de consumo se describe en gráfico 13.

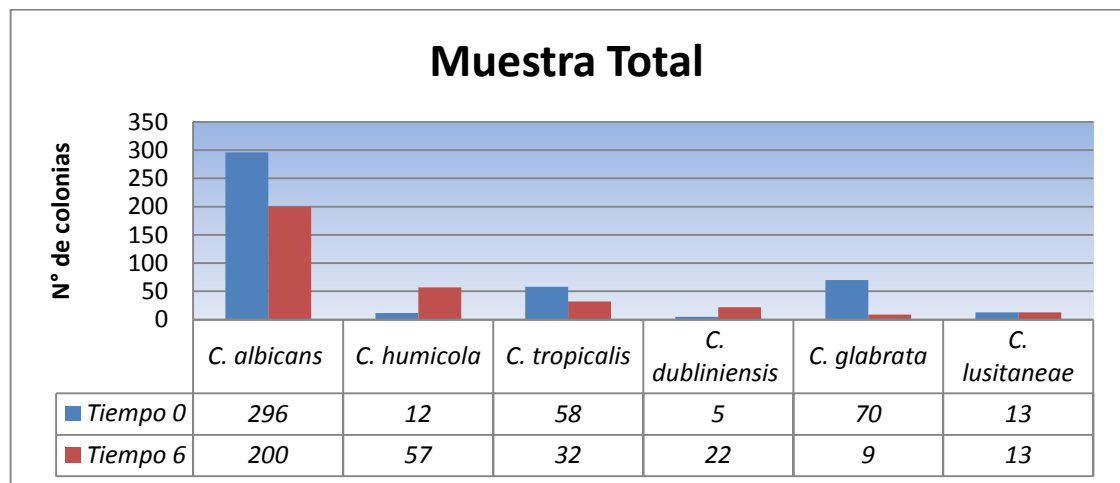


Gráfico 13: Identificación de LGC mediante PCR y/o test bioquímico en la muestra total a tiempo 0 y a los 6 meses de consumo (Tiempo 6).

Del total de colonias aisladas al inicio del estudio, 369 correspondieron a AM con EP y 85 a AM sin EP. A los 6 meses, 223 correspondieron a AM con EP y 110 a AM sin EP. Cabe destacar que a tiempo 0 fue mayor la diversidad de especies del género *Candida* identificadas en el grupo con EP, comparado con el grupo sin EP.

Luego de 6 meses, los AM con EP que consumieron leche con probiótico o placebo disminuyeron su diversidad de especies presentando 4 en total. En contraste a los sin EP que consumieron leche con probiótico o placebo que aumentaron la diversidad de especies, presentando 5 en total. De todas las especies identificadas, *C. albicans*, *C. humicola* y *C. tropicalis* estuvieron presentes en todos los grupos. En cambio, *C. dubliniensis* solo estuvo presentes en los AM con EP que consumieron leche con probiótico y en los sin EP, independientes del tipo de leche. Por otra parte, *C. glabrata* solo estuvo presente en el grupo con EP/Placebo, y *C. lusitaneae* en los AM sin EP, también independiente del tipo de leche consumida durante 6 meses.

A continuación se describe en detalle la distribución de especies de LGC en cada grupo de estudio a tiempo cero y a los 6 meses del consumo del lácteo.

5.4.1 Identificación de especies de LGC en grupo con EP/Probiótico, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.

En el grupo con EP/Probiótico a tiempo cero (T0), *C. albicans* correspondió a un 56,38% de las colonias aisladas, seguida por *C. tropicalis* (22,15%), *C. glabrata* (16,11%), *C. humicola* (4,70%) y *C. dubliniensis* (0,67%). Luego del consumo de leche con probiótico durante 6 meses, *C. albicans* siguió siendo la especie más prevalente (77,17%), y además se observó una disminución en la diversidad de especies de CNCA. Respecto a esto, *C. glabrata* no se encontró en ninguno de los AM de este grupo, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis* se identificó en un 6,5% y *C. humicola* en un 9,8% (Gráfico 14).

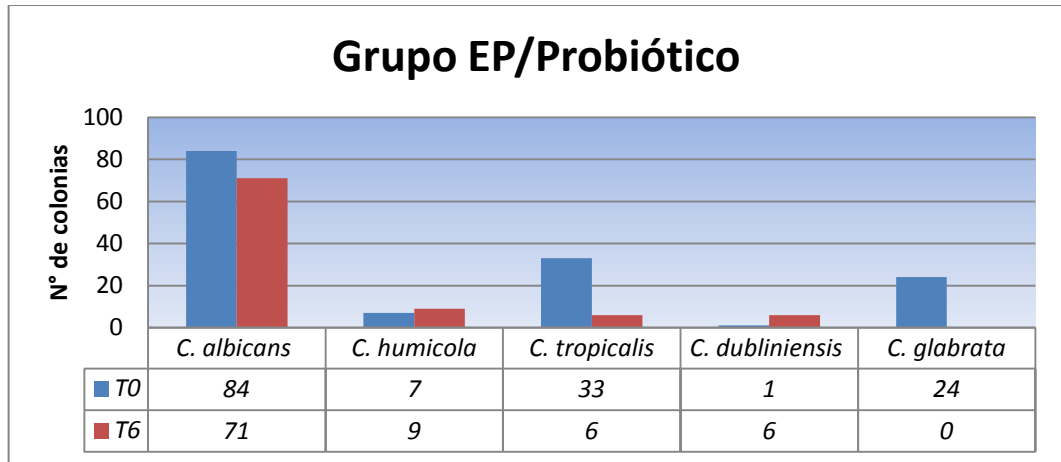


Gráfico 14: Identificación de LGC mediante PCR y/o test bioquímico en grupo con EP que consumió leche con probiótico durante 6 meses, comparado al T0.

5.4.2 Identificación de especies de LGC en grupo con EP/Placebo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.

En el grupo con EP/Placebo a tiempo cero (T0), *C. albicans* correspondió a un 79,09% de las colonias aisladas, seguida por *C. glabrata* (7,73%), *C. tropicalis* (6,82%), *C. lusitaneae* (4,55%) y *C. dubliniensis* (1,82%). Luego del consumo de leche con placebo durante 6 meses, *C. albicans* siguió siendo la especie más prevalente (75,57%). Respecto a las especies de CNCA, *C. dubliniensis* y *C. lusitaneae* no se encontraron en ninguno de los AM de este grupo; *C. tropicalis* se encontró en un 1,53%, *C. glabrata* en un 6,87% y *C. humicola* en un 16,03% (Gráfico 15).

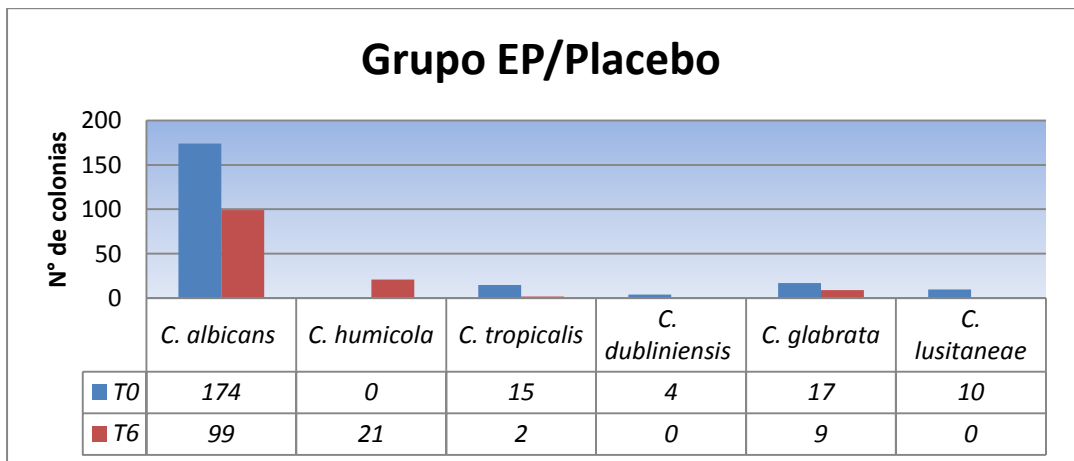


Gráfico 15: Identificación de LGC mediante PCR y/o test bioquímico en grupo con EP que consumió leche con placebo durante 6 meses, comparado al T0.

5.4.3 Identificación de especies de LGC en grupo sin EP/Probiótico, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.

En el grupo sin EP/Probiótico a tiempo cero (T0), *C. albicans* correspondió a un 80% de las colonias aisladas, seguida por *C. lusitaneae* (12%) y *C. humicola* (8%). Luego del consumo de leche con probiótico durante 6 meses, aumentó la diversidad de especies de CNCA y disminuyó *C. albicans* (29,74%). Respecto a las especies de CNCA, *C. dubliniensis* se encontró en un 29,74%, seguida por *C. lusitaneae* (21,27%), *C. humicola* (10,64%) y *C. tropicalis* (8,51%) (Gráfico 16).

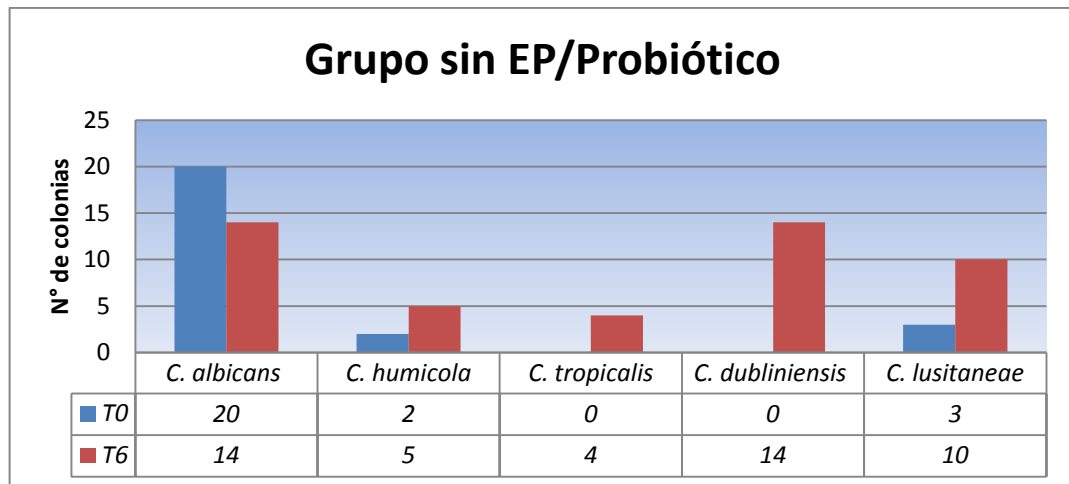


Gráfico 16: Identificación de LGC mediante PCR y/o test bioquímico en grupo sin EP que consumió leche con probiótico durante 6 meses, comparado al T0.

5.4.4 Identificación de especies de LGC en grupo sin EP/Placebo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.

En el grupo sin EP/Placebo a tiempo cero (T0), *C. albicans* correspondió a un 30% de las colonias aisladas, *C. glabrata* (48,33%), *C. tropicalis* (16,67%) y *C. humicola* (5%). Luego del consumo de leche con placebo durante 6 meses, *C. albicans* correspondió a un 25,40%. Respecto a las especies de CNCA, *C. humicola* correspondió a un 34,92%, seguida por *C. tropicalis* (31,75%), *C. lusitaneae* (4,76%) y *C. dubliniensis* (3,17%) (Gráfico 17).

