



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

ÁREA DE BIOQUÍMICA

“EFECTO DE TERAPIA EN BASE A CARVACROL EN EL RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida* EN ADULTOS MAYORES PORTADORES DE PRÓTESIS REMOVIBLE CON CANDIDIASIS ORAL ASOCIADA A ESTOMATITIS PROTÉSICA”.

Daniela Vera Quijada

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Ximena Lee Muñoz

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dra. Irene Morales Bozo

Prof. Dra. Blanca Urzúa Orellana

Adscrito a Proyecto FONIS SA15I20030

Santiago – Chile

2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Chile, y particularmente a la Facultad de Odontología por permitirme crecer de forma intelectual y académica, a lo largo de estos años. El conocimiento es la mejor herramienta para aportar en el futuro al área de la salud y al desarrollo del país.

Agradezco también al Proyecto de Investigación FONIS SA15I20030, al cual está adscrito este trabajo, por darme la posibilidad de aportar con un granito de arena al saber odontológico y contribuir al resultado final de esta investigación.

Especialmente agradezco, a las profesoras Ximena Lee Muñoz e Irene Morales Bozo, por la paciencia, el apoyo y los consejos para lograr llevar a cabo este trabajo. Les doy las gracias por la confianza que han puesto sobre mí, para compartir su valioso trabajo.

Doy las gracias a las profesoras Blanca Urzúa Orellana y Patricia Palma Fluxá, por su ayuda en el largo procesamiento de datos, por compartir conmigo sus resultados y conclusiones. Al profesor Cristian Vergara por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

Agradezco también a Andrea y Sarita del laboratorio de bioquímica por toda su ayuda, tiempo brindado y amabilidad para conmigo, que hicieron de mi experiencia en el laboratorio un agrado.

Agradezco principalmente a mi familia por el apoyo incondicional a lo largo de estos años, ha sido un camino largo y dificultoso, pero con grandes metas superadas. A mi madre Paola Quijada Riquelme por apoyarme en el día a día, con infinita paciencia y motivación que me ha permitido desarrollarme como persona. A mi padre Eduardo Vera Corona por su amor, sabiduría y aliento en los momentos difíciles.

Agradezco a mi hermana Camila Vera Quijada por las incontables noches de ayuda y compañía, por su ayuda en la redacción de este trabajo. Sin ti no podría haber sido posible terminar esta larga carrera y me encanta ver la gran mujer en la que te has convertido.

Agradezco a Patricio Merino Acevedo por toda su ayuda, su comprensión y compañía, por estos diez años de amistad y por acompañarme en el aprendizaje de la odontología. Sé que pronto serán una gran Odontólogo.

Finalmente, gracias a mi pareja Christopher Paine Castro por su ternura, amor y por tolerarme en los días difíciles, ha sido mi soporte emocional y mi compañero de vida por más de un año. Espero que sigamos siempre igual y que nuestro proyecto de vida conjunta nos lleve lejos.

ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	6-7
2. Marco teórico.....	8-18
2.1 Envejecimiento poblacional y desafíos en salud oral.....	8
2.2 Estomatitis protésica.....	9-11
2.3 Rol de <i>Candida</i> spp en estomatitis protésica.....	12-13
2.4 Tratamiento farmacológico.....	13-15
2.5 Tratamiento antimicótico local convencional.....	15-16
2.6 Tratamiento antimicótico local de origen natural.....	16-18
3. Hipótesis y objetivos.....	19
3.1 Hipótesis.....	19
3.2 Objetivo general.....	19
3.3 Objetivos específicos.....	19
4. Materiales y Métodos.....	20-26
4.1 Muestra.....	20-21
4.2 Definición e indicadores de resultados.....	21
4.3 Preparación de antimicóticos.....	21-22
4.4 Diseño del estudio.....	22-23
4.5 Procesamiento de datos clínicos.....	23
4.6 Procesamiento de muestras.....	24
4.7 Recuento levaduras del género <i>Candida</i>	24-26
4.8 Análisis estadístico.....	26
5. Resultados.....	27-37
5.1 Caracterización demográfica y datos clínicos.....	27-30
5.2 Recuento microbiológico.....	31-33
5.3 Variabilidad de especies de <i>Candida</i> spp en CHROMagar.....	34-37
6. Discusión.....	38-49
7. Conclusiones.....	50
8. Referencias bibliográficas.....	50-55
9. Anexos y apéndices.....	56-72
9.1 Anexo n° 1: Consentimiento informado.....	56-62

9.2 Anexo n° 2: Protocolo clínico.....63-65
9.3 Anexo n° 3: Ficha clínica.....66-72

1. RESUMEN

Introducción: Las lesiones de estomatitis protésica son frecuentemente colonizadas por levaduras del género *Candida*, dando origen a candidiasis oral. Ésta última suele manifestarse en adultos mayores con diversas comorbilidades y que presentan polifarmacia.

Debido al rol etiológico de *Candida* en la estomatitis protésica, la terapia antimicótica ha sido ampliamente usada para su tratamiento. Miconazol es considerado altamente efectivo y seguro para el tratamiento de candidiasis oral. Sin embargo, debido a su mecanismo de acción se lo ha asociado a la aparición de cepas resistentes.

Desde esta perspectiva, surge Carvacrol como alternativa terapéutica a antimicóticos convencionales. Corresponde a un fenol derivado del tomillo y el orégano, que ha demostrado tener efectividad antimicótica *in vitro*, por lo tanto, se propone su utilización para tratar la candidiasis oral asociada a estomatitis protésica.

Objetivo: Determinar si los adultos mayores con candidiasis oral asociada a estomatitis protésica, que son tratados con Carvacrol al 0,5%, presentan disminución similar en el recuento y variabilidad de especie de *Candida* que aquellos tratados con Miconazol al 2%.

Materiales y métodos: Se realizó un ensayo clínico aleatorizado triple enmascaramiento, cuyos ciegos fueron voluntarios, evaluadores clínicos y equipo de investigación. Se incluyeron 38 individuos, adultos mayores, con signos clínicos de estomatitis protésica y que aceptaron participar en el estudio. De forma aleatoria se trataron a los individuos con Miconazol 2% o Carvacrol 0,5% en plastibase, realizando recuentos salivales en la sesión A (día 1), sesión B (día 8) y sesión C (día 15), para constatar la presencia de levaduras del género *Candida*.

Resultados: Miconazol y Carvacrol presentaron disminución similar de recuentos y variabilidad de especie de *Candida*. Ambos medicamentos obtuvieron resultados estadísticamente significativos respecto al aumento de individuos cuyos recuentos tendieron a cero unidades formadoras de colonias, durante el tiempo de estudio.

Discusión: Se reafirma la efectividad de Miconazol y se constata la presencia de actividad antimicótica de Carvacrol postulada por la literatura. Debido a que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de Carvacrol y Miconazol, se puede afirmar que tienen una efectividad antimicótica similar.

Conclusión: Carvacrol puede ser considerado como una terapia local efectiva para el tratamiento de candidiasis oral asociada a estomatitis protésica.

Palabras clave: estomatitis protésica, levaduras del género *Candida*, Miconazol y Carvacrol.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1.- Envejecimiento poblacional y desafíos en salud oral

En las últimas décadas, la población mundial ha experimentado una rápida transición demográfico-epidemiológica, siendo los grupos de mayor edad los que más crecen proporcionalmente, se espera que esta tendencia continúe y se incremente a futuro (León S. y cols., 2016). De la misma forma, Chile ha experimentado un proceso similar, ubicándose actualmente como la segunda nación más envejecida de Sudamérica (SENAMA, 2016) y se pronostica que para el año 2025 poseerá el índice de envejecimiento más alto de la región, llegando a tener una proporción de personas mayores cercana al 28% para el año 2050 (León S. y cols., 2016).

La encuesta nacional de salud 2016-2017 define que, el 27% de la población chilena posee dentición no funcional, que se entiende como la presencia de menos de 20 dientes en la cavidad oral. De ese total, el 45,2% corresponden a sujetos entre 45 a 64 años y el 81,7% a mayores de 65 años. En Chile, el 65,8% de las personas de 65 años y más son portadores de prótesis removible (MINSAL, 2018). Una pobre salud oral y una discapacidad oral por la pérdida de dientes, tienen un impacto importante en la salud general y la calidad de vida en las personas mayores. Posee además, un efecto significativamente negativo en la autoestima y bienestar psicosocial de las personas (Valenzuela M. y cols., 2015).

En la actualidad no existen recursos necesarios para controlar la patología oral en toda la población, ya que el daño en los adultos es muy severo (Red Salud, 2013). Frente a éste escenario, es necesario abordar el fenómeno de envejecimiento poblacional, con sus múltiples aspectos políticos, sociales y económicos, especialmente en torno a los grupos más vulnerables, de los que forman parte los adultos mayores (Valenzuela M. y cols., 2015), siendo imprescindible encontrar estrategias preventivas y opciones de tratamiento costo-efectivas.

2.2.- Estomatitis protésica

Una lesión de mucosa oral se define como cualquier cambio anormal en la superficie oral (enrojecimiento, pigmentación o úlcera) o cualquier aumento de volumen (Espinoza I. y cols., 2003). Con el paso del tiempo el epitelio oral se adelgaza, y la síntesis de colágeno en los tejidos conectivos disminuye, lo que produce una reducción de la reparación tisular (Cueto A. y cols., 2013), todo lo anterior favorece la aparición de éstas lesiones. En 2003 se determinó que la prevalencia de lesiones de mucosa oral alcanzaba un 53%, siendo la estomatitis protésica (EP) la más frecuente, que afecta al 34% de los sujetos portadores de prótesis removible (PR) (Espinoza I. y cols., 2003). Similares resultados fueron encontrados en 2013, donde las lesiones en mucosa oral alcanzaron una prevalencia de un 67,5% y la EP un 37% (Cueto A. y cols., 2013).

La literatura define a la EP como un proceso inflamatorio que se presenta en la mucosa de soporte, en sujetos parcial o totalmente desdentados portadores de PR (Figueiral M. y cols., 2007). Se caracteriza por un enrojecimiento persistente del área de soporte de una PR, preferentemente en la zona palatina, presentando edema y/o tejido hiperplásico (Brevis P. y cols., 2008). A pesar de su alta frecuencia en la mayoría de los casos las lesiones son asintomáticas, solo una minoría de los individuos presentan dolor o sensación urente (Gendreau L. y cols., 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) creó un instructivo para la identificación y categorización de lesiones en la mucosa oral, dentro de ellas considera a la EP como una entidad de reconocimiento clínico (OMS, 2013). Puesto que no tiene métodos de diagnóstico publicados por la OMS, han sido utilizados los criterios de Axéll descritos en 1976 (Axéll T. y cols., 1976). No obstante, una de las clasificaciones para EP más utilizadas en la literatura corresponde a la de Newton de 1962, en la que se clasifica de acuerdo al aspecto clínico de la mucosa afectada bajo la zona de soporte de la PR según severidad (Brevis P. y cols., 2008) (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de Newton por tipo de lesiones de mucosa oral según severidad para estomatitis protésica (EP) (Brevis P. y cols., 2008).

Clasificación de EP	Características clínicas
Tipo I	Mucosa de soporte protésico con inflamación localizada y puntiforme.
Tipo II	Mucosa de soporte protésico con inflamación generalizada y difusa.
Tipo III	Mucosa de soporte protésico con inflamación crónica, generalizada caracterizada por la presencia de hiperplasia papilar.

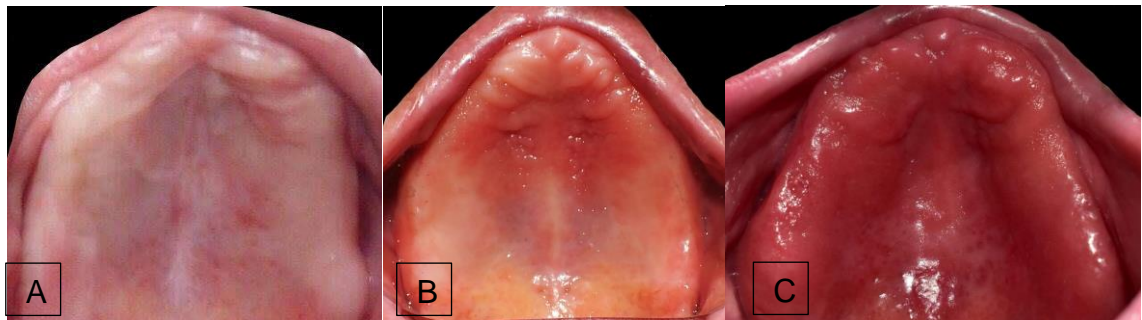


Figura 1: Presentación clínica de estomatitis protésica (EP) según Newton: (A) EP tipo I, (B) EP tipo II y (C) EP tipo III. Fotografías registradas de participantes del estudio que cuentan con consentimiento informado.

La EP presenta una etiología multifactorial, identificándose dos grupos de factores predisponentes, locales y sistémicos. Dentro de los factores locales, encontramos los mecánico-traumáticos, pues la presión oclusal que genera una prótesis mal ajustada aumenta el trauma sobre la mucosa de soporte protésico, lo que paulatinamente genera microlesiones en el epitelio oral (Emami E. y cols., 2012). Por otro lado, se encuentra el factor higiénico-infeccioso, debido a que una pobre higiene oral ha sido relacionada fuertemente por la literatura a la aparición de EP. La mayoría de los individuos portadores de PR no higieniza correctamente sus dientes remanentes y/o su aparato protésico, la acumulación de detritus provee del sustrato necesario para la aparición de infecciones oportunistas, como la adhesión de levaduras del género *Candida* (LGC) (Gendreau L. y cols., 2011).

La antigüedad protésica y el uso nocturno de PR han sido asociadas a una mala higiene oral y al riesgo de desarrollar EP. Lo anterior debido a que se genera un ambiente anaerobio, se mantiene un pH ácido y disminuye la función protectora de la saliva entre la prótesis y la mucosa, lo que genera condiciones para la infección por LGC (Ercalik S. y cols., 2015). Los biomateriales utilizados para la fabricación de PR

pueden ser colonizados por LGC, por lo tanto, una pobre higiene permite el crecimiento de una compleja biopelícula en el aparato protésico, que puede colonizar la mucosa oral y generar recurrencias (Gendreau L. y cols., 2011).

Dentro de los factores de tipo sistémicos encontramos los de tipo nutricional, debido a que una dieta rica en carbohidratos representa un factor de riesgo que aumenta la adherencia de LGC a células epiteliales de la mucosa oral. A consecuencia de una limitación en la eficiencia masticatoria, la dieta de los sujetos parcial o totalmente desdentados, generalmente no es adecuada. Este hecho puede provocar desnutrición, deficiencia de hierro, ácido fólico, vitamina B, C y posiblemente vitamina A, lo que podría reducir las defensas del hospedero y generar pérdida de la integridad de la mucosa, facilitando su colonización por LGC (Farah C. y cols., 2010).

Un segundo factor a considerar son los desórdenes endocrinos, especialmente la Diabetes Mellitus (DM) mal controlada, que ha sido relacionada por la literatura a la prevalencia de infecciones por LGC. Un pobre control metabólico disminuye el flujo salival normal, reduce el pH y aumenta los niveles de glucosa en la saliva, dichos factores facilitan el crecimiento de LGC, por lo tanto, una DM mal controlada podría asociarse a EP (Farah C. y cols., 2010).