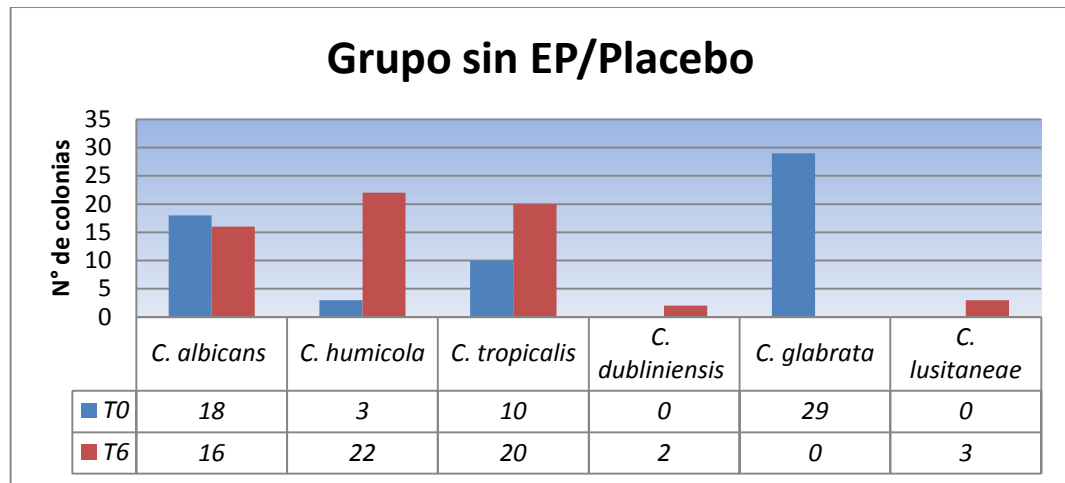


Gráfico 17: Identificación de LGC mediante PCR y/o test bioquímico en grupo sin EP que consumió leche con placebo durante 6 meses, comparado al T0.

5.5 Asociación de pH salival con especies de LGC por grupo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.

Al inicio del estudio, en los AM con y sin EP, *C. albicans* fue la especie más prevalente cuando el pH fue más ácido ($\text{pH} < 6,5$). Respecto a las CNCA, se observó mayor diversidad cuando el pH estuvo cercano a la neutralidad o fue más alcalino ($\text{pH} > 7,1$). Luego del consumo de leche con probiótico la distribución de las especies de LGC según pH se modificó. Respecto a esto, el porcentaje de *C. albicans* disminuyó en los AM que presentaron pH ácido ($\text{pH} < 6,5$). Por otra parte, aumentó la diversidad de especies de CNCA cuando el pH salival fue más bajo que los valores obtenidos inicialmente, en los AM con y sin EP. Sin embargo, en los sujetos con y sin EP que consumieron placebo también existió esta tendencia.

A continuación se describe en detalle la distribución de especies según pH, en cada grupo de estudio.

5.5.1 Especies de LGC aisladas del grupo con EP/Probiótico en función del pH salival a tiempo cero y 6 meses.

Al inicio del estudio, se observaron claras diferencias en la distribución de las LGC al agrupar las muestras en 4 categorías en función de intervalos de pH salival, como se observa en el gráfico 18. Se observó una mayor diversidad de CNCA

cuando el pH salival se encontró en el intervalo que va entre 7,1 y 7,5. *C. albicans*, estuvo presente en todos los rangos de pH a excepción del rango que va entre 6,5 y 7,0.

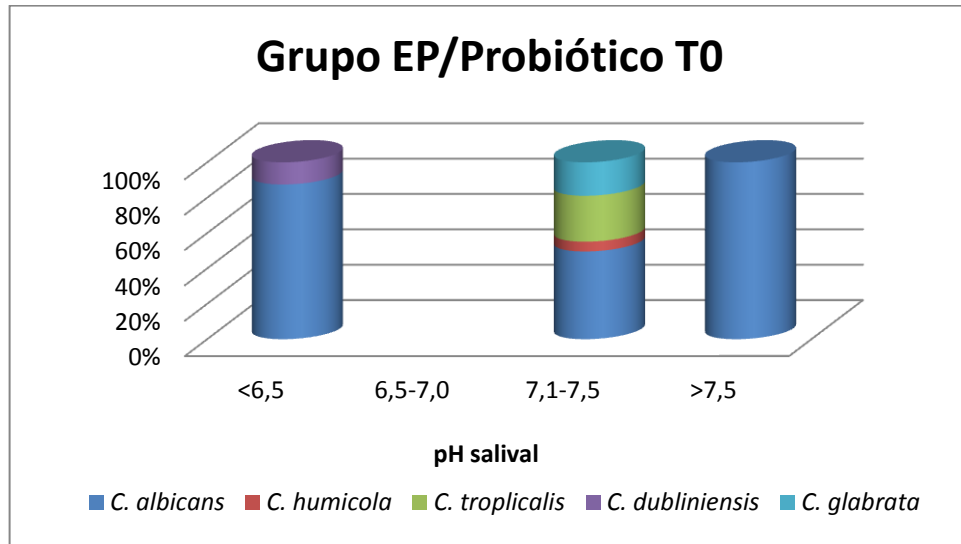


Gráfico 18: Diversidad de especies de LGC versus pH salival en grupo con EP/Probiótico en tiempo cero (T0).

Luego del consumo de leche suplementada con probiótico, existió mayor diversidad de especies de CNCA cuando el pH fue menor a 6,5. *C. albicans* se identificó en todos los intervalos de pH, sin embargo, disminuyó su porcentaje a un pH menor a 6,5 (Gráfico 19).

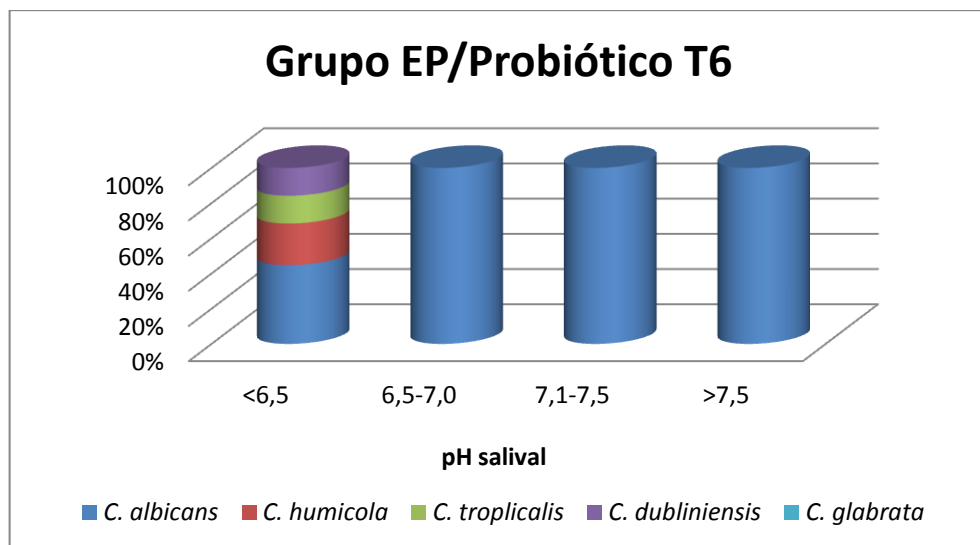


Gráfico 19: Diversidad de especies de LGC versus pH salival en grupo con EP/Probiótico a los 6 meses.

5.5.2 Especies de LGC aisladas del grupo con EP/Placebo en función del pH salival a tiempo 0 y 6 meses.

Al inicio del estudio, se observó una mayor diversidad de CNCA en los sujetos cuyo pH fue mayor a 7,5. *C. albicans* se encontró en todos los intervalos de pH (Gráfico 20).

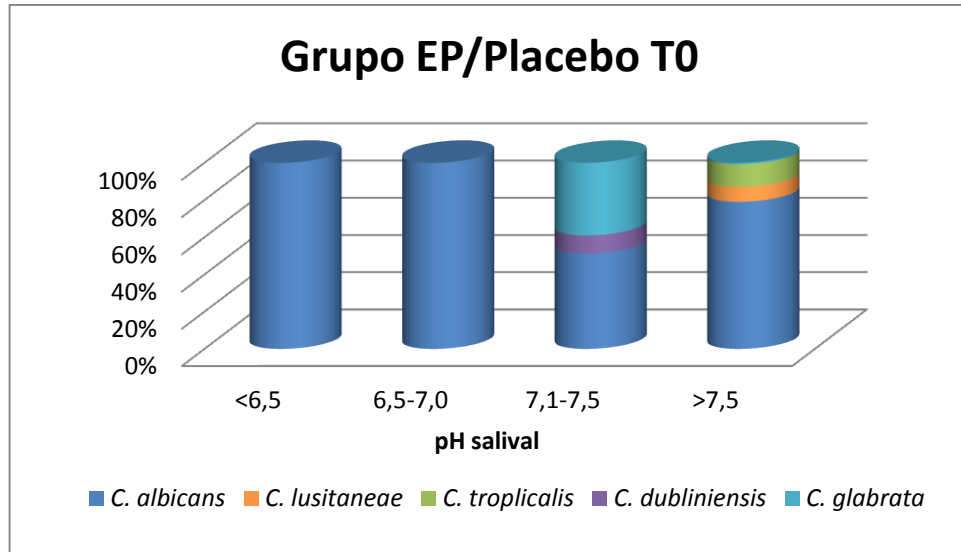


Gráfico 20: Diversidad de especies de LGC versus pH salival en grupo con EP/Probiótico en tiempo cero (T0).

Luego del consumo de leche suplementada con placebo, se observó mayor diversidad de especies en el intervalo de pH 6,5-7,0. *C. albicans* se identificó en todos los intervalos de pH, disminuyendo su porcentaje a pH<6,5 y entre 6,5-7,0. Cabe destacar que se identificó *C. humicola*, especie que no se encontraba anteriormente, la cual se presentó a pH mayores o iguales a 6,5 (Gráfico 21).

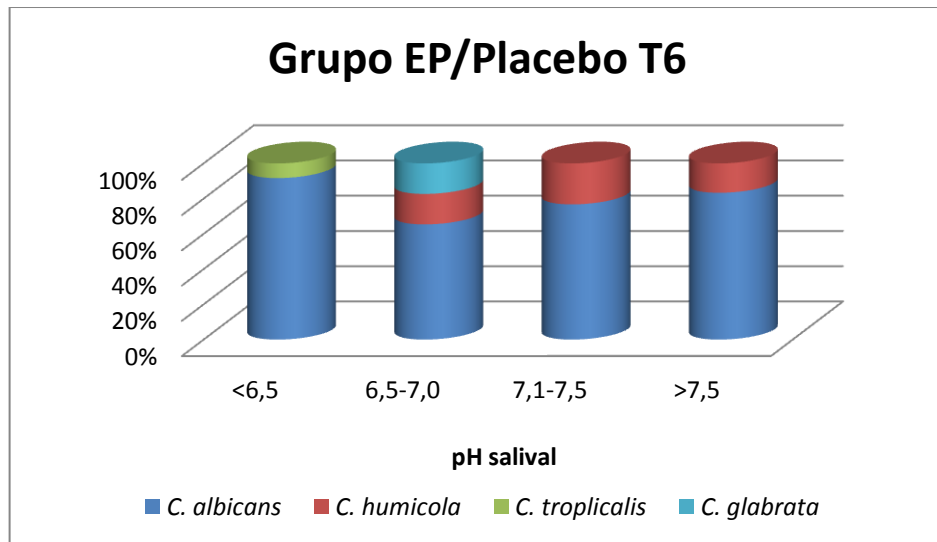


Gráfico 21: Diversidad de especies de LGC versus pH salival en grupo con EP/Placebo a los 6 meses de consumo (T6).

5.5.3 Especies de LGC aisladas del grupo sin EP/Probiótico en función del pH salival a tiempo cero y 6 meses.

Al inicio del estudio, se observó una mayor diversidad de especies en los sujetos cuyo pH salival fue entre 6,5-7,0 (Gráfico 22). Luego del consumo de leche suplementada con probiótico, existió mayor diversidad de CNCA a pH menores a 6,5, disminuyendo el porcentaje de *C. albicans* en esta categoría. Si bien desapareció a pH 6,5-7,0, aumentó a pH 7,1-7,5 (Gráfico 23).

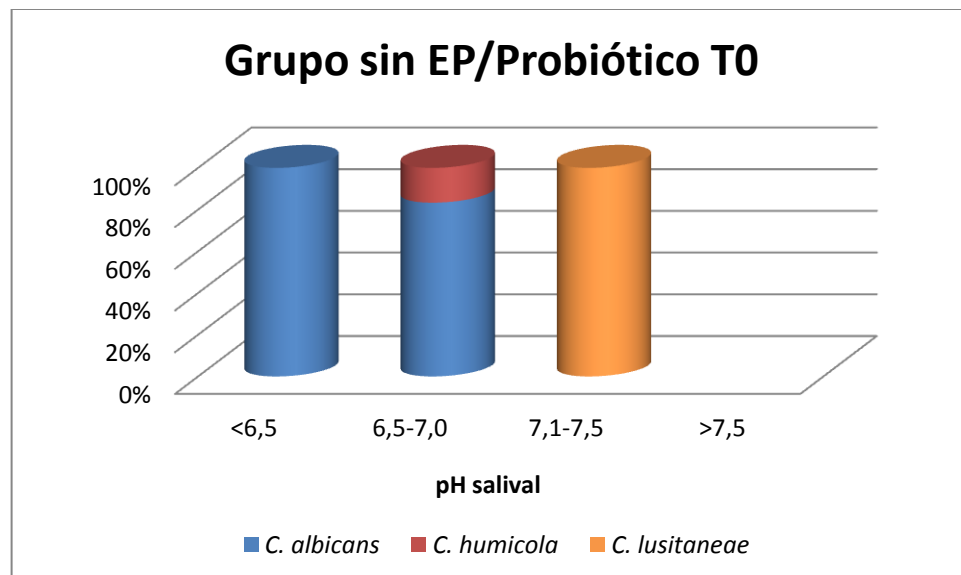


Gráfico 22: Diversidad de especies de LGC versus pH salival en grupo sin EP/Probiótico al tiempo cero (T0).

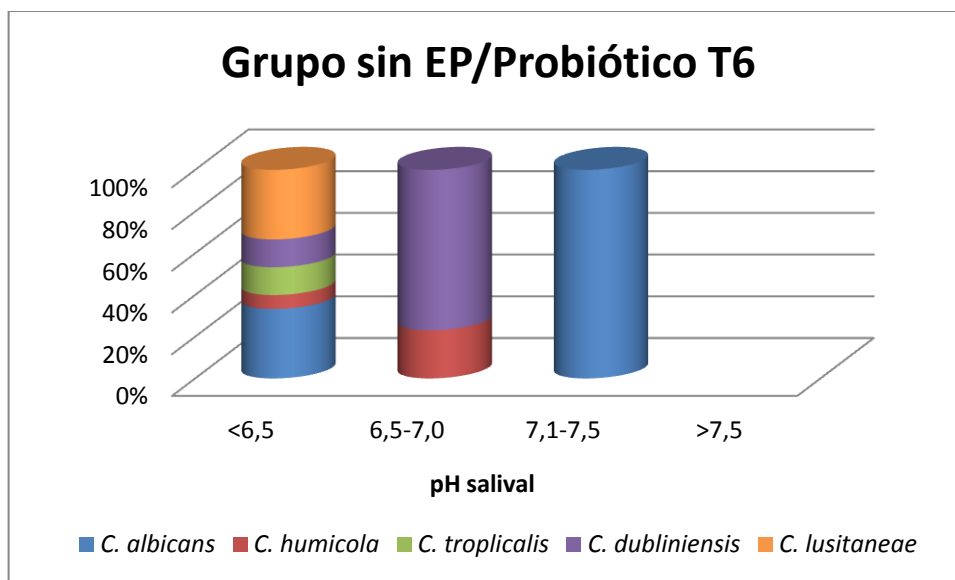


Gráfico 23: Diversidad de especies de LGC versus pH salival en grupo sin EP/Probiótico a los 6 meses de consumo (T6).

5.5.4 Especies de LGC aisladas del grupo sin EP/Placebo en función del pH salival a tiempo cero y 6 meses.

Al inicio del estudio, se observó una mayor diversidad de especies en los sujetos cuyo pH salival fue entre 7,1-7,5 y mayor a 7,5 (Gráfico 24).

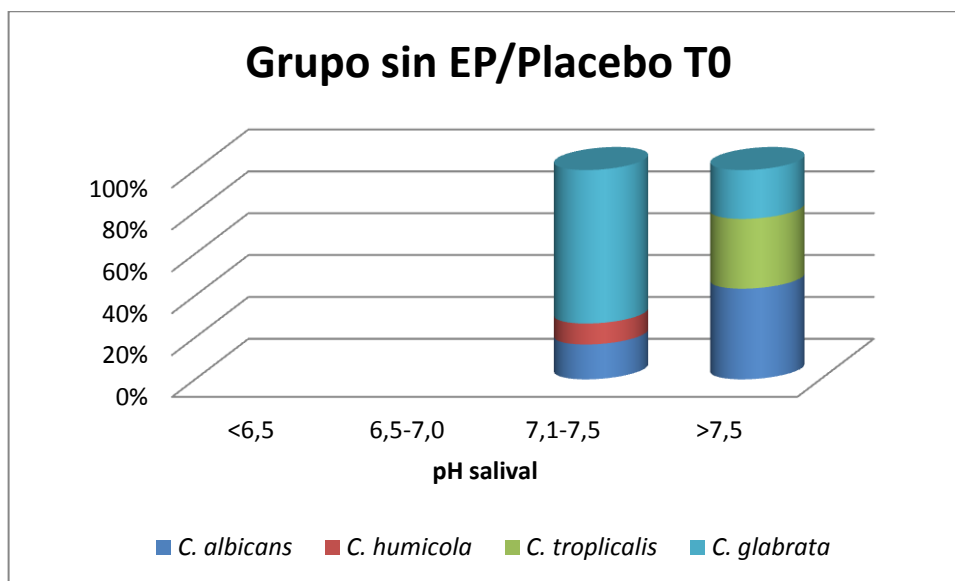


Gráfico 24: Diversidad de especies de LGC versus pH salival en grupo sin EP/Placebo al tiempo cero (T0).

Luego del consumo de leche suplementada con placebo se mantuvo una mayor diversidad de especies a pH 7,1-7,5 y mayores a 7,5. Sin embargo, hubo variación en las especies existentes, con respecto a las iniciales. Por una parte, no se identificó *C. glabrata* y se identificó *C. lusitanae* a pH > 7,5, que no se encontraba inicialmente. Cabe destacar que *C. tropicalis* se identificó tanto a pH ácido como alcalino; y *C. humicola* se encontró a un pH mayor o igual a 6,5 en este grupo (Gráfico 25).

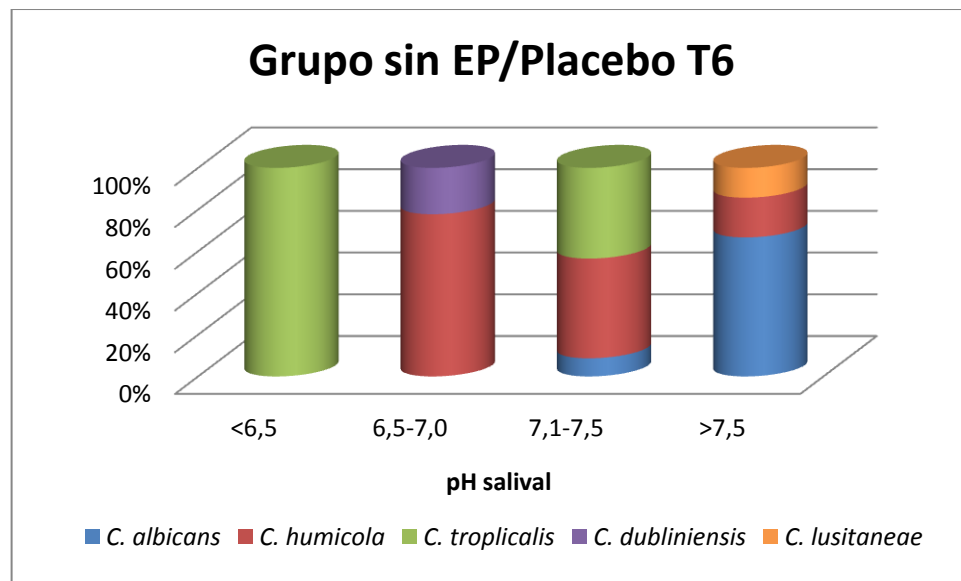


Gráfico 25: Diversidad de especies de LGC versus pH salival en grupo sin EP/Placebo a los 6 meses de consumo (T6).

5.6 Asociación de VFS (ml/min) con especies de LGC por grupo, a tiempo 0 y 6 meses de consumo del lácteo.

Para su análisis se agruparon las especies de LGC en 3 categorías: menor a 0,2 ml/min (hiposialia), 0,2-0,4 ml/min (flujo salival reducido), mayor a 0,4 ml/min (flujo salival normal) (Glazar y cols., 2010).

Al inicio del estudio, *C. albicans* fue la especie más prevalente cuando la VFS fue menor a 0,2 ml/min a excepción del grupo sin EP que consumió placebo que presentó mayor prevalencia de *C. glabrata*. Respecto a las especies de CNCA, se observó mayor diversidad cuando la VFS fue mayor a 0,4 ml/min. Estos resultados se cumplen para todos los grupos a excepción del grupo sin EP que consumió

placebo, en los cuales se observó igual proporción de CNCA a valores $< 0,2$ y $> 0,4$ ml/min.

Luego del consumo de leche con probiótico, en los AM con y sin EP, la distribución de especies de LGC según VFS se modificó. Respecto a esto, se observó mayor diversidad de CNCA cuando la VFS fue menor a $0,2$ ml/min. Por otra parte, los AM con EP que consumieron leche con placebo presentaron un aumento en la diversidad de CNCA a VFS $<0,2$ ml/min y entre $0,2$ y $0,4$ ml/min y disminuyó a valores $>0,4$ ml/min. En los AM sin EP aumentó la diversidad cuando la VFS fue entre $0,2$ y $0,4$ ml/min y mayor a $0,4$ ml/min.

A continuación se describe en detalle la distribución de especies según VFS, en cada grupo de estudio.

5.6.1 Especies de LGC aisladas del grupo con EP/Probiótico en función de la VFS (ml/min) a tiempo cero y 6 meses.

Al análisis en conjunto de todas las especies de LGC del grupo con EP/Probiótico al inicio del estudio, se observó una mayor diversidad de especies CNCA en los sujetos cuya VFS fue mayor a $0,4$ ml/min (Gráfico 26). Luego del consumo de leche suplementada con probiótico, se observó mayor diversidad de CNCA cuando la VFS fue menor a $0,2$ ml/min, disminuyendo la frecuencia de *C. albicans* en esta categoría (Gráfico 27).