Muchas clases de fármacos se han relacionados a la aparición de infecciones por LGC, entre ellos podemos encontrar antibióticos de amplio espectro, fármacos inmunomoduladores e hiposalivantes. El uso prolongado de estos medicamentos provoca alteraciones en la microbiota comensal de la cavidad oral, produciendo un desequilibrio que genera sobre crecimiento de LGC (Farah C. y cols., 2010). Un gran número de fármacos poseen efectos hiposalivantes, tales como, antidepresivos, antipsicóticos, anticolinérgicos, antihipertensivos y antiadrenérgicos (Farah y cols., 2010). Ahora bien, la farmacoterapia en los adultos mayores suele ser extensa debido que se padecen simultáneamente varias patologías, requiriéndose el uso concomitante de múltiples medicamentos. La OMS define como Polifarmacia a la acción de consumir tres o más fármacos a la vez, lo que puede generar efectos secundarios como interacciones farmacológicas y disminución del flujo salival (Robles A. y cols., 2017).

2.3.- Rol de *Candida* spp en estomatitis protésica

La infección por *Candida* spp suele presentarse en individuos portadores de PR que tienen EP. En efecto, se ha reconocido que la presencia de LGC es un factor etiológico principal para el desarrollo de EP y se lo ha relacionado con formas más severa EP (Lee X. y cols., 2014; Gendreau L. y cols., 2011). Las LGC corresponden a los patógenos fúngicos oportunistas más frecuentes, son parte de la microbiota comensal de piel, mucosas y aparato gastrointestinal. Se estima que alrededor de un 50% de los individuos son portadores sanos de LGC (Murray P. y cols., 2013; Williams D. y cols., 2011). Las *Candida* spp crecen en cultivos o tejidos como células ovas en gemación, de 3 a 6 µm de tamaño y tienen capacidad de transformación desde una fase de levadura a una forma micelial o hifa (Lee X. y cols., 2013).

C. albicans exhibe diversos mecanismos de virulencia, que le permiten colonizar la mucosa oral y los aparatos protésicos. El primer paso es la adhesión, las levaduras producen adhesinas aglutininas proteicas con las que son capaces de adherirse y posteriormente invadir células epiteliales, endoteliales, penetrar en fisuras y superficies protésicas. Éste proceso se lleva a cabo por la interacción de mecanismos específicos (ligando-receptor) e inespecíficos como fuerzas de Van der Waals (Murray P. y cols., 2013; Williams D. y cols., 2011).

Aunque el total de mecanismos utilizados por las *C.albicans* no se han dilucidado, se sabe que poseen un segundo factor de virulencia, que corresponde a la capacidad de secreción de diversas proteinasas, que hidrolizan moléculas pertenecientes al sistema inmune del hospedero, lo que permite que atraviesen la barrera epitelial de la mucosa oral y promuevan la invasión tisular. Las LGC exhiben además la capacidad de realizar cambios fenotípicos que aumentan su virulencia y permiten la evasión de defensas del hospedero (Murray P. y cols., 2013). Poseen además, la capacidad de desarrollar de una compleja biopelícula, que corresponde a una comunidad de microorganismos rodeados por una matriz de polisacáridos, que les permite protegerse de la acción del fluido salival, y generar resistencia contra factores inmunes y antimicrobianos. Es importante mencionar, que pueden desarrollarse biopelículas sobre el polimetacrilato que conforma las PR (Williams D. y cols., 2011).

C. albicans es la principal especie patógena del género, sin embargo, existen otras especies comunes como; *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Estas últimas son agrupadas como *Candida* no albicans, que han sido reconocidas como agentes infecciosos en humanos y cuya presencia e incremento se ha asociado al aumento de resistencias farmacológicas a antimicóticos (Williams D. y cols., 2011).

Cuando un cuadro de EP se ha establecido, la aparición de signos y síntomas se correlaciona fuertemente con un recuento de colonias de LGC superior o igual a 400 UFC/mL en saliva (Epstein J. y cols., 1980), entonces es posible denominar a este cuadro candidiasis oral asociada a EP. La mayoría de los individuos que presentan EP son portadores de *C.albicans*, sin embargo, existen sujetos con recuento altos sin signos clínicos y sujetos con recuentos bajos con signos clínicos, aquello da cuenta del rol de otros factores en la etiopatología multifactorial de la EP (Lee X. y cols., 2013; Gendreau L. y cols., 2011).

2.4.- Tratamiento farmacológico

El tratamiento de la EP asociada a LGC es complejo, pues como ya se ha mencionado, posee una etiología multifactorial (Salerno C. y cols., 2011), requiriéndose corregir o eliminar factores locales y/o sistémicos para su remisión. Desde el punto de vista de los factores locales; el rebasado, reparación o renovación protésica son tratamientos indicados para resolver el cuadro de EP. De hecho, se ha visto que aproximadamente en dos tercios de los casos en que se realiza reemplazo combinado con instrucción de higiene oral, se resuelve la inflamación (Gendreau L. y cols., 2011). Sin embargo, corregir el desajuste protésico corresponde a un tratamiento de alto costo, tanto para el paciente, como para el sistema de salud chileno.

La guía del MINSAL, salud oral integral para adultos de 60 años (MINSAL, Guía Clínica, 2010), sugiere como tratamiento tres ejes principales:

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

En relación al tercer eje de tratamiento, la terapia antimicótica ha demostrado con alto nivel de evidencia, que puede disminuir significativamente la presencia de LGC en la mucosa oral y reducir el cuadro de inflamación aguda de EP (Gendreau L. y cols., 2011). La Sociedad de Enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos de América (IDSA), ha enfatizado que la terapia con antimicóticos tópicos, puede ser la primera línea de tratamiento para candidiasis oral (Zhang L. y cols., 2016). Por ello, es relevante conocer a cabalidad sus formas de acción y limitaciones al momento de utilizar los distintos tipos de antimicóticos.

Actualmente existen pocos medicamentos antimicóticos en comparación con la gran cantidad de generaciones de antibióticos utilizados en medicina. Lo anterior puede deberse, a que es difícil tener un agente que posea toxicidad para una célula eucariota como las LGC, sin generar toxicidad en las células humanas del hospedero. Los fármacos antimicóticos, pueden clasificarse según su modo de acción en cuatro grupos; los polienos, los azoles, las equinocardinas y la Flucitosina (Williams D. y cols., 2011).

Según el MINSAL, se pueden indicar antimicóticos específicos, ya sea de la familia de los polienos (Nistatina y Anfotericina B) o de los azoles (Miconazol, Clotrimazol, Ketoconazol, Itraconazol y Fluconazol), con sus diferentes presentaciones farmacológicas. Alternativamente es posible utilizar antisépticos y desinfectantes. Otra opción, es el uso de hipoclorito de sodio como enjuague nocturno, para eliminar la placa bacteriana de los aparatos protésicos (MINSAL, Guía Clínica, 2010).

En primer lugar, uno de los tratamientos más utilizados por años para la candidiasis oral, corresponde a la Nistatina y la Anfotericina B, de la familia de los polienos. Su mecanismo de acción genera disrupción de la membrana fúngica, a través de su interacción con ergosterol, lo que provoca pérdida del contenido citoplasmático de la levadura. Los polienos tienen amplio espectro de acción antimicótica y poseen baja hepatotoxicidad, no obstante, tienen un sabor desagradable y no presentan buena adherencia a la mucosa oral, lo que disminuye su eficacia (García-Cuesta C. y cols., 2014).

En segundo lugar, los antimicóticos de la familia de los azoles son ampliamente utilizados para el tratamiento de candidiasis oral. Su mecanismo de acción genera inhibición de la síntesis de ergosterol, debido a que actúa sobre la enzima lanosterol desmetilasa, clave en la formación de la membrana celular. Dentro de éste grupo, Fluconazol corresponde al tratamiento sistémico de primera línea para el tratamiento de candidiasis oral, su efecto a nivel intraoral está relacionado con la secreción del fármaco a través de la saliva, donde alcanza niveles similares a los plasmáticos (Williams D. y cols., 2011; Benito-Cruz B. y cols., 2016).

Aunque Fluconazol posee un buen perfil de seguridad cuando se administra de forma sistémica, se ha encontrado que posee interacciones farmacológicas con anticoagulantes orales cumarínicos y con medicamentos para el tratamiento de DM, como glibenclamida. Además, su uso prolongado en el tiempo ha dado lugar al desarrollo de resistencias en las LGC (Williams D. y cols., 2011). Itraconazol también posee eficacia en el tratamiento sistémico de la candidiasis oral, sin embargo, se sugiere su uso como terapia alternativa en reemplazo de Fluconazol (Benito-Cruz B. y cols., 2016).

2.5.- Tratamiento antimicótico local convencional

Miconazol, corresponde a un antimicótico de la familia de los azoles, utilizado por más de 40 años para el tratamiento de infecciones fúngicas locales, que ha sido considerado efectivo y seguro para la salud (Zhang L. y cols., 2016). Respecto a su acción terapéutica, algunos estudios consideran su eficacia entre un 80-90% (Capistrano H. y cols., 2013), pero la mayoría de las investigaciones han descrito una eficacia de casi un 100%, de los casos tratados con éste antimicótico (Pinelli L. y cols., 2013; Tay L. y cols., 2014).

Debido a su presentación en gel, Miconazol posee buenas propiedades de adhesión, por ésta razón éste tratamiento tópico es el de elección para casos de candidiasis oral asociada a EP. Actualmente, se ha innovado para una presentación en tableta adhesiva al paladar, que se administra una vez al día y tiene alta efectividad. Sin embargo, Miconazol al ser absorbido a nivel gastrointestinal, puede generar efecto secundarios como: sensación de náuseas, irritación y diarrea (García-Cuesta C. y

cols., 2014). En Chile, solo existen presentaciones farmacológicas de Nistatina en solución para enjuague bucal y de Miconazol en gel, que se aplica sobre la prótesis dental cuatro veces al día. Los antimicóticos han demostrado inhibir el crecimiento de *C.albicans*, con remisión de signos y síntomas luego de 12 a 14 días de tratamiento (Isham N. y cols., 2010).

Con el paso de los años, se ha descrito la aparición de levaduras resistentes a los antimicóticos de tipo poliénicos y azoles, incluyendo a Miconazol. Entre los mecanismos de resistencia descritos, se puede mencionar: la alteración química de la estructura de la enzima lanosterol desmetilasa, eliminación del antimicótico desde el medio intracelular, a través de bombas transportadoras, y compensación con formación de otros esteroides para la biosíntesis de la membrana (Williams D. y cols., 2011). El incremento en la persistencia y modificación de distribución de *Candida* no albicans, ha sido asociado al aumento de resistencias contra Miconazol (Isham N. y cols., 2010).

2.6.- Tratamiento antimicótico local de origen natural

El rol creciente de los hongos en las infecciones humanas, unido al aumento clínico y microbiológico de resistencia a los pocos antimicóticos existentes, ha estimulado el desarrollo de nuevos y diversos compuestos con mayor espectro de acción antimicótica y menor toxicidad que las actuales moléculas. Así pues, se ha aumentado el interés por los productos de origen natural, debido a que son una extensa fuente de moléculas, que de forma aislada o sinérgica posee actividad antimicótica, lo que ha llevado a replantear el interés en líneas de investigación sobre el tratamiento con productos naturales (Thomson P. y cols., 2011).

Desde ésta visión, surge Carvacrol (2-metil-5-(1-metil etil)-fenol), que corresponde a un fenol mono terpénico, isómero del timol, producido por varias plantas aromáticas, incluyendo el tomillo y el orégano. Actualmente, ha sido utilizado como desinfectante, como fragancia en formulaciones cosméticas y para el control del deterioro de alimentos. Por otro lado, a nivel dental ha sido empleado en el tratamiento de la odontalgia, sensibilidad dentaria, antiséptico en endodoncia y en abscesos alveolares. De hecho, la Agencia Federal de Administración de Alimentos y Fármacos

de Estados Unidos de América (FDA), ha considerado a Carvacrol como seguro para su consumo y uso en alimentos (Suntres Z. y cols., 2015; Xu H. y cols., 2006).

La literatura ha reconocido que Carvacrol posee múltiples propiedades biológicas, entre ellas: antioxidante, antibacteriano, antimicótico, antiinflamatorio, entre otras. En específico, ha demostrado ejercer un efecto antimicótico *in vitro* sobre *C.albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y otros hongos patógenos. (Vardar-Unlu G. y cols., 2010). Algunos estudios, han considerado que Carvacrol es eficiente inhibiendo la adhesión de células plactónicas a la mucosa oral y posteriormente puede retrasar la formación de biopelículas (Gharbi A. y cols., 2015).

Los mecanismos específicos que participan en su acción, están pobremente caracterizados. Se ha estudiado y propuesto que Carvacrol podría ejercer sus propiedades antimicóticas a través de estrés de calcio (Ca^{+2}) e inhibiendo la vía TOR. La exposición de *S. cerevisiae* a Carvacrol resulta en un aumento dosis-dependiente de los niveles de Ca^{+2} , que se correlaciona con su eficacia antimicótica. (Sharifi-Rad M. y cols., 2018).

En la actualidad se ha realizado variados ensayos *in vitro* para determinar la eficacia antimicótica de Carvacrol y su concentración mínima inhibitoria (CIM). Tres autores buscaron determinar la CIM y comparar la eficacia de Carvacrol, Timol y otros aceites esenciales. La CIM presentó una variación entre concentraciones al 0,08% y al 0,25% de peso en volumen (p/v), para colonias aisladas de LGC (Vardar-Unlu G. y cols., 2010; Gallucci M. y cols., 2014; Khan A. y cols., 2015). Por otro lado, los valores de las CIM han sido consideradas como al 0,25% (v/v) para CIM₅₀ y de 0,50% (v/v) para CIM₉₀ (Marcos-Arias C. y cols., 2011).

Luego de su administración oral, la molécula insoluble de Carvacrol, se absorbe lentamente a nivel intestinal distribuyéndose en tejidos, sangre, orina y heces. A nivel metabólico, una porción importante de la dosis de Carvacrol, se conjuga mediante la enzima UDP-glucoronosiltransferasa, formando conjugados glucorónicos y excretándose de forma inalterada dentro de las primeras 24 horas por la orina. Solo una porción menor, sufre el proceso oxidación para su inactivación (Suntres Z. y cols., 2015; Sharifi-Rad M. y cols., 2018).

Respecto a la toxicidad de Carvacrol, se han realizado muy pocos y limitados estudios. Se ha informado que la dosis media letal (DL₅₀) por vía oral en ratones corresponde a 810 mg/Kg, mientras que por vía venosa o intraperitoneal se ha estimado en 80 y 73 mg/Kg respectivamente. La DL₅₀ vía tópica y vía subcutánea se ha estimado en 680 mg/Kg (Andersen A. y cols., 2006; Suntres Z. y cols., 2015).

Marcos-Arias y cols., realizaron un estudio que describe el efecto antimicótico *in vitro* de Carvacrol y de otros derivados terpénicos. En dicho trabajo se incluyeron especies aisladas de levaduras en sujetos con EP, sensibles o resistentes a Fluconazol. Se encontró que Carvacrol presentaba buena actividad *in vitro* contra colonias aisladas de LGC (Marcos- Arias C. y cols., 2011). Bajo el mismo enfoque Ferreira y cols., realizaron una revisión sistemática que analiza la evidencia existente sobre el uso de productos naturales para el tratamiento de candidiasis oral. Este trabajo concluyó, que no existe evidencia de que ninguno de los productos utilizados, fuera eficaz para el tratamiento de la candidiasis oral (Ferreira G. cols., 2015).