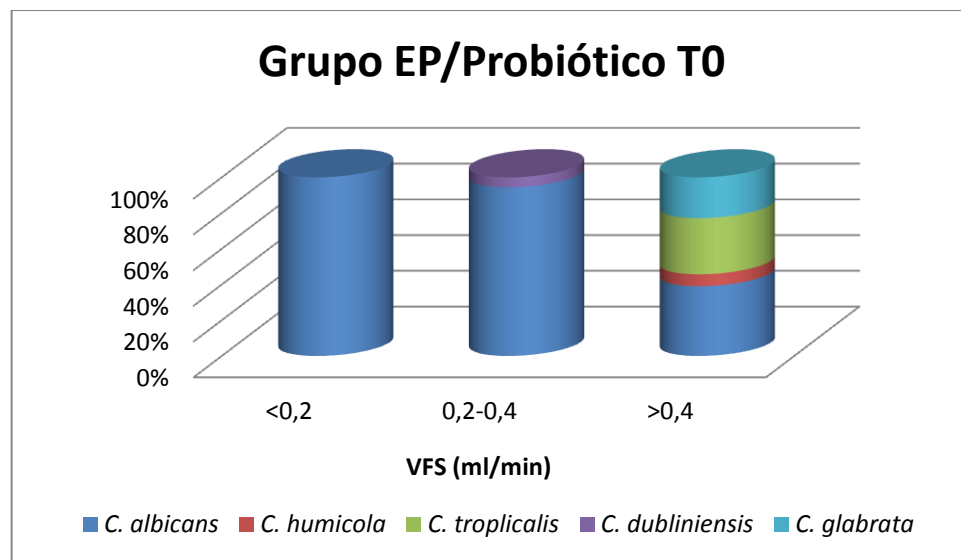


Gráfico 26: Diversidad de especies de LGC versus VFS en grupo con EP/Probiótico en tiempo cero (T0).

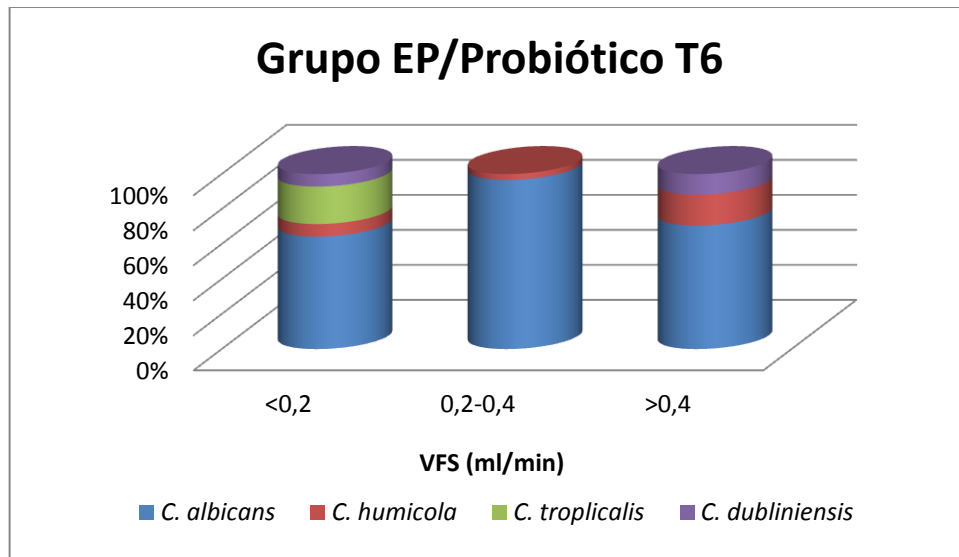


Gráfico 27: Diversidad de especies de LGC versus VFS en grupo con EP/Probiótico a los 6 meses de consumo (T6).

5.6.2 Especies de LGC aisladas del grupo con EP/Placebo en función de la VFS (ml/min) a tiempo 0 y 6 meses.

Al análisis en conjunto de todas las especies de LGC del grupo con EP/Placebo al inicio del estudio, se observó una mayor diversidad de especies CNCA en los sujetos cuya VFS fue mayor a 0,4 ml/min (Gráfico 28). Luego del consumo de leche con placebo, aumentó la diversidad de CNCA a VFS<0,2 y entre 0,2-0,4 ml/min, disminuyendo a valores >0,4 ml/min. *C. albicans* disminuyó su frecuencia en las categorías < 0,2 y >0,4 ml/min (Gráfico 29).

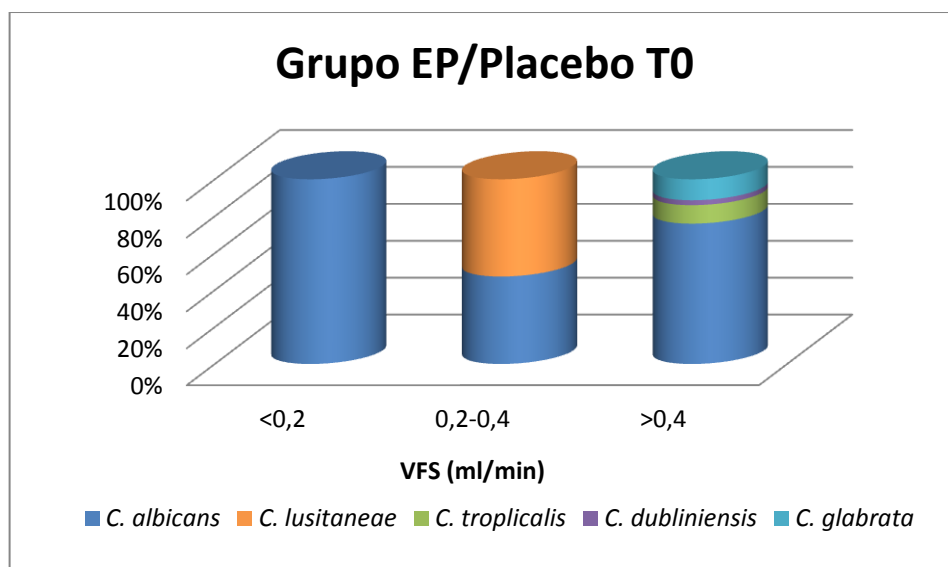


Gráfico 28: Diversidad de especies de LGC versus VFS en grupo con EP/Placebo en tiempo cero (T0).

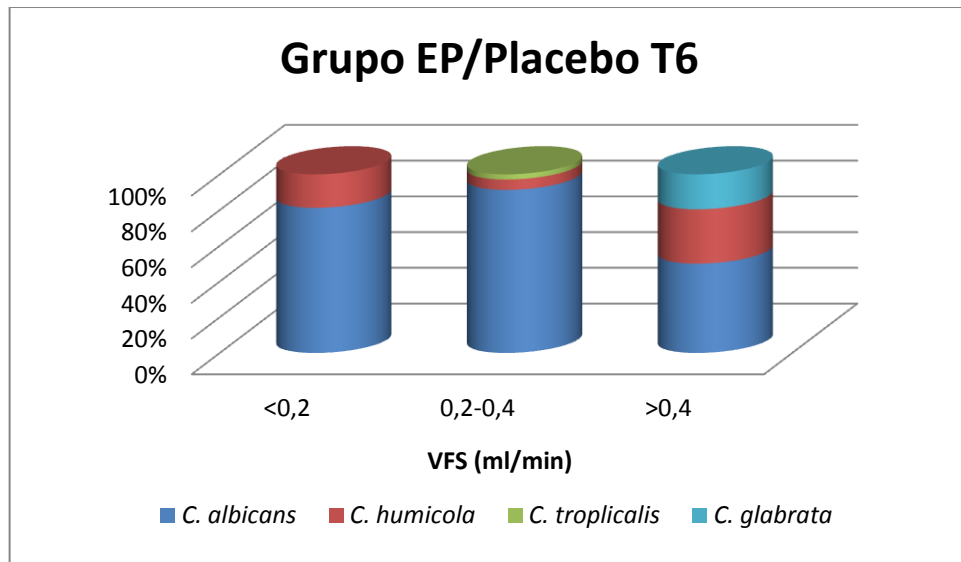


Gráfico 29: Diversidad de especies de LGC versus VFS en grupo con EP/Placebo a los 6 meses de consumo (T6).

5.6.3 Especies de LGC aisladas del grupo sin EP/Probiótico en función de la VFS (ml/min) a tiempo cero y 6 meses.

Al análisis en conjunto de todas las especies de LGC del grupo sin EP/Probiótico al inicio del estudio, se observó una mayor diversidad de especies en los sujetos cuya VFS fue mayor a 0,4 ml/min (Gráfico 30). Luego del consumo de leche suplementada con probiótico, se observó mayor diversidad de especies de CNCA cuando la VFS fue menor a 0,2 ml/min, no se identificó *C. albicans* en esta categoría (Gráfico 31).

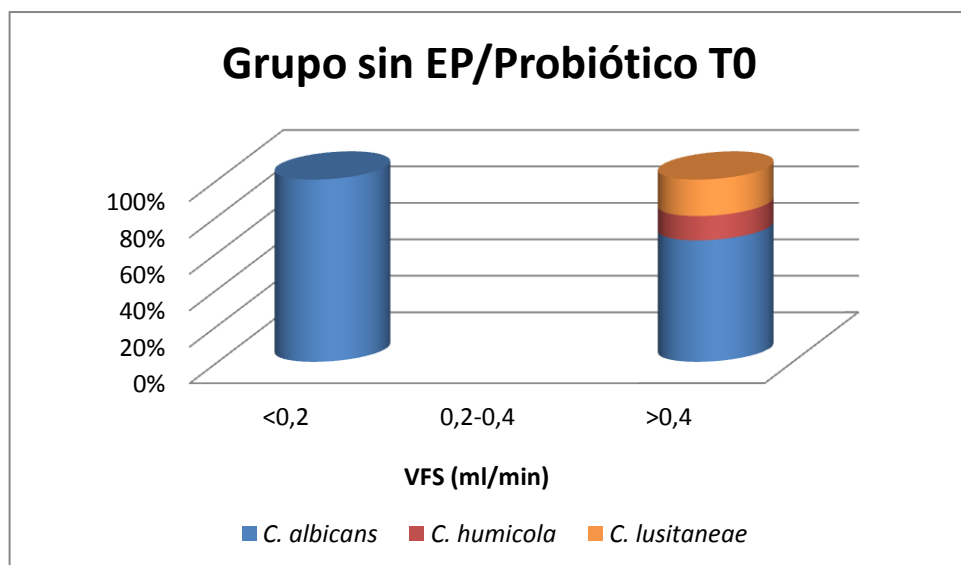


Gráfico 30: Diversidad de especies de LGC versus VFS en grupo sin EP/Probiótico en tiempo cero (T0).

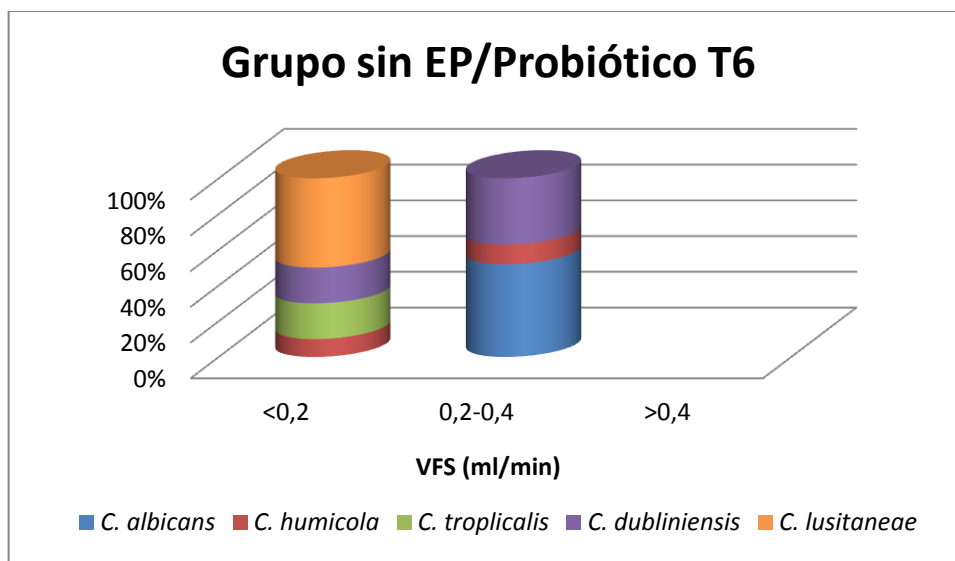


Gráfico 31: Diversidad de especies de LGC versus VFS en grupo sin EP/Probiótico a los 6 meses de consumo (T6).

5.6.4 Especies de LGC aisladas del grupo sin EP/Placebo en función de la VFS (ml/min) a tiempo cero y 6 meses.

Al análisis en conjunto de todas las especies de LGC del grupo sin EP/Placebo al inicio del estudio, se observó 3 especies del género *Candida* a VFS menores a 0,2 ml/min y mayores a 0,4 ml/min (Gráfico 32).

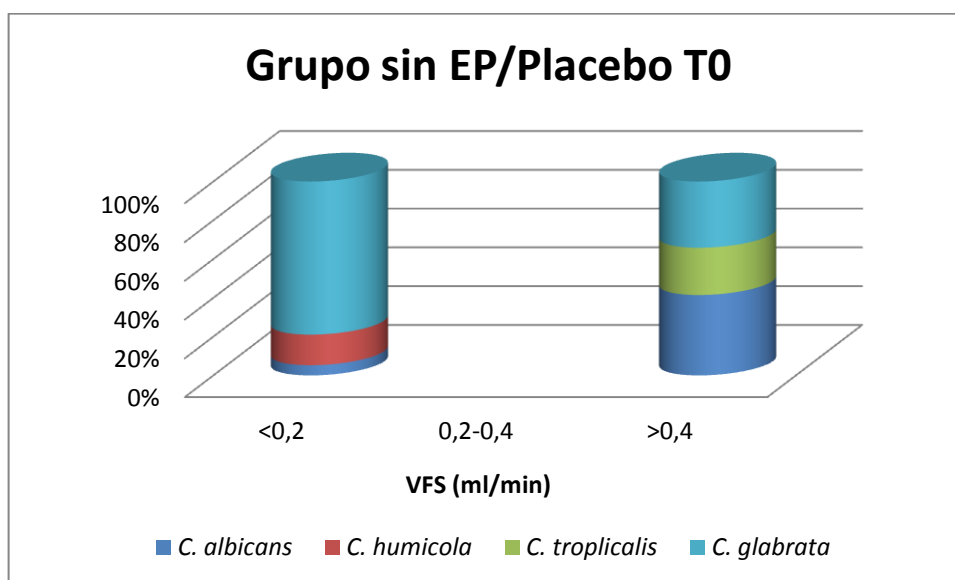


Gráfico 32: Diversidad de especies de LGC versus VFS en grupo sin EP/Placebo en tiempo cero (T0).

Luego del consumo de leche suplementada con placebo, se observó mayor diversidad de especies cuando la VFS fue mayor a 0,4 ml/min y aumentó la diversidad de especies CNCA cuando la VFS fue entre 0,2 y 0,4 ml/min y mayor a 0,4 ml/min (Gráfico 33).

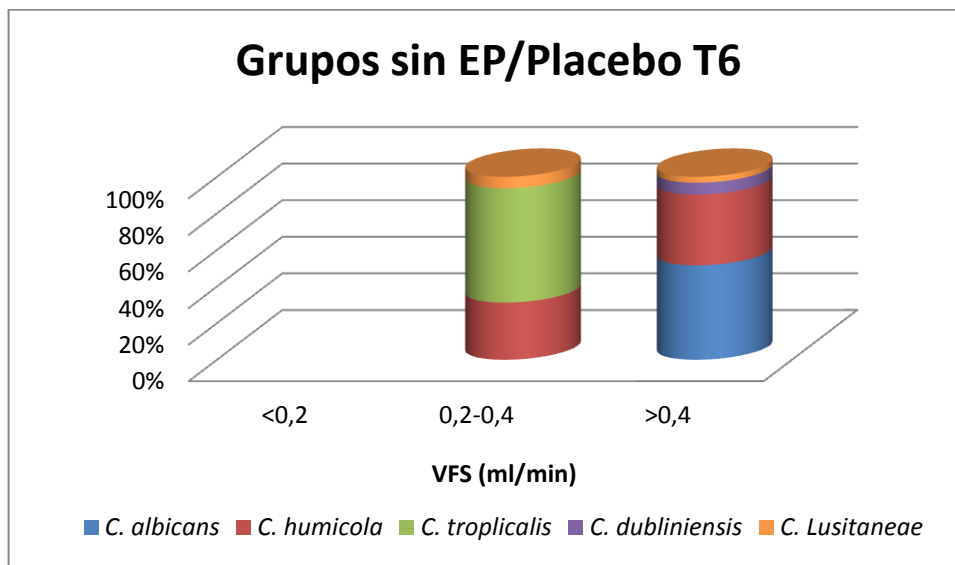


Gráfico 33: Diversidad de especies de LGC versus VFS en grupo sin EP/Placebo a los 6 meses de consumo (T6).

6. DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio fue determinar el efecto del consumo de leche suplementada con probiótico, durante un período de seis meses, en el recuento y diversidad de LGC asociado a cambios en el pH y velocidad de flujo salival, en AM portadores de PR con EP.

Según la literatura, individuos con EP presentan un mayor recuento de LGC en comparación con pacientes sin EP (Bilhan y cols., 2009; Lee y cols., 2013; Marinovski y cols., 2014), lo cual concuerda con nuestros hallazgos. En nuestro estudio, luego del consumo durante 6 meses de leche suplementada con probiótico (*L. rhamnosus* GG), se encontraron diferencias significativas en los individuos con EP, presentando una disminución del recuento de LGC. Al igual que en nuestra investigación, Hatakka y cols. (2007), observaron una disminución del 32% en el recuento de LGC en AM que consumieron queso enriquecido con probióticos (*L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS). Además, se observó un aumento en los recuentos del grupo control a la octava semana del estudio, lo cual concuerda con nuestra investigación, ya que el grupo con EP que consumió leche con placebo, presentó un incremento en los recuentos; sin embargo, este aumento fue sin diferencias estadísticas. En otro estudio, Mendoca y cols. (2012), evaluaron los efectos de la administración de una bebida láctea enriquecida con probióticos (*Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium breve*) durante 30 días, obteniéndose una reducción significativa de los recuentos de LGC tras su aplicación. Por otra parte, Li y cols. (2014) observaron que a las cuatro semanas del uso de probióticos (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), hubo una disminución de LGC en individuos con EP. Asimismo, Ahola y cols. (2002) determinaron que el consumo de queso suplementado con probióticos (*Lactobacillus* GG y *Lactobacillus rhamnosus* LC705), disminuyen el nivel de levaduras en saliva de adultos sanos. Sin embargo, este estudio no es del todo comparable, ya que examinaron individuos más jóvenes.

En nuestro estudio, los pacientes sin EP que consumieron probióticos o placebo no presentaron diferencias en el recuento de LGC, esto no concuerda con los resultados obtenidos por Ishikawa y cols. (2014), quienes evaluaron el recuento de LGC en individuos de edad avanzada, portadores de prótesis, sin síntomas clínicos. Estos investigadores utilizaron cápsulas que contenían 3 cepas probióticas (*Lactobacillus liofilizado rhamnosus HS111*, *Lactobacillus acidophilus HS101*, *Bifidobacterium bifidum*), durante 5 semanas. Ellos observaron una disminución de LGC tanto en el grupo experimental como en el grupo control, sin embargo, la disminución fue mayor en el primer grupo. Las diferencias con nuestra investigación, pueden deberse a la menor cantidad de individuos del grupo sin EP en nuestro estudio. Además, hay que considerar que cada cepa probiótica confiere distintos beneficios al hospedero, por lo tanto, para evaluar un beneficio en salud, cada cepa probiótica debe ser testeada individualmente. Por consiguiente, sus efectos no pueden extrapolarse directamente a las otras (Meurman, 2005), por lo tanto, los estudios mencionados anteriormente no son del todo comparables. Asimismo, se ha observado que la combinación de estas cepas puede potenciar algunos efectos y comportarse de manera sinérgica, lo cual podría haber ocurrido en los estudios mencionados previamente. Por otra parte, el vehículo de administración también puede influir en los resultados (Caglar y cols., 2005). Sin embargo, a partir de nuestro estudio se podría sugerir que la cepa probiótica *L. rhamnosus* GG por si sola, sería efectiva en la disminución del recuento de LGC, cuando es administrada en un producto lácteo durante 6 meses.

Si bien se desconoce el mecanismo exacto por el cual los probióticos disminuirían el recuento de LGC, Gomes y cols. (2015) plantearon que los principales mecanismos de actividad anti-*Candida* de los probióticos se debe a la competencia por sitios de unión y nutrientes, cambios en el pH y producción de ácido láctico, ácido acético y peróxido de hidrógeno. También se puede deber por estimulación en la producción de citoquinas, inducción de secreción de IgA y mantenimiento de la barrera epitelial (Ishikawa y cols., 2014). Por otra parte, varios autores plantean que los probióticos estimulan el sistema inmune, lo cual podría influir en la proliferación de patógenos orales. Respecto a esto, Arunachalam y cols. (2000) determinaron que el uso de probióticos (*Bifidobacterium Lactis*)

estimula la producción de interferón alfa (INF- α), mejorando la capacidad fagocítica. También se ha observado que el consumo de leche suplementada con probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *Bifidobacterium lactis* HN019) producen un aumento de linfocitos T auxiliares y aumentan la actividad de células *natural killer* (NK), en sangre periférica de adultos mayores sanos (Gill y cols., 2001). Mendoca y cols. (2012) plantean que la disminución de LGC, podría deberse a una estimulación inmunológica secretora. Sin embargo, en nuestro estudio, no se realizó una caracterización inmunológica en los sujetos participantes.

Por otra parte, Köler y cols. (2012) en un estudio *in vitro* investigaron el potencial de las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *Lactobacillus reuteri* RC-14 en el control de *C. albicans*. Estos investigadores observaron que el ácido láctico a pH bajo juega un papel importante en la supresión del crecimiento de estas levaduras. También se observó que en co-cultivos con cepas de *Lactobacillus*, las células de *C. albicans* perdían actividad metabólica y presentaban una menor expresión de genes implicados en la resistencia a fluconazol. Estos resultados proporcionan fuerte evidencia de que los probióticos tienen propiedades antifúngicas bajo ciertas condiciones.