Otros estudios han sugerido, que existe eficacia de Carvacrol frente a varios aislados sensibles y resistentes, incluyendo *C. albicans*, y *C. no albicans* de zonas cutáneas, broncoalveolares, orofaríngeas y esofágicas (Suntres Z. y cols., 2015). Un estudio en 2006, realizó una evaluación el aceite esencial de *Zataria Multiflora* en el tratamiento de 12 individuos. El preparado que se usó contenía aceite de Timol, Carvacrol, p-cimeno, Linalool y Terpineno. Debido a que la concentración de Carvacrol alcanzada en el preparado fue de un 0,01%, el efecto antimicótico del obtenido del ensayo, no puede ser atribuido a Carvacrol (Amanlou M. y cols., 2006).

Finalmente, aunque se ha demostrado que Carvacrol tiene efecto antimicótico *in vitro* sobre especies de LGC, no existe evidencia significativa de su efecto en el tratamiento de EP. Así pues, se propone utilizar Carvacrol como agente antimicótico para el tratamiento de candidiasis oral asociada a EP, en adultos mayores que portan prótesis removibles.

3A. HIPÓTESIS.

Los adultos mayores portadores de prótesis removible que presentan candidiasis oral asociada a estomatitis protésica, y que son tratados con terapia en base a Carvacrol al 0,5%, presentan disminución similar en el recuento y variabilidad de especie de levaduras del género *Candida* que aquellos tratados con Miconazol al 2%.

3B. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si los adultos mayores portadores de prótesis removible, que presentan candidiasis oral asociada a estomatitis protésica y que son tratados con Carvacrol al 0,5%, presentan disminución similar en el recuento y variabilidad de especie de levaduras del género *Candida* que aquellos tratados con Miconazol al 2%.

3C. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Determinar el recuento de levaduras del género *Candida* en adultos mayores portadores de prótesis removible con candidiasis oral asociada a estomatitis protésica, antes y después de ser tratados con terapia en base a Carvacrol al 0,5% y Miconazol al 2%.
- 2.- Identificar presuntivamente especies de levaduras del género *Candida* en adultos mayores portadores de prótesis removible con candidiasis oral asociada a estomatitis protésica, antes y después de ser tratados con terapia en base a Carvacrol al 0,5% y Miconazol al 2%.

4. METODOLOGÍA.

Se realizó un ensayo clínico aleatorizado triple enmascaramiento (ciego), con modalidad de análisis “por protocolo”. La variable en estudio fue la candidiasis oral asociada a estomatitis protésica, medida a través de la disminución en el recuento y variabilidad de especie de levaduras del género *Candida*.

Definición de ciegos: Fueron ciegos, los individuos voluntarios, los miembros del equipo de investigación a cargo de la evaluación clínica que tuvieron comunicación con los sujetos voluntarios y los miembros del equipo de investigación quienes analizaron los datos.

Los investigadores clínicos fueron calibrados mediante la valoración del coeficiente *kappa* (Landis J. y Koch G., 1977), con un valor de 0,81-1,00. El investigador principal se ocupó de la dirección del proyecto de investigación, organización, aleatorización de productos a utilizar y su develación al final del experimento.

4.1.- Muestra

Se incluyó un grupo de 60 individuos reclutados en el Servicio de Diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, del Centro de Referencia de Salud, Peñalolén Cordillera Oriente, y del Centro de Diagnóstico y Tratamiento Maruri del Servicio de Salud Metropolitana Norte.

Cálculo del tamaño muestral: Se utilizó una muestra por conveniencia de 60 individuos, debido a su accesibilidad inmediata para la participación en el estudio.

Criterios de inclusión: Adultos mayores sanos, o con enfermedades de base controladas por su médico tratante, que porten prótesis removibles, con signos clínicos de estomatitis protésica y que aceptaron participar del estudio previa firma del consentimiento informado aprobado por comité de ética de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile y por Servicio Metropolitano Oriente (Anexo 1).

Criterios de exclusión: Adultos mayores con enfermedades de base no controladas, sujetos con alergia a alguno de los componentes de los antimicóticos, o que no

cuenten con el permiso del médico tratante. También se excluyeron aquellos que presentaron deterioro cognitivo diagnosticado y que no aceptaron participar en el estudio.

4.2.- Definición e indicadores de resultados

Principal: Disminución de los recuentos de levaduras del género *Candida* (LGC). Se estima que un valor ≥ 400 UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mL) se correlaciona con la candidiasis oral (Epstein J. y cols., 1980). Por lo tanto, se realizó en los voluntarios un recuento de LGC en saliva, antes y después de ser tratados con el antimicótico convencional o el experimental, para determinar la disminución o no del recuento en cada individuo.

Secundario: Observación la variabilidad de especie de LGC, identificadas en los cultivos de los voluntarios antes y después de ser tratados con el antimicótico convencional o el experimental.

4.3.- Preparación de antimicóticos

Se prepararon dos productos a fin de ser probados en el grupo estudio. El antimicótico convencional o control correspondió a un preparado por recetario magistral de Miconazol al 2% en plastibase y el experimental a un preparado por recetario magistral de Carvacrol al 0,5% en plastibase. Ambos fármacos poseían características similares; respecto al color, el extracto de Carvacrol varía entre incoloro a amarillo claro, que preparado en plastibase adoptaba la tonalidad de la base semisólida. El olor y sabor del extracto de Carvacrol se describe como picante, este factor diferencial fue solventado por la baja concentración utilizada en este estudio, que disminuyó las diferencias entre ambos fármacos. Los preparados fueron contenidos en tubos opacos idénticos de 40 gramos, rotulados según secuencia aleatoria y etiquetados con las instrucciones de uso.

Procedimiento de aleatorización: Se generó una lista de aleatorización mediante el software Random Allocation. Correspondió a una aleatorización simple, que identificó secuencialmente a los sujetos que fueron asignados al grupo experimental y al grupo control. La secuencia de aleatorización de los tubos que contenían el tratamiento

control o experimental, fueron identificados por un código conocido sólo por el investigador principal.

4.4.- Diseño del estudio

Los individuos que concordaron con los criterios de inclusión y que de forma informada y voluntaria aceptaron participar del estudio, es decir, firmaron el consentimiento informado (Anexo 1), fueron seleccionados y evaluados por el equipo de odontólogos clínicos. Se confeccionó una hoja de protocolo clínico (Anexo 2), a modo de estandarizar los pasos seguidos por el examinador para cada voluntario.

Actividad Clínica: Se realizó una anamnesis y un examen clínico estandarizados a cada voluntario, la información obtenida fue consignada en una ficha clínica (Anexo 3). Se utilizaron guantes, mascarilla, espejo, sonda dental y luz artificial para examinar a cada sujeto, las lesiones compatibles con EP y candidiasis oral según severidad fueron registradas basándose en los criterios de clasificación de Newton (Brevis P. y cols., 2008).

Se determinó la presencia candidiasis oral basado en signos clínicos y en el recuento viable de LGC. Se le informó a cada voluntario respecto de su salud oral, y se orientó en los casos en que se requirió recambio de aparatos protésicos. Se indicó cómo proceder para su posterior atención y tratamiento, ya sea por su propios medios o invitándolos a ser atendidos en nuestra Facultad en el Curso de Prótesis Removible.

Toma de muestras: A cada voluntario se le tomó muestras de saliva para determinar el recuento de colonias viables e identificación de variabilidad de especie de LGC. Se concertaron tres citas para cada individuo con espacios de tiempo de una semana; sesión A (día 1), sesión B (día 8) y sesión C (día 15), en cada una de estas sesiones se repitió la toma de muestra de saliva no estimulada.

Para cada cita el sujeto debió estar en ayunas mínimo 2 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, antimicótico o esteroideal por al menos 3 meses, se instó también suspensión de uso de colutorios orales.

En la sesión A, se solicitó a cada voluntario depositar 2 mL de saliva en un frasco plástico estéril, el cual fue sellado y rotulado. Las muestras fueron refrigeradas y trasladadas al laboratorio de bioquímica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, para ser procesadas en un periodo de tiempo inferior a cuatro horas. A la mitad de los individuos se les entregó un tubo con 40 gramos de antimicótico control y a la otra mitad se les entregó el experimental. Se les explicó las instrucciones de uso de manera oral y escrita, todos debieron aplicar un centímetro de producto sobre la prótesis dental en su cara interna, cuatro veces al día, por dos semanas.

En la sesión B, los voluntarios volvieron para una reevaluación clínica y para tomar una segunda muestra de saliva no estimulada. En la sesión C, se repitió por última vez el examen clínico y toma de muestra salival, para ambos casos los tubos obtenidos se rotularon, refrigeraron y procesaron de igual forma que en la sesión A. Finalmente, en la última sesión se evaluó la apariencia final de la mucosa protésica y en aquellos individuos en que no desaparecieron los signos de candidiasis oral, se indicó uso de tratamiento convencional.

Se consideró la aparición de signos o síntomas como irritación de la mucosa oral, sensación de ardor, sabor y/u olores desagradables como reacciones adversas, Si alguno de estos eventos sucedió, se acordó suspender el tratamiento y derivar al investigador médico del equipo al más breve plazo.

4.5.- Procesamiento de Datos Clínicos

Los datos clínicos obtenidos del protocolo utilizado y diseñado para este estudio (Anexo 2), fueron tabulados y se seleccionaron los datos que aportaran mayor información relativa a los objetivos de éste estudio, tales como: género, centro del que fueron reclutados, tipo de estomatitis protésica, higiene dental y frecuencia, antigüedad de prótesis y frecuencia de uso.

Respecto al ítem de antecedentes mórbidos y fármacos, fueron seleccionados aquellos que podrían influir en la presentación del cuadro clínico en estudio, tales como: Hipertensión Arterial, Diabetes Mellitus, Asma Bronquial, consumo de antihipertesivos, antidepresivos, anticolinérgico, antipsicóticos, corticoterapia y polifarmacia.

4.6.- Procesamiento de muestras

Para obtener el recuento de *C. albicans*, las muestras salivales recolectadas se sembraron en medio selectivo sólido Agar Sabouraud suplementado con Cloranfenicol (CAF 50 µg/ml), para posteriormente realizar recuento de UFC. Una cantidad de 100 µL de muestra de saliva se homogenizó y diluyó en 900 µL de en buffer fosfato estéril pH 7,4 (PBS) dos veces, obteniéndose diluciones 1:10 y 1:100. Se sembraron tres placas, la primera con 100 µL de la muestra de saliva de manera directa, la segunda con 100 µL de la dilución 1: 10 y la tercera con 100 µL de la dilución 1: 100. Las placas se incubaron a 30°C por 48 horas en condiciones de aerobiosis.

Para obtener la identificación presuntiva de las especies de *Candida* spp, las muestras salivales recolectadas se sembraron en un medio sólido cromogénico CHROMagar *Candida*. La muestra de saliva se homogenizó y diluyó 100 µL en 900 µL PBS dos veces, obteniéndose diluciones de 1:10 y 1:100. Se sembraron tres placas, la primera con 100 µL de la muestra de saliva de manera directa, la segunda con 100 µL de la dilución 1:10 y la tercera con 100 µL de la dilución 1:100. Las placas se incubaron a 30°C por 48 horas en condiciones de aerobiosis.

4.7.- Recuento de levaduras del género *Candida*

Luego de cada toma de muestras en los tiempos A, B y C, se obtuvieron un total de seis placas por voluntario, tres cada medio utilizado. Luego de su incubación, las placas de cada sujeto fueron contadas de forma separada por tres miembros del equipo de investigación. Se obtuvo tres datos de recuento de UFC para cada una de las placas.

Posteriormente, se calcularon valores promedio del recuento de los tres observadores del equipo de investigación para cada una de las placas. Luego para la dilución de saliva directa, 1:10 y 1:100 se multiplicó por los factores de dilución (por 10, 100 y 1000 respectivamente), a fin de obtener el recuento final para cada sesión en valores de UFC/mL (Tabla 2)

	UFC en dilución directa	UFC en dilución 1:10	UFC en dilución 1:100
Observador 1	960	112	10
Observador 2	960	112	10
Observador 3	996	118	10
Promedio	972	114	10
Multiplicación por factor de dilución	972 x (10) 9.720 (UFC/mL)	114 x (100) 11.400 (UFC/mL)	10 x (1000) 10.000 (UFC/mL)
Promedio final = 10.373 = 1,037x10⁴ UFC/mL			

Tabla 2: Ejemplo de un cálculo de recuento final de levaduras del género *Candida* y transformación en unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL). Voluntario número 6, sesión inicial en medio de Agar Sabouraud.

Los recuentos totales obtenidos en los medios Agar Sabouraud y CHROMagar fueron comparados, determinándose que comparativamente los mayores recuentos de UFC se obtuvieron de las muestras en el medio cromogénico. Finalmente, se consideró el recuento final en UFC más alto alcanzado en cualquiera de los medios por conveniencia. Entonces, se obtuvo una planilla única de recuentos totales para ser utilizado en el análisis estadístico.

En el medio CHROMagar, se contabilizaron las colonias obtenidas de distintos colores en cinco categorías: verdes, moradas, rosadas, azules y otras (tabla 3). Se obtuvo así, la identificación presuntiva de las especies presentes. En los casos en que el recuento mayor tuvo lugar en el medio Agar Sabouraud se transformó mediante porcentajes la proporción de especies obtenidas en CHROMagar.

Color Colonia	Identificación presuntiva de especie
Verde	<i>Candida albicans</i>
Morado	<i>Candida glabrata</i>
Rosado	<i>Candida krusei</i>
Azul	<i>Candida tropicalis</i>
Otro	Otras especies encontradas

Tabla 3: Clasificación utilizada para levaduras del género *Candida* sembradas en CHROMagar por color y su correspondiente identificación presuntiva de especie.

Finalmente el investigador principal develó la secuencia aleatoria utilizada en los voluntarios, representados en la tabulación por los códigos (1) para Miconazol y (2) para Carvacrol.

4.8.- Análisis Estadístico

Para el análisis se utilizó el software Stata/SE 14.0 para Windows de StataCorpLP, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. En la descripción de los datos con variables categóricas se utilizaron frecuencias y porcentajes. Para la descripción de datos con variables cuantitativas se utilizaron promedio y desviación estándar, o mediana y rangos, según correspondió, de acuerdo a la distribución de los resultados.

Para el análisis comparativo del cambio en los recuentos de colonias de levaduras (antes y después) para cada grupo de tratamiento, se utilizó la prueba de rango con signo de Wilcoxon, prueba de Kruskal Wallis o el Test exacto de Fisher según correspondió. Se aceptaron diferencias estadísticamente significativas con un error alfa igual o menor a 0,05% y un intervalo de confianza del 95%.

5. RESULTADOS

El estudio analizó una muestra de 60 individuos, de los cuales, cuatro no tenían fichas clínicas completas y diez no cumplían en su totalidad con los criterios de inclusión. Tres sujetos abandonaron el tratamiento luego de la sesión A, tres individuos no asistieron a la sesión B y dos abandonaron el tratamiento en la sesión C. En consecuencia, 38 voluntarios fueron incluidos en el ensayo clínico.

5.1.- Caracterización demográfica y datos clínicos

De los 38 voluntarios incluidos, 30 eran de sexo femenino (79%) y 8 de sexo masculino (21%). El promedio de edad se encontró en 70,4 años, siendo el 79%, mayores de 65 años.

La mayoría de los individuos provinieron del CRS de Peñalolén (68,4%), seguido por aquellos derivados del servicio de diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (31,6%). Ninguno de los sujetos fue reclutado del CDT de Maruri.

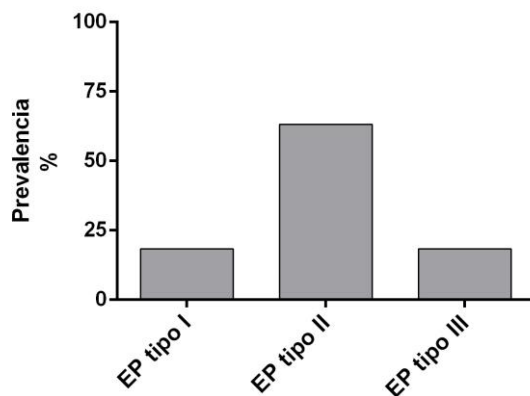


Gráfico 1: Distribución de prevalencia por tipo de estomatitis protésica (EP) en el grupo estudio (38 voluntarios), durante la sesión inicial.

Prevalencia de EP y portación de *Candida spp*: En la sesión inicial, del total de voluntarios, 7 sujetos presentaban EP tipo I (18,4%), 24 individuos tenían EP tipo II (63,2%) y 7 tenían EP tipo III (18,4%) (Gráfico 1). En términos de portación de LGC, en 37 voluntarios se observó crecimiento de colonias sembradas en ambos medios utilizados, Agar Sabouraud y CHROMagar (97,4%), datos no mostrados.

Prevalencia de EP comparada con higiene oral: El 34,2% de los participantes no realizaban higiene dental y el 65,8% si lo hacía, de éste último grupo la mediana de la frecuencia de cepillado fue de 2 veces al día, correspondiendo al 29% de los sujetos. Al comparar la prevalencia de EP con la higiene oral de los individuos del estudio, se pudo observar que el mayor porcentaje de voluntarios que realizaba higiene dental diaria, fueron aquellos que presentaban EP tipo III (71,4%), seguido de EP tipo II (70,8%) y finalmente EP tipo I (42,9%), sin diferencia estadísticamente significativa entre EP e higiene oral (Test de Kruskal Wallis, $p=0,3$) (Gráfico 2).

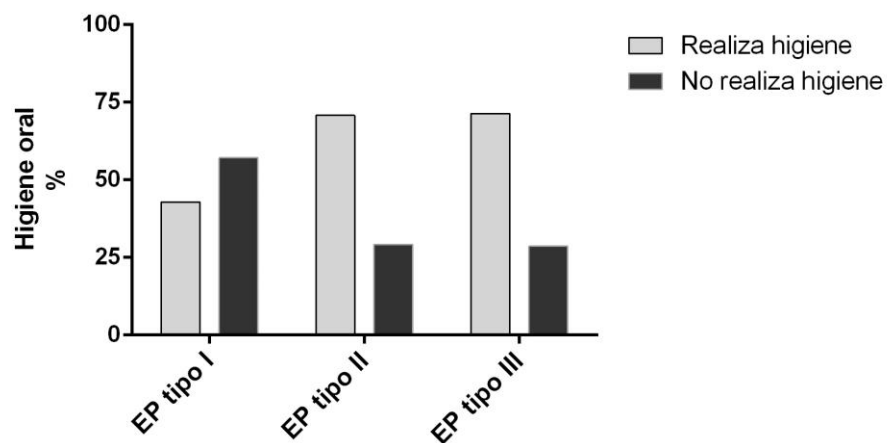


Gráfico 2: Distribución de prevalencia por tipo de estomatitis protésica (EP) en grupo estudio (38 voluntarios), comparada con hábito de realización de higiene oral, durante la sesión inicial.

Ocasión de uso de PR comparada con prevalencia de EP: Para el parámetro antigüedad del aparato protésico la mediana se encontró en 7,5 años. Respecto a la ocasión de uso, el 15,8% (6 sujetos) usaban su prótesis solo en el día y el 84,2% (32 sujetos) la usaban en el día y la noche. Al relacionar la prevalencia de EP y la ocasión de uso protésico, se observó que EP tipo II fue mayor en los voluntarios que usaban su prótesis de forma continua (91,7%) e igual para EP tipo I y III (71,4%). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre prevalencia de EP y ocasión de uso protésico (Test de Kruskal Wallis $p=0,2$) (Gráfico 3).

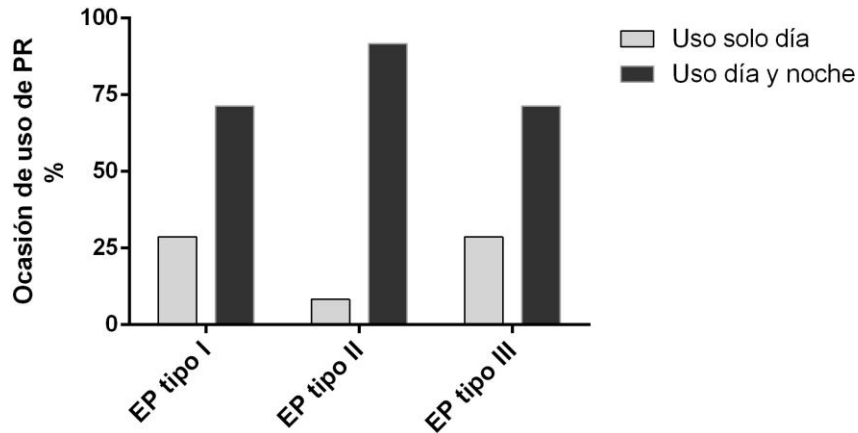


Gráfico 3: Distribución de prevalencia por tipo de estomatitis protésica (EP) en el grupo estudio (38 voluntarios), comparada con ocasión de uso de prótesis removible (PR), durante la sesión inicial.

Con el objetivo de analizar los datos clínicos de los voluntarios, se determinó el porcentaje de voluntarios que consumían fármacos y el porcentaje de individuos con antecedentes mórbidos (Tabla 4 y 5).

Tabla 4: Distribución porcentual de consumo de fármacos en el grupo estudio (38 voluntarios), durante la sesión inicial.

Consumo por tipo de fármaco	Sí	No
Antihipertensivo	57,9%	42,1%
Antidepresivo	10,5%	89,5%
Anticolinérgico	5,3%	94,7%
Antipsicótico	0%	100%
Corticoterapia	2,6%	97,4%
Polifarmacia	57,9%	42,1%

Tabla 5: Distribución porcentual de presencia o ausencia de enfermedades crónicas en el grupo estudio (38 voluntarios), durante la sesión inicial.

Enfermedades crónicas presentes	Sí	No
Hipertensión arterial	60,5%	39,5%
Diabetes mellitus	34,2%	65,8%
Asma	13,2%	86,8%

Se puede observar que las condiciones más prevalentes en los individuos fueron Hipertensión Arterial (60,5%), Polifarmacia (57,9%) y Diabetes Mellitus (34,2%). Cabe destacar que para el caso de Hipertensión Arterial (HTA), a pesar de que la prevalencia fue de un 60,5%, solo un 57,9% de los sujetos seguía su tratamiento (antihipertensivo), por tanto éste valor porcentual fue utilizado para el análisis de consumo de fármacos y enfermedades crónicas presentes.

Ocurrencia de candidiasis oral asociada a EP comparada con consumo de fármacos y enfermedades crónicas presentes: Al comparar la prevalencia de los tres principales factores con la ocurrencia de candidiasis oral, se observa que el 57,1% de los voluntarios con candidiasis consumían fármacos antihipertensivos y presentaban polifarmacia, sin diferencia estadísticamente significativa entre consumo de los fármacos y ocurrencia de candidiasis oral (Test de Kruskal Wallis $p=0,7$ para ambas variables). Además el 34,3% de los individuos con candidiasis oral presentaban Diabetes mellitus (DM), sin diferencia estadísticamente significativa entre prevalencia de DM y ocurrencia de candidiasis oral (Test de Kruskal Wallis $p=0,9$) (Gráfico 4)

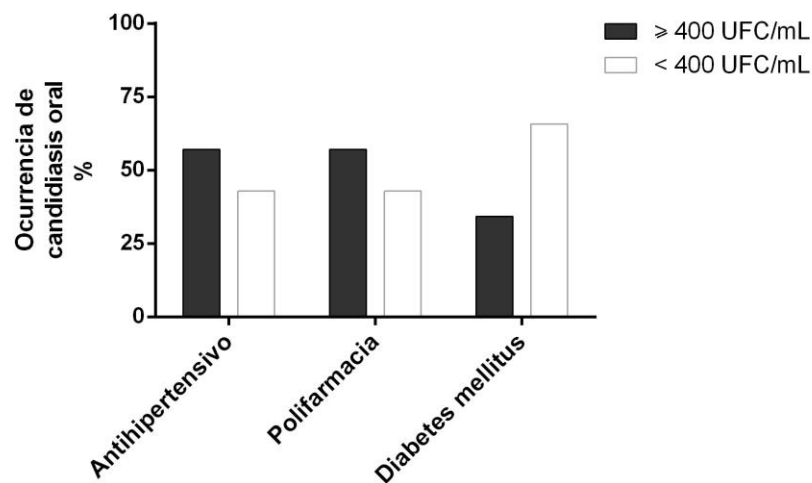
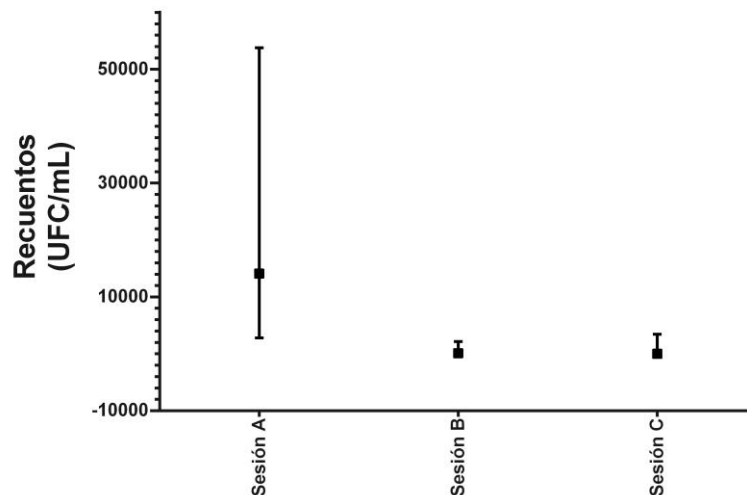


Gráfico 4: Distribución de ocurrencia de candidiasis oral, que corresponde a recuento *Candida* spp superior o igual a 400 unidades formadoras de colonias por mililitro (≥ 400 UFC/mL), comparada con prevalencia de Diabetes mellitus y consumo de fármacos. Grupo estudio (38 voluntarios), durante la sesión inicial.

5.2.- Recuento Microbiológico.

Datos de recuento de *Candida* spp obtenidos de tratamiento con Miconazol

El 55,3% (21 individuos) fueron tratados con el fármaco control, Miconazol. Al examinar los valores de recuento de LGC en las sesiones A, B y C se pudo observar una marcada y constante disminución de los valores medianos de UFC, luego del tratamiento con Miconazol al 2% (Gráfico 5 y Tabla 6).



Tiempo	Recuento de UFC/mL
Sesión A	14.100
Sesión B	110
Sesión C	10

Tabla 6: Valores de recuentos medianos en unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL), durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15). Grupo tratado con Miconazol 2% (21 voluntarios).

Gráfico 5: Representación gráfica de variación de valores de recuentos medianos con intervalo de rango, en unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL), durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15). Grupo tratado con Miconazol 2% (21 voluntarios).

Al describir la distribución de EP en los individuos tratados con Miconazol en la sesión inicial, se observa que EP tipo II fue la primera mayoría, seguido de EP tipo III y I (Tabla 7).

EP	Prevalencia (%)
Tipo I	9,5
Tipo II	71,4
Tipo III	19,1

Tabla 7: Distribución de prevalencia en porcentaje por tipo de estomatitis protésica (EP). Grupo tratado con Miconazol 2% (21 voluntarios), durante sesión inicial.

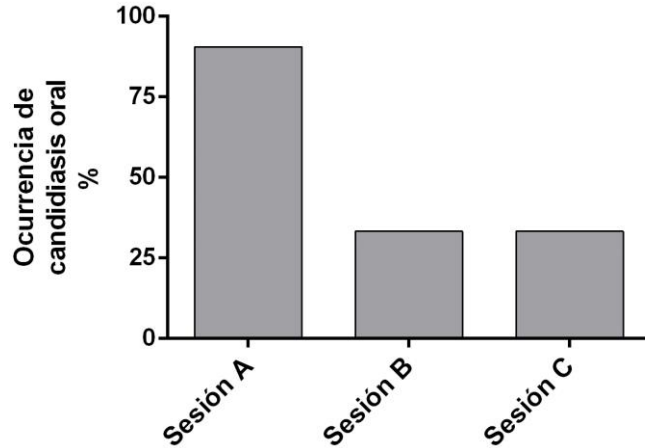


Gráfico 6: Distribución porcentual de ocurrencia de candidiasis oral durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15). Grupo tratado con Miconazol 2% (21 voluntarios).

Al analizar la ocurrencia de candidiasis oral en tiempo en los individuos tratados con Miconazol, se observó una disminución de un 90,5% a un 33,3% entre la sesión A hasta la B. Se destaca que no hubo variación en C. (Gráfico 6).

Datos de recuento de *Candida* spp obtenidos de tratamiento con Carvacrol

El 44,7% (17 individuos) fueron tratados con el fármaco experimental, Carvacrol. Al examinar los valores de recuento de LGC en las sesiones A, B y C se puede observar una marcada y constante disminución los valores medianos de UFC después del tratamiento con Carvacrol al 0,5% (Gráfico 7 y Tabla 8).

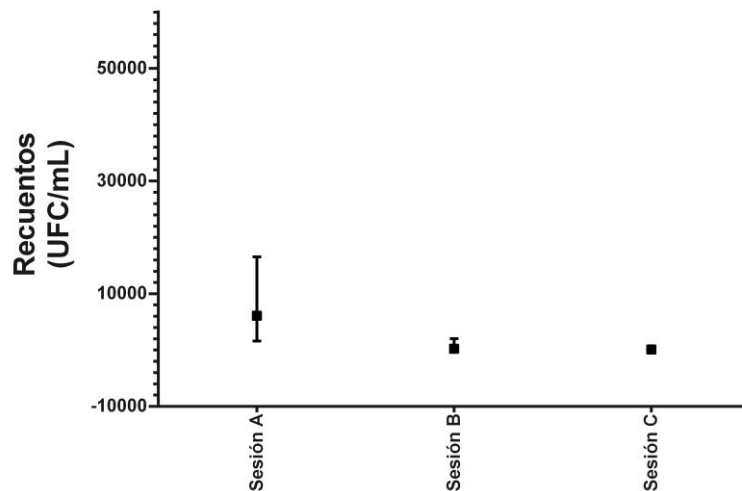


Gráfico 7: Representación gráfica de variación de valores de recuentos medianos con intervalo de rango, en unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL), durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15). Grupo tratado con Carvacrol 0,5% (17 voluntarios).

Tiempo	Recuento de UFC/mL
Sesión A	6.097
Sesión B	240
Sesión C	95

Tabla 8: Valores de recuentos medianos en unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL), durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15). Grupo tratado con Carvacrol 0,5% (17 voluntarios).

Al describir la distribución de EP en los individuos tratados con Carvacrol en la sesión inicial, se observa que EP tipo II fue la primera mayoría, seguido de EP tipo I y III (Tabla 9).

EP	Prevalencia (%)
Tipo I	29,4
Tipo II	52,9
Tipo III	17,7

Tabla 9: Distribución de prevalencia en porcentaje por tipo de estomatitis protésica (EP). Grupo tratado con Carvacrol 0,5% (17 voluntarios), durante sesión inicial.