Son numerosos los estudios que relacionan a *C. albicans* con la EP. Zoromodiam y cols. (2011) identificaron especies de LGC en individuos con EP, portadores de PR. En su estudio establecieron que *C. albicans* fue la especie más aislada (41,5%), seguida por *C. glabrata* (18,4%) y *C. tropicalis* (12,9%). Esto se asemeja a nuestro estudio, ya que *C. albicans* fue la especie más prevalente en los AM con EP, al inicio del estudio, seguida por *C. tropicalis* y *C. glabrata*. La alta prevalencia de *C. albicans* podría explicarse debido a su gran capacidad de adhesión a las células epiteliales de la mucosa palatina (Gutiérrez y cols., 2013). Existen autores que plantean que las especies de CNCA también han sido aisladas con una alta frecuencia en tejidos afectados por EP (Pera-cenci y cols., 2008; Lee y cols., 2013), lo cual concuerda con nuestros hallazgos. Luego del consumo de leche con probiótico, durante 6 meses, los AM con EP presentaron una disminución de *C. albicans*, sin embargo, ésta siguió siendo la especie más prevalente al igual que

en el estudio de Hatakka y cols. (2007) y Mendoca y cols. (2012). En este último estudio, el perfil de las especies CNCA fue ligeramente modificado, observándose una disminución después del consumo del lácteo suplementado con probiótico, lo cual se asemeja con nuestra investigación, ya que luego del consumo de leche con probióticos, durante 6 meses, disminuyó *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Considerando que existen estudios que indican que la presencia simultánea de *C. albicans* y CNCA estaría relacionada con un aumento de la severidad de EP (Moran y cols., 2002; Lee y cols., 2013) y que *C. tropicalis* es una de las especies más virulentas dentro de CNCA (Moran y cols., 2002), ésta disminución podría ser beneficiosa y tendría relación con una probable mejoría en las características clínicas de la EP. Por lo que, a partir de estos resultados el uso de probióticos podría ser una terapia auspiciosa en el control de la candidiasis en este grupo de individuos. Sin embargo, esta disminución también se observó en el grupo que consumió leche con placebo, por lo que existen otros factores involucrados. A partir de esto, no sería posible afirmar que la diversidad de especies de LGC se modifica por el consumo de leche suplementada con probiótico, lo cual puede explicarse por el tamaño de la muestra, por lo que se sugiere aumentar el tamaño de la misma en posteriores investigaciones.

C. albicans disminuyó en el grupo sin EP que consumió leche con probiótico, esto se asemeja a los resultados obtenidos por Ishikawa y cols. (2014), quienes observaron una disminución de *C. albicans* de un 52,1% a un 23,1%, luego del uso de cápsulas suplementadas con probióticos en AM portadores de PR sin EP. También observaron que al inicio del estudio se identificó *C. tropicalis* en un 16,7% de las muestras, *C. glabrata* en un 16,7% y *C. dubliniensis* en un 6,3%. Al final del periodo experimental las especies de CNCA disminuyeron a un 1,8%. Esto último, no concuerda con nuestros resultados, ya que en nuestro estudio aumentó la diversidad de especies de CNCA en los AM sin EP que consumieron leche con probiótico. En esa investigación, además se demostró que el probiótico fue capaz de reducir la incidencia de LGC en la mucosa oral, independientemente de las especies del género *Candida*, al igual que en nuestro estudio.

Campos y cols. (2008) evaluaron la composición de *biofilms* en individuos que usaban prótesis completas con EP y sin EP. Estos investigadores observaron una diversidad fúngica mayor en pacientes sin EP. Esto se contradice con nuestro estudio, ya que los pacientes con EP presentaron mayor diversidad de LGC al tiempo cero. Cabe destacar que la diversidad de especies, aumentó en los sujetos sin EP que consumieron probióticos. Por lo tanto, la mayor diversidad, tal como el estudio mencionado, podría ser indicativo de un estado más saludable y sustentaría la utilización del probiótico, incluso desde el punto de vista preventivo. Sin embargo, nuestra muestra de pacientes sin EP que consumieron probióticos, es baja para este análisis. Además, en nuestro estudio se analizó la composición de muestras de saliva, no de *biofilms*.

Es importante destacar que al inicio de nuestro estudio se identificó en los AM con EP y sin EP, *C. humicola*. Luego del consumo del lácteo durante 6 meses, independiente del tipo de leche, existió un aumento de *C. humicola*. En la actualidad existen pocos estudios respecto a esta especie, sin embargo, existe una investigación realizada entre los años 2000-2013, en la cual se aislaron especies de LGC poco frecuentes como *C. lusitanae*, *C. haemulonii*, *C. humicola* y *C. ciferrii* de distintos sitios anatómicos, sugiriendo que estas especies deben añadirse a la lista creciente de hongos oportunistas patógenos (Ng y cols., 2015). Oliveira y cols. (2006), aislaron CNCA de la cavidad oral como *C. humicola* y *C. lusitanae*, al igual que en nuestro estudio. Sin embargo, se precisan más estudios que establezcan el rol de *C. humicola* en el desarrollo de la EP. A la luz de nuestros resultados, su presencia podría ser una señal de la eventual resolución clínica de la EP. Esta alta proporción de LGC distintas a *C. albicans* encontradas en nuestro estudio, debiese otorgar evidencia respecto a la necesidad de modificar el enfoque terapéutico de la candidiasis.

La saliva juega un papel crítico en la homeostasis oral y se ve afectada por procesos fisiológicos como el envejecimiento. Se ha observado que la edad avanzada se asocia con una tasa de flujo salival no estimulada disminuida (Fellom-Palamares y cols., 2004; Li y cols., 2007). Sin embargo, al inicio de

nuestra investigación los AM con EP tuvieron un promedio de 0,5 ml/min y los sin EP 0,43 ml/min, valores que se encuentran dentro de parámetros normales, según lo establecido por Glazar y cols. (2010). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Altarawneh y cols. (2013), quienes al medir el flujo salival encontraron que el promedio fue de 0,5 ml/min, sin diferencias entre los pacientes con y sin EP. También es similar a lo obtenido por Mravak y cols. (2000) quienes tras analizar 70 sujetos, tanto sanos como con EP, un 53,1% presentó salivación normal y solo un 5,7% presentó hiposialia. De los que presentaron esta última condición, el mayor porcentaje correspondía al grupo control, sin embargo, no hubo diferencias estadísticas para las variaciones de flujo salival entre los grupos. Por otra parte, nuestros datos son menores a lo obtenido por Yurdukuro y cols. (2001) quienes obtuvieron una VFS promedio de 0,62 ml/min en adultos portadores de PR. No obstante, este estudio comprendió adultos entre 44 y 75 años, lo cual puede explicar las diferencias.

En nuestra investigación, luego del consumo de leche suplementada con probióticos, durante 6 meses, los AM con EP no presentaron diferencias estadísticas en la VFS, sin embargo, en el grupo con EP que consumió leche con placebo la VFS disminuyó significativamente. Estos resultados sugieren que los probióticos podrían mantener los valores de VFS, sin embargo, el mecanismo por medio del cual realizaría esto no está claro. Sería interesante medir en futuras investigaciones el grado de xerostomía, luego del consumo de probiótico, ya que autores como Campisi y cols. (2008) han descrito que la xerostomía, producto de la disminución del flujo salival, se asocia al desarrollo de EP. Sumado a esto, en una tesis paralela desarrollada en este mismo proyecto se evaluó el porcentaje de AM con esta condición, dando como resultado que la mayoría de los sujetos con EP, no presentaban xerostomía al inicio del estudio, pero si había una mayor cantidad de individuos con esta condición en los AM sin EP.

Respecto, a la influencia del uso de probióticos en la VFS, Hattaka y cols. (2007) determinaron que el uso de queso con probióticos durante 16 semanas tiene un efecto positivo en el control de la hiposialia, al aumentar la VFS significativamente en AM. Estas diferencias podrían explicarse debido a que en el estudio anterior los

AM presentaron inicialmente flujo salival disminuido, mientras que en nuestro estudio los sujetos al inicio presentaron valores normales. Por otra parte, se utilizó un medio de administración distinto y se utilizaron tres cepas probióticas y no una como en nuestro estudio, lo cual podría haber potenciado el efecto como lo describe Meurman (2005). Otros autores también observaron que el flujo salival se incrementó por la administración oral de productos suplementados con probióticos, sin embargo, en estos estudios se utilizó una cepa probiótica distinta a la utilizada en el nuestro (Nishihara y cols., 2014; Suzuki y cols., 2012). Es importante destacar que existen variables que influyen en la VFS como es el uso de fármacos, especialmente los antidepresivos y antihipertensivos, que no fue controlado en este estudio. Por lo que sería pertinente que en posteriores investigaciones se homogeneizara la muestra por cantidad y consumo de fármacos.

Existen estudios que describen que sujetos con EP presentan un pH salival menor en comparación con pacientes sin EP (Marinoski y cols., 2014). Esto concuerda con nuestro estudio, ya que al inicio, también se encontró un pH salival ligeramente más ácido en el grupo con EP. Luego de 6 meses de consumo de leche suplementada con probiótico o placebo, se encontró una disminución significativa del pH salival en el grupo con EP que consumió leche con placebo, no así en el grupo que consumió leche con probiótico. Esto se podría explicar porque se mantuvo la condición de EP y a la naturaleza acidúrica y acidofílica de LGC, factor etiológico fundamental de esta patología, sumado a la metabolización de azúcares de la dieta que contribuirían a mantener el pH salival bajo. Anteriormente ya se observó que en el grupo con EP que consumió placebo disminuyó la VFS, lo cual podría influir en el pH de este grupo. Respecto a esto, Budtz-Jorgensen y cols. (2000) mencionaron que la retención de glucosa en la cavidad oral se ve aumentada cuando el flujo salival disminuye, y por tanto aumentan las posibilidades de adherencia y colonización de las LGC a la superficie protésica que enfrenta a la mucosa oral, las cuales podrían metabolizar estos azúcares y generar productos ácidos que contribuirían a disminuir el pH.

En nuestro estudio, si bien no hubo diferencias significativas en el pH salival en los AM con EP que consumieron leche con probiótico, se observó una tendencia a la

disminución del pH. Esto concuerda con la investigación de Köler y cols. (2012), quienes plantearon que es probable que el ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por cepas probióticas de *Lactobacillus* causen una disminución sustancial en el pH. En otro estudio, Sudhir y cols. (2012) evaluaron el efecto de un producto lácteo suplementado con probióticos en el pH salival, evidenciando una ligera reducción, no obstante, esta disminución fue por encima del pH crítico (5,2-5,5) de disolución de la hidroxiapatita presente en el esmalte dental. Lo cual concuerda con nuestro estudio, ya que el pH de los AM con EP, luego del periodo experimental, se mantuvo en parámetros normales. Sin embargo, este estudio no es del todo comparable, ya que utilizaron otra cepa probiótica.

Con respecto a los pacientes sin EP, el pH promedio de AM al inicio del estudio fue de 7,43; lo cual es mayor a lo obtenido por Muñoz y Narvaez (2012), quienes obtuvieron en pacientes sanos un valor promedio de 6,86. Por otra parte, Maheshwari y cols. (2013), analizaron el pH salival de un grupo de pacientes adultos y adultos mayores sin enfermedades sistémicas, encontrando un pH promedio de 7,3, valor que se acerca al obtenido en nuestro estudio. Marinoski y cols. (2014), obtuvieron un pH disminuido ($\text{pH} < 6,5$) en un 33% de los pacientes sin EP, con diferencias estadísticas. Sin embargo, esta investigación no es del todo comparable, ya que estos autores analizaron muestras provenientes de mucosa palatal y dorso lingual de 30 sujetos. Además, es importante destacar que existen estudios que indican que la saliva en contacto con la mucosa oral y bajo la PR, presenta un pH considerablemente más ácido al pH de la saliva recolectada (Aguirre, 2002), por lo que es probable que el pH que se encuentra bajo las prótesis de los AM sea más bajo que el encontrado en este estudio. Luego del consumo de leche con probiótico o placebo, los AM sin EP no presentaron diferencias estadísticas en el pH salival, por lo que se podría sugerir que los probióticos en estos individuos no influirían en este parámetro salival. Sin embargo, hay que considerar que algunos AM presentaron dientes remanentes con caries activa, lo cual pudo influir en nuestros resultados. Respecto a esto, existe un estudio donde se observó una relación significativa entre la caries y el pH salival (Farsi, 2008). Por otra parte, en otra investigación se observó que la caries activa disminuye ligeramente el pH salival (Preethi y cols., 2010).

Estudios revelan que *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia en pacientes con flujo salival reducido y xerostomía, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, lo cual se hace más evidente en AM (Budtz-Jorgensen, 2000; Torres y cols., 2002). Si bien en nuestro estudio, no se aisló *C. parapsilosis* y *C. krusei*, sí se observó una alta prevalencia de *C. albicans* cuando existió hiposialia, en los AM con EP, tanto al inicio del estudio como a los 6 meses de consumo de leche con probiótico. Sin embargo, luego del consumo de leche con probiótico hubo mayor diversidad de CNCA cuando el flujo salival fue menor a 0,2 ml/min (hiposialia), disminuyendo el porcentaje de *C. albicans*, lo cual se puede deber a un aumento de la competencia por sitios de unión y nutrientes. Lo anterior concuerda con Epstein y cols. (1993), quienes describieron que a menor flujo salival, podría existir una mayor prevalencia de distintas especies de LGC. Por otra parte, la disminución de *C. albicans* en los AM con hiposialia podría ser beneficioso, considerando que es la especie más virulenta y que a valores bajo 0,2 ml/min de saliva se predispondría a cambios en el microambiente oral que favorecerían un incremento en los recuentos de LGC (Hofer y cols., 2004). Este incremento podría deberse a una menor limpieza por arrastre de las superficies protésicas y orales, menor actividad antibacteriana y antifúngica y menor presencia de moléculas defensivas como histatina e IgA, las cuales disminuyen la adherencia y colonización de LGC en las superficies orales (Pereira-Cenci y cols., 2008; Hibino y cols., 2009; Abaci y cols., 2010).

Por otra parte, se ha observado que *C. albicans* es más ácido tolerante que otras especies del género (Li y cols., 2007), esto concuerda con nuestros hallazgos tanto al inicio del estudio como a los 6 meses de consumo de leche con probiótico, ya que fue la especie más prevalente a pH ácido ($\text{pH} < 6,5$) en los AM con EP. Esto también concuerda con Williams y cols. (2011) quienes plantearon que existe una mayor proliferación de *C. albicans* en saliva ácida, esto se debe a un incremento en su capacidad de adherencia a células epiteliales y su actividad de proteinasas. Sumado a esto, estudios *in vitro* demuestran que *C. albicans* puede prosperar en una amplia gama de pH ($\text{pH}: 2-10$) (Davis, 2003), lo cual concuerda con nuestros hallazgos, ya que esta especie se observó tanto en ambientes ácidos

como alcalinos al inicio del estudio y al final de la investigación. Por otra parte, se ha observado que un microambiente oral ligeramente ácido (pH=5) en AM, favorecería el crecimiento excesivo de *C. albicans*, mientras que a un pH levemente mayor exhiben un crecimiento notablemente más rápido CNCA como *C. glabrata* (Li y cols., 2007). Lo anteriormente planteado podría tener relación con los datos obtenidos en este estudio, en un inicio las especies de CNCA se encontraron preferentemente a pH más cercanos a la neutralidad o más alcalinos. Luego del consumo de leche, independientemente del tipo consumida (con probiótico o placebo), se observó una alteración entre la asociación de las especies de LGC y pH salival (aumentó la diversidad de especies a valores menores de pH). Si bien, no hay estudios con probióticos que establezcan esta asociación, existen estudios que sugieren que los probióticos modifican el microambiente circundante mediante la modulación del pH y favorecen el desarrollo de especies menos patógenas en la microbiota oral (Sudhakar y cols., 2011; Nangia y cols., 2014), lo cual podría tener relación con la modificación de la asociación entre estas variables. Sin embargo, se requieren de más estudios para poder esclarecer el efecto de los probióticos en esta asociación.

7. CONCLUSIONES

- En nuestro estudio, el consumo de leche suplementada con cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus GG*, durante 6 meses, fue eficaz en la reducción del recuento de levaduras del género *Candida* en la cavidad oral, de adultos mayores portadores de PR con estomatitis protésica.
- No fue posible comprobar el efecto de leche suplementada con probiótico en el pH salival o VFS. Es por esto que podríamos suponer que la disminución del recuento de LGC, podría explicarse por otros mecanismos asociados al uso de probióticos y no necesariamente, a la modificación de estos parámetros salivales.
- Hubo una alteración en la diversidad de especies (disminuyó CNCA en los AM con EP; aumentó CNCA en los AM sin EP), independiente del tipo de leche consumida. Por lo tanto, no fue posible comprobar el efecto de leche suplementada con probiótico en la diversidad de especies de LGC.
- Luego del consumo de leche durante 6 meses, hubo una modificación en la asociación entre diversidad de especies de LGC y parámetros salivales (pH y VFS), en todos los grupos de estudio (aumentó la diversidad de especies a valores menores de pH y VFS, en comparación a los valores iniciales). Por lo tanto, no fue posible comprobar el efecto de leche suplementada con probiótico en la asociación entre estas variables.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H (2010). Determining *Candida spp.* Incidence in Denture Wearers. *Mycopathologia* 169: 365–372.
- Aguirre J (2002). Candidiasis Orales. *Rev Iberoam Micol* 19: 17-21.
- Ahola A, Yli-Knuutila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman J y cols. (2002). Short-term consumption of probiotic containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol* 47: 799-804.
- Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, Curran A, Barrow D, Barros S y cols. (2013). Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, salivary flow and dry mouth. *J Prosthodont* 22(1): 13-22.
- Araújo A, Machado L, Del Bel Cury A, Da Silva W (2014). Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole. *Microb Pathog* 69: 39-44.
- Arunachalam K, Gill H, Chandra R (2000). Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr* 54: 263-267.
- Ayuso R, Torrent J, Lopez J (2004). Estomatitis protésica: puesta al día. *RCOE* 9(6): 657-662.
- Biasoli M, Tosello M, Magaro H (2002). Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses* 45: 465-459.
- Bilhan H, Sulun T, Erkose, G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O y cols. (2009). The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. *Clin Oral Invest* 13: 363-368.
- Budtz-Jorgensen E (2000). Ecology of *Candida*-associated Denture Stomatitis. *Microb Ecol Health D.* 12: 170-185

- Caglar E, Kargul B, Tanboga I (2005). Bacteriotherapy and probiotics role on oral health. *Oral Diseases* 11(3): 131-137.
- Caglar E, Kavaloglu SC, Kuscu OO, Sandalli N, Holgerson PL, Twetman S (2007). Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig* 11:425-429.
- Calderone R, Fonzi W (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* 9(7): 327-335.
- Campisi G, Panzarella V, Matranga D, Calvino F, Pizzo G, Lo Muzio L y cols. (2008). Risk factors of oral candidosis: a twofold approach of study by fuzzy logic and traditional statistic. *Arch Oral Biol* 53: 388-97.
- Campos M, Marchini L, Bernardes L, Paulino L, Nobrega F (2008). *Biofilm* microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 23(5): 419-424.
- Davis D (2003). Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr genet* 44(1):1-7.
- Dar-Odeh NS, Al-Beyari M, Abu-Hammad OA (2012). The role of antifungal drugs in the management of denture-associated stomatitis. *Int Arabic J Antimicrobial Agents* 2(1):1-5.
- Donlan R, Costerton J (2002). *Biofilms*: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167–193.
- Emami E, Taraf H, Grandmont P, Gauthier G, Koninck L, Lamarche C y cols. (2012). The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. *Int J Prosthodont* 25: 113–119.
- Encuesta CASEN, 2013.
http://observatorio.ministeriodesarrollosocial.gob.cl/documentos/Presentacion_Resultados_Encuesta_Casen_2013.pdf (Consultado en enero de 2016)
- Encuesta Nacional de salud 2003.
<http://epi.minsal.cl/epi/html/invest/ens/informefinalens.pdf> (Consultado en Julio de 2015)

- Encuesta nacional de salud 2009-2010.
<http://web.minsal.cl/portal/url/item/bcb03d7bc28b64dfe040010165012d23.pdf>
(Consultado en enero de 2016)
- Epstein JB, Freilich MM, Le ND (1993). Risk factors for oropharyngeal candidiasis in patients who receive radiation therapy for malignant conditions of the head and neck. *Oral Surgery, Oral Med, Oral Pathol* 76(2): 169-174.
- Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J (2003). Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *J Oral Pathol Med* 32: 571–575.
- Estrada-Barraza D, Martínez A, Flores-Padilla L, Mendoza-De Elias R, Sánchez-Vargas LO (2011). Comparación entre métodos convencionales, CHROMagar *Candida* y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol* 28(1): 36-42.
- Farsi N (2008). Dental Caries in Relation to Salivary Factors in Saudi Population Groups. *J Contemp Dent Pract* (9)3: 16-23.
- Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C (2007). Denture-related stomatitis: Identification of a etiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil* 34: 448–455.
- Fenoll-Palomares C, Muñoz-Montagud JV, Sánchez V, Herreros B, Hernández V, Mínguez M y cols. (2004). Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Rev Esp Enferm Dig* 96(11): 773-783.
- Flichy-Fernández AJ, Alegre-Domingo T, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago M (2010). Probiotic treatment in the oral cavity: An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15(5): 677-680.
- Gendreau L, Loewy Z (2011). Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont* 20: 251–260.
- Gomes R, Miyazak M, Filho I (2015). Action of probiotics on oral pathogens: Efficacy and controversies. *Dent Oral Craniofac Res* 1(4): 121-125

- Gill H, Rutherford K, Cross M (2001). Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol* 21:264-271.
- Gutiérrez C, Bustos L, Sánchez M., Zaror L, Zambrano M (2013). Estomatitis Subprotésica en pacientes de la IX región, Chile. *Int J Odontostomat* 7(2): 207-213.
- Glazar I, Urek MM, Brumini G, Pezelj-ribaric S (2010). Oral sensorial complaints, salivary flow rate and mucosal lesions in the institutionalized elderly. *J Oral Rehabil* 37: 93–99.
- Gleiznys A, Zdanavičienė E, Žilinskas J (2015). *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija* 17(2): 54-66.
- Hatakka K, Ahola A, Yli-Knuutila H (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly – a randomized controlled trial. *J Dent Res* 86:125-130.
- Haukioja A (2010). Probiotics and Oral Health. *Eur J Dent* 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. *Swed Dent J* 7: 227-238.
- Hernández S, Villamil J, Lama E, Puc R, Rueda F (2009). Prevalencia de *C. albicans* en pacientes con y sin estomatitis subprotésica. *Rev Odontol Latinoam* 1(1): 7-11.
- Hibino K, Samaranayake L, Hägg U, Wong R, Lee W (2009). The role of salivary factors in persistent oral carriage of *Candida* in humans. *Arch Oral Biol* 54: 678-683.
- Hofer E, Jensen SB, Pendersen AM, Bardow A, Nauntofte B (2004). Oral microflora in patients with salivary gland hypofunction. *Oral Biosci Med* 2 S: 93-108.
- Ishikawa K, Mayer M, Miyazima T, Matsubara V, Silva E, Paula C y cols. (2014). A multispecies probiotic reduces oral *Candida* colonization in denture wearers. *J Prosthodont* 24(3): 194-199.

- Köhler 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*. *Infect Dis Obstet Gynecol* Article ID 636474, 14 pages.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (2011). *The Yeast a taxonomic study*. (5ta ed.) Elsevier: 9-11.
- 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. *Int J Odontostomat* 7(2): 279- 285.
- Lefimil C, Lozano C, Morales-Bozo I, Plaza A, Maturana C, Urzúa B (2013). DNA from oral bacteria by sodium hydroxide–paper method suitable for polymerase chain reaction. *Anal biochem* 433(2): 129-131.
- Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A (2007). *Candida glabrata*, an Emerging Oral Opportunistic Pathogen. *J Dent Res* 86(3): 204-215.
- Li D, Li Q, Liu C, Lin M, Li X, Xiao X y cols. (2014). Efficacy and safety of probiotics in the treatment of *Candida*-associated stomatitis. *Mycoses* 57:141-6.
- López R, Méndez L, Hernández F, Castañón R (2004). *Micología Médica*, 2da Edición, Editorial Trillas, México: 99-111
- Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR (1999). Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res* 78: 857-868.
- Maheshwari A, Maheshwari B, Khandelwal V (2013). Salivary flow assessment In denture wearers. *WebmedCentral plus Biochemistry* 4(11): WMCPLS00103.
- Marinoski J, Bokor-Bratic M, Cankovic M (2014). Is denture stomatitis always related with *Candida* infection?. A case control study. *Med Glas* 11(2): 379-84.
- Mata de Henning M y Perrone M (2001). Factores Determinantes de Patogenicidad en relación a la ecología de *Candida albicans* en cavidad bucal. Revisión Bibliográfica. *Acta odontol. Venez* 39(2): 55-59.

- Mendoca F, Santos S, Faria I, Goncalves e Silva C, Jorge A, Leao M (2012). Effects of probiotic bacteria on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity of elderly. *Brasileña Dental Journal* 23: 534-538.
- Ministerio de salud: Guía clínica, Salud oral integral para adultos de 60 años 2010. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7221747c2c9484b7e04001011f0141a4.pdf>. (Consultado en Julio de 2015).
- Meurman J (2005). Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci* 113: 188–196.
- Monroy TB, Maldonado VM, Martínez FF, Barrios BA, Quindós G, Vargas L (2005). Colonización por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* en pacientes portadores de prótesis. *Med Oral* 10:27-39.
- Morales R, Aldape B (2013). Salivary flow and the prevalence of xerostomia in geriatric patients. *Revista ADM* 70(1): 25-29.
- Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC (2002). Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens. *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington, DC: 37-53.
- Muñoz K, Alarcón M (2010). Efecto de los probióticos en las condiciones periodontales. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 3(3): 136-139.
- Muñoz L, Narvaez C (2012). pH salival, capacidad buffer, proteínas totales y flujo salival en pacientes hipertensos controlados usuarios de diuréticos. *Int J Odontostomat* 6(1): 11-17.
- Mukherjee P, Chandra J (2004). *Candida biofilm* resistance. *Drug Resist Update* 7: 301–309.
- Mravak-Stipetic M, Hemerich L, Jurcic I, Jerolimov V (2000). Stimulating local factors in the development of denture stomatitis. *Acta stomatol croal* (34): 133-136.
- Nadeem S, Shafiq A, Hakim S, Anjum Y, Kazm S (2013). Effect of growth media, pH and temperature on yeast to hyphal transition in *Candida albicans*. *Open J Med Microbiol* 3: 185-192.

- Nangia T, Setia V, Kochhar GK, Kaur K, Bansal R, Sharma R (2014). Probiotics: Review of Literature. *J Periodontal Med Clin Pract* 1: 144-151.
- Nikawa H, Nishimura H, Yamamoto T, Samaranayake LP (1995). A novel method to study the hyphal phase of *Candida albicans* and to evaluate its hydrophobicity. *Oral Microbiol Immunol* 10: 110-114.
- Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki K, Darmawan S, y cols. (2004). *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of *mutans streptococci*. *Int J Food Microbiol* 95: 219-23.
- Nishihara T, Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T (2014). Effects of *Lactobacillus salivarius*-containing tablets on caries risk factors: a randomized open-label clinical trial. *BMC Oral Health* 14: 110.
- Ng K , Kuan C , Kaur H , Na S , Atiya N, Velayuthan R (2015). *Candida* species epidemiology 2000–2013: a laboratory-based report. *Trop Med Int Health* 20(11): 1447-1453.
- Odds F, Bernaerts R (1994). CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 32(8): 1923-1929.
- Olivares P, (2006). Perfil epidemiológico del adulto mayor en Chile. INE http://www.supersalud.gob.cl/documentacion/569/articles-4020_recurso_1.pdf. (Consultado en julio de 2015).
- Oliveira M, Mikami Y, Miyaji M, Gabas R, Moretti M (2006). Determinação da freqüência de *Candida* na cavidade oral de pacientes graves internados no Hospital de Clínicas UNICAMP, através de testes fenotípicos. *Rev Panam Infectol* 8 (4):16-20.
- Pardi G, Cardozo E (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odonto Venez* 40(1): 9-17.
- Pardi G, Cardozo E (2003). Relación entre la placa dental y la estomatitis sub-protésica. *Acta Odonto Venez* 41(1):72-76.
- Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM (2008). Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci* 16 (2): 86-94.

- Petersen PE, Yamamoto T (2005). Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 33(2): 81-92.
- Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D (1998). Simple, Inexpensive, Reliable Method for Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 36(7): 2093-2095.
- Preethi B, Reshma D, Anand P (2010). Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Proteins and Total Antioxidant Capacity Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children: An In Vivo Study. *Ind J Clin Biochem*: 25(4):425–428.
- Quesada Gómez C, Murillo Hidalgo L, Ureña Varela M, Vargas Monge E (2007). *Candida dubliniensis*: Caracterización, diagnóstico, importancia en paciente inmunocomprometidos y diferenciación de *C. albicans*. *Rev Med Costa Rica Centroam* 64(578): 43-48.
- Redding S, Kirkpatrick W, Coco B, Sadkowski L, Fothergill A, Rinaldi M y cols. (2002). *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. *J Clin Microbiol* 40: 1879-1881.
- Romeo O, Racco C, Criseo G (2006). Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 44(7): 2590-2592.
- Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, y cols. (2011). *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16(2): 139-143.
- Samaranayake LP (1986). Nutritional factors and oral candidosis. *J Oral Pathol Med* 15(2): 61-65.
- SENAMA. Tercera Encuesta Nacional de calidad de vida en la vejez, 2013. <http://www.senama.cl/filesapp/Chile%20y%20sus%20mayores%202013,%200Encuesta%20de%20Calidad%20de%20Vida.pdf> (Consultado en octubre de 2015)

- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 36: 288–305.
- Sudhakar Reddy R, Swapna L, Ramesh T, Rajesh Singh T, Vijayalaxmi N, Lavanya R (2011). Bacteria in Oral Health – Probiotics and Prebiotics A Review. *Int J Biol Med Res* 2(4): 1226 -1233.
- Sudhir R, Praveen P, Anantharaj A, Venkataraghavan K (2012). Assessment of the effect of probiotic curd consumption on salivary pH and *Streptococcus mutans* counts. *Nigerian Med J.* 3: 135-139.
- Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaied A, Stokes C, Vaughan C y cols. (2004). Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS yeast research* 4(4-5): 369-376.
- Suzuki N, Tanabe K, Takeshita T, Yoneda M, Iwamoto T, Oshiro S y cols. (2012). Effects of oil drops containing *Lactobacillus salivarius* WB21 on periodontal health and oral microbiota producing volatile sulfur compounds. *J Breath Res* 6: 17106.
- Stamatova I, Meurman J (2009). Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent* 22(6): 329-38.
- Snyderman D (2008). The safety of probiotics. *Clin Infect diseases* (Suppl 2): 104-111.
- Tay L, Habib J, Herrera D, Campanha N, Gomes B, Dos Santos F (2014). Evaluation of different treatment methods against denture stomatitis: a randomized clinical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 118: 72-77.
- Tobar E, Silva F, Olivares R, Gaete P, Luppi M (2011). Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Rev Chilena Infect* 28(1): 41-49.
- Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Akiti T, Nucci M y cols. (2002). Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93: 149–154.

- Twetman S, Keller MK (2012). Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res*. Sep 24(2): 98-102.
- Walsh L (2008). Aspectos clínicos de biología salival para el Clínico. *J Minim Interv Dent* 1(1): 5-23.
- Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW (1998). *Candida*-associated denture stomatitis. A etiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J* 43: 45-50.
- Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic, S, Lewis MA (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology* 2000 55(1): 250-265.
- Yurdukoru B, Terzioğlu H, Yilmaz T (2001). Assessment of whole saliva flow rate in denture wearing patients. *J Oral Rehabil* 28(1):109-112.
- Zomorodiam K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M y cols. (2011). Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol* 49(2): 208-211.

9. ANEXOS.

9.1 Anexo 1: Consentimiento informado



Fecha de edición: 20 de agosto de 2013

CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

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

NOMBRE DEL PACIENTE :
FECHA :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lugar donde se realizará la intervención.

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

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

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

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

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

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

Aclaraciones

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

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

Carta de Consentimiento Informado

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

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

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

Nombre del Paciente: _____

RUT: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

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

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____

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

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

9.2 Anexo 2: Ficha clínica

Código: **FICHA CLÍNICA FONIS SA13I20113**

Nombre Revisor:.....

Fecha:.....

NOMBRE (s):

APELLIDOS:

GÉNERO EDAD (años) NIVEL EDUCACIONAL ESTADO CIVIL

1- Femenino

2- Masculino

1. Sin escolaridad

2. Primaria

3. Secundaria

4. Superior

1. Soltero(a)

2. Casado(a)

3. Viudo(a)

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

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

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

1	<input style="width: 350px; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 150px; height: 20px;" type="text"/>
2	<input style="width: 350px; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 150px; height: 20px;" type="text"/>
3	<input style="width: 350px; height: 20px;" type="text"/>	<input style="width: 150px; height: 20px;" type="text"/>

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 vestibulo		
4	Estomatitis protésica	4	Mucosa oral		
5	Queilitis angular	5	Piso de la boca		
6	Glositis romboidal	6	Lengua		
7	Candidiasis pseudomembranosa	7	Paladar duro y/o blando		
8	Hiperplasia irritativa (éupulis)	8	Bordes alveolares/ encías		
9	Úlcera traumática	9	No registrado		
10	Úlcera no asociada a trauma				
11	Gingivitis necrotizante aguda				
12	Absceso (especificar origen)				
13	Máculas				
14	No registrado				
15	Herpes Labial				
16	Otro Trastorno (especificar)				

FICHA CLÍNICA FONIS SA13I20113

VIII. ESTOMATITIS PROTÉSICA: (Clasifique según Newton)

Si No

TIPO

UBICACIÓN MAXILAR

UBICACIÓN MANDIBULAR

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

1. Paladar duro
2. Paladar
3. Reborde alveolar

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