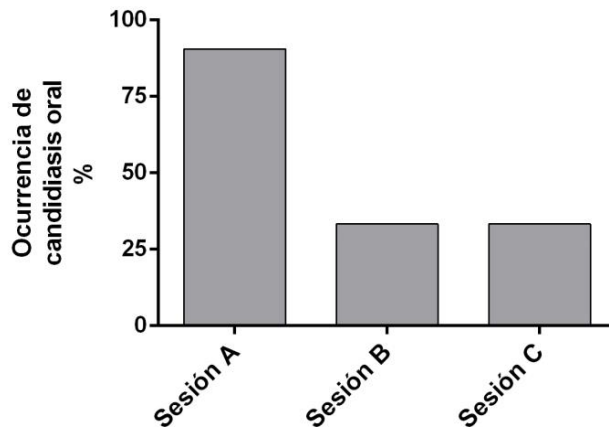


Gráfico 8: Distribución porcentual de ocurrencia de candidiasis oral durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15). Grupo tratado con Carvacrol 0,5% (17 voluntarios).

Al analizar la ocurrencia de candidiasis oral en tiempo en los individuos tratados con Carvacrol, se observó una disminución de un 94,1% a un 17,7% entre la sesión A hasta la C. Se destaca que se observa una disminución progresiva de la ocurrencia. (Gráfico 8).

Finalmente, se contrastó los valores de recuentos de *Candida* spp en UFC, entre los grupos de individuos tratados con Miconazol y Carvacrol en las sesiones A, B y C. No se observó diferencia estadísticamente significativa en la disminución de los recuentos de LGC entre ambos fármacos, en ninguno de los tiempos analizados (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon) (Tabla 10).

Tiempo	Fármaco	Recuento (UFC/mL)	Probabilidad
Sesión A	Miconazol	14.100	p = 0,4
	Carvacrol	6.097	
Sesión B	Miconazol	110	p = 0,3
	Carvacrol	240	
Sesión C	Miconazol	10	p = 0,3
	Carvacrol	95	

Tabla 10: Contraste de valores de recuentos medianos, en unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL), de grupo tratado con Miconazol 2% y Carvacrol 0,5%, durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15).

5.3.- Variabilidad de especies de *Candida* spp en CHROMagar

Datos de identificación de especies *Candida* spp, por cantidad de especie

Se cuantificó la diversidad de especies de LGC en las sesiones A, B y C, en los individuos tratados con el tratamiento control y experimental. Se las clasificó en cuatro grupos; “0 especie”, “1 especie”, “2 especies” y “3 o más especies”. Los valores obtenidos fueron utilizados para analizar el efecto de ambos tratamientos en la diversidad de las especies identificadas.

De acuerdo al análisis estadístico realizado mediante el Test exacto de Fisher, en el grupo tratado con Miconazol, aumentó el porcentaje de sujetos con 0 especies (de 4,8% a 38,1%, $p=0,04$). En aquellos que presentaban 1 especie se observó un aumento entre las sesiones A y B (de 33,3% a 38,1%) y una disminución en C (de 38,1% a 28,6%, $p=0,9$). Se registró disminución de los individuos que presentaban 2 especies (de 57,1% a 19%, $p=0,04$). Cabe destacar, que para los voluntarios que tenían 3 o más especies el porcentaje de UFC entre las sesiones A y B se mantuvo constante y en la sesión C aumentó de 4,8% a 14,3% ($p=0,6$) (Gráfico 9).

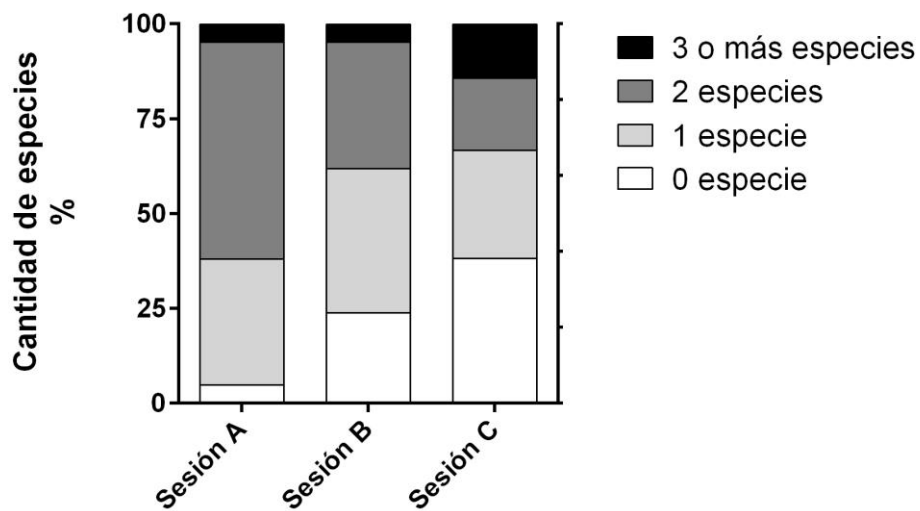


Gráfico 9: Distribución porcentual por cantidad de especies de *Candida* spp durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15), en medio CHROMagar. Grupo tratado con Miconazol 2% (21 voluntarios).

Para los individuos tratados con Carvacrol, los valores porcentuales desde los tiempos A al C, tendieron a aumentar la cantidad de sujetos con 0 especies (de 0% a 41,2%, $p=0,006$) y a disminuir gradualmente en aquellos que poseían 1 especie (de 58,8% a 29,4% $p=0,2$). Los voluntarios que tenían 2 especies aumentaron entre A y B (de 29,4% a 41,2%, $p=0,3$) y luego se redujeron en C (de 41,2% a 17,7%, $p=0,3$). Cabe destacar, que para los individuos que tenían 3 o más especies el porcentaje de UFC entre las sesiones A y B, se redujo totalmente (de un 11,8% a 0%, $p=0,5$), porcentaje que se recuperó por completo en C (11,8%, $p=0,5$) (Gráfico 10).

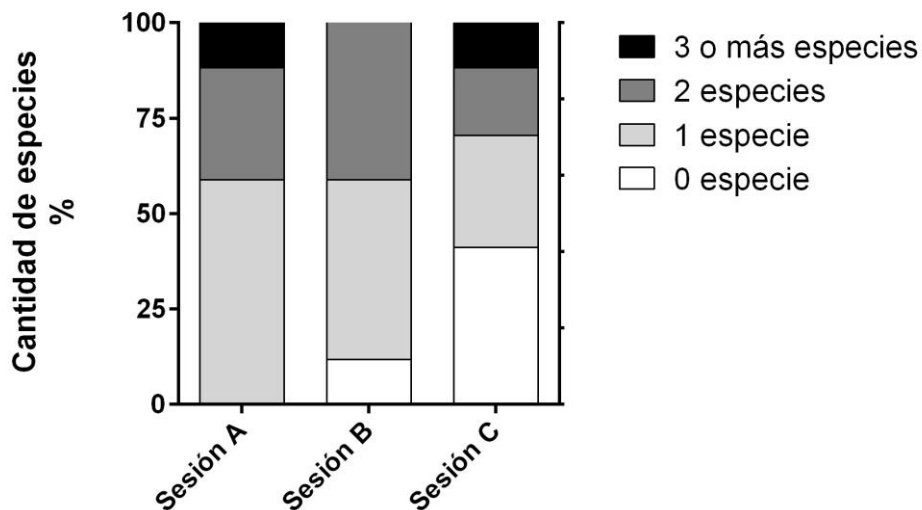


Gráfico 10: Distribución porcentual por cantidad de especies de *Candida* spp durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15), en medio CHROMagar. Grupo tratado con Carvacrol 0,5% (17 voluntarios).

Datos de identificación de especies *Candida* spp, por tipo de especie

Se procedió a agrupar por diversidad de especies de LGC obtenidas, en dos grupos: “*C. albicans*” y “*Candida* no *albicans*” (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y otras). De este modo fue posible analizar la variabilidad de especie en cuatro categorías; 0 especies, presencia únicamente de *C. albicans*, presencia conjunta de *C. albicans*/*C. no albicans* y presencia exclusiva de *C. no albicans*.

Para los voluntarios tratados con Miconazol, los valores porcentuales desde los tiempos A al C tendieron a aumentar los porcentajes de individuos con 0 especies (de 4,8% a 38,1%, $p=0,04$). Se registró una reducción en aquellos que tenían solo presencia de *C. albicans* (de 33,3% a 19,1%, $p=0,6$) y una disminución porcentual en los individuos que tenían presencia conjunta de *C. albicans/C. no albicans* (de 61,9% a 33,3%, $p=0,2$). Cabe destacar, que en los sujetos que solo tenían *C. no albicans*, se observó un leve aumento (de 0% a 9,5%, $p=0,5$) (Gráfico 11).

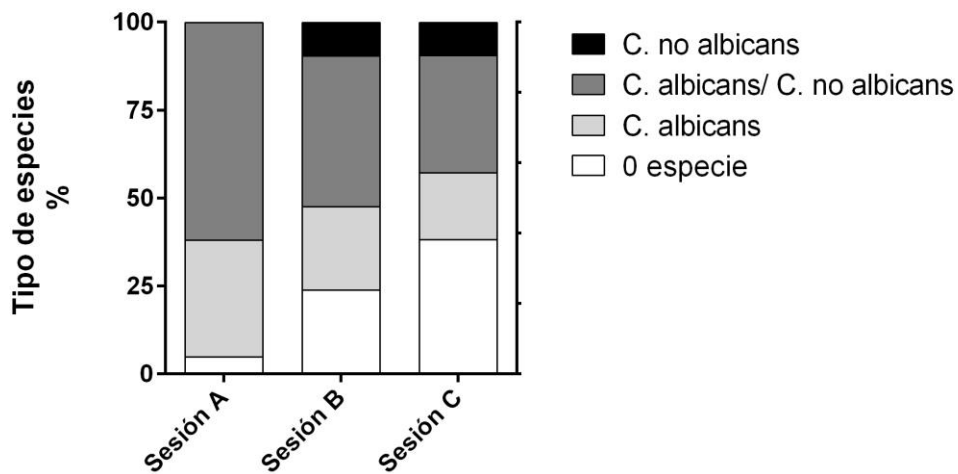


Gráfico 11: Distribución porcentual por tipo de especies de *Candida* spp durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15), en medio CHROMagar. Grupo tratado con Miconazol 2% (21 voluntarios).

Para los voluntarios tratados con Carvacrol, desde los tiempos A al C, se tendieron a aumentar los porcentajes de individuos con 0 especies (de 0% a 41,2%, $p=0,006$) y reducir aquellos que tenían solo presencia *C. albicans* (de 58,8% a 23,5%, $p=0,1$). Se observó una estabilización porcentual entre A y B, en los individuos que tenían presencia conjunta de *C. albicans/C. no albicans* (41,2%), posteriormente el valor disminuyó (29,4%, $p=0,2$). Cabe destacar, que en los sujetos que solo tenían *C. no albicans*, se observó un leve aumento (de 0% a 5,9%, $p=1$) (Gráfico 12).

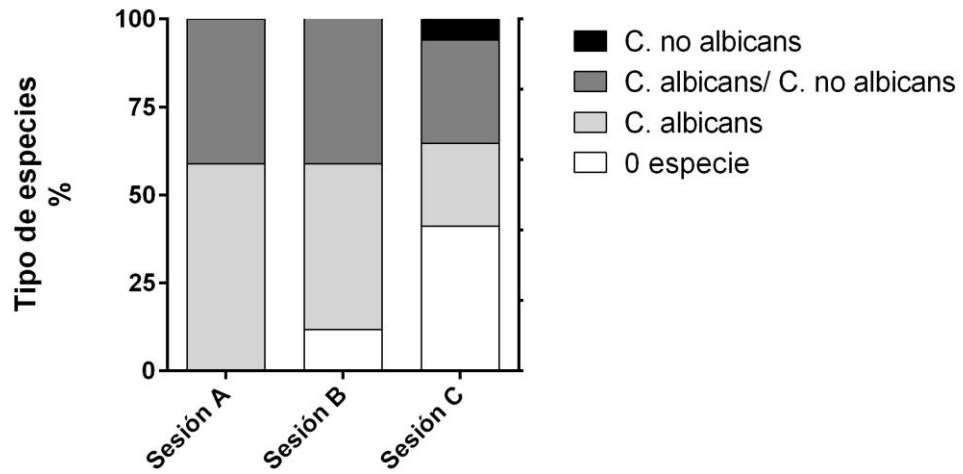


Gráfico 12: Distribución porcentual por tipo de especies de *Candida* spp durante las sesiones A (día 1), B (día 8) y C (día 15), en medio CHROMagar. Grupo tratado con Carvacrol 0,5% (17 voluntarios).

6. DISCUSIÓN

En éste trabajo de investigación, la muestra en estudio incluyó a adultos mayores con EP, con un promedio de edad de 70,4 años. A nivel mundial, se ha observado un crecimiento significativo de los grupos de mayor edad, tendencia que se ha seguido en Chile (León S. y cols., 2015). La literatura, apoya el hecho de que la prevalencia de edentulismo aumenta con la edad y con ello la necesidad de uso de aparatos protésicos (Gendreau L. y cols., 2011). Lo anterior plantea nuevos desafíos desde el punto de vista de la cobertura de las necesidades odontológicas en grupos etarios avanzados, como los son los participantes de este estudio.

Al analizar la distribución por género de los participantes en este trabajo, se encontró una mayor cantidad de mujeres afectadas por EP (79%), en relación a la cantidad de hombres. En un estudio de cohorte realizado por Figueiral y cols., se encontró una prevalencia de EP en mujeres correspondiente a un 59,8% (Figueiral M. y cols., 2007). El porcentaje de mujeres afectadas en este estudio fue comparativamente mayor a la proporción descrita por la literatura.

La distribución por tipo de EP encontrada en este trabajo, arrojó un 19,6% para EP tipo I, un 58,7% para EP tipo II y un 21,7% para EP tipo III. Ésta distribución no concuerda con la encontrada por Albaci O. y cols., cuya prevalencia principal fue de un 20% para EP tipo I y un 14% para EP tipo II (Albaci O. y cols., 2010), tampoco con Figueiral M. y cols., quienes también encontraron la mayor prevalencia en EP tipo I (Figueiral M. y cols., 2007). Esta diferencia puede ser atribuida al tamaño de la muestra de voluntarios de éste estudio y a que los criterios de inclusión consideraron solamente pacientes con EP, factores que pudieron afectar la distribución típica de la muestra, de manera que no sigue la frecuencia normal.

Entre los principales factores etiológicos de EP, una pobre higiene oral y protésica, han sido asociadas en la literatura como factores que aumentan la prevalencia de EP e infección por LGC (Gendreau L. y cols., 2011). Teniendo este antecedente presente, en éste trabajo se observó que la mayoría de los participantes (65,8%), realizaba higiene oral en promedio 2 veces al día. Por lo

tanto, se incluyeron de forma aleatoria a una población con aparentes buenos hábitos de higiene oral.

Sin embargo, si comparamos la frecuencia de higiene con la prevalencia de EP, encontramos que aquellos individuos que tienen EP tipo II y III, presentan una frecuencia de higiene oral de un 70,8% y 71,4% respectivamente. Paradójicamente, presentan la mejor higienización con una mayor severidad inflamatoria. Contrariamente, solo el 42,9% de los voluntarios con EP tipo I, realizaban higiene oral. Es posible que la técnica de higiene de los sujetos fuera entonces inadecuada, pues no disminuye la severidad de EP. Ésta situación es contraria a lo expuesto por Yarborough A. y cols., quienes afirman que la higiene oral resulta en una mejora sostenida de EP en el tiempo (Yarborough A. y cols., 2016). En este estudio no se realizó instrucción de higiene oral o protésica durante el reclutamiento de voluntarios del ensayo clínico.

Debemos considerar además, que existen múltiples factores etiológicos que pueden influir en la aparición del cuadro de EP (Gendreau L. y cols., 2011), y que pudieron modificar la distribución por severidad en el grupo de voluntarios. Cabe mencionar, que la falta de información respecto a las técnicas de higiene oral de los voluntarios, y la no realización de instrucción de higiene oral y protésica durante la investigación, dan cuenta de la diferencia encontrada con lo relatado por la literatura.

Otro factor etiológico relevante de analizar, corresponde a la antigüedad protésica y el uso continuo de prótesis removibles (PR). En este trabajo, la mediana de antigüedad protésica fue de 7,5 años y la mayor parte de los voluntarios (84,2%) utilizaban sus aparatos protésicos de manera continua tanto en el día como en la noche. De acuerdo a los resultados obtenidos, el 71,4%, 91,7% y 71,4% de los individuos que usaban sus prótesis de día y noche, tuvieron una prevalencia de EP tipo I, II y III, respectivamente.

La distribución por tipos de EP comparada con la frecuencia mencionada, presenta pequeñas variaciones no estadísticamente significativas, que pueden ser atribuidas al tamaño muestral y la aleatoriedad de inclusión de los sujetos. Estos

porcentajes de prevalencia, son similares y reafirman lo dicho por Ercarlik S. y cols., quienes aseveran que la antigüedad protésica y una mayor frecuencia de uso están correlacionadas con la aparición de EP. En particular el uso nocturno de PR, se ha asociado significativamente con EP, pues disminuye la función protectora de la saliva y la resistencia de la mucosa (Ercarlik S. y cols., 2015).

Por otra parte, al analizar las enfermedades crónicas presentes y el consumo de diversos tipos de fármacos en los participantes, las tres condiciones más prevalentes fueron; el consumo de antihipertesivos, la polifarmacia y la DM. Estos datos son similares a los encontrados por Ercalík S. y cols., en cuyo estudio las enfermedades con mayor prevalencia fueron HTA y DM. De igual forma, Cueto A. y cols., encontraron en su población estudio que HTA fue la enfermedad con más ocurrencia (Ercalík y cols., 2015; Cueto A. y cols., 2012).

El 57,1% de los individuos con candidiasis oral presentaron consumo de antihipertesivos, correspondiente a casi la mitad de los voluntarios incluidos en éste estudio. La literatura ha considerado a la HTA como una de las enfermedades crónicas no transmisibles más frecuentes a nivel mundial (Bancalari R. y cols., 2011), por lo tanto, el consumo de antihipertensivos es muy frecuente. Existen gran variedad de fármacos que la literatura ha descrito como hiposalivantes, entre ellos los antihipertesivos, relacionados con la disminución del flujo salival, que no permite que los mecanismos antimicóticos naturales ejerzan su función protectora (Farah C. y cols., 2010).

Tal como fue mencionado en el ítem “Marco teórico” de este trabajo, la OMS define la polifarmacia como el consumo de tres o más fármacos simultáneamente (Robles A. y cols., 2017). El 57,1% de los voluntarios que tenían candidiasis oral presentaban polifarmacia, nuevamente un factor de riesgo relevante en la infección por LGC y disminución del flujo salival normal. La creciente población de personas mayores que presentan alta carga de enfermedades crónicas no transmisibles, está relacionada a un aumento en la polifarmacia en ésta población (León S. y cols., 2016).

Por último, el 34,3% de los sujetos con candidiasis oral presentó DM, enfermedad crónica, que según la literatura genera mayor predisposición a la infección

por LGC. La evidencia científica afirma que un pobre control metabólico en personas con DM disminuye el flujo salival, disminuye el pH intraoral e incrementa los niveles de glucosa, factores que facilitan la colonización fúngica (Farah C. y cols., 2010).

Ahora bien, desde el punto de vista del tratamiento de la candidiasis oral, la terapia antimicótica ha demostrado con alto nivel de evidencia, que puede disminuir significativamente la presencia de LGC en la mucosa oral y reducir el cuadro de inflamación de EP (Gendreau L. y cols., 2011). El medicamento de elección para el tratamiento de candidiasis oral corresponde a Miconazol, lo anterior debido a su comprobada efectividad y buenas propiedades de adherencia a la mucosa palatina (García-Cuesta C. y cols., 2014). Esta es la razón por la que éste fármaco fue elegido como control de este estudio.

El 55,3% de la muestra total de voluntarios, fueron tratados aleatoriamente con Miconazol. En éste grupo, durante la primera sesión, se observó que la prevalencia de estomatitis tuvo la siguiente distribución; EP tipo I (9,5%), EP tipo II (71,4%) y EP tipo III (19,1%). Se mantiene por tanto, la distribución atípica del total de voluntarios incluidos.

Es necesario indicar, que hubiese sido relevante comparar los datos clínicos de EP antes y después del tratamiento con Miconazol, sin embargo, la apariencia clínica final no fue registrada en el total de voluntarios incluidos. La comparación por tanto no fue posible, lo que representa una limitante de ésta investigación.

En relación a la primera parte del objetivo específico número uno, que busca determinar los recuentos de LGC en el grupo de individuos control antes y después de ser tratados con Miconazol, se observó que hay una disminución drástica de los recuentos de LGC en el tiempo. Éste hecho apoya la efectividad de Miconazol descrita por la literatura (Zhang L. y cols., 2016).

Por otro lado, podemos relacionar la ocurrencia de candidiasis oral en los voluntarios tratados con Miconazol y su variación en el tiempo. La presencia de candidiasis disminuyó ampliamente entre la sesión A hasta la B, y luego se mantuvo estable en la sesión C. La situación anterior, implicaría, que a pesar de la alta efectividad de Miconazol, su actividad antimicrobiana puede verse afectada, por

ejemplo por la formación de biopelículas de *Candida* en la cavidad oral (Williams D. y cols., 2011).

Sin embargo, es necesario considerar dos importantes limitantes de ésta investigación. Primero, se está trabajando que con un tamaño muestral pequeño, por tanto limitado. Segundo, es relevante destacar, que el grupo control presentó de forma aleatoria, un mayor recuento de LGC que el grupo experimental, en la sesión inicial. Éste factor, podría provocar que el fármaco experimental haya resultado aparentemente más efectivo que el fármaco control, conclusión que podría ser errónea, ya que una población con mayor cantidad de recuentos de UFC inicial, probablemente tendrá menor disminución de UFC en el recuento final.

Otro factor a considerar, son los biomateriales dentales de las PR, tales como el acrílico de termocurado, que pueden ser colonizados por *Candida* spp y perpetuar la infección. Por ello, si la prótesis no es descontaminada se produce recurrencia de EP y sobreinfección de las mucosas (Gendreau L. y cols., 2011). Es relevante también valorar, a la higiene oral como un factor necesario para la erradicación de la candidiasis oral, debido a que un aumento en la instrucción de higiene oral permite resultados sostenibles en el tiempo (Yarborough A. y cols., 2016). Por el contrario, una pobre higiene oral aumenta la ocurrencia de EP e infección por LGC (Gendreau L. y cols., 2011).

Con el paso del tiempo, se ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas terapias que aporten a la poca cantidad de antimicóticos existentes. Así pues, la terapia en base a Carvacrol surge como una alternativa natural, para en tratamiento de micosis locales. La literatura ha reconocido que Carvacrol posee múltiples acciones biológicas, entre ellas actividad antimicótica (Suntres Z. y cols., 2015). Por ésta razón, fue seleccionado como fármaco experimental de éste trabajo.

El 44,7% del total de voluntarios, fueron tratados aleatoriamente con Carvacrol. En éste grupo durante la primera sesión, se observó que la prevalencia de estomatitis tuvo la siguiente distribución según severidad: EP tipo I (29,4%), EP tipo II (52,9%) y EP tipo III (17,7%). Se mantiene de igual forma, la distribución atípica del total de voluntarios incluidos en éste estudio.

Al igual que para el grupo control, se debe indicar que hubiese sido relevante comparar los datos clínicos de EP, antes y después del tratamiento con Carvacrol, en términos de apariencia clínica, lo que representa una limitante de ésta investigación.

En relación a la segunda parte del objetivo específico número uno, que busca determinar los recuentos de LGC en el grupo de individuos experimental, antes y después de ser tratados con Carvacrol, se observa una disminución de los recuentos de LGC en el tiempo de estudio. Éste resultado apoya la existencia de acción antimicótica de Carvacrol descrita por la literatura (Nóbrega R. y cols., 2016).

Desde otro punto de vista, podemos analizar la ocurrencia de Candidiasis en voluntarios tratados con Carvacrol y su variación en el tiempo. La ocurrencia de candidiasis oral tuvo una disminución paulatina desde la sesión A hasta la C, con una baja mantención de su prevalencia al final del tratamiento. Algunos estudios, han considerado que Carvacrol es eficiente inhibiendo la adhesión de células plactónicas a la mucosa oral y posteriormente puede retrasar la formación de biopelículas (Gharbi A. y cols., 2015). Éste resultado concuerda con lo descrito por la literatura.

Para el caso de éste fármaco experimental es necesario volver a considerar el efecto de las dos principales limitantes de ésta investigación. Por un lado, como ya se mencionó, se trabajó con un tamaño muestral pequeño. Por otro lado, el grupo experimental presentó de forma aleatoria, un menor recuento de LGC que el grupo control, en la sesión inicial. Éste hecho, podría explicar una mayor disminución porcentual de la ocurrencia de candidiasis oral al final del tratamiento. Aquello podría interpretarse erróneamente como una mayor efectividad de Carvacrol por sobre Miconazol, sin embargo, una población con menores recuentos de UFC, posiblemente tendrá una mayor disminución de UFC en el recuento final.

Además del análisis de recuentos, la identificación presuntiva y distribución las especies existentes en los sujetos, es parte relevante para este estudio. Dentro de las LGC en la microbiota oral, existen dos grandes grupos: *C. albicans* y *C. no albicans* (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. dubliniensis*), cuya presencia

podría variar la presentación clínica de la candidiasis oral en los voluntarios (Ahmad A. y cols., 2011; Gallucci M. y cols., 2014).

En relación a la primera parte del objetivo específico número dos, que busca identificar presuntamente las LGC, en el grupo de individuos control, antes y después de ser tratados con Miconazol, se analizó la diversidad de especies de *Candida* spp. Se realizó una primera clasificación de colonias por número de especies encontradas y su variación en el tiempo. Se utilizaron cuatro categorías: ninguna especie, una especie, dos especies y tres o más especies.

En primer lugar, se observó un incremento sostenido de los individuos que presentaban “ninguna especie”, desde la sesión A hasta la C. Éste efecto, resultó ser estadísticamente significativo y es reflejo de la efectividad de Miconazol en la remisión completa de la infección micótica, descrita por la literatura (Zhang L. y cols., 2016). En segundo lugar, en los sujetos que presentaban “una especie”, se observa un aumento y posterior disminución de sus porcentajes en el tiempo. Éste comportamiento no resultó ser estadísticamente significativo desde el punto de vista numérico, pero los resultados de ésta clasificación podrían haber sido afectados por la disminución de la categoría “dos especies”, cuya reducción implica el aumento porcentual de individuos con “una especie”.

En tercer lugar, se observó una disminución paulatina de los individuos que presentaban “dos especies”, desde la sesión A hasta la C. Éste comportamiento, resultó ser estadísticamente significativo y es reflejo de la comprobada acción antimicótica de Miconazol. Finalmente, para aquellos que tenían “tres o más especies”, se registró un leve aumento porcentual en el tiempo de estudio. Dicho resultado, no fue estadísticamente significativo y tomando en cuenta que la variación porcentual (de un 4,8% a un 14,3%), representa numéricamente un aumento de dos sujetos, se puede considerar como una variación insignificante.

No obstante, ésta actividad antimicrobiana aparentemente poco efectiva para la categoría “tres o más especies”, podría responder a la falta de actividad de los antimicóticos convencionales frente a la formación de biopelículas de *Candida*. La compleja arquitectura de la biopelículas orales, protege a las levaduras de la

penetración de los antimicrobianos dificultando su acción (Williams D. y cols., 2011). Por otro lado, también existe la posibilidad de una reinfección de levaduras, promovido por la falta de higiene oral y por la contaminación de PR, que permitirían que se recolonice la mucosa oral.

Se realizó una segunda clasificación para el grupo control, donde se analizaron los recuentos de LGC por tipo especie y su variación en el tiempo. Nuevamente, se utilizaron cuatro categorías: ninguna especie, solo *Candida albicans*, ambas (*C. albicans*/*C. no albicans*) y solo *Candida no albicans*. De igual forma que para la categorización anterior, es posible observar el aumento estadísticamente significativo de los individuos que presentaban “ninguna especie”, reflejo de la actividad de Miconazol.

Al analizar las categorías “solo *C. albicans*” y “ambas (*C. albicans* y *C. no albicans*)”, se observó que ambas presentaron disminuciones porcentuales desde el tiempo A hasta el C. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos, de igual forma se constata reducción del crecimiento de levaduras para dichas especies. En último lugar, para aquellos que tenían “solo *C. no albicans*”, se registró un aumento porcentual en el tiempo de estudio. Dicho resultado, no fue estadísticamente significativo y tomando en cuenta que la variación porcentual (de un 0% a un 9,5%), representa numéricamente un aumento de dos sujetos, se puede considerar como una variación insignificante.

Mediante ésta segunda clasificación, también es posible constatar la actividad antimicrobiana de Miconazol, especialmente frente a *C. albicans*, en las cuales se demuestra acción antimicrobiana. Por otra lado, la aparente baja efectividad del medicamento contra *C. no albicans*, podría estar relacionado con la existencia de cepas resistentes a Miconazol. Las *C. no albicans* han sido asociadas a la persistencia de infecciones con múltiples especies de levaduras (Gallucci M. y cols., 2014; Williams D. y cols., 2011). Algunos estudios, han relacionado la presencia de *C. glabrata* y *C. krusei*, con un mayor riesgo de desarrollar resistencia contra antimicóticos convencionales (Dar-Odeh N. y cols., 2012).

Un último factor que no se puede desatender, es la alta adherencia que el voluntario debe demostrar al tratamiento para el uso del fármaco control. Según la literatura, Miconazol debe ser aplicado, de manera tópica, cuatro veces al día por 12 a 14 días (Isham N. y cols., 2010). Dicho esquema terapéutico, puede asociarse al incumplimiento de su aplicación, por diversos factores, por ejemplo, olvidos. La falta de seguimiento cercano al tratamiento de cada sujeto, correspondería a una limitante de ésta investigación.

En relación a la segunda parte del objetivo específico número dos, que busca identificar presuntivamente las LGC, en el grupo de individuos experimental, antes y después de ser tratados con Carvacrol, se analizara al igual que para el fármaco control, la distribución de especies por cantidad y por tipo.

Se observó un incremento sostenido de los individuos que presentaban “ninguna especie”, desde la sesión A hasta la C. Este efecto, resultó ser estadísticamente significativo y es reflejo de la actividad antimicótica de Carvacrol postulada por la literatura (Suntres y cols., 2015). En aquellos sujetos que registraban “una especie”, se observó una aparente disminución paulatina de sus porcentajes en el tiempo. No obstante, este comportamiento no resultó ser estadísticamente significativo, aunque es posible constatar reducción en la cantidad de LGC.

Posteriormente, se observó que los sujetos que presentaban “dos especies”, tuvieron un aparente aumento porcentual inicial, con una posterior disminución. Dicho comportamiento, no fue estadísticamente significativo, pero su resultado pudo verse afectado por la disminución entre A y B de la categoría “tres o más especies”, cuya reducción implicaría el aumento porcentual de los individuos con “dos especies”. Finalmente, para aquellos que tenían tres o más especies, se registró una reducción completa entre los tiempos A y B, con recuperación porcentual en C (11,8%). Este resultado, no fue estadísticamente significativo y tomando en cuenta que la variación porcentual (de un 0 a un 11,8%), representa numéricamente en aumento de dos individuos, se puede considerar como una variación insignificante.

Aunque la actividad antimicrobiana, resulta ser aparentemente poco efectiva para la categoría tres o más especies, podría responder a una gran diversidad de factores. Al igual que para Miconazol, la aplicación tópica de Carvacrol se puede ver parcialmente imposibilitada (en términos de penetración) por la formación de biopelículas complejas de LGC, en la cavidad oral. Sin embargo, se debe considerar de igual forma, la posibilidad de reinfección de la mucosa debido a falta de higiene oral y contaminación del aparato protésico. Lo anterior se suma a los factores sistémicos que presentan alrededor del 50% de los individuos en estudio, que facilitarían la adhesión microbiana (Gendreau L. y cols., 2011).

Continuando con la segunda clasificación por tipo de especies, se puede constatar, al igual que en la categorización anterior, que hubo un aumento estadísticamente significativo en los individuos que presentaban “ninguna especie”, éste segundo resultado es una fuerte evidencia que comprueba la efectividad antimicótica de Carvacrol *in vivo* y permite considerar su posible aplicabilidad como alternativa tópica para el tratamiento de candidiasis oral. Al analizar la categoría “solo *C. albicans*”, se observó una disminución porcentual que no fue estadísticamente significativa. A pesar de ello, es posible constatar actividad antimicrobiana de Carvacrol sobre la especie *C. albicans*, visible en la reducción de recuentos.

Al observar la categoría “ambas (*C. albicans*/ *C. no albicans*)”, entre la sesión A hasta la B, hubo una estabilización porcentual en un 41,2%, que se redujo a un 29,4% en la sesión C. Por otro lado, la categoría “solo *C. no albicans*”, se mantuvo en 0% en los primeros dos tiempos, y aumento a un 5% en la sesión final C. Ambos resultados, no fueron estadísticamente significativos, y para la última categoría, la variación porcentual (de un 0% a un 5%), corresponde numéricamente a solo un individuo.

Debido a que Carvacrol, está siendo probado en esta investigación como un nuevo medicamento antimicótico, es difícil asociar la falta de actividad antimicrobiana, en *C. no albicans*, a la generación de resistencias farmacológicas. Esta molécula, corresponde a un fenol, cuyo mecanismo de acción, permitiría la apoptosis de las LGC por estrés de calcio (Ca^{2+}) (Suntres Z. y cols., 2015).

Recientemente la inhibición de la vía TOR ha sido relacionada con la regulación morfológica de *C. albicans* y se la ha asociado con una disminución en los fenómenos de adhesión y formación de biopelículas (Flanagan P. y cols., 2017). Por lo tanto, su acción sería más inespecífica que los mecanismos de acción utilizados por la familia de los azoles. En conclusión, sería más improbable la aparición de resistencias en Carvacrol, en el transcurso de esta investigación.

Al igual que para Miconazol, Carvacrol se aplicó 4 veces al día de forma tópica, por 14 días. Por tanto, el factor adherencia al tratamiento también puede influir en los resultados obtenidos. Dicho esquema terapéutico, se puede asociar al incumplimiento en su aplicación por olvido, e incluso, a la eliminación accidental del producto desde la cavidad oral, por consumo de alimentos posterior a su aplicación. La falta de seguimiento cercano al tratamiento de cada sujeto, corresponde nuevamente, a una limitante de esta investigación.

Se estudió dos grupos de individuos, control y experimental, que presentaban una distribución por género, edad, antecedentes mórbidos y severidad inflamatoria similar. Mediante los recuentos generales en las sesiones A, B y C para Miconazol y Carvacrol, se puede observar que ambos fármacos, presentaron buena eficacia antimicótica contra *Candida* spp. Ahora bien, si comparamos la disminución de los recuentos para ambos grupos, aplicando la prueba no paramétrica con signo de Wilcoxon, se obtienen diferencias no estadísticamente significativas en los tiempos A, B y C, para el grupo control en comparación con el experimental.

En conclusión, el comportamiento antimicótico de ambos productos fue similar, en términos de disminución de recuentos y variabilidad de especie. El resultado anterior, responde el objetivo general de ésta investigación, que busca determinar si los individuos tratados con Carvacrol al 0,5%, presentan una efectividad similar sobre especies de levaduras del género *Candida*, que aquellos tratados con Miconazol al 2%.

Así pues, se considera correcta la hipótesis planteada al inicio del estudio. Por lo tanto, se puede afirmar que los adultos mayores portadores de prótesis removible, que presentan candidiasis oral asociada a estomatitis protésica, que

fueron tratados con terapia en base a Carvacrol al 0,5%, presentaron una disminución similar en el recuento y variabilidad de especie de levaduras del género *Candida*, que aquellos tratados con Miconazol al 2%.

7. CONCLUSIONES

- En el grupo estudio, la mayoría de los individuos fueron de sexo femenino. En la muestra total, la severidad de estomatitis protésica fue mayor para la tipo II, seguida de la tipo III y finalmente la tipo I.
- La higiene oral de los individuos fue buena en términos de realización y frecuencia, pero no se relacionó con una disminución en la prevalencia de estomatitis protésica. Por el contrario, el uso nocturno prótesis removibles se correlacionó con un aumento en la severidad de estomatitis protésica. Por último, el consumo de antihipertensivos, presencia de polifarmacia y la Diabetes Mellitus fueron los tres factores mórbidos más prevalentes, relacionados a la presencia de candidiasis oral asociada a estomatitis protésica.
- Se observó buena actividad antimicótica en Miconazol y Carvacrol, en términos de la disminución de recuentos de levaduras y remisión de la candidiasis oral asociada a estomatitis protésica.
- Miconazol y Carvacrol, presentaron una actividad antimicótica similar frente a la reducción de recuentos por variabilidad de especies. Ambos obtuvieron resultados estadísticamente significativos respecto al aumento de individuos con “ninguna especie”, entre el inicio hasta término del estudio.
- No existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antimicótica de Carvacrol y Miconazol, por lo tanto tienen una efectividad similar.
- Carvacrol puede ser considerado como una terapia local efectiva para el tratamiento de candidiasis oral asociada a estomatitis protésica.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albaci O., Haliki A., Ozturk B., Toksavul S., Ulusoy M., Boyacioglu H. (2010). Determining *Candida spp* incidence in denture wearers. *Mycopathologia*. 169:365-372.
- Ahmad A. y cols., 2011. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Jan;30(1):41-50.
- Amanlou M, Beitollahi JM, Abdollahzadeh S y cols., 2006. Miconazole gel compared with *Zataria multiflora* Boiss gel in the treatment of denture stomatitis. *Phytotherapy Research*. 20(11):966- 969.
- Andersen A, 2006. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro- m-cresol, p- chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol,p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and Carvacrol. *Internacional Journal of Toxicology*. 25(Suppl 1):29–127.
- Axéll T, 1976. A prevalence study of oral mucosal lesions in an adult Swedish population. *Odontol Revy Suppl* 36:1-103.
- Benito-Cruz B. y cols., 2016. Oral *Candida* isolates and fluconazole susceptibility patterns in older Mexican women. *Arch Gerontol Geriatr*. 2016 Jul-Aug;65:204-10.
- Brevis P, Cancino MJ, Cantín LM, 2008. Estomatitis subprótesis. Estudio clínico y microbiológico de *Candida*. *Int. J. Odontostomat* 2(1):101-108.
- Capistrano HM, de Assis EM, Leal RM y cols., 2013. Brazilian green propolis compared to Miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2013:947980.
- Cueto A, Martínez R, Niklander S y cols., 2013. Prevalence of oral mucosal lesions in an elderly population in the city of Valparaiso, Chile. *Gerodontology*. 30(3):201-206.
- Dar-Odeh N. y cols., 2012. The role of antifungal drugs in the management of denture-associated stomatitis. *Intern Arabic Journal of Antimic Agents*. Vol 2 N° 1:1.

- Emami E, Taraf H, de Grandmont P y cols., 2012. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. *Int J Prosthodont.* 25:113–119.
- Epstein J, Pearsall N, Truelove E., 1980. Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. *J. Clin. Microbiol.* 12:475-6.
- Ercarlik S, y cols., 2015. Association between Oral Mucosal Lesions and Hygiene Habits in a Population of Removable Prosthesis Wearers. *J Prosthodont.* 2015 Jun;24(4):271-8.
- Espinoza I, Rojas R, Aranda W y cols., 2003. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *J. Oral. Pathol. Med.* 32:571-575.
- Farah C, Lynch N, McCullough M., 2010. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust. Dent. J.* 55(1):48–54.
- Flanagan P. y cols., 2017. The *Candida albicans* TOR-Activating GTPases Gtr1 and Rhb1 Coregulate Starvation Responses and Biofilm Formation. *mSphere.* 2017 Nov-Dec; 2(6): e00477-17.
- Ferreira G. y cols., 2015. Does Scientific Evidence for the Use of Natural Products in the Treatment of Oral Candidiasis Exist? A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2015, Article 147804: 8.
- Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C., 2007. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors – a large cohort. *J. Oral. Rehabil.* 34:448-455.
- Gallucci M. y cols., 2014. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. *J Appl Microbiol.* 2014 Apr;116(4):795-804.
- Garcia-Cuesta C, Sarrion-Pérez MG, Bagán JV., 2014. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J. Clin. Exp. Dent.* 1. 6(5):e576-582.

- Gendreau L, Loewy Z., 2011. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J. Prosthodont.* 20:251–260
- Gharbi A, Legigan T, Humblot V y cols., 2015. Surface functionalization by covalent immobilization of an innovative Carvacrol derivative to avoid fungal biofilm formation. *AMB Express.* 5: 5: 9.
- INE., 2004. Chile: Proyecciones y Estimaciones de Población 1990-2020. País y Regiones.11:33-35.
<http://palma.ine.cl/demografia/menu/EstadisticasDemograficas/DEMOGRAFIA.pdf>
- Isham N, Ghannoum MA., 2010. Antifungal activity of Miconazole against recent *Candida* strains. *Mycoses.* 53:434-437.
- Khan A. y cols., 2015. Effect of two monoterpene phenols on antioxidant defense system in *Candida albicans*. *Microb Pathog.* 2015 Mar;80:50-6.
- Landis J, Koch G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-74.
- Lee X, Gómez L, Vergara C y cols., 2013. Association between presence of *Candida* yeasts and elderly patient factors with and without denture stomatitis. *Int. J. Odontostomat.* 7(2):279- 285.
- Lee X, Cajas N, Gómez L y cols., 2014. Ocurrencia de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica antes y después de tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral.* 2015; 8(1):31-37.
- León S y Giacaman RA, 2016. Reality and challenges of the oral health for older adults in Chile and the role of a new discipline: geriatric dentistry. 144:496.502.
- Lepelley M. y cols., 2017. Pharmacokinetic drug interaction between miconazole mucoadhesive tablet and tacrolimus: About 3 case-reports in transplant patients. *Therapie.* 2017 Sep;72(4):475-482.

Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L y cols., 2011. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. BMC Complement. Altern. Med. 26;11:119.

MINSAL., 2018. Encuesta Nacional de Salud 2016-2017, segunda entrega de resultados. http://redsalud.ssmso.cl/wp-content/uploads/2018/02/2-Resultados-ENS_MINSAL_31_01_2018-ilovepdf-compressed.pdf

MINSAL., 2010. Guía clínica: Salud oral integral para adultos de 60 años. 58-59.

Murray P, Rosenthal K, Pfaller M., 2013. Microbiología médica (7a ed.) Elsevier. 6:66:617-619.

Nóbrega R. y cols., 2016. Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. Pharm Biol. 2016 Nov;54(11):2591-2596.

OMS., 2013. Oral Health Surveys: Basic Methods. 5ta Edition. 54-55:108, 121.

Pinelli LA, Montandon AA, Corbi SC y cols., 2013. Ricinus communis treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. J. Oral. Rehabil. 40(5):375-380

Red Salud., 2013. Diagnóstico de salud bucal. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7dc33df0bb34ec58e04001011e011c36.pdf>

Robles A, Hernández E. y cols., 2017. Quality of Life (QOL) and polypharmacy in the Older Adults Program “packers”. Nure Inv. 14(91).

Salerno C, Pascale M, Contaldo M y cols., 2011. *Candida*-associated denture stomatitis. Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal. 16:139–143.

SENAMA, 2016. Estándares de calidad para establecimientos de larga estadía para adultos mayores, Protocolos SENAMA 2016, 8-19.

Sharifi-Rad M. y cols., 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review. Phytother Res. 2018 Sep;32(9):1675-1687.

Suntres Z. y cols., 2015. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. Crit Rev Food Sci Nutr. 2015;55(3):304-18.

Tay LY, Jorge JH, Herrera DR y cols., 2014. Evaluation of different treatment methods against denture stomatitis: a randomized clinical study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 118(1):72-77.

Thomson P, Anticevic S y cols., 2011. *In vitro* antifungal susceptibility, *in vivo* antifungal activity and security from a natural product obtained from sunrise oil (AMO₃) against dermatophytes. *Rev Chil Infect* 2011; 28 (6): 512-519

Valenzuela MF., 2015. Buscando un mejoramiento en la salud oral de los adultos mayores: ¿es necesaria una reforma al GES-60 años? *Rev. Chilena Salud Pública* 2015: Vol 19 (2): 181-187.

Vardar-Unlu G, Yagmuroglu A y Unlu M y cols., 2010. Evaluation of *in vitro* activity of Carvacrol against *Candida albicans* strains. *Nat. Prod. Res.* 24:1189–1193.

Williams D, Kuriyama T, Silva S y cols., 2011. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol.* 2000. 55:250–265.

Xu H, Dellling M, Jun JC y cols., 2006. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat. Neurosci.* 9:628–635.

Yarborough A. y cols., 2016. Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *J Prosthodont.* 2016 Jun;25(4):288-301.

Zhang L-W, Fu J-Y y cols., 2016. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2016 Apr;22(3):185-95.

9. ANEXOS.

9.1 Anexo n° 1: Consentimiento Informado

ACTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha elaboración: 13/10/2015

Fecha de edición:

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

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

TÍTULO DEL ESTUDIO: FITOTERAPIA EN BASE A CARVACROL PARA EL TRATAMIENTO DE LA CANDIDIASIS ORAL ASOCIADA A ESTOMATITIS PROTÉSICA, EN ADULTOS MAYORES PORTADORES DE PRÓTESIS REMOVIBLE.

OBJETIVO DEL ESTUDIO: Las personas adultas mayores que usan prótesis removibles presentan, con una alta frecuencia, una infección en el paladar producida por un microorganismo llamado *Candida*. En algunos casos esta infección produce ardor, irritación o molestias. Para aliviar el problema de la infección existen remedios que eliminan a este microorganismo y que se conocen como antifúngicos. En Chile existe un solo antifúngico en forma de pasta que puede ser usado entre el paladar y la prótesis dental y que es eficiente en eliminar a

Candida. Este remedio, llamado Miconazol, es caro (alrededor de \$20.000) y puede producir náuseas, irritación o diarrea. Además algunas *Candida*, ya no son eliminadas por este remedio, porque han creado resistencia a él.

Existe un producto derivado de la planta de orégano o tomillo, llamado Carvacrol, que ha demostrado que puede eliminar a *Candida* y que no produce náuseas, irritación o diarrea. Por esta razón es que hemos pensado en probar si una pasta de Carvacrol podría eliminar la infección del paladar debajo de la prótesis como lo hace el remedio Miconazol.

Por estos motivos, es que invitaremos a participar en este estudio, a personas adultas mayores que usen prótesis removible y que tengan infección en el paladar por *Candida*, para evaluar si al usar la pasta de Carvacrol desaparecen las señales de infección en el paladar y si disminuyen las *Candida* en la boca en forma parecida a cuando usan Miconazol.

MODALIDAD DE PARTICIPACIÓN DE LOS VOLUNTARIOS. A las personas que participen en este estudio, un profesional Dentista les hará preguntas sobre datos personales, problemas de salud, remedios que toman y les examinará la boca para ver si tienen problemas de infección en el paladar; procedimiento que durará alrededor de 30 minutos. Las personas que tengan infección en el paladar, serán invitadas a participar en el estudio.

Las personas que acepten participar en el estudio serán asignadas, al azar, a uno de los siguientes grupos: Grupo 1: personas que recibirán el tratamiento de Miconazol; Grupo 2: personas que recibirán el tratamiento de Carvacrol.

Al inicio del estudio, las personas deberán entregar una muestra de saliva y se les pasará un algodón húmedo por el paladar, para medir cuántas *Candida* tienen en su boca.

Durante el estudio, se comparará si un preparado en pasta, derivado de la planta de orégano o tomillo es mejor, igual o peor que un preparado en pasta del remedio Miconazol que normalmente se usa para el tratamiento de la infección del paladar

por *Candida*. Las personas que acepten participar en el estudio, no sabrán cuál es el preparado que están usando, pues estarán envasados en frascos iguales y marcados con un número.

A cada persona se le entregará un tubo con uno de los preparados, el que usará entre el paladar y la prótesis dental, de acuerdo a las instrucciones que le de él Dentista: 4 veces al día durante 1 semana. Al terminar la semana, la persona vendrá de nuevo al Dentista y se le examinará el paladar para saber si el preparado usado le alivió los problemas de infección. Además, deberá entregar una muestra de saliva y se le pasará un algodón húmedo por el paladar, para saber si el preparado usado disminuyó la *Candida* en su boca.

Luego se le entregará otro tubo con pasta, el que usará 4 veces al día, por otra semana, de la misma forma anterior. Al terminar la semana, la persona volverá al Dentista y se le examinará el paladar nuevamente para saber si el preparado usado le alivió los problemas de infección en la segunda semana. Además, deberá entregar otra muestra de saliva y se le pasará un algodón húmedo por el paladar, para saber si el preparado usado disminuyó la *Candida* en su boca en la segunda semana.

Los gastos de traslado serán pagados por el proyecto. A todas las personas que se examine, se les informará del estado de su salud bucal y en caso de ser necesario se les orientará sobre cómo proceder para su posterior atención y tratamiento.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN. Adultos mayores sanos, o con enfermedades de base controladas por el médico tratante, que porten prótesis removibles, con signos clínicos de Estomatitis Subprotésica y que acepten participar, previa firma del consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN. Adultos mayores con enfermedades de base no controladas, sujetos con alergia a alguno de los componentes de los antifúngicos, o que no cuenten con el permiso del médico tratante. También se excluyen aquellos

que presentan deterioro cognitivo diagnosticado y que no acepten participar del estudio.

CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS DE LOS PARTICIPANTES. Los datos de los participantes recolectados durante el estudio clínico, serán desvinculados de variables que puedan identificar a las personas que participan, de manera de cautelar su confidencialidad. Estos datos serán conocidos exclusivamente por un Investigador Clínico; para los fines del análisis de resultados, los nombres de los participantes serán reemplazados por códigos.

A continuación usted declara que:

1. Al firmar este documento, voluntariamente doy mi consentimiento para participar de una investigación cuyo profesional responsable es la Dra. Irene Morales, y que es realizado conjuntamente por la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, la Unidad Dental del Centro de Referencia de Salud de Peñalolén Cordillera Oriente y el Fondo Nacional para la Investigación y Desarrollo en Salud (FONIS).
2. Estoy en conocimiento que esta investigación tiene como objetivo saber si una sustancia derivada del orégano o tomillo, llamada Carvacrol, puede eliminar la infección del paladar producida por *Candida* de un modo similar al que lo hace el remedio que se usa normalmente, llamado Miconazol.
3. Comprendo que se me realizarán preguntas sobre mis datos personales, mi estado de salud y los remedios que tomo, además de un examen clínico bucal y toma de muestra de saliva y me pasarán un algodón húmedo en el paladar, por

parte de un Cirujano-Dentista al que autorizo expresamente para realizar dicho procedimiento. Entiendo que el procedimiento durará alrededor de 30 minutos.

4. Estoy en conocimiento de que por el hecho de participar en esta investigación, tendré que usar un producto en forma de pasta, entre el paladar y la prótesis dental, 4 veces al día durante 7 días, tiempo posterior al cual se me volverá a realizar un examen clínico y una toma de muestra de saliva y del paladar. Entiendo que tendré que usar el mismo producto por una segunda semana, tiempo posterior al cual se me volverá a realizar el examen clínico y la toma de muestra de saliva y del paladar.

5. Sé que ninguno de los procedimientos mencionados (examen clínico, entrevista, tomas de muestra y uso de la pasta) tendrá costo para mi persona.

6. Declaro que mi participación en este estudio es libre y voluntaria, pudiendo incluso dejar de participar en él cuando lo desee.

7. Sé que la información obtenida de mi persona será manejada de manera absolutamente confidencial, y únicamente utilizada para fines de investigación sin fines de lucro. Entiendo que mi nombre y mis datos personales no serán jamás identificados públicamente.

8. Por mi condición de voluntario, entiendo que no recibiré ningún pago de dinero y que mi participación en este estudio no obliga de manera alguna a los investigadores a hacerse cargo en forma gratuita del tratamiento de posibles enfermedades bucales. Entiendo si, que se me entregará el dinero necesario para los gastos de movilización asociados a los viajes que implica el estudio.

9. Entiendo que por el hecho de participar en el estudio, tengo derecho a que se me informe sobre los resultados de los exámenes que se me realicen y puedo realizar cualquier tipo de preguntas relacionadas con dudas que me surjan acerca de la investigación antes, durante y después del ensayo.

10. Comprendo que los beneficios para mi persona, por el hecho de participar en esta investigación, serán: 1) tener información de mi estado de salud bucal y de posibles infecciones bucales, 2) al usar la pasta podría ayudar a tener mi boca en mejores condiciones de salud, 3) si el producto usado no me alivia la infección en el paladar, me la tratarán con el remedio que sea necesario para eliminar la infección.

11. Me han informado que, el uso de la pasta podría eventualmente provocar reacciones no deseables, que en general son de muy baja ocurrencia, tales como náuseas, irritación o diarrea. En tal caso DEBO SUSPENDER SU USO y comunicarme con el equipo investigador lo antes posible, quienes obligatoriamente realizarán el diagnóstico y tratamiento de esas molestias con cargo al Equipo de investigadores de la Facultad de Odontología.

12. Me han informado que, en caso de sufrir algún daño relacionado directamente con el estudio, la compensación de estos daños estará a cargo del Equipo de investigadores de la Facultad de Odontología.

13. Entiendo que si el producto en estudio resulta eficaz en aliviar la infección del paladar, los investigadores se encargarán de entregar esta información al Ministerio de Salud para que esté disponible para todas las personas.

14. Si necesito cualquier aclaración o información adicional sobre esta investigación y de mi participación en él, debo dirigirme a la Dra. Irene Morales al teléfono 29781794 o a la Dra. Ximena Lee al teléfono 29781845.

15. Entiendo que si ocurriese cualquier evento fortuito o inesperado relacionado o no con el estudio (Por ejemplo: que si me enfermo de cualquier cosa, que tengo un accidente, que perdí el remedio, que el remedio me produjo irritación en el paladar, etc.), debo comunicarlo al Médico del Equipo de investigadores Dr. José Manuel Manríquez, al teléfono 9781775 o al 9781712.

Fecha de aplicación: _____

Nombre del Voluntario

Firma

Participante en el Estudio

Nombre del Investigador que toma el

Firma

Consentimiento Informado

Nombre del Investigador

Firma

Responsable del Proyecto

9.2 Anexo n° 2: Protocolo clínico

Proyecto: Fitoterapia en base a Carvacrol para el tratamiento de la candidiasis oral asociada a estomatitis protésica, en adultos mayores portadores de prótesis removible. FONIS SA15I20030.

Ficha N° _____

Protocolo Clínico: Pasos a seguir con cada voluntario participante en el estudio.

	Descripción	Marca de chequeo
Fase	CONSENTIMIENTO INFORMADO (Día 1 del ensayo)	
1	Entrevista Inicial, invitación a participar en el estudio	
2	Aplicación y firma del consentimiento informado	
Fase	RECLUTAMIENTO DEL PACIENTE EN EL ESTUDIO (Día 1 del ensayo)	
1	Llenado de la Ficha clínica.	
2	Examen clínico extra e intraoral.	
Fase	TORULADO MUCOSA PALATINA Y TOMA DE MUESTRA DE SALIVA (Día 1 del ensayo)	
1	Frotar mucosa palatina con tórula estéril (Guardar en tubo Falcon)	
2	Toma de muestra de 2 ml de saliva (Tubo Falcon grande).	

3	Guardar ambos frascos en hielo.	
4	Enviar muestras al Laboratorio de Bioquímica.	
Fase	INICIO DE ENSAYO CLÍNICO (Día 1 del ensayo)	
1	Entrega del antifúngico y dar instrucciones al paciente para usarlo desde el día 1 al 7.	
2	Citar al paciente para el día 8.	
3	Entrega de dinero para movilización (\$5.000), firmar recibo.	
Fase	TORULADO MUCOSA PALATINA Y TOMA DE MUESTRA DE SALIVA (Día 8 del ensayo)	
1	Frotar mucosa palatina con tórula estéril (Guardar en tubo Falcon)	
2	Toma de muestra de 2 ml de saliva (Tubo Falcon grande).	
3	Guardar Ambos frascos en hielo.	
4	Enviar muestras al Laboratorio de Bioquímica.	
Fase	CONTINUACION DE ENSAYO CLÍNICO (día 8 del ensayo)	
1	Repetir instrucciones al paciente para usar antifungico desde el día 8 al 14.	
2	Citar al paciente para el día 15.	
3	Entrega de dinero para movilización (\$5.000), firmar recibo.	
Fase	CONTINUACION DEL ENSAYO CLINICO (Día 15 del ensayo)	
1	Frotar mucosa palatina con tórula estéril (Guardar en tubo Falcon)	
2	Toma de muestra de 2 ml de saliva (Tubo Falcon grande).	

3	Guardar ambos frascos en hielo.	
4	Enviar e muestras al Laboratorio de Bioquímica.	
5	Entrega de dinero para movilización (\$5.000), firmar recibo.	
6	Fin del estudio.	
Fase	EVALUACIÓN DE NECESIDAD DE TRATAMIENTO ADICIONAL POST ENSAYO CLÍNICO	
1	Evaluar signos de estomatitis subprotésica e indicar tratamiento adicional si corresponde.	

9.3 Anexo n° 3: Ficha Clínica

Nº Ficha	
Antifúngico usado	

FICHA CLÍNICA FONIS SA15I20030

Nombre Revisor:

Fecha:

NOMBRE(s):

.....

APELLIDOS:

.....

GÉNERO: F..... M..... EDAD: años

NIVEL EDUCACIONAL: Básico:..... Medio:..... Superior:.....

ESTADO CIVIL: Soltero(a):..... Casado(a):..... Viudo(a):.....

Teléfono:Correo electrónico.....

DIRECCIÓN:

.....

.....

CENTRO:

FOUCH_____	MARURI_____	CRS Peñalolén_____
------------	-------------	-----------------------

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

Hipertensión		Colon irritable	
Respiratorias crónicas		Arritmias y cardiopatías	

Hipercolesterolemia		Úlcera péptica	
Depresión		Artritis/ Artrosis	
Sobrepeso/ obesidad		Osteoporosis	
Diabetes Tipo II		Alergia(s): ¿Cuál?(es)	
Otra(s) (Especifique):			

II. Enfermedades agudas

	Enfermedad aguda (especifique)	Fecha
1		
2		
3		
4		

III. Fármacos que consume: (especifique)

	Fármaco	Dosis
1		
2		
3		
4		
5		

IV. Patologías orales:

1. Mucosa Oral

LESIONES

LOCALIZACIÓN

LESIÓN LOCALIZACIÓN

0	Ningún estado anormal	0	Borde bermellón		
1	Leucoplasia	1	Comisuras		
2	Líquen plano	2	Labios		
3	Eritroplasia	3	Fondo de vestíbulo		
4	Estomatitis protésica (*)	4	Mucosa oral		
5	Queilitis angular	5	Piso de la boca		
6	Glositis romboidal	6	Lengua		
7	Candidiasis pseudomembranosa	7	Paladar duro y/o blando		
8	Hiperplasia irritativa	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	Otro trastorno (especificar)				

14	No registrado				
----	---------------	--	--	--	--

(*) ESTOMATITIS PROTÉSICA: (Clasifique según Newton)

TIPO I: TIPO II: TIPO III:

UBICACIÓN:

Maxilar:

PALADAR DURO: PALADAR BLANDO: REBORDE ALVEOLAR SUPERIOR:

Mandíbula:

REBORDE ALVEOLAR INFERIOR:.....

OTRA UBICACIÓN

(especificar).....

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

	Severidad
Sin lesión	
Cavitada	
No cavitada	

	Actividad
Inactiva	
Activa	

Observaciones:.....

2. Edentulismo: (Clasifique según Kennedy)

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

Consigne el código (1-2-3-4 ó 5):

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

3. Higiene oral y protésica

Higiene de:	Sí	No	Frecuencia (veces al día)	¿Qué utiliza?	Sí	No
Dientes				Cepillo de dientes		
				Hilo/ seda dental		
				Cepillo interdentario		
				Enjuague bucal		
				Otro ¿cuál?		
Mucosas				Cepillo suave		
				Gasas		
Lengua				Limpiador lingual		

4. Uso de prótesis

Tipo de prótesis	Sí	No	Antigüedad de la prótesis (años)	Frecuencia diaria de uso	
				Sólo de día	Día y noche
Removible acrílica					
Removible metal acrílica					
Prótesis fija					
Prótesis implantosoportada					

5. Encuesta de Xerostomía

	Día 1	Día 8	Día 15
¿Tiene sensación de boca seca?	Sí____ No____	Sí____ No____	Sí____ No____
¿Siente la saliva espesa?	Sí____ No____	Sí____ No____	Sí____ No____
¿Tiene sensación de ardor en la lengua?	Sí____ No____	Sí____ No____	Sí____ No____
¿Tiene dificultades para tragar?	Sí____ No____	Sí____ No____	Sí____ No____

¿Tiene que tomar agua para tragar alimentos?	Sí_____ No_____	Sí_____ No_____	Sí_____ No_____
---	------------------------	------------------------	------------------------

6. Observaciones:
