



# Universidad Abierta Interamericana

## Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

### Especialidad en Periodoncia

Tutora: Dra. Virginia Jewtuchowicz

Directora de la Especialidad: Dra. María Isabel Brusca

Alumna: Od Elba Beatriz Secreto

### **Evaluación de la presencia de especies de *Candida spp.* en las bolsas periodontales de pacientes post-menopáusicas**

Diciembre 2022

---

## **Resumen**

Las especies de *Candida spp* son patógenos oportunistas que pueden causar enfermedades en huéspedes que están afectados por procesos sistémicos subyacentes. Los organismos fúngicos comúnmente colonizan la lengua, el paladar y la mucosa bucal. Tal colonización también puede ocurrir en la placa subgingival de adultos con periodontitis. Se ha encontrado que cepas de *Candida spp* están presentes en la cavidad oral de pacientes sanos, y también se ha informado que la proporción de levaduras en las bolsas periodontales es similar a la de algunos patógenos periodontales bacterianos. Esto sugiere un papel para *Candida spp.* en la patogenia de la enfermedad. La disminución de la concentración de estrógenos afecta a la mucosa oral debido a la presencia de receptores de estrógeno. El epitelio de la mucosa durante el período de la menopausia es más vulnerable a infecciones, candidiasis, síndrome de boca ardiente o LPO (liquen plano oral); además, las glándulas salivales también son dependientes de hormonas, lo que provoca cambios en la secreción de saliva y en su consistencia de modo tal que puedan afectar los dientes y los tejidos periodontales. En esta investigación, nuestro objetivo es examinar la prevalencia de *Candida spp* en bolsas periodontales de mujeres menopáusicas con enfermedad periodontal, y su posible correlación con los cambios hormonales.

## **Abstract**

The *Candida spp.* are opportunistic pathogens that can cause disease in hosts that are affected by underlying systemic processes. Fungal organisms commonly colonize the tongue, palate, and buccal mucosa. Such colonization can also occur in the subgingival plaque of adults with periodontitis. Strains of *Candida spp* have been found to be present in the oral cavity of healthy patients, and the proportion of yeasts in periodontal pockets has also been reported to be similar to that of some bacterial periodontal pathogens. This suggests a role for *Candida spp.* in the pathogenesis of the disease. The decreased concentration of estrogen affects the oral mucosa due to the presence of estrogen receptors. The mucosal epithelium during the menopausal period is more vulnerable to infections, candidiasis, burning mouth syndrome or OLP (oral lichen planus); In addition, the salivary glands are also dependent on hormones, which causes changes in saliva secretion and its consistency in such a way that they can affect the teeth and periodontal tissues. In this investigation, our objective is to examine the prevalence of *Candida spp* in periodontal pockets of menopausal women with periodontal disease, and its possible correlation with hormonal changes.

## **Agradecimiento**

A Marisa, por su contagioso entusiasmo y su inspiradora actitud durante toda la carrera de especialización.

A Virginia, por su apoyo incondicional en todo el trabajo de investigación, por su actitud siempre positiva y por brindarme calma en momentos de angustia.

A mi familia, por ser mi “hinchada”.

A las pacientes que generosamente aceptaron participar de este trabajo.

A todos los docentes de la carrera de especialidad en periodoncia, especialmente a la Dra Olga Antonenko, por compartir su conocimiento con tanta sencillez, optimismo y prodigalidad.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
1.1 La Enfermedad Periodontal	6
1.2 El ecosistema bucal	6
1.3 Respuestas inflamatorias en el periodonto	10
1.4 Candida spp.	12
1.5 Candida y Periodontitis	14
1.6 Enfermedad Periodontal y Condiciones Sistémicas	16
1.7 Menopausia y Enfermedad Periodontal	17
1.8 Diversidad del microbioma oral y Menopausia	21
<b>2. Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>23</b>
4.1 Viabilidad del estudio:	23
4.2 Deficiencias en el conocimiento del problema que orientan al estudio	23
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>23</b>
5.1 Criterios de inclusión y exclusión	24
5.2. Criterios de eliminación	24
5.3 Diseño Observacional:	24
5.4 Unidades experimentales o unidades de análisis	26
5.5 Variable Independiente:	26
5.6 Variables dependientes:	27
5.7 Consideraciones éticas	27
5.8 Recolección de las muestras de mucosa bucal	27
5.9 Recolección de las muestras de surcos periodontales	28
5.10 Procesamiento de las muestras:	28
5.10.1 Estudio micológico convencional	28
5.10.1.1 Examen directo y cultivo	28
5.10.1.2 Identificación de los aislamientos	29
5.10.1.3 Procesamiento y análisis estadístico de los datos	29
<b>6. Resultados</b>	<b>30</b>
6.1 Características clínicas de las pacientes estudiadas	30
6.2 Estudios micológicos: Examen directo y cultivo	32
6.3 Distribución de levaduras según el estadio de enfermedad periodontal.	33
6.4 Distribución de levaduras como especie única o asociaciones en mucosa	35
6.5 Distribución de levaduras como especie única o asociaciones en surcos periodontales	35
6.6 Distribución de especies de levaduras en ambos nichos ecológicos	36
6.7 Distribución de levaduras según tipo de prótesis	36
<b>7. Discusión</b>	<b>37</b>

7.1 Características clínicas de las pacientes seleccionadas.	37
7.2 Estudios micológicos: Examen directo y cultivo	39
7.3 Distribución de las especies de levaduras en los nichos ecológicos	41
7.4 Distribución de levaduras según distintos parámetros	42
<b>8. Conclusiones</b>	<b>43</b>
<b>9. Referencias Bibliográficas</b>	<b>44</b>
<b>10. Anexos</b>	<b>54</b>
10.1 Anexo I: Formulario de consentimiento informado	54
A. Propósito y Antecedentes	54
B. Procedimientos que se le aplicarán	55
C. Riesgos y molestias	55
D. Confidencialidad	55
E. Beneficios	56
F. Consideraciones financieras	56
G. Preguntas	56
10.2 Anexo II: Ficha de recolección de datos personales y clínicos generales de los pacientes	58
10.3 Anexo III: Ficha de recolección de datos odontológicos del paciente	59
10.4 Anexo IV: Medios de Cultivos y Soluciones	60

# 1. Introducción

## 1.1 La Enfermedad Periodontal

La enfermedad periodontal es un proceso patológico complejo de los tejidos de soporte de los dientes que se desarrolla de forma no lineal como resultado de un desbalance entre la microbiota y el sistema inmune. En este proceso pequeños fenómenos resultan en efectos desmedidos.

Se la puede describir como una enfermedad inflamatoria iniciada por microorganismos específicos o grupos de microorganismos específicos presentes en la biopelícula subgingival, los cuales interactúan de manera compleja con eventos inmuno-inflamatorios del huésped, y esto resulta en la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar.(1) En la actualidad el consenso apunta a que la destrucción del tejido periodontal está más relacionado con la incapacidad del huésped para resolver la inflamación que con el resultado directo de la propia inflamación inicial. (2)

La principal característica clínica de la enfermedad periodontal es la presencia de pérdida de inserción clínicamente detectable, que se produce como resultado de la destrucción inflamatoria del ligamento periodontal y el hueso alveolar. Esta pérdida suele ir acompañada de formación de bolsas periodontales y cambios en la densidad y altura del hueso alveolar subyacente.

El papel desencadenante de las bacterias que conforman la biopelícula es evidente, ya que son las bacterias las que inician y perpetúan las respuestas inflamatorias que se desarrollan en los tejidos gingivales. Sin embargo, el principal determinante de la susceptibilidad a la enfermedad es la naturaleza de las propias respuestas inmuno-inflamatorias. Es la respuesta exagerada de los mismos procesos de defensa, que son los protectores designados para evitar la entrada de bacterias y sus productos en los tejidos, la que desencadena la mayoría de los daños tisulares que conducen a las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

La enfermedad periodontal es, por tanto, una entidad clínica única. No es una infección en el sentido clásico de la palabra.

## 1.2 El ecosistema bucal

La cavidad oral, al igual que otros hábitats del cuerpo, también posee una comunidad microbiana característica que proporciona beneficios al huésped. (3)

Muchas especies bacterianas colonizan la cavidad oral desde el nacimiento. Las interacciones de las bacterias van desde compartir mecanismos de defensa (p. ej., resistencia a los antibióticos) hasta competir por los recursos disponibles (p. ej., comensales que son beneficiosos para el huésped al no permitir el crecimiento de especies patógenas). La cavidad oral también puede ser colonizada por levaduras, protozoos y virus. (2)

Estos microorganismos colonizan las superficies mucosas y dentales de la boca formando comunidades multiespecíficas, tridimensionales y estructuralmente organizadas que se denominan biopelículas (4). Éstas constituyen un tipo de defensa contra la inmunidad del huésped. En general, la descamación asegura que la carga microbiana en las superficies mucosas se mantenga relativamente baja. Por el contrario, la boca es un sitio único en el cuerpo que proporciona superficies que no se descaman (dientes, prótesis, implantes) para la colonización microbiana, lo cual puede dar lugar a la acumulación de un gran número de microorganismos, en particular en los sitios estancados y difíciles de limpiar, a menos que los pacientes practiquen una higiene bucal eficaz.

La estructura de biopelícula es más compleja que las bacterias individuales que la componen y se adhiere fuertemente a las superficies dentales en presencia de agua. Algunas de sus características son:

- El biofilm comprende células microbianas encerradas dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos).
- Las bacterias del biofilm son 1000 veces menos sensibles a los agentes antimicrobianos que las bacterias que flotan libremente (planctónicas).
- Los microorganismos forman comunidades dentro de la biopelícula que presentan una ecología altamente compleja. Un sistema circulatorio primitivo que consta de canales de agua que corren entre colonias facilita la eliminación de productos de desecho y el suministro de nutrientes a las capas más profundas de la biopelícula por difusión. Además, existen fuertes gradientes químicos (p. ej., oxígeno o pH); que producen distintos microambientes dentro de la biopelícula. (2)

Se han detectado más de 770 tipos diferentes de microorganismos (taxones o filotipos) en muestras de la boca; de estos, el 57% tienen nombre oficial, el 13% no tienen nombre pero son cultivables y el 30% se conocen solo como filotipos actualmente "no cultivables". Un solo individuo puede albergar entre 100 y 300 especies. (5) En la enfermedad periodontal, la presencia de diversas especies de microorganismos puede ser identificada en la bolsa periodontal y es imposible concluir que una sola especie o incluso un grupo de especies causan la enfermedad periodontal. Muchas de las especies que se consideran importantes en

la patogenia periodontal pueden predominar en bolsas profundas porque la bolsa es un entorno favorable en el que pueden sobrevivir. Muchas de las características únicas de la periodontitis se derivan de la anatomía del periodonto, en el cual una superficie dura que no se descama (el diente) está parcialmente incrustada dentro del cuerpo, cruza una superficie epitelial y está parcialmente expuesta al mundo exterior. Las bacterias que colonizan esta superficie están efectivamente fuera del cuerpo (aunque están en el surco o bolsa gingival), sin embargo, la respuesta inflamatoria que se desarrolla se encuentra dentro del cuerpo (es decir, dentro de los tejidos). Estos factores añaden complejidad a nuestra comprensión del papel de la biopelícula y las respuestas inmuno-inflamatorias que forman parte de la degradación del tejido periodontal. Adicionalmente podemos señalar que la composición y la actividad metabólica de la biopelícula que se encuentra en distintas superficies de la boca varía sustancialmente debido a las diferencias en las propiedades biológicas y físicas de cada sitio. (1, 2, 3, 6, 7)

En general, una vez establecida, la composición microbiana de la biopelícula en un sitio, ésta permanece estable a lo largo del tiempo (8), pero una perturbación importante en el entorno del huésped, (por ejemplo: un cambio sustancial en la dieta o una alteración en el estado inmunitario del huésped), puede generar cambios en el equilibrio de la microbiota oral y aumentar el riesgo de enfermedad. Es importante destacar que esta estabilidad, denominada homeostasis microbiana, refleja un estado sumamente dinámico en el que las proporciones de las diversas especies que componen la microbiota oral se mantienen en equilibrio debido a las numerosas interacciones, tanto sinérgicas como antagónicas. (9).

La homeostasis microbiana puede alterarse si uno de los parámetros clave que afectan a su crecimiento se altera y es lo suficientemente robusto o persistente como para resultar en la reorganización de la composición de la biopelícula, permitiendo la proliferación de componentes que antes eran menores. Tales perturbaciones pueden deberse a factores inmunológicos (p. ej., disfunción de neutrófilos, inmunosupresión, etc.) o no inmunológicos (p. ej., xerostomía, cambios en la dieta, etc.), y pueden predisponer a un sitio a la enfermedad (9), y forma la base de la "hipótesis de la placa ecológica" que describe la relación dinámica entre la microbiota oral y el huésped en la salud y la enfermedad (4, 3).

El consenso actual respalda el hecho de que tanto el huésped como los microorganismos desempeñan roles importantes en la composición microbiana final de la placa dental. Se han propuesto varias teorías a lo largo de los años para determinar si la cantidad de placa, la calidad, el microambiente o los patógenos específicos dentro de la placa son los más importantes en la patogénesis de la enfermedad periodontal. Comprender las diversas

hipótesis de la placa, su influencia en la justificación del tratamiento y los inconvenientes es importante para el manejo adecuado de los pacientes. (1, 2, 3)

Sigmund Socransky y colaboradores demostraron que los microorganismos presentes en la placa bacteriana subgingival se asocian entre ellos formando complejos bacterianos de diferentes grados de patogenicidad, y los categorizaron en colores verde, amarillo, azul, violeta, naranja y rojo. Los colores rojo y naranja se relacionan con un mayor grado de severidad de la enfermedad periodontal y con su progresión (11, 12).

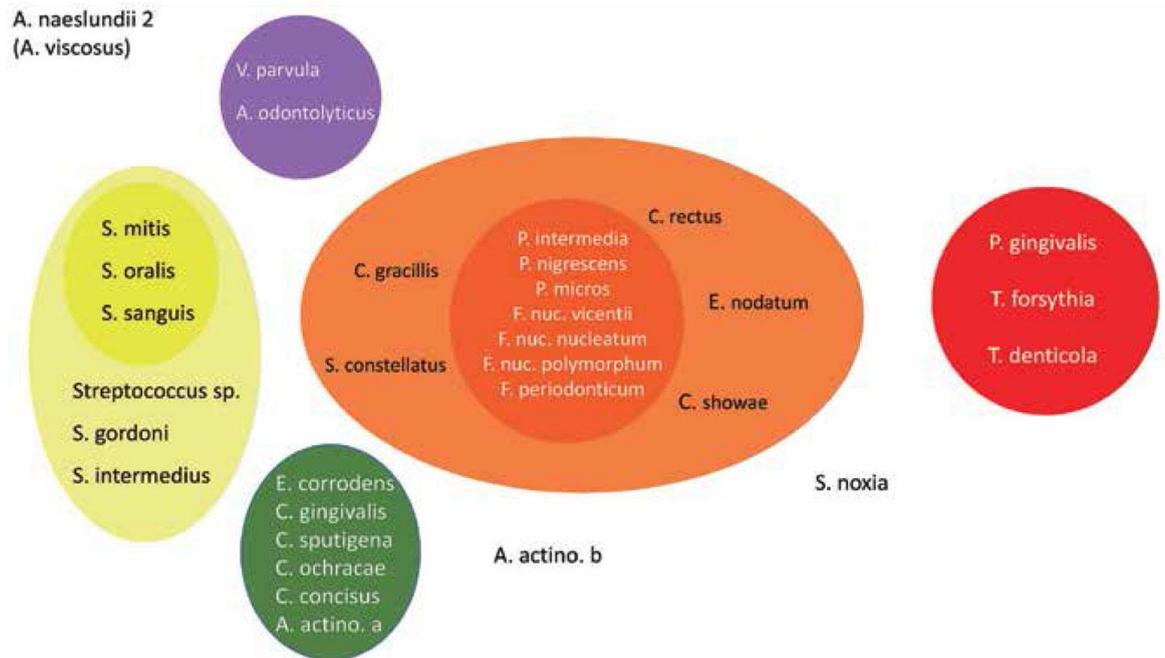


Fig1 - Complejos bacterianos de la placa bacteriana subgingival según Socransky y col (11, 12)

Las diferencias principales entre salud y enfermedad se basan en el predominio de los *clusters* rojo y naranja. El complejo rojo que aparece más tardíamente en el desarrollo del biofilm está conformado por bacterias que se consideran periodontopatógenas: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*. (13)

Las diferentes hipótesis manejadas en la actualidad no logran combinar los comportamientos microbianos y del huésped que conducen al mantenimiento de la salud o al viraje hacia la enfermedad. No obstante, la bibliografía sugiere que se debe considerar lo siguiente:

- Para el proceso de caries, el modelo que mejor se ajusta es la hipótesis de la placa ecológica. Considera el papel de los carbohidratos fermentables y otros cambios microambientales en la ecología de la placa como responsables del proceso de desmineralización.

- El modelo de disbiosis y sinergia polimicrobiana (PSD) recientemente descrito para la periodontitis destaca la importancia de la idea de que las bacterias distintas de las especies clásicas del “complejo rojo” podrían tener funciones clave similares en la periodontitis. El modelo PSD es actualmente el más extenso; sin embargo, está modelado solo para periodontitis.

Se ha sugerido que la presencia de virus y hongos podría complejizar e influir en el desarrollo de la enfermedad, pero los estudios realizados al respecto no han arrojado resultados concluyentes. La especie *Candida* es uno de los hongos que se han encontrado presentes en la enfermedad periodontal.

### 1.3 Respuestas inflamatorias en el periodonto

Si bien la acumulación de placa subgingival intacta durante un período prolongado de tiempo puede provocar la liberación de moléculas inflamatorias tanto de los microorganismos como del hospedero, hoy en día está claro que la mayor parte de la descomposición del tejido se debe a los procesos inflamatorios desregulados del huésped (14, 2). La respuesta inflamatoria puede ser:

- Aguda (hiperactividad de PMN<sup>1</sup>): los abscesos y la inflamación aguda ocurren principalmente cuando los PMN son activados por niveles muy altos de quimiocinas dentro de los tejidos periodontales. Durante el proceso de "estallido respiratorio", se liberan cantidades elevadas de enzimas líticas que median en la destrucción del tejido del huésped.
- Crónica (hiperactividad de macrófagos): en condiciones crónicas, los metabolitos bacterianos estimulan el eje macrófago-célula-T, que a su vez altera a los fibroblastos residentes y hace que éstos secreten mediadores secundarios que destruyen tejidos (p. ej., MMP, PGE<sub>2</sub>).

Cuando la placa bacteriana se mantiene intacta durante un cierto período de tiempo, se observan histológicamente cuatro etapas progresivas: lesión inicial, lesión temprana, lesión establecida y lesión avanzada. Estas descripciones histológicas enfatizan cómo la infiltración masiva y progresiva de los tejidos por células inmunitarias/inflamatorias conduce a la liberación extracelular de enzimas destructivas, lo que resulta en la interrupción de la anatomía del tejido conectivo (agotamiento del colágeno) y la posterior proliferación de células del epitelio de unión en áreas agotadas, lo que se refleja clínicamente como pérdida de inserción y formación de bolsas.

---

<sup>1</sup> Polimorfonucleares

El biofilm de la placa subgingival puede liberar directamente productos nocivos que dañan los tejidos, pero lo más importante para la patogénesis de la enfermedad periodontal es el hecho de que este biofilm induce respuestas inmuno-inflamatorias del huésped dentro del periodonto que también pueden causar daño tisular; este daño es quizás más destructivo que el causado directamente por las bacterias.

Si bien el proceso de destrucción del tejido periodontal y la reabsorción ósea es complicado e involucra a muchas células, moléculas y mediadores reguladores, los principales "jugadores" se pueden identificar de la siguiente manera:

- Moléculas instigadoras: LPS, LTA (origen bacteriano); IL-1, TNF $\alpha$  (derivado del huésped).
- Células efectoras: fibroblastos, osteoclastos.
- Moléculas efectoras: MMP (ruptura del tejido conectivo); PGE2 (resorción ósea osteoclástica) (10, 2)

Podemos destacar como moléculas más importantes involucradas en las respuestas inflamatorias dentro del periodonto, que se derivan tanto de los microorganismos como del huésped, a:

- LPS, lipopolisacárido/endotoxina;
- LTA, ácido lipoteicoico;
- Kgp, gingipaína específica de lisina;
- Rgp, gingipaína específica de arginina;
- H<sub>2</sub>S, sulfuro de hidrógeno;
- PGE2, prostaglandina E2.

Cuando el biofilm de la placa subgingival continúa presente, se inicia la inflamación crónica. Los productos bacterianos (p. ej., lipopolisacáridos/LPS) activan los macrófagos para producir citoquinas como las interleucinas (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ). Éstos estimulan los fibroblastos residentes e instigan cambios dentro de ellos, haciendo que produzcan cantidades excesivas de enzimas que destruyen el colágeno como las metaloproteinasas de matriz (MMP) y mediadores inflamatorios como las prostaglandinas (PGE2). Las MMP causan la destrucción de las fibras de colágeno y los componentes de la matriz extracelular dentro del espacio de la encía y el ligamento periodontal (PDL); también provocan la descomposición de los componentes orgánicos del hueso alveolar. PGE2 activa las células osteoclásticas para secretar enzimas como hidrolasas ácidas que trabajan para destruir los componentes mineralizados inorgánicos del hueso. La conversión de precursores osteoclásticos en osteoclastos depende en gran medida del sistema RANK/RANKL/OPG, que

puede mejorar indirectamente con PGE2. Si la inmunidad innata no logra eliminar la infección, se reclutan células efectoras del sistema de inmunidad adaptativa (linfocitos: células T y células B). Las respuestas inmunitarias no son en realidad una “progresión lineal” de eventos. La inmunidad innata y adaptativa están estrechamente integradas y no funcionan de forma aislada para abordar los factores etiológicos que contribuyen a la enfermedad periodontal.

En conjunto, las respuestas inmunitarias inflamatorias desreguladas, inducidas por las bacterias de la placa y sus productos, se unen para causar la ruptura del tejido conectivo y la reabsorción ósea dentro del periodonto. Esto resulta clínicamente en la pérdida de unión de las fibras de colágeno gingival/PDL a la superficie del diente, lo que lleva a la formación de bolsas, movilidad dental, migración dental e incluso pérdida dental. (1, 2, 3)

#### 1.4 *Candida spp.*

La periodontitis es una de las primeras enfermedades humanas reconocidas por estar asociadas con biopelículas de especies mixtas. Esta biopelícula consiste en una multitud de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y también virus. Varios estudios han informado un aumento de la colonización subgingival por levaduras, particularmente *C. albicans*, en pacientes con periodontitis crónica, en comparación con sujetos periodontalmente sanos. (15, 16)

Varias especies de *Candida* se recuperan de la cavidad bucal humana, incluidas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* (3). La infección fúngica más común de la mucosa oral es la candidiasis, principalmente causada por la especie *C. albicans*, el cual es un comensal normal de la cavidad bucal, que se comporta como patógeno oportunista. La mucosa oral constituye el principal reservorio de *Candida spp.*, habitualmente sobre la superficie de la lengua y mucosa vestibular y lingual de la cavidad bucal. La proporción de *C. albicans* en la población total de levadura oral puede llegar al 50-80%. La infección por esta especie generalmente ocurre como consecuencia de la reducción de las defensas del huésped, la reducción de la secreción de saliva, el tabaquismo y el tratamiento con corticosteroides, pero puede deberse a una amplia gama de factores predisponentes. Las alteraciones en la flora microbiana oral, como después de la terapia con antibióticos de amplio espectro, también pueden provocar candidiasis oral. Los factores predisponentes son, sin embargo, a menudo difíciles de identificar. Según su sitio, las infecciones pueden definirse como superficiales o sistémicas. La candidiasis es causada por

una sobrecrecimiento de *C. albicans* e infiltración en las capas de la mucosa oral, debido a su tigmotropismo. La candidiasis puede afectar los tejidos blandos de toda la cavidad bucal, incluido el tejido gingival. Cualquier condición que comprometa el sistema inmunológico de un paciente puede considerarse un factor de riesgo para la candidiasis. La candidiasis oral puede ocurrir con el uso a largo plazo de antibióticos, terapia con esteroides o quimioterapia. La diabetes mellitus, la radioterapia de cabeza y cuello y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son factores de riesgo para la infección aguda por *Candida pseudomembranosa*. La candidiasis pseudomembranosa se manifiesta como lesiones blancas que se pueden limpiar con gasas, dejando un área eritematosa. La candidiasis atrófica crónica se manifiesta típicamente como un área eritematosa debajo de una prótesis removible y se asocia con una mala higiene oral. En pacientes sin prótesis, la candidiasis atrófica crónica puede manifestarse como enrojecimiento generalizado o incluso ardor generalizado en la boca. Cuando una persona usa prótesis completas o parciales continuamente, tiene xerostomía o está inmunocomprometida, se crea un ambiente ideal para el crecimiento excesivo de *Candida*. Muchos métodos para superar la infección por candidiasis oral se han centrado en prótesis dentales completas o parciales removibles, con inclusiones como nistatina, clorhexidina, polvos de óxido metálico, aceites naturales y herbales, fotocatalizadores o nanopartículas de plata en el revestimiento para promover la administración prolongada del antimicrobiano. Muchos antimicrobianos son útiles para controlar el crecimiento excesivo de *C. albicans* in vitro, pero se necesita más investigación in vivo para desarrollar los mejores protocolos. (1, 17, 18) Se ha propuesto considerar que la interacción entre la inmunidad de las mucosas y *C. albicans* involucra muchos mecanismos interconectados que pueden proporcionar nuevos objetivos candidatos a fármacos contra la infección por *C. albicans*. El mecanismo de regulación inmunitaria del huésped proporciona una base para desarrollar compuestos que pueden activar defensas específicas del huésped, maximizando así la eliminación de *C. albicans* y minimizando el daño a las células huésped normales. Además, los mecanismos de autoprotección de *C. albicans* frente a la inmunidad del huésped proporcionan más información sobre cómo bloquear eficazmente el escape inmunitario de *C. albicans*. (19) *C. albicans* se puede clasificar en tres genotipos de acuerdo con la presencia o ausencia de intrones transponibles del grupo I en el gen 25S rDNA. Se ha investigado la asociación entre el genotipo de *C. albicans* oral y la actividad de virulencia (es decir, actividad enzimática extracelular, adherencia a las células epiteliales y formación de biopelículas). Sin embargo, no se ha encontrado una asociación significativa entre el genotipo de *C. albicans oral* y la actividad fúngica. (20)

La infección por *C. albicans* causa principalmente edema superficial epitelial. Las hifas se encuentran en el 1/3 externo de la capa queratinizada o epitelio y se distribuyen verticalmente en la superficie epitelial, con varias infiltraciones de neutrófilos. Estas hifas y las células inflamatorias infiltradas forman microabscesos. Además, se pueden encontrar numerosos linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos y otras células inflamatorias en el tejido conectivo debajo del epitelio. Muchas células inmunitarias participan en el proceso antifúngico durante las infecciones por *C. albicans* (19). Si bien la infección por estas especies en la mucosa oral suele ser una infección superficial, las infecciones sistémicas no son infrecuentes en pacientes debilitados inmunológicamente. Los biofilms combinados con *C. albicans* y *Streptococcus gordonii* tienen alta resistencia a antibióticos antibacterianos y antifúngicos. Un estudio demostró que las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* combinado con *C. albicans* son altamente resistentes a los antibióticos (19).

### 1.5 *Candida* y Periodontitis

Si bien no hay duda de que la biopelícula es la causa de la enfermedad periodontal, su expresión es el resultado de la interacción de factores bacterianos, del hospedador, ambientales y sistémicos. Esta interacción conduce a la individualidad de la expresión de la enfermedad que, a su vez, conduce a la individualidad del tratamiento. (3) La inclusión de hongos como comensales en el biofilm oral es un concepto importante e innovador en biología oral. De hecho, miles de filotipos bacterianos y más de cien de hongos pueden colonizar la cavidad bucal. El perfil taxonómico combinado con el análisis de expresión funcional ha revelado que *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y periodontopatógenos prominentes no siempre están presentes o son numéricamente importantes en las lesiones de candidiasis, caries o periodontitis. Sin embargo, *C. albicans* combinado con *Streptococcus* spp. co-aumentan su virulencia en candidiasis invasiva, caries de la primera infancia o periimplantitis. (21) Estudios recientes revelaron que no solo las bacterias periodontopáticas sino también los virus del herpes (por ejemplo, el virus del herpes simple 1, el virus de Epstein-Barr y el citomegalovirus humano) y la *C. albicans* oral están involucrados en la periodontitis. *C. albicans* puede detectarse en sitios subgingivales de pacientes con periodontitis, lo que indica que *C. albicans* tiene la capacidad de colonizar bolsas periodontales inflamatorias y está implicada de manera importante en la periodontitis. (20) Diversos estudios señalan la presencia de *Candida* spp en los tejidos subgingivales de un 10 a un 30% en pacientes sanos, siendo aún mayor en pacientes inmunocomprometidos y

diabéticos (22, 23, 24, 25, 26). *Candida albicans*, tiene un rol preponderante entre otras especies de su genus en la enfermedad periodontal, y sus hifas fueron encontradas en asociación con especies bacterianas anaerobias invasivas relacionada con el biofilm periopatogénico presente en el tejido conectivo de pacientes que padecen enfermedad periodontal. (27, 28, 20). *Candida spp* puede coagregarse con las bacterias del biofilm subgingival y adherirse a las células epiteliales. Tal interacción está asociada con la capacidad de *Candida spp* para invadir el tejido conjuntivo gingival, y puede ser de relevancia en la colonización microbiana que contribuye a la complejización de alteraciones orales ocasionadas por algunos medicamentos y enfermedades sistémicas. Además, *C. albicans* puede crear condiciones ideales de supervivencia y colonización para otras bacterias, y tales coinfecciones conducen a enfermedades infecciosas más graves y resistencia a los medicamentos. (19) La secreción de polisacáridos de *C. albicans* provoca el desarrollo de biopelículas de *Streptococcus mutans* en la boca, lo que aumenta la incidencia de caries dental. Adicionalmente la proliferación de *Candida spp* puede dar lugar a la germinación de formas más virulentas y con mayor capacidad de adherirse y penetrar las células del hospedero, lo cual podría potenciar y complejizar el desarrollo de la enfermedad periodontal. Las cepas de *C. albicans* positivas para proteinasa se asocian con enfermedad e invasión de epitelios queratinizados como el de la encía. La invasión y el aumento de la descamación se deben a la producción de hialuronidasa. Dado que las especies bacterianas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* son los patógenos periodontales asociados con mayor frecuencia, la evidencia de la participación de la levadura en la enfermedad periodontal sigue siendo subestimada. Los hongos pueden actuar directamente, junto con patógenos bacterianos subgingivales, o como cofactor al inducir la producción de citocinas proinflamatorias, que aumentan la aparición de pérdida de inserción periodontal y, como resultado, conducen a la aparición de enfermedad periodontal. (29, 30, 31, 28, 32) En un trabajo de revisión de bibliografía realizado por Suresh Unniachan y col en 2020 (15) se encontró que de acuerdo a los trabajos revisados, se puede concluir que existe una fuerte asociación entre la presencia de especies de *Candida* y la enfermedad periodontal. *P. gingivalis* facilita el crecimiento de *C. albicans* en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Por lo tanto, es vital examinar la coexistencia de bacterias periodontopáticas y otros microorganismos para comprender mejor la patogenia de la periodontitis. Es posible que la coinfección de bacterias periodontopáticas y *C. albicans* tenga una participación importante en la inflamación periodontal. (20)

El raspado y alisado radicular es el “*gold standard*” en el tratamiento de la periodontitis crónica. Sin embargo, en algunos pacientes, la periodontitis es resistente al tratamiento convencional y requiere terapia antibiótica sistémica. Esto puede promover el crecimiento activo de hongos que afectan negativamente el curso de la enfermedad periodontal (28). Las levaduras y los patógenos periodontales pueden interactuar física, química y metabólicamente para influir en la supervivencia microbiana, la colonización y la formación de biopelículas (21). El ambiente anaeróbico de la bolsa periodontal puede promover la virulencia de *Candida* spp. aumentando la secreción de proteinasas que dañan los tejidos, modulan la respuesta inmune y atraen otros periodontopatógenos (33, 34). Esto contribuye a la formación de gruesas biopelículas polimicrobianas (35, 36, 37).

## 1.6 Enfermedad Periodontal y Condiciones Sistémicas

En 2013 se publicó el informe de consenso que realizaron en conjunto la Federación Europea de Periodoncia y la Academia Estadounidense de Periodoncia acerca de la periodontitis y su relación con condiciones sistémicas (38). En este informe, así como en otros estudios realizados sobre el tema, se determinó que la enfermedad periodontal constituye una afección de la salud de la población mundial que está fuertemente asociada con condiciones sistémicas. La evidencia apunta hacia una asociación entre infecciones orales, la inflamación resultante y enfermedades sistémicas como diabetes mellitus, artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer), aterosclerosis, enfermedad cardiovascular y accidente cerebrovascular (21, 39, 40). Queda por establecer si los patógenos periodontales específicos estimulan el desarrollo de enfermedades sistémicas, o si ciertas enfermedades sistémicas hacen que cambie la abundancia de patógenos periodontales. Si los patógenos causan enfermedades no orales, entonces representarían objetivos obvios para la intervención terapéutica. Pero como mínimo, la presencia de patógenos periodontales podría usarse como marcador de diagnóstico para predecir la susceptibilidad a enfermedades no orales. (41, 42)

Varios factores aumentan el riesgo de enfermedades periodontales. Estos factores de riesgo, modificables y no modificables, contribuyen a la importancia clínica de las enfermedades periodontales. Los patógenos periodontales podrían promover el desarrollo de enfermedades no orales directa o indirectamente. Principalmente bacterias anaerobias gramnegativas, que producen endotoxinas que podrían contribuir directamente a la enfermedad sistémica. (41, 43, 44, 45) Si bien las investigaciones de la base biológica de las conexiones entre las

enfermedades periodontales y las condiciones sistémicas generalmente enfatizaron el bacterioma, también es biológicamente plausible, bajo una hipótesis análoga, que otros tipos de organismos puedan tener un papel similar. Los virus humanos serían "sospechosos" lógicos en este papel, dada su ubicuidad en la cavidad oral, asociación con enfermedades periodontales y capacidad para provocar una fuerte respuesta inflamatoria, comprometer las respuestas inmunitarias y hacer sinergia con las bacterias a favor de un consorcio microbiano más patógeno. (46)

## 1.7 Menopausia y Enfermedad Periodontal

Los cambios endocrinos sustanciales, transitorios, fisiológicos o patológicos, pueden afectar la condición periodontal a través de la modulación de la respuesta inflamatoria, así como a través de una acción directa sobre los patógenos periodontales. Manifestaciones periodontales de las hormonas esteroides sexuales se pueden observar en relación con los cambios endocrinos que se producen durante la pubertad, el ciclo menstrual, el embarazo y la menopausia (47). Estos cambios son controlados por los sistemas endocrino y reproductivo. Por este motivo se ha enfocado la mirada específicamente sobre la asociación entre el sistema endocrino y las enfermedades periodontales en el sistema de clasificación utilizado actualmente, enfatizando su importancia en el diagnóstico y tratamiento (47, 48). El vínculo propuesto entre las hormonas esteroides sexuales y la enfermedad periodontal surge del papel modulador de estas hormonas durante el desarrollo gonadal sobre el sistema inmunitario y el metabolismo óseo. (48, 49) Las hormonas esteroides sexuales no solo determinan las características de género, sino que también tienen efectos locales y funcionales que crean un diálogo entre éstas y el periodonto (48, 49).

Los cambios hormonales en las mujeres aumentan la probabilidad de enfermedad periodontal, pudiendo experimentar inflamación gingival antes de la menstruación y durante la ovulación debido a un alto nivel de progesterona que bloquea la reparación de las fibras de colágeno y provoca la dilatación de los vasos sanguíneos. La deficiencia de estrógeno reduce la densidad ósea después de la menopausia, lo que puede culminar en la pérdida de hueso alveolar y, finalmente, la pérdida de los dientes.

La menopausia es el cese natural del ciclo menstrual de una mujer que generalmente se observa entre las edades de 45 y 55 años y marca el final de la fertilidad.

La esperanza de vida femenina es de más de 80 años, y muchas mujeres viven el 40% de sus vidas en la menopausia. Esta cohorte representa un gran número de los pacientes que se ven

en las prácticas clínicas. A lo largo de la vida de una mujer, el número de ovocitos disminuye constantemente. La menopausia se asocia con síntomas de deficiencia de estrógenos. Los niveles de estradiol caen gradualmente en los años previos a la menopausia. Los niveles de FSH y LH comienzan a elevarse y los niveles de hormonas sexuales comienzan a fluctuar. Esta etapa de la perimenopausia se caracteriza por una creciente falta de respuesta ovárica y ovulación esporádica. Los ciclos anovulatorios indican niveles bajos de estradiol y progesterona debido a la ausencia de función del cuerpo lúteo.

Los cambios orales en la menopausia incluyen adelgazamiento de la mucosa oral, malestar oral (es decir, ardor en la boca), recesión gingival, xerostomía, alteración del sentido del gusto, pérdida de hueso alveolar y reabsorción de la cresta alveolar. (1, 2, 50)

Las fluctuaciones de las hormonas sexuales durante la menopausia se han relacionado con cambios inflamatorios en la encía, hipertrofia o atrofia. El estrógeno y la progesterona son las principales hormonas sexuales que pueden afectar el periodonto al influir significativamente en los diferentes sistemas de órganos. (51) El estrógeno afecta la proliferación celular, la diferenciación y la queratinización del epitelio gingival. Se han identificado receptores de hormonas en las capas basales y espinosas del epitelio y los tejidos conectivos, lo que implica que las encías y otros tejidos orales son objetivos que pueden manifestar deficiencias hormonales. Los esteroides sexuales afectan directamente los tejidos conectivos, y los estrógenos aumentan el contenido de líquido intracelular. La deficiencia de estrógeno puede reducir la formación de colágeno en los tejidos conectivos y disminuir el grosor de la piel. Las alteraciones en el colágeno afectan tejidos como las articulaciones, el cabello, las uñas y las glándulas. Las hormonas sexuales, principalmente los estrógenos, impiden el progreso de IL-1, IL12, TNF-alfa y GM-CSF, que tienen una gran participación detrás de la actividad osteoclástica que conduce a la pérdida de hueso compacto y esponjoso. La síntesis disminuida de hormonas sexuales juega un papel clave en la inflamación severa de la encía adherida, la encía marginal en caso de periodontitis generalizada. Por otro lado, esta disminución tiene alguna contribución al mecanismo de pérdida ósea del esqueleto. Varias hormonas sexuales tienen un papel clave en diferentes cambios microvasculares, como la inflamación de la capa endotelial del tejido oral, la interrupción en la formación de varios mastocitos, la formación de trombos y el proceso de permeabilidad de los vasos puede volverse más rápido. (51).

El envejecimiento normal del periodonto es el resultado del envejecimiento celular, que es la base de los cambios intrínsecos observados en los tejidos orales a lo largo del tiempo. El proceso de envejecimiento no afecta a todos los tejidos de la misma manera. El tejido

epitelial, que es uno de los componentes principales del periodonto, siempre se renueva. En el epitelio, una población progenitora de células (es decir, células madre) en la capa basal proporciona nuevas células. Las células de la capa basal son las células menos diferenciadas del epitelio bucal. Una pequeña subpoblación de estas células produce células basales y retiene el potencial proliferativo del tejido. Una subpoblación más grande de estas células (células amplificadoras) produce células disponibles para la maduración posterior. Esta población de células en maduración experimenta continuamente un proceso de diferenciación o maduración. Por definición, la célula diferenciada (por ej, la célula epitelial) ya no puede dividirse. Por el contrario, la célula basal permanece como parte de la población progenitora de células lista para regresar al ciclo mitótico y producir nuevamente ambos tipos de células. Hay una fuente constante de renovación.

En el proceso de envejecimiento, la renovación celular se produce a un ritmo más lento y con menos células. El efecto es ralentizar los procesos regenerativos. A medida que las células progenitoras se desgastan y mueren, cada vez hay menos de estas células para reemplazar a las muertas. Este efecto es característico de los cambios biológicos que ocurren con el envejecimiento. Con el envejecimiento, las células madre sufren un agotamiento que afecta el potencial regenerativo del organismo. Se han documentado reducciones en el número de células madre y en su respuesta a estímulos en su entorno local. A través de la acción de los gerontogenes o la senescencia replicativa (es decir, el límite de Haylick y el acortamiento de los telómeros), el número de células progenitoras disminuye. El componente celular disminuido tiene el efecto concomitante de disminuir tanto las reservas celulares como la síntesis de proteínas. Esto hace que el tejido epitelial oral se adelgace, con una queratinización reducida. (1, 2, 3, 50) Mientras que el epitelio oral y el epitelio sulcular tienen una función en gran medida protectora, el epitelio de unión cumple muchas más funciones y tiene una importancia considerable en la regulación de la salud de los tejidos. Hoy en día se reconoce que las células epiteliales no son espectadores pasivos en los tejidos gingivales; más bien, son metabólicamente activas y capaces de reaccionar a estímulos externos mediante la síntesis de varias citocinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y enzimas. El grado de queratinización gingival disminuye con la edad y el inicio de la menopausia.

Los trastornos orales no son una característica común de la menopausia, pero algunas mujeres sufren ciertas afecciones como la gingivoestomatitis menopáusica que se caracteriza por mucosa oral seca y brillante y encía que puede aparecer anormalmente pálida o de color rojo brillante con tendencia a sangrar con facilidad. (50) Los cambios gingivales más comúnmente

informados que se observan en mujeres de esta edad son de naturaleza descamativa y se caracterizan por una superficie gingival lisa y pulida, apariencia moteada. Pero es difícil relacionar las hormonas sexuales con la patogenia gingivo-periodontal debido a su etiología multifactorial. (52) Según un estudio de 2018 la evidencia tendería a apoyar más el efecto de las perturbaciones de las hormonas esteroides sexuales en una enfermedad periodontal existente que sobre el inicio de la enfermedad. (49)

Una de las enfermedades más comunes que se observan a esta edad es la osteoporosis. Puede ser un factor que contribuya a agravar la periodontitis preexistente. El proceso alveolar tiene una capacidad endocrina similar a la del sistema esquelético (53, 54). Dado que la remodelación ósea está regulada por factores locales y sistémicos, la pérdida ósea sistémica puede contribuir a la pérdida ósea local o viceversa. La evidencia de la posible asociación entre la menopausia y la enfermedad periodontal es realizada en términos de niveles de marcadores de recambio óseo investigados en mujeres con perimenopausia y posmenopausia. Un estudio de 2017 de casos y controles comparó los niveles de fosfatasa alcalina en saliva en mujeres posmenopáusicas según su estado periodontal y mostró que los niveles elevados de marcadores se observan principalmente en mujeres afectadas por periodontitis (54, 55). Otros estudios similares que evaluaron la progresión de la enfermedad periodontal no pudieron demostrar cambios significativos. Además, se evaluaron los efectos de la terapia periodontal no quirúrgica sobre los marcadores locales de osteoprotegerina en mujeres premenopáusicas y posmenopáusicas con o sin periodontitis. Aunque el tratamiento periodontal mejoró la condición periodontal clínica, el efecto positivo logrado no tuvo impacto en los niveles de marcadores investigados sin depender del estado menopáusico. Del mismo modo, la evidencia clínica reciente no es suficiente para establecer la causalidad entre la baja densidad mineral ósea sistémica y la pérdida de dientes (54).

La revisión periódica y la actualización del historial médico y el estado oral son esenciales para estas pacientes. (54, 56, 50, 52, 57, 58, 59, 60) El uso de la TRH<sup>2</sup> ha sido ampliamente estudiado y no solo se sabe que reduce el riesgo de osteoporosis e infarto de miocardio e incluso retrasa la aparición de la enfermedad de Alzheimer, sino que también afecta al periodonto. Las mujeres posmenopáusicas que no toman TRH tienen 2,1 veces más probabilidades de tener periodontitis que las mujeres premenopáusicas.(52, 55, 57) Un estudio longitudinal de 42,171 mujeres en sus etapas posmenopáusicas mostró que el

---

<sup>2</sup> Terapia de reemplazo hormonal

tratamiento de la osteoporosis con terapia hormonal con estrógeno resultó en una reducción de la pérdida de dientes. (42, 44, 47, 54).

## 1.8 Diversidad del microbioma oral y Menopausia

En un estudio reciente de Soliman et al, se estudió el uso de la terapia hormonal (HT) en la menopausia y el microbioma subgingival. La abundancia relativa de varias bacterias subgingivales difería significativamente entre las usuarias actuales y las nunca usuarias de TRH en una cohorte de mujeres posmenopáusicas. Se necesitan estudios adicionales para determinar hasta qué punto estas relaciones podrían explicar la asociación inversa previamente informada entre el uso de TRH y la enfermedad periodontal en mujeres mayores. (61) . La homeostasis del periodonto implica complejas relaciones multifactoriales en las que el sistema endocrino juega un papel importante, y está bien documentado que las manifestaciones periodontales ocurren cuando se produce un desequilibrio de las hormonas esteroides. (62) Las hormonas sexuales femeninas afectan la composición del microbioma oral, tanto cualitativa como cuantitativamente (63). Esto se ha demostrado en la encía; sobre fibras periósticas, fibroblastos dispersos de la lámina propia, fibroblastos del ligamento periodontal y osteoblastos (63). Además, durante la menopausia, la mujer experimenta xerostomía, hiposalivación y alteraciones del gusto, lo que influye en el microbioma salival hasta la gingivoestomatitis menopáusica.(64)

Los efectos de las hormonas gonadales sobre los organismos microbianos orales han sido revisados exhaustivamente por Kumar (65), quien señala que siguiendo el paradigma predominante de que los esteroides sexuales afectan a las bacterias subgingivales, se esperaría que los efectos acumulativos del ciclo hormonal de la mujer a lo largo de la vida causara cambios a largo plazo en el microbioma subgingival femenino. No obstante, los datos disponibles indican que, aunque los esteroides sexuales femeninos alteran las superficies de las mucosas, el efecto sobre las biopelículas asociadas a las mucosas no es tan evidente. Por lo tanto, existen opiniones divergentes sobre el efecto de las hormonas ováricas en los ecosistemas microbianos complejos del cuerpo humano.

En este aspecto algunos trabajos de investigación sugirieron que los aumentos en los esteroides sexuales femeninos llevaron a una colonización preferencial por *Bacteroides* de pigmento negro, especialmente *P. intermedia*. La evidencia para apoyar esto proviene de los siguientes datos:

1. Se encontraron niveles más altos de Bacteroides de pigmento negro en mujeres embarazadas que en mujeres no embarazadas.
2. Se encontraron niveles más altos de Bacteroides de pigmento negro en mujeres que usaban anticonceptivos orales.
3. El estrógeno y la progesterona sustituyen a la vitamina K, un nutriente importante para los Bacteroides de pigmentación negra.

Sin embargo, varias variables de confusión afectan a estos estudios, la más importante de las cuales es que el microbioma subgingival se ve afectado por varios factores ambientales, incluida la inflamación. Como las hormonas ováricas ejercen un efecto predominantemente proinflamatorio sobre la encía, es difícil separar los efectos directos de los esteroides sexuales femeninos de los efectos de la inflamación gingival en la comunidad gingival. Otros factores que deben tenerse en cuenta son que muy pocos estudios demuestran una correlación positiva entre los niveles hormonales y bacterianos, y las correlaciones positivas entre la inflamación gingival y los perfiles bacterianos son consistentes en todos los estudios. (66) Las especies de *Prevotella* se encuentran en la salud y la enfermedad periodontal, y muestran una mayor prevalencia en sitios con profundidades de sondaje profundas e inflamación. A este respecto cabe destacar el rol de asociación que juega *Candida* spp con *P. Intermedia*, como mencionáramos anteriormente (61, 64, 65, 66) y su relación con la mayor virulencia y patogenicidad ante esta asociación.

## 2. Objetivos

- 2.1. Demostrar la prevalencia de especies de levaduras en biopelícula subgingival y en distintos sitios de mucosa bucal (lengua, carrillo y paladar), en pacientes en etapa peri y post-menopáusica que padecen enfermedad periodontal.
- 2.2. Estudiar la variación de diferentes especies de *Cándida* en las bolsas periodontales de mujeres en etapa post-menopáusica y peri-menopáusica
- 2.3. Comparar los resultados obtenidos con la media poblacional de otros grupos etarios que también padecen enfermedad periodontal.

## 3. Hipótesis

La prevalencia de *Cándida* spp en bolsas periodontales varía junto con las variaciones hormonales de pacientes peri y post-menopáusicas, y estas variaciones influyen en la progresión de la enfermedad periodontal en estas pacientes, relacionándose además con otros desórdenes de carácter sistémico.

## 4. Justificación

Creemos que el estudio es relevante debido a que es escasa la información con respecto a este tema en relación a la población en estudio.

### 4.1 Viabilidad del estudio:

Creemos que el estudio es viable y susceptible de ser puesto en práctica ya que la persona que lo realizará es odontóloga y se desempeña como tal en su consultorio desde hace más de 20 años. Las pacientes que constituyen la población de interés para este estudio concurren habitualmente a la atención en este ámbito y atienden su salud dento-gingival con la odontóloga que realizará la investigación en cuestión.

### 4.2 Deficiencias en el conocimiento del problema que orientan al estudio

Si bien la población de mujeres en etapa peri y post-menopáusica en Argentina, según proyección del INDEC (67), es de aproximadamente 8 millones, no contamos con información relacionada con la prevalencia de enfermedad periodontal y sus características para esta población.

Aunque numerosos estudios señalan la presencia de *Cándida* spp en bolsas periodontales, las cuales actúan como reservorios de este microorganismo; la relación entre la prevalencia de *Cándida* spp en asociación con la enfermedad periodontal y su posible incidencia en la complejización y gravedad de la enfermedad periodontal ha sido poco estudiada para esta población.

Adicionalmente no se ha hallado una considerable cantidad de estudios que relacionen la presencia de *Candida* spp en el microbioma oral de esta población en particular en relación con su proporción, variación y gravedad de las manifestaciones de la enfermedad periodontal.

## 5. Materiales y Métodos

La participación de los pacientes en el estudio fue voluntaria y todas dieron su consentimiento informado (Anexo I).

La población accesible fueron 25 pacientes de sexo femenino, adultas, en etapa de menopausia o perimenopausia, inmunocompetentes, no fumadoras, con diferentes estadios y grados de enfermedad periodontal que concurren a tratar su enfermedad al consultorio

particular de la Od. que escribe esta tesis. La edad de las pacientes fue de 49 a 89 años, 2 en etapa perimenopáusica y 23 en etapa de menopausia.

A cada paciente se le realizó una historia clínica con sus antecedentes personales y familiares, se completó el odontograma según revisión clínica y la medición de indicadores clínicos con sonda periodontal de presión controlada (Anexos II y III):

Profundidad de sondaje (PS) se realizó en todas las piezas dentarias en sus cuatro caras: mesial, vestibular, distal y palatino/lingual. Considerada normal hasta 3 milímetros alrededor de las piezas dentarias, y se consideró para evaluación a aquellas piezas dentarias cuya PS fuera la mayor.

### 5.1 Criterios de inclusión y exclusión

Pacientes de sexo femenino, de 48 años en adelante, que estén en etapa peri o post-menopáusica, que no reciban tratamiento de reemplazo hormonal, y que presenten patología periodontal en estadios II en adelante, que viven en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, a las cuales se les haya diagnosticado presencia de enfermedad periodontal.

El tipo de muestreo a realizar será no probabilístico y de conveniencia. Se evaluará a las pacientes que concurran a la consulta odontológica en consultorio, dentro del marco de la práctica privada de odontología general, entre marzo de 2022 y agosto de 2022 a las cuales se les haya diagnosticado la presencia de enfermedad periodontal a través de los métodos de diagnóstico habituales del ejercicio de la odontología en el consultorio donde se registrarán las muestras.

También quedaron excluidas aquellas pacientes que no otorgaron su consentimiento a participar en el estudio luego de haber sido debidamente informados (Anexo 1).

### 5.2. Criterios de eliminación

Por cuestiones éticas, quedaron eliminadas aquellas pacientes que requirieron la aplicación de terapias complementarias quirúrgicas y/o farmacológicas, locales o sistémicas

### 5.3 Diseño Observacional:

Se realizará un estudio de observación, ya que el investigador no interviene en la acción de la variable independiente, sino que lo hace la naturaleza.

Este estudio será analítico, ya que el investigador busca una relación causal o de asociación entre las variables con los elementos de la hipótesis.

Con respecto a la secuencia en el tiempo, el estudio es de tipo casos y controles, individual, de incidencia y retrospectivo.

La cohorte de casos se constituirá seleccionando a un conjunto de pacientes que tienen como características comunes estar en período peri o post-menopáusico y padecer enfermedad periodontal, la cual será tratada en el consultorio odontológico a donde concurren a realizar consulta. Las pacientes serán observadas durante el período que dure el tratamiento requerido y su mantenimiento, y se tratará su enfermedad periodontal, con la finalidad de analizar la evolución de su estado de salud.

Una vez obtenidos todos los datos pertinentes, se dividirá la cohorte en grupos según el estadio y grado de enfermedad periodontal desarrollada, de acuerdo a la nueva clasificación de enfermedades gíngivo-muco-periodontales y peri-implantarias (69, 70), según presencia de restauraciones protésicas en boca y/o uso de placas para bruxismo, y/o uso de elementos ortodóncicos (si los hubiere) y se comparará la composición y el volumen de *Candida* spp y sus variaciones entre grupos.

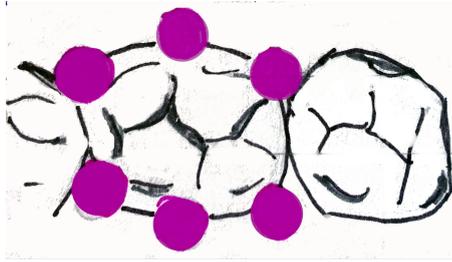
Se notarán los casos en los que las pacientes estén tomando medicación sistémica debido a que se desea evitar la influencia de la toma de medicación como variables confundidora.

Una vez seleccionadas las pacientes se realizaron los siguientes procedimientos:

- Firma de consentimiento informado (Anexo 1).
- Actualización de historia médica general.
- Examen clínico de tejidos blandos y dentales.
- Toma de las muestras microbiológicas.
- Medición de profundidades de surcos periodontales y sangrado al sondaje.
- Instrucciones de higiene e informe de diagnósticos para tratamiento en los casos que lo necesitaran.

Para cumplir con el objetivo 2.3 “Comparar los resultados obtenidos con la media poblacional de otros grupos etarios que también padecen enfermedad periodontal”, se compararán estos resultados con el grupo de control, el cual estará constituido por los resultados obtenidos en estudios similares para pacientes con enfermedad periodontal que no estén en período de menopausia, llevados a cabo por otros autores en sus trabajos de investigación. De los trabajos estudiados (62, 64, 65, 71, 72, 73, 74) elegimos para la comparación la investigación llevada a cabo por Jabri et al (72) porque utiliza los mismos estándares y las mismas categorías para medir la enfermedad periodontal que utilizamos en este trabajo. Cabe destacar, no obstante, la diferencia geográfica de las poblaciones de ambos estudios.

Para cumplir con el objetivo



**Fig 1:** Puntos de sondaje que se evaluaron en cada pieza dentaria.



**Fig 2:** Medición de bolsa periodontal con sonda de tipo Marquis marca Hu-Friedy®

Se estudiará asimismo la variación en la presencia de *Candida spp* dentro de la muestra observada según otras variables como estadio y grado de la enfermedad periodontal, y uso de elementos protésicos, a fin de cumplir con el objetivo 2.2 “Estudiar la variación de diferentes especies de Cándida en las bolsas periodontales de mujeres en etapa post-menopáusica y peri-menopáusica”.

#### 5.4 Unidades experimentales o unidades de análisis

La muestra la constituyó la población accesible que cumplió con los criterios de inclusión y exclusión. Se evaluaron en el consultorio 50 pacientes, de las cuales sólo 25 cumplían con estos criterios. Los principales motivos por los cuales se consideró que las otras pacientes no cumplían con los criterios de inclusión y exclusión fueron:

- a) Recibía terapia de reemplazo hormonal (5 pacientes)
- b) Recibió tratamiento con antifúngicos o antimicrobianos por vía sistémica en los últimos 3 meses, de las cuales en su mayoría se trató de pacientes que recibían tratamiento por onicomicosis. (5 pacientes)
- c) No deseaba participar del estudio (3 pacientes)
- d) Padecía gingivitis pero no periodontitis. (8 pacientes)
- e) En estado de salud periodontal y gingival (4 pacientes)

#### 5.5 Variable Independiente:

Presencia de *Cándida spp* en bolsas periodontales de pacientes de sexo femenino en etapas peri y post-menopáusica.

## 5.6 Variables dependientes:

- 1) Variación de la composición y proporción de *Candida spp* en bolsas periodontales de pacientes peri y post-menopáusicas.
- 2) Posible relación de elementos protéticos en boca con la presencia de *Candida spp*.

## 5.7 Consideraciones éticas

Se dio cumplimiento a lo establecido en la Ley 25326 (Protección de Datos Personales), que garantiza una adecuada disociación de los datos e impide identificar a los sujetos. Además, en la encuesta se informó convenientemente a los sujetos sobre los alcances de la investigación, considerando su participación y firma de hoja de consentimiento informado como aceptación.

## 5.8 Recolección de las muestras de mucosa bucal

Previo a la toma de material clínico la paciente leyó y firmó el consentimiento informado (Anexo I). Se solicitó a cada paciente que hiciera un enjuague bucal con agua destilada estéril. Luego se realizó un hisopado de carrillos, lengua y paladar con hisopos estériles. Se guardaron rotulados por separado en tubos Eppendorf con 100 ml de agua destilada estéril. Los materiales e instrumental utilizados para este estudio fueron esterilizados con nivel priónico como aconseja la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) en autoclave a 134°C durante 18 minutos de meseta, en el consultorio donde se tomaron las muestras, supervisado por tiras reactivas de las marcas Kims e Integron. (75)



**Fig 3** Tiras reactivas de control utilizadas

## 5.9 Recolección de las muestras de surcos periodontales

Para tomar las muestras se eliminó la biopelícula supragingival con cureta de periodoncia Hu-Friedy, se frotó la superficie dentaria con gasa estéril, se aisló el sector con rollos de algodón estériles y se utilizó suctor de alta potencia. Se recolectó biopelícula subgingival de los surcos con una cureta Hu-Friedy en bolsa periodontal de 4mm o más, eligiendo aquellas piezas dentarias y caras con mayor profundidad de sondaje, y se colocó la muestra de biofilm subgingival en un tubo Eppendorf con solución fisiológica estéril a fin de realizar los estudios microbiológicos de rutina.

Con un hisopo estéril se tomó muestra por los tejidos blandos orales y se colocó en otro tubo Eppendorf acondicionado como el anterior, al cual se le realizaron los mismos estudios microbiológicos de rutina que al tubo anterior.

Las muestras se identificaron con un número otorgado a cada paciente y asentado en la ficha periodontal de cada una, mencionando el sextante en el cual se tomó la muestra.

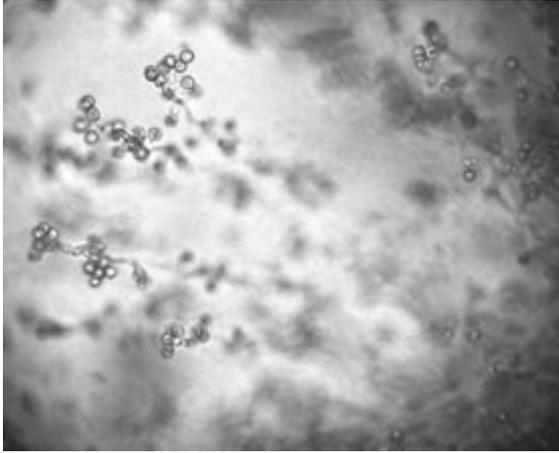
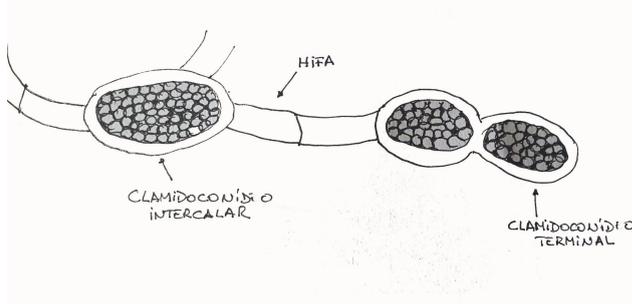
## 5.10 Procesamiento de las muestras:

### 5.10.1 Estudio micológico convencional

Para llevar a cabo el objetivo 2.1.: “Demostrar la prevalencia de especies de levaduras en biopelícula subgingival y en distintos sitios de mucosa bucal (lengua, carillo y paladar), en en pacientes en etapa peri y post-menopáusica que padecen enfermedad periodontal”, se procesaron las muestras de la siguiente forma:

#### 5.10.1.1 Examen directo y cultivo

Se realizaron estudios microscópicos en fresco (Fig. 4), tinciones de Gram-Nicolle y de Giemsa, y se sembraron en medios sólido cromogénico diferencial (CHROMagar Company, París, Francia), que también fueron utilizados en otros estudios y nos pareció oportuno a fin de poder realizar comparaciones (76, 77, 78). Se incubaron a 37° C durante una semana, observando diariamente la presencia de desarrollo.

	
<p><b>Fig. 4,</b> En fresco se pueden ver características fenotípicas como la presencia de clamidoconidios y pseudomicelios</p>	<p><b>Fig 5:</b> Esquema de clamidoconidios, que se forman ante la adversidad de las condiciones del medio.</p>

#### 5.10.1.2 Identificación de los aislamientos

Los aislamientos se identificaron sobre la base del color desarrollado en el medio cromogénico, observándose la presencia de una o más especies, micromorfología en agar leche 1%-Tween 80 (103) y perfil de asimilación de carbohidratos por sistemas comerciales API ID 32D (®BioMérieux, Francia). Las levaduras obtenidas fueron realizadas en las mismas condiciones del cultivo primario en agar Sabouraud a fin de obtener aislamientos puros para su identificación. Los mismos se conservaron en agua con glicerina (20%) a -20°C y a -70° C. Esto se realizó con la finalidad de cumplir con el objetivo 2.2. “Estudiar la variación de diferentes especies de Cándida en las bolsas periodontales de mujeres en etapa post-menopáusica y peri-menopáusica”.

#### 5.10.1.3 Procesamiento y análisis estadístico de los datos

Los resultados se volcaron en tablas del programa Calc de la suite de oficina de LibreOffice para su procesamiento.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se utilizaron los programas epi-info y los programas GNU pspp versión 1.4.1 y JASP 0.16.4.

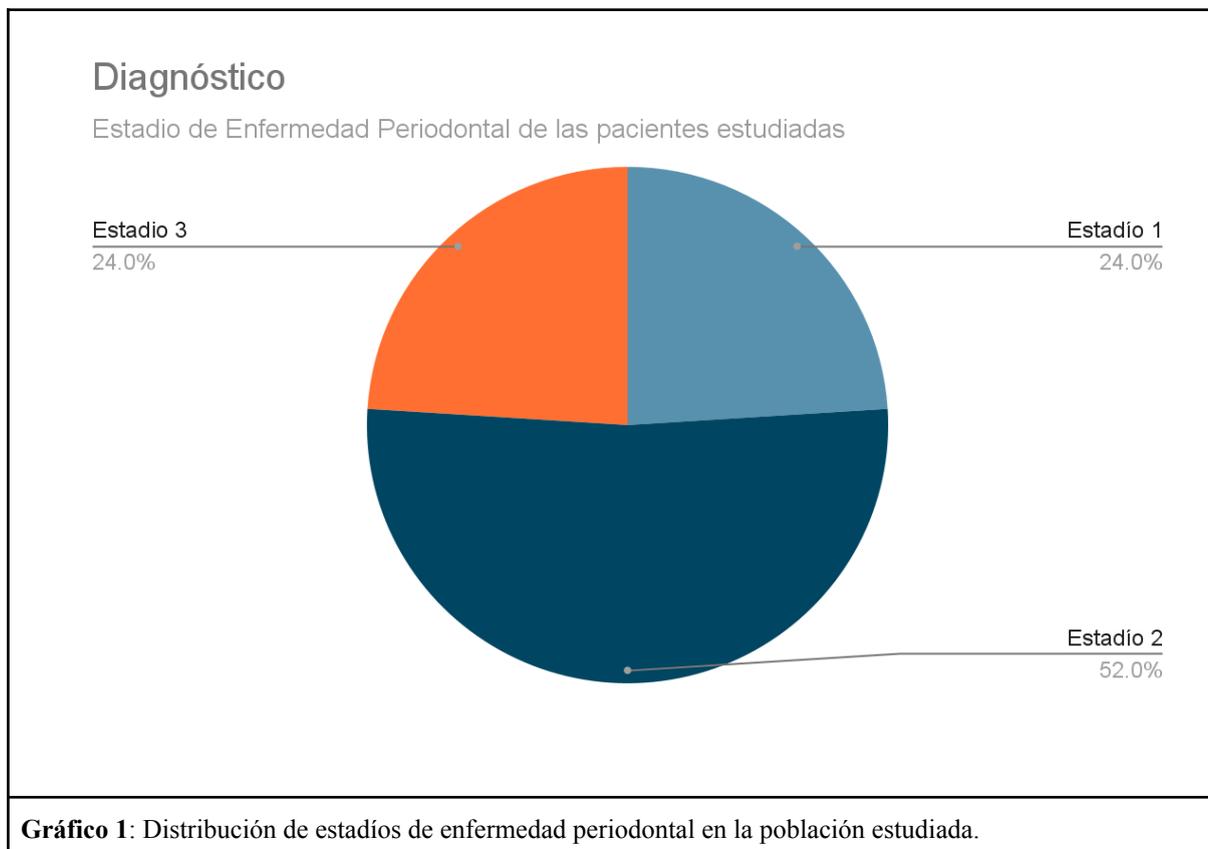
Se calcularon porcentajes, promedios e intervalos de confianza. Los mismos se estimaron con un nivel de confianza del 95% mediante el programa StatCalc de EpiInfo.

La comparación de promedios de los índices clínicos se realizó mediante el test de ANOVA, con la finalidad de cumplir con el objetivo 2.3 “Comparar los resultados obtenidos con la media poblacional de otros grupos etarios que también padecen enfermedad periodontal”.

## 6. Resultados

### 6.1 Características clínicas de las pacientes estudiadas

Se estudiaron 25 pacientes mujeres, inmunocompetentes, de una edad promedio de 65,64 años de edad, las cuales no habían recibido previamente tratamiento local ni sistémico con antifúngicos durante el transcurso de por lo menos un año. Ninguna de las pacientes estaba recibiendo tratamiento de reemplazo hormonal desde hacía por lo menos un año cuando se tomaron las muestras. Dos de las pacientes están en etapa perimenopáusica, no habiendo menstruado durante más de 3 meses pero menos de 12 meses. El promedio de dientes en boca fue de 18,36 contra la cantidad de 32 dientes en boca de un adulto, es decir el 57% de las piezas dentarias estaban presentes en boca. El 13% de las pacientes son fumadoras, y el 16% son ex-fumadoras que cesaron su tabaquismo hace por lo menos 2 años. Las 25 pacientes



estudiadas tenían en total 12 implantes instalados, el promedio de dientes con prótesis fija fue de 14,59, y el 56% usaban prótesis removible, aunque 2 de ellas expresaron no usarla para comer.

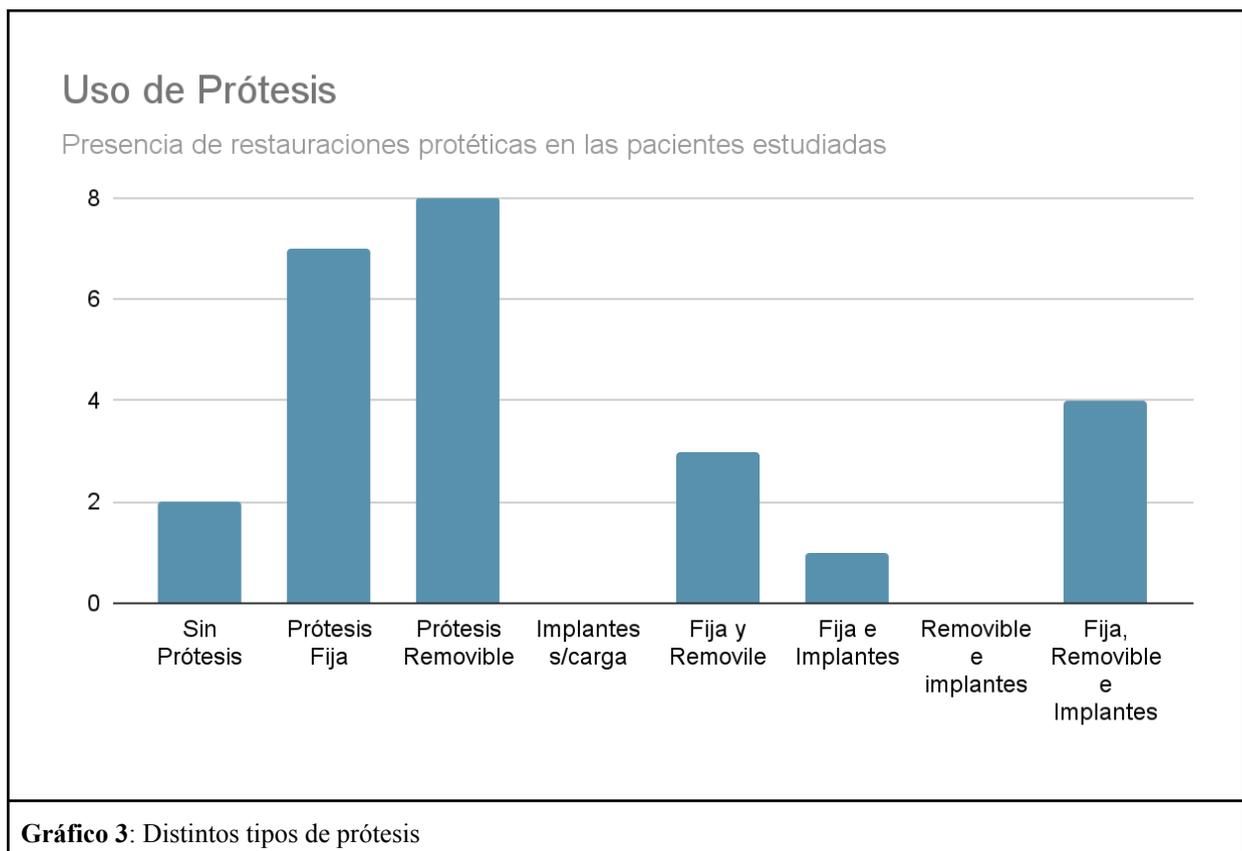
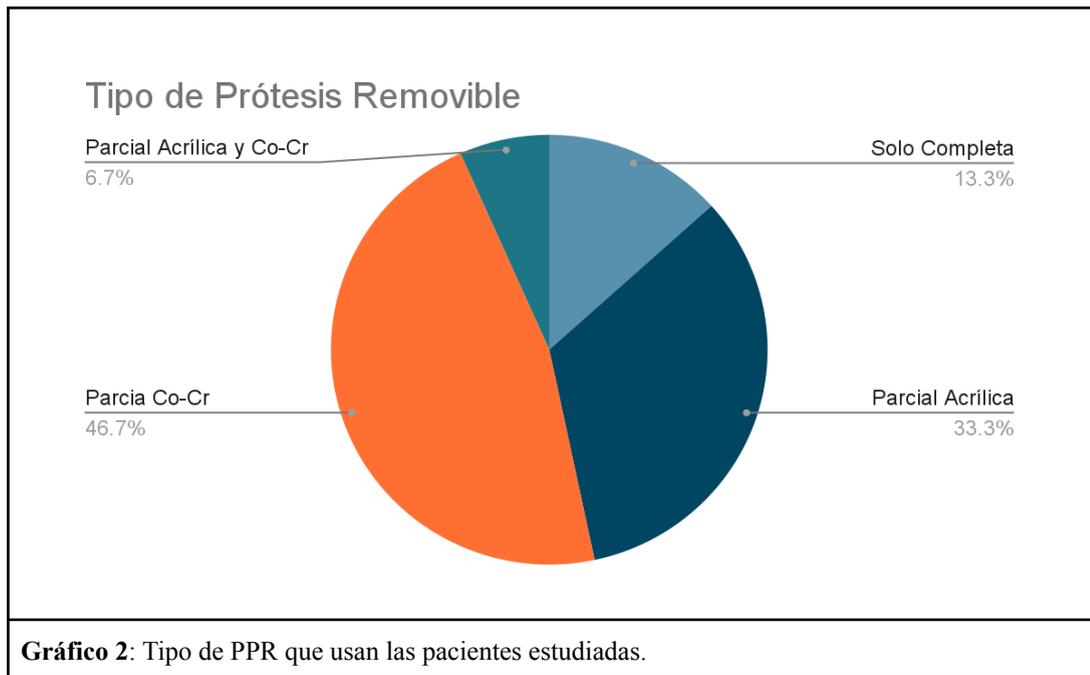
Todas las pacientes que integraron la cohorte cumplían con los criterios de inclusión y exclusión detallados en 5.1.

Las muestras fueron tomadas en el consultorio odontológico de las odontólogas Secreto, Elba Beatriz y Claudia Liliana, donde las pacientes habitualmente se atienden.

Debido a la cuarentena impuesta por causa de la pandemia de covid-19, las pacientes no habían concurrido a realizar tratamiento odontológico desde marzo de 2020 hasta después de marzo de 2022. Todas las pacientes declararon haber recibido por lo menos 3 (tres) dosis de vacuna para covid-19 en el momento de realizar la toma, y 9 de ellas declararon haber padecido la forma leve de infección por covid-19 dos (2) meses o más anteriores a la toma de muestras.

Características Clínicas de las Pacientes Estudiadas		
Edad	65,64	Promedio
Fumadoras	13%	Porcentaje
Piezas dentarias ausentes	341	Valor absoluto
	13,64	Promedio
Implantes presentes	12	Valores absolutos
Pacientes portadoras de prótesis fija (sola o combinada con prótesis removible)	14	
Portadoras de Prótesis Removible únicamente	8	
Portadora de Prótesis Removible Cobalto Cromo (sin combinación con prótesis acrílica)	7	

**Tabla 1:** Características Clínicas de la muestra



## 6.2 Estudios micológicos: Examen directo y cultivo

Se procesaron la totalidad de las muestras obtenidas: 25 de cavidad bucal y 25 de surcos periodontales, entre los cuales se eligieron los de mayor profundidad en cada boca, y se

hicieron observaciones en microscopio óptico de los frescos y tinciones que permitieron reconocer la presencia de levaduras y algunas características particulares como pseudomicelios.

Si bien los medios cromogénicos han demostrado ser útiles para el hallazgo de más de una especie de levadura en muchos materiales clínicos, encontramos poca información en la literatura especializada acerca de su utilización en muestras procedentes de surcos periodontales y su comparación con los medios de cultivos tradicionales.

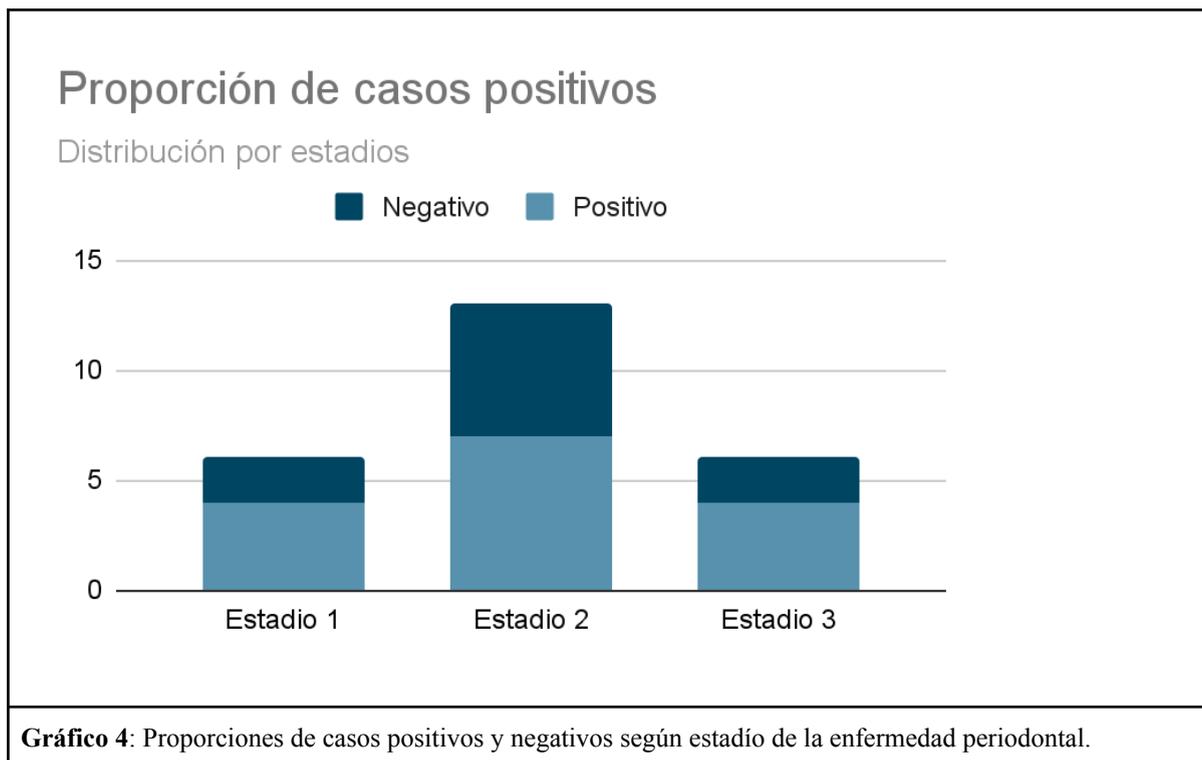
Ambos medios sólidos empleados, Sabouraud y CHROMagar Candida, permitieron el aislamiento primario de los hongos por igual.

Las muestras fueron sembradas directamente en medio cromogénico.

De todos los sitios estudiados *C. albicans* es la especie predominante. Siguen en prevalencia *C. kruzei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, y *C. tropicalis*. Este resultado coincide con los hallados por otros autores. (79, 80, 81, 82)

### 6.3 Distribución de levaduras según el estadio de enfermedad periodontal.

Para analizar los cultivos positivos y negativos según el estadio de enfermedad periodontal se tomaron en consideración las pautas de la nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias (69, 70) y se formaron tres grupos con los estadios en que se clasificó la progresión de la patología de las pacientes. Un grupo en estadio 1 (6 casos), otro en estadio 2 (13 casos) y otro en estadio 3 (6 casos). Cinco de los casos estudiados registraron un grado C de progresión, el resto se les diagnosticó grado B de progresión. En todos los casos el diagnóstico fue realizado por la misma odontóloga.



	Positivo en cav. bucal	Positivo en bolsa periodontal
Estadio 1 (N=6)	4	1
Estadio 2 (N=13)	6	5
Estadio 3 (N=6)	4	4

**Tabla 2:** Distribución de cultivos positivos y negativos en mucosa y surco.

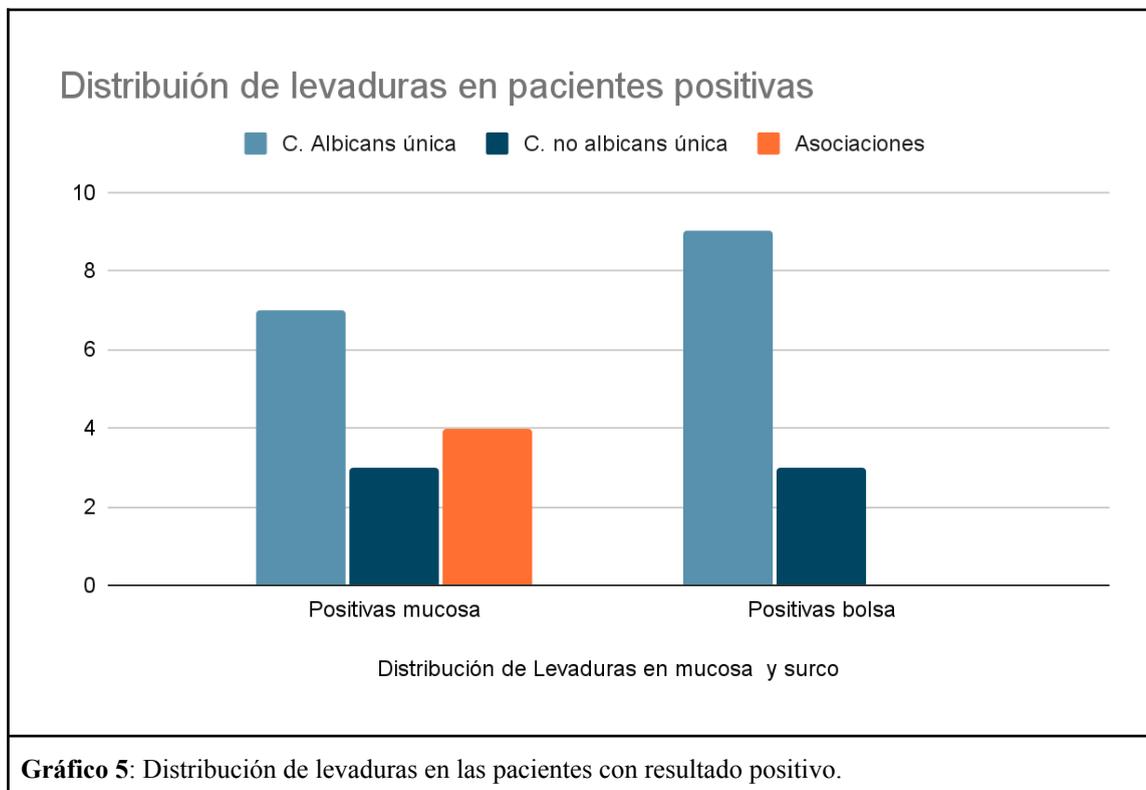
En el gráfico N°4 podemos observar que en los 6 casos en estadio 1 de progresión de la enfermedad periodontal se presentaron 4 casos positivos (66,6%) y 2 negativos (33,3%), en cavidad bucal, pero solo 1 caso positivo en surco periodontal (16,6%). De los 13 casos en estadio 2, se observaron 6 casos de cultivos positivos (46%) y 7 negativos (54%) en cavidad bucal, pero 5 positivos en surco periodontal (38,46%); Finalmente de los 6 casos en estadio 3, los cultivos positivos fueron 4 casos (66,6%) y los negativos 2 casos (33,3%) tanto en cavidad bucal como en surco periodontal. Cabe destacar que de las 3 pacientes a las que se les diagnosticó grado C de progresión de la enfermedad periodontal (progresión rápida o

impredecible por factores de riesgo asociados) la totalidad dieron cultivos positivos en cavidad bucal y en bolsa periodontal.

Este análisis permite inferir que en esta población, la presencia de especies de *Candida spp* podría tener una leve asociación con la severidad de la enfermedad periodontal.

#### 6.4 Distribución de levaduras como especie única o asociaciones en mucosa

Los cultivos positivos de mucosa y surco periodontal estudiados se analizaron en relación a la presencia de una o más especies de levaduras halladas en cada sitio. Del total de casos positivos de colonización de levaduras en mucosa (n=14), 10 casos fueron encontrados como única especie, y 4 como asociación.



#### 6.5 Distribución de levaduras como especie única o asociaciones en surcos periodontales

También se analizaron las asociaciones de las levaduras encontradas en los surcos periodontales. De los 25 sitios totales, 13 dieron resultados negativos para la colonización de levaduras (52%). De los 12 positivos restantes todos los casos fueron colonizaciones como especie única, como se plasmó en el gráfico 5.

## 6.6 Distribución de especies de levaduras en ambos nichos ecológicos

Comparamos las proporciones de levaduras encontradas en los tejidos blandos y en los surcos periodontales en relación con el número de pacientes que participaron en este estudio (N=25). En los casos estudiados (N=25) se relacionaron los cultivos positivos y negativos de mucosa y surcos periodontales de cada paciente. En 14 casos positivos de colonización de levaduras en mucosa 12 tuvieron colonización positiva en los surcos y 2 fueron negativos. De los 11 casos restantes que tuvieron resultados negativos en las mucosas todos fueron negativos en surcos. No se encontró ningún caso en que tuviera resultado negativo en mucosa y positivo en surco.

Estos resultados sugieren que existe una implicancia directa entre la presencia positiva de levaduras en mucosa y su presencia en los surcos periodontales.

<b>Relación de cultivos positivos y negativos en surco y en mucosa</b>		
<b>Cultivo en mucosas</b>	<b>Cultivo en surco periodontal</b>	<b>Casos</b>
Negativo	Positivo	0
Positivo	Negativo	2
Negativo	Negativo	11
Positivo	Positivo	12
<b>Total de Pacientes</b>		<b>25</b>

Tabla 3

## 6.7 Distribución de levaduras según tipo de prótesis

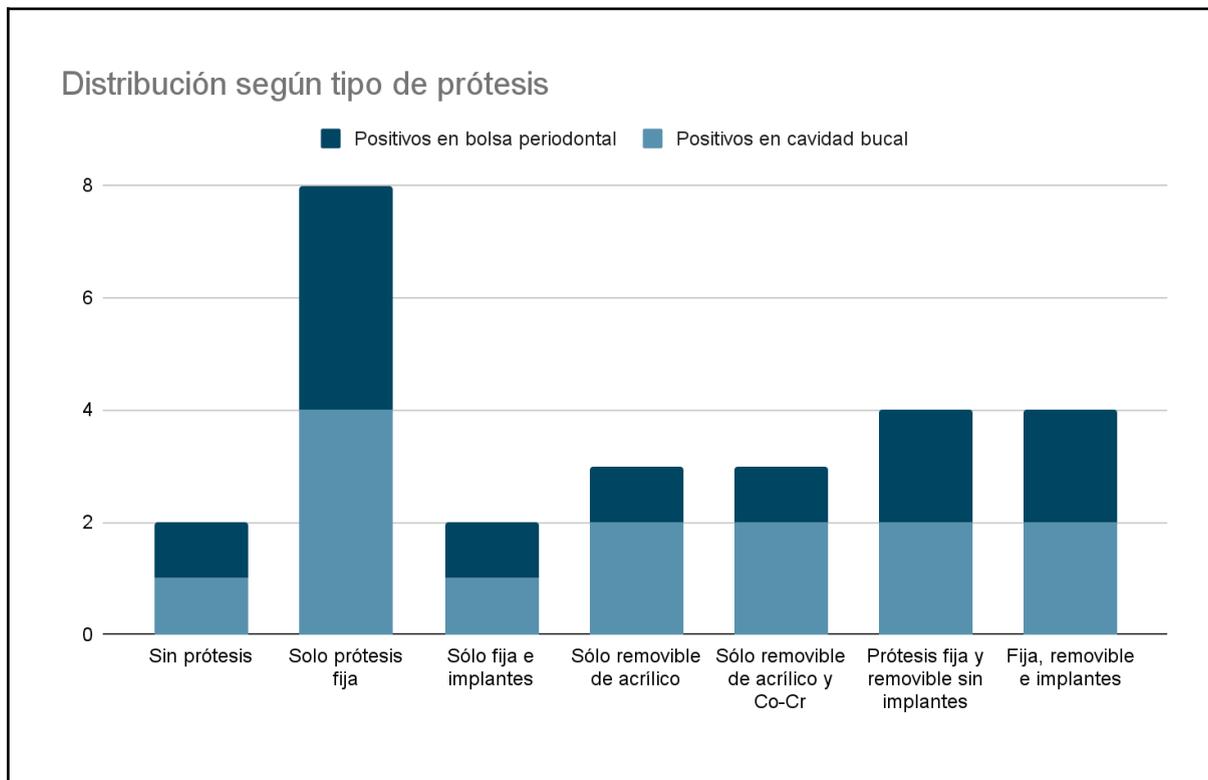


**Fig 6:** Estomatitis paraprótica, ocasionada por Candida

**Fig7:** Placa de bruxismo en deficiente estado de preservación.

Del total de 25 pacientes estudiadas (N=25) 22 usan algún tipo de elemento protésico para reemplazar todas o algunas de las piezas dentarias ausentes.

Entre las pacientes que usan prótesis removible podemos diferenciar a las que usan prótesis completa vs las que usan prótesis parcial, y entre estas últimas, entre las que usan prótesis parcial de acrílico y las que usan prótesis parcial de cobalto-cromo. Ninguna de las pacientes estudiadas usaba prótesis flexibles, y ninguna de las prótesis estaba rota. Ninguna de las pacientes estudiadas usaba prótesis removible sobre implantes. Dos (2) pacientes usaban placa de bruxismo, y otras 2 la tienen pero no la usan o sólo la usan esporádicamente.



**Gráfico 5:** Resultados positivos y negativos según tipo de prótesis.

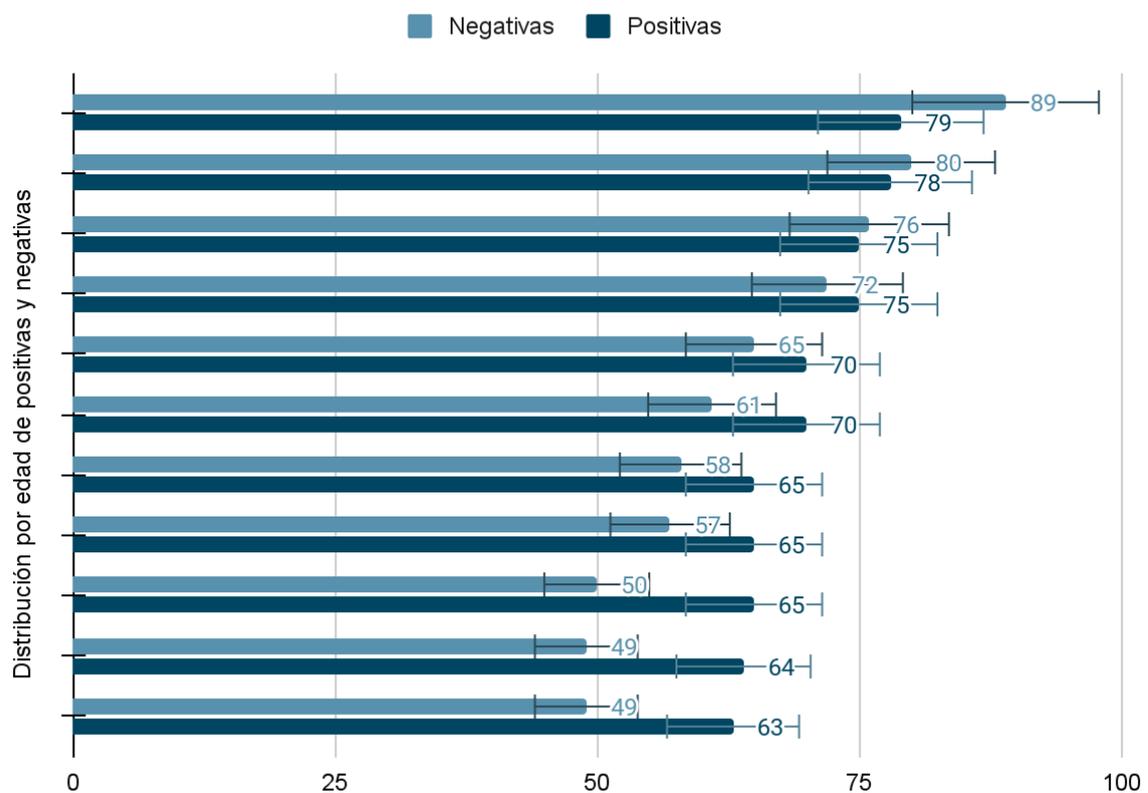
## 7. Discusión

### 7.1 Características clínicas de las pacientes seleccionadas.

Se estudiaron 25 pacientes de sexo femenino con una edad promedio de 65.64 años. Estas pacientes no habían recibido tratamiento local previo ni sistémico con antifúngicos y tampoco habían recibido terapia de reemplazo hormonal. La distribución de edades de las pacientes

agrupadas según los resultados positivos o negativos (positivas vs negativas) de los cultivos fue similar, con pacientes de mayor edad en el extremo superior del grupo de negativas y de menor edad en el extremo inferior del mismo grupo. No obstante, la diferencia entre los promedios de edades de ambos grupos fue inferior a 10 (70 años para las positivas, con un EE de 2,64 y 77 para las negativas, con un EE de 4,36). El grupo de negativas contó con una paciente de 89 años y dos de 49 años. Si removemos estos dos extremos que no se encuentran representados en el grupo de positivas, el promedio de edad de las pacientes con resultado negativo de 50 a 79 años es de 64,87 años, con un EE de 3,09. Pensamos que estas variaciones en error estándar se deben al tamaño de la muestra, y sería interesante poder

### Distribución por edad de positivas y negativas



repetir este estudio con una muestra mayor de pacientes.

El 13% de las pacientes fueron fumadoras. El 12% de las pacientes eran diabéticas (diabetes tipo 2 en todos los casos) y el 36% eran hipertensas y estaban medicadas. Esta población tenía un promedio de 18,36 dientes presentes cuando en un adulto los dientes totales son 32, (es decir, el 57, 37% de las piezas dentales de un adulto) y de un total de 459 piezas presentes en boca, 67 portaban prótesis fija, es decir el 14,59%).

De las 25 pacientes, 14 tenían rehabilitación con prótesis removibles de la cuales 7 tenían exclusivamente prótesis de cobalto-cromo, y 7 tenían alguna prótesis de acrílico. De las 25 pacientes, 15 tenían prótesis fija. De estas, 4 tenían además prótesis fija sobre implantes. Ninguna usaba prótesis removable sobre implantes y ninguna tenía implantes sin corona.

De las 25 pacientes 6 estaban en un estadio 3 de enfermedad periodontal (69, 70) de las cuales 4 además tenían grado C de progresión, y las otras 2, grado B; 13 de las pacientes estaban en estadio 2 de extensión, y 12 de ellas tenían un grado B de progresión mientras que una tenía grado C. Cuatro (4) pacientes se encontraban en estadio 1 de extensión, y las cuatro tenían grado B de progresión. Ninguna paciente tenía grado A de progresión. Entre las pacientes que se encontraban en estadio 3 de extensión, 4 dieron resultado positivo para *Candida spp* en mucosa oral y surco periodontal; de las 13 que se encontraban en estadio 2 de progresión 6 dieron resultado positivo para cultivo de *Candida spp* en mucosa bucal y 5 dieron resultado positivo para presencia de *Candida spp* en bolsa periodontal. La única paciente que tuvo estadio 2 y grado C de progresión, dio resultado positivo para *Candida spp* en mucosa bucal y en surco periodontal. De las 6 pacientes que se encontraban en estadio 1 de extensión, 4 dieron resultado positivo para presencia de *Candida spp* en mucosa bucal, y 3 dieron resultado positivo para presencia de *Candida spp* en bolsa periodontal.

Las muestras fueron tomadas en los consultorios de las Odontólogas E.B. Secreto y C.L. Secreto, que se encuentra en la Comuna 4 de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, donde la totalidad de las pacientes que conforman la muestra poblacional atienden su salud bucal. Todas las pacientes viven o trabajan en la zona.

## 7.2 Estudios micológicos: Examen directo y cultivo

La totalidad de muestras obtenidas en este trabajo, 25 surcos periodontales y 25 hisopados de mucosa bucal, se procesaron utilizando una metodología directa de diagnóstico fúngico, es decir microscopía y cultivo. Con respecto a las observaciones microscópicas, el fresco fue útil para la identificación rápida de levaduras y/o pseudomicelios en las muestras. Si bien no se realizaron tinciones específicas para hongos, las tinciones de Gram-Nicolle y Giemsa facilitaron la visualización de los elementos fúngicos en las muestras. Ambos procedimientos permitieron un diagnóstico presuntivo de infección fúngica en surco periodontal y una mejor interpretación de los cultivos, ya que el valor de los mismos puede ser controvertido con estudios microscópicos negativos, debido a que *Candida spp* pertenece a la microbiota

habitual de cavidad bucal. Estos procedimientos presentan también, como ventaja, su bajo costo y sencillez, pudiéndose implementar en laboratorios de baja complejidad.

Realizamos una comparación de los resultados hallados para la población n=25 de pacientes periodontales en etapa menopáusica respecto de la población periodontal joven que estudiaron Jabri et al (72) y obtuvimos un resultado de OR de 2,1891 que indicaría que la presencia de *Candida spp* es más frecuente en las pacientes menopáusicas que en pacientes jóvenes.

	Menopáusicas	Jóvenes	Totales
Positivas Candida	14	25	39
Negativas Candida	11	43	54
Totales	25	68	93

**Tabla 4:** Comparación con pacientes jóvenes.

A nivel epidemiológico, tomando los mismos valores de la tabla Nª4 obtuvimos un valor de RAP de 0,0651 y un RAP% de 24,22%.

El cultivo permitió la recuperación y posterior identificación de especies de levaduras presentes en las muestras.

En este estudio, la siembra directa de las muestras en medio de CHROMagar Candida facilitó la identificación presuntiva de *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Hallazgos similares fueron informados por otros autores (81, 82, 83).

De las 25 pacientes participantes, 14 presentaron cultivos positivos para levaduras en mucosa bucal, de los cuales 12 también presentaron levaduras en surcos periodontales. No se observó ningún caso con presencia de levaduras en surco periodontal y ausencia de levaduras en mucosa. Esto último nos permite suponer que las levaduras halladas en los surcos periodontales provienen de la mucosa bucal. Por lo tanto tomando como referencia los resultados obtenidos en la tabla N° 4 podemos inferir que el surco periodontal es un nicho ecológico que proporciona condiciones microambientales favorables para que puedan colonizar las levaduras y que podría existir una implicancia directa entre la presencia de levaduras en mucosa y en los surcos periodontales.

En este estudio la especie de mayor prevalencia en mucosa bucal sobre 14 muestras colonizadas con levaduras fue *C. albicans* con 78.57% (11/14) (IC95% LC10.4%)<sup>3</sup>.

Cabe destacar que encontramos asociación de *C. albicans* con *C.kruzei* 2/14 y con *C. tropicalis* 1/14, pero no encontramos asociación entre *C. parapsilosis* y otras especies, o *C.*

<sup>3</sup> Valores obtenidos a través de la aplicación StatCalc provista por OpenEpi.

glabrata y otras especies. A diferencia de los hallazgos de otros autores, no encontramos presencia de *C. dublinensis* en mucosa oral. Una posible explicación a estos resultados discordantes es la diferencia entre las poblaciones estudiadas y en el número de pacientes incluidos. (84)

### 7.3 Distribución de las especies de levaduras en los nichos ecológicos

En cuanto a la distribución de las especies en los 12 surcos periodontales con colonización de levaduras, *C. albicans* fue la especie más prevalente (9/12 n%). Creemos que es importante mencionar el hallazgo de especies de *Candida* no *albicans* en surcos periodontales, *C. parapsilosis* el 2/12 n% ; *C. glabrata* 1/12 n% . A diferencia de los resultados reportados por otros autores, no encontramos presencia de *C. dublinensis* en las bolsas periodontales. Pensamos que esto podría deberse al tamaño de la muestra. (84)

Comparando la presencia de *Candida* spp en las bolsas periodontales de pacientes con enfermedad periodontal, encontramos que los resultados hallados son más elevados que los que reportan otros autores como Slots et al (80), Reynaud et al (27) quienes no encontraron relación de sexo y edad con respecto a la presencia de levaduras en bolsa periodontal, pero esto podría deberse a lo acotado de la población estudiada en nuestro trabajo.

Mujica y col (81) investigaron la prevalencia y distribución de *Candida* spp en distintos tejidos, en una población de Argentina de hombres y mujeres de amplio rango de edad que hubieran presentado signos y síntomas compatibles con micosis, y encontraron proporciones similares a las halladas en este trabajo con respecto a la distribución de diferentes especies de *Candida* en mucosa oral y digestiva, con *C. albicans* siendo la especie de mayor prevalencia. Al respecto observan que “La prevalencia del género *Candida* en mucosa oral se encuentra en paulatino aumento, debido a múltiples factores del huésped (...)” (Mujica y col, 2004).

Comparando los resultados de prevalencia y distribución de especies en surcos periodontales con los surcos gingivales estudiados en el trabajo de Jewtuchowicz, Brusca et al. 2007 (85), la prevalencia de *C. albicans* es marcadamente superior en todos los casos. Nótese que en el mencionado trabajo de Jewtuchowicz el número de especies de levaduras encontradas en salud es bajo y hay también menor diversidad. A mayor tamaño de la muestra, mayor es la diversidad de especies encontradas y por lo tanto el porcentaje de *C. albicans* disminuye proporcionalmente.

Es importante realizar la vigilancia epidemiológica con el fin de conocer la prevalencia de las especies de levaduras en la biopelícula del surco periodontal debido a que constituyen reservorios de microorganismos oportunistas que, en situaciones clínicas particulares, como

en pacientes con deficiencias de su sistema inmunológico, participarían en enfermedades tales como candidiasis bucal y enfermedades diseminadas. (86, 87, 88, 89, 90, 91, 92)

Al comparar la distribución de levaduras según los indicadores clínicos de periodontitis, se observó que en las pacientes con estadios 2 y 3 de enfermedad periodontal la colonización de levaduras en las bolsas periodontales fue de 48% mientras que en estudios que relevan la presencia de levaduras en los surcos de pacientes sanos fue de entre 3.8% y 36% (72, 85). Estos hallazgos sugieren que *Candida* spp encontraría un nicho ecológico favorable para su crecimiento, tanto en sitios con o sin enfermedad, con una leve preferencia por los sitios con enfermedad.

#### 7.4 Distribución de levaduras según distintos parámetros

En cuanto a la prevalencia de levaduras según la rehabilitación protética, pacientes con prótesis fija (n=15) presentaron una prevalencia de levaduras de 46.7% (7/15), mientras que de las pacientes rehabilitados con prótesis removibles (n=14) presentaron portación de levaduras de 50% (7/14) ( $p < 0.05$ ).

Estos hallazgos permiten inferir que la placa periodontal es un nicho ecológico favorable para el desarrollo de especies de levaduras y en especial en casos de rehabilitación removible que a pesar de presentar la posibilidad de retirarlos para higienizar por parte del paciente, están constituidos en acrílico, material que ofrece más adhesión a las especies de *Candida*.

Es conocido que nichos artificiales como aditamentos de ortodoncia (brackets, alambres) o prótesis dental aumentan la portación de levaduras en mucosa bucal. El uso de aparatología bucal induce alteraciones dentro de la cavidad bucal. (93, 94, 95) mostraron que la presencia de prótesis u otro aditamento bucal, incrementa el número de *Candida*, no solo en el sitio ocluido sino en toda la mucosa. Las prótesis dentales están confeccionadas con resinas acrílicas, en las que en defectos de la superficie favorecen la formación inicial de placa y, además, evitan su remoción (93). La superficie de la prótesis es muy porosa y por lo tanto es susceptible de ser colonizada por multitud de microorganismos que pueden dar origen a patología en la cavidad bucal.

Existe un gran número de factores involucrados en la adhesión de *Candida* a distintas superficies orales como mucosa o esmalte dentario y distintos polímeros de uso odontológico. Existe evidencia clara que *C. albicans* se adhiere a las superficies bucales, incluyendo aparatología bucal como por ejemplo, de acrílico y mucosa (94). Los mecanismos de adherencia difieren entre las uniones de *Candida* a las superficies inertes bajo controles de

fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas, y la adhesión a la mucosa dependiente de un número de complejos sistemas de reconocimiento de ligandos. Otros factores dentro de la cavidad bucal como la saliva, pH, bacterias y la formación de pseudomicelios han mostrado influenciar la adhesión de las especies de *Candida albicans* a las superficies bucales (93, 95, 97).

Observando los gráficos N° 3 y N° 5 comprobamos lo antedicho cuando comparamos el tipo de prótesis que tenían las pacientes evaluadas en relación con la colonización de levaduras. En las pacientes con prótesis removible había mayor colonización de levaduras y observamos mayor pérdida de nivel de inserción. Si bien los aditamentos bucales pueden alterar la ecología en la cavidad bucal facilitando la adherencia, colonización y retención de levaduras en biopelícula subgingival, no está demostrado aún que estos microorganismos participen activamente de la patogenia de la de la reabsorción ósea relacionada con la pérdida de inserción periodontal.

En nuestro estudio obtuvimos como resultado que el uso de prótesis removibles ( $\eta^2 = 0.084$ ) pueden tener un efecto moderado como factor de riesgo para la colonización de levaduras en surcos periodontales ( $p < 0.05$ ).

El conocimiento de la fuente de infección, la forma de transmisión y puerta de entrada de las infecciones permitirá tomar medidas tendientes a evitar su futura presentación.

Si bien para este trabajo se seleccionaron mujeres inmunocompetentes, son numerosas las ocasiones en las que ellas podrían requerir la instalación de implantes dentales, el uso de prótesis, de catéteres, sondas, sistemas de respiración mecánica y dado que las infecciones por microorganismos oportunistas muchas veces son de origen endógeno, es decir, a partir de la microbiota de cavidad bucal del propio paciente, es fundamental conocer su composición y el comportamiento de estos microorganismos que pueden colonizar e incluso invadir al hospedero, para instaurar, cuando sea necesario, una terapéutica o profilaxis, efectiva y precoz.

## 8. Conclusiones

Las principales conclusiones de este trabajo de Tesis de grado son:

- *Candida albicans* fue la especie predominante tanto en mucosa bucal como en el surco periodontal en pacientes postmenopáusicas
- En ambos sitios estudiados, mucosa bucal y surco periodontal también fueron encontradas otras especies oportunistas como *C. parapsilosis*, *C. kruzei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

- La distribución de especies de levaduras en mucosa bucal y surcos periodontales fue similar.
- La rehabilitación con prótesis afectan moderadamente la colonización de surcos periodontales, transformando el surco en un espacio favorable para la colonización por especies de *Candida*.
- Los estadios de enfermedad periodontal 2 y 3 fueron mejores reservorios de especies de *Candida*, lo cual permite inferir una potencial participación de *Candida* en estadios más avanzados de enfermedad periodontal

## 9. Referencias Bibliográficas

1. Newman MG. Newman and Carranza's Clinical periodontology Ebook. Elsevier Health Sciences; 2018.
2. Newman MG, Dragan IF, Elangovan S, Karan AK, editores. Newman and Carranza's essentials of clinical periodontology: An integrated study companion. Philadelphia, PA: Elsevier - Health Sciences Division; 2021.
3. Lang NP, Berglundh T, Giannobile WV, Sanz M, editores. Lindhe's Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 7th ed. Standards Information Network; 2021.
4. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control: Plaque biofilms and communities. Periodontol 2000 [Internet]. 2011;55(1):16–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00339.x>
5. Marsh PD. Dental Biofilms in Health and Disease. In: Understanding Dental Caries. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 41–52.
6. Quintana SMC, Sjostrom PD, Socarrás DA, Baldeón GMM. Microbiota of oral cavity ecosystems. Rev Cubana Estomatol. 2017;54(1):84-99.
7. Teles, Flavia, et al. "Impact of systemic factors in shaping the periodontal microbiome." Periodontology 2000 85.1 (2021): 126-160
8. Hall MW, Singh N, Ng KF, Lam DK, Goldberg MB, Tenenbaum HC, et al. Inter-personal diversity and temporal dynamics of dental, tongue, and salivary microbiota in the healthy oral cavity. NPJ Biofilms Microbiomes [Internet]. 2017;3(1):2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41522-016-0011-0>

9. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2017;44:S12-22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12679>
10. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease: Inflammatory and immune pathways in periodontal disease. *Periodontol 2000* [Internet]. 2014;64(1):57-80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/prd.12002>
11. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, 2005; 38: 135-187.
12. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-44
13. Badanian A, Bueno L, Papone V. Análisis bacteriano comparativo de cuadros de Periodontitis Crónica y Agresiva en una población muestra de Uruguay. *Odontoestomatología* [Internet]. 2019;21(33):5-13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.22592/ode2019n33a2>
14. Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM Jr, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000* [Internet]. 2016;71(1):22-51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/prd.12110>
15. Suresh Unniachan A, Krishnavilasom Jayakumari N, Sethuraman S. Association between *Candida* species and periodontal disease: A systematic review. *CMM* [Internet]. 28 de junio de 2020; Disponible en: <https://publish.kne-publishing.com/index.php/CMM/article/view/3420>
16. Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2013; 48(4):428 -32.
17. Radunovic M, Barac M, Kuzmanovic P, Pfcic J, Pavlica D, Jovanovic A, Pucar A, et al. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolated from tongue and subgingival biofilm of periodontitis patients. *Antibiotics (Basel)* [Internet]. 2022;11(6):802. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics11060802>
18. Sardi, J. C. O., et al. "In vitro antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from patients with chronic periodontitis and diabetes." *Clin Microbiol* 2 (2013): 103.
19. Zhou Y, Cheng L, Lei YL, Ren B, Zhou X. The interactions between *Candida albicans* and mucosal immunity. *Front Microbiol* [Internet]. 2021;12:652725. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.652725>

20. Oka, Iori, Hideo Shigeishi, and Kouji Ohta. "Co-Infection of Oral *Candida albicans* and *Porphyromonas gingivalis* Is Associated with Active Periodontitis in Middle-Aged and Older Japanese People." *Medicina* 58.6; 2022: 723.
21. Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. *Med Mycol* [Internet]. 2017;56(6):653-67. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myx111>
22. L Rodríguez M. The Oral Cavity: A Reservoir that Favors Colonization and Selection of *Candida parapsilosis sensu stricto* Strains with High Pathogen Potential Under Conditions of Gingival-periodontal Disease. *J Dent Sci Ther*. 3 de enero de 2018;2(1):1-9.
23. Peters BA, Wu J, Hayes RB, Ahn J. The oral fungal mycobiome: characteristics and relation to periodontitis in a pilot study. *BMC Microbiol*. 12 de julio de 2017;17(1):157.
24. Gutiérrez-Romero, Fabiola, et al. "Análisis Microbiológico del Fluido Crevicular para Determinar Presencia de *Candida albicans* en Bolsas Periodontales de Sujetos Adultos." *International journal of odontostomatology* 16.1 (2022): 1-6.
25. Slazhneva E, Tikhomirova E, Tsarev V, Orekhova L, Loboda E, Atrushkevich V. *Candida* species detection in patients with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Dent Res* [Internet]. 2022; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cre2.635>
26. Holmstrup P, Damgaard C, Olsen I, Klinge B, Flyvbjerg A, Nielsen CH, et al. Comorbidity of periodontal disease: two sides of the same coin? An introduction for the clinician. *Journal of Oral Microbiology*. 1 de enero de 2017;9(1):1332710.
27. Reynaud HA, Mostby Nygaard B, Bygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol*. 2001;28:860–864.
28. De-La-Torre J, Quindós G, Marcos-Arias C, Marichalar-Mendia X, Gainza ML, Eraso E, et al. Oral *Candida* colonization in patients with chronic periodontitis. Is there any relationship? *Revista Iberoamericana de Micología*. julio de 2018;35(3):134-9.
29. As U, Guru SS, Batra S. *Candida* species in periodontal disease: A literature review. *IP International Journal of Periodontology and Implantology*. 15(2020):124–9.
30. Sztukowska MN, Dutton LC, Delaney C, Ramsdale M, Ramage G, Jenkinson HF, et al. Community Development between *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans* Mediated by InlJ and Als3. *mBio* [Internet]. 24 de abril de 2018 [citado 16 de

febrero de 2022]; Disponible en:

<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/mBio.00202-18>

31. Jabri B, Iken M, Achmit M, Rida S, Ennibi OK. Occurrence of *Candida albicans* in Periodontitis. *International Journal of Dentistry*. 29 de mayo de 2021;2021:e5589664.
32. Ardila Medina CM, López Gaviria ME, Guzmán Zuluaga IC. Prevalencia de *Cándida* y asociación con periodontopatógenos presentes en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica. *Avances en Periodoncia*. diciembre de 2014;26(3):129-34.
33. Lafuente-Ibanez de Mendoza I, Cayero-Garay A, Quindós-Andrés G, Aguirre-Urizar JM. A systematic review on the implication of *Candida* in peri-implantitis. *International journal of implant dentistry*. 2021 Dec;7(1):1-9.
34. Rosa EA, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, da Silva WJ, Yau JY, Samaranayake LP. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*. 2008 Oct 1;57(10):1277-81.
35. Montelongo-Jáuregui D, Lopez-Ribot JL. *Candida* interactions with the oral bacterial microbiota. *Journal of fungi*. 2018 Nov 3;4(4):122.
36. Wall G, Montelongo-Jauregui D, Bonifacio BV, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 2019 Dec 1;52:1-6.
37. Young T, Alshanta OA, Kean R, Bradshaw D, Pratten J, Williams C, Woodall C, Ramage G, Brown JL. *Candida albicans* as an essential “keystone” component within polymicrobial oral biofilm models?. *Microorganisms*. 2020 Dec 28;9(1):59.
38. Tonetti MS, Van Dyke TE, working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol* [Internet]. 2013;84(4 Suppl):S24-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2013.1340019>
39. Otomo-Corgel J, Pucher JJ, Rethman MP, Reynolds MA. State of the science: chronic periodontitis and systemic health . *J Evid Based Dent Pract*. 2012; 12: 20–28.
40. Scannapieco FA, Cantos A. Oral inflammation and infection, and chronic medical diseases: implications for the elderly. *Periodontol 2000* . 2016; 72: 153–175.
41. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J* [Internet]. 2019;42(1):27-35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>
42. Pussinen PJ, Jousilahti P, Alfthan G, Palosuo T, Asikainen S, Salomaa V. Antibodies to periodontal pathogens are associated with coronary heart disease. *Arterioscler*

Thromb Vasc Biol [Internet]. 2003;23(7):1250–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000072969.71452.87>

43. Ebersole JL, Stevens J, Steffen MJ, Dawson D Iii, Novak MJ. Systemic endotoxin levels in chronic indolent periodontal infections. *J Periodontal Res* [Internet]. 2010;45(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01169.x>
44. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. junio de 2017;11(2):72-80.
45. Paquette DW. The periodontal infection-systemic disease link: a review of the truth or myth. *J Int Acad Periodontol*. julio de 2002;4(3):101-9.
46. Teles F, Collman RG, Mominkhan D, Wang Y. Viruses, periodontitis, and comorbidities. *Periodontol 2000*. 2022 Jun;89(1):190-206. doi: 10.1111/prd.12435. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35244970.
47. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang H-L. Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol*. 2003;30(8): 671–81. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2003.00055.x>
48. Sankari, S. Leena, et al. "Sex Hormones: Its Impact on Women's Oral Health—A Review." *Indian Journal of Public Health Research & Development* 10.8 (2019).
49. Akcalı A, Akcalı Z, Batool F, Petit C, Huck O. Are Sex Steroid Hormones Influencing Periodontal Conditions? A Systematic Review. *Curr Oral Health Rep*. 1 de marzo de 2018;5(1):33-8.
50. Ciesielska A, Kusiak A, Ossowska A, Grzybowska ME. Changes in the Oral Cavity in Menopausal Women—A Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. enero de 2022;19(1):253.
51. Bidyasagar Bal SC, Oberoi SS, Dalai RP, Sethy S. Hormonal Changes Across the Life Cycle of Women and its Effects on the Periodontium. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*. 2020 Oct 1;14(4).
52. Haas AN, Rösing CK, Oppermann RV, Albandar JM, Susin C. Association among menopause, hormone replacement therapy, and periodontal attachment loss in southern Brazilian women. *J Periodontol*. 2009;80:1380–7.
53. Karsenty G. The mutual dependence between bone and gonads. *J Endocrinol*. 2012;213(2):107–14. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0452>.
54. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal

- women. *J Periodontol* [Internet]. 2000;71(9):1492-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2000.71.9.1492>
55. Sophia K, Suresh S, Sudhakar U, Jayakumar P, Mathew D. Comparative analysis of salivary alkaline phosphatase in post menopausal women with and without periodontitis. *J Clin Diagn Res*. 2017;11:122–4.
  56. Sathish, Akanksha Kidiyur, Jothi Varghese, and Aldridge Jose Fernandes. "The Impact of Sex Hormones on the Periodontium During a Woman's Lifetime: a Concise-Review Update." *Current Oral Health Reports*. 2022: 1-11.
  57. Sánchez A. Asociación de periodontitis y osteoporosis. *Revista Médica de Rosario*. 2020;86(3):168-168.
  58. Hambire, Chaitali, and Umesh Hambire. "Oral Health Care and Treatment Needs in Postmenopausal Women." *Journal of Oral Health and Community Dentistry* 15.1 (2021).
  59. Shah KK. Survey on Relation between Menopause and Oral Health. *Rese Jour of Pharm and Technol*. 2015;8(8):1150.
  60. Friedlander AH. The physiology, medical management and oral implications of menopause. *The Journal of the American Dental Association*. 1 de enero de 2002;133(1):73-81.
  61. Soliman AI, LaMonte MJ, Hovey KM, McSkimming DI, Andrews CA, Diaz PI, Buck MJ, Sun Y, Millen AE, Wactawski-Wende J. Relationship between the subgingival microbiome and menopausal hormone therapy use: The buffalo OsteoPerio study. *Journal of Periodontology*. 2022 May 9.
  62. Singh, Malvika, et al. "Periodontal status in pre-and post-menopausal women: A review." *Asian Pac J Health Sci* 5 (2018): 2-26.
  63. Mariotti A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med* [Internet]. 1994;5(1):27–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/10454411940050010201>
  64. Han, K.I., Y.R. Seo, B.B. Patnaik, H.J. Kwon, E.G. Jung, K.W. Nam, W.J. Kim, J.S. Lee and M.D. Han: A preliminary study on bacterial composition in the subgingival plaque of woman with periodontitis during pregnancy and menopause. *J. Environ. Biol.*, 41, 711-717. 2020.
  65. Kumar PS. Sex and the subgingival microbiome: Do female sex steroids affect periodontal bacteria? *Periodontology* [Internet]. 2000;61(1):103–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00>

66. Saleh S, Sarhat E, Ali N. Determination of some Biochemical Marker in Postmenopausal Women with Chronic Periodontitis. Prensa Med Argent [Internet]. 2020; Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Entedhar-Sarhat/publication/344054367\\_Determination\\_of\\_some\\_Biochemical\\_Marker\\_in\\_Postmenopausal\\_Women\\_with\\_Chronic\\_Periodontitis/links/60c6677ba6fdcc2e6140374c/Determination-of-some-Biochemical-Marker-in-Postmenopausal-Women-with-Chronic-Periodontitis.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Entedhar-Sarhat/publication/344054367_Determination_of_some_Biochemical_Marker_in_Postmenopausal_Women_with_Chronic_Periodontitis/links/60c6677ba6fdcc2e6140374c/Determination-of-some-Biochemical-Marker-in-Postmenopausal-Women-with-Chronic-Periodontitis.pdf)
67. INDEC - Composición y Distribución de la Población Argentina [Internet]. Disponible en: <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Nivel4-Tema-2-18-77>
68. Buenos Aires Ciudad, GCBA, Comuna 4 - Consultas. Disponible en <https://www.estadisticaciudad.gob.ar/eyc/?p=46917>
69. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935. PMID: 29926489.
70. Casas A. Nueva clasificación de enfermedades periodontales y periimplantarias. *Revista el dentista moderno*. 2020:28-41.
71. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, Coccola C, Cifuentes V. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Cándida albicans* and *Cándida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol*. 2008; 46:783-793.
72. Jabri B, Iken M, Ait-Ou-Amar S, Rida S, Bouziane A, Ennibi OK. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in Periodontitis in Adolescents and Young Adults. *Int J Microbiol*. 2022 Jan 11;2022:4625368. doi: 10.1155/2022/4625368. PMID: 35058983; PMCID: PMC8766183.
73. Jewtuchowicz VM, Brusca MI, Mujica MT, Gliosca LA, Finquelievich JL, Lovannitti CA, Rosa AC. Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with dental devices. *Acta Odontol Latinoam*. 2007; 20:17-22.
74. Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Cándida* vary as function of host age. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34:2246-2254.

75. OMS. Desinfección y esterilización en Manual de Bioseguridad en el laboratorio. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. 3ra edición. 2005. ISBN: 9243546503 pp 73-103
76. Jitsurong S, Kiamsiri S, Pattararangrong N. New milk médium for germ tuve and chlamydoconidia production by *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 1993; 123:95-98.
77. Beighton D, Ludford R, Clark DT, et al. Use of CHROMagar *Candida* médium for isolation of yeasts from dental samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33:3025-3027.
78. Odd FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation médium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. . *Journal of Clinical Microbiology* . 1994; 32:1923-1929.
79. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M,. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Diseases*. 2004; 10:106-112.
80. Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. . *Oral Microbiology and Immunology* . 1990; 5:305-308.
81. Mujica MT, Finkelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannitti CA. [Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999-2001]. . *Revista Argentina de Microbiología* . 2004; 36:107-112.
82. Da Costa KR, Ferreira JC, Komesu MC, Candido RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: Quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia*. 2009;167:73-9.
83. Kutsyk RV, Pavliuk TD. Investigation of quantitative and species composition and antifungal drug susceptibility of yeasts isolated from patients wit generalized periodontitis complicated by candidosis. *Mikrobiol Z*. 2003; 65:26-29.
84. Jewtuchowicz V, Mujica MT, Malzone MC, Cuesta A, Nastri ML, Iovannitti CA and Rosa AC. Genetic relatedness of subgingival and buccal *Candida dubliniensis* isolates in immunocompetent subjects assessed by RAPD-PCR. *Journal of Oral Microbiology* 2009. DOI:10.3402/jom.v1i0. 2003.
85. Jewtuchowicz VM, Brusca MI, Mujica MT, Gliosca LA, Finkelievich JL, Lovannitti CA, Rosa AC. Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. *Acta Odontologica Latinoamericana: AOL*. 2007 Jan 1;20(1):17-22.

86. Yu J, Zhang M, Wang JL, et al. *Cándida* species distribution in the patients with high risk of deep fungal infections and relevant risk factors: a prospective cohort study. . *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* . 2007; 87:2991-2993.
87. Tadec L, Talarmin JP, Gastinne T, Bretonnière C, Miegerville M, Le Pape P, Morio F. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses*. 2016 May; 59(5):296-303. doi: 10.1111/myc.12470. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26806101.
88. Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, Delbos V, Parot E, Marot-Leblond A, Moalic E, Flohic AML, Brangerd B. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *JMedMicrobiol*. 2006 Feb;55(Pt2):223-228. doi: 10.1099/jmm.0.46155-0. PMID: 16434716.
89. Bassetti M, Peghin M, Carnelutti A, Righi E, Merelli M, Ansaldi F, Trucchi C, Alicino C, Sartor A, Wauters J, Lagrou K, Tascini C, Menichetti F, Mesini A, De Rosa FG, Lagunes L, Rello J, Colombo AL, Vena A, Munoz P, Tumbarello M, Sganga G, Martin-Loeches I, Viscoli C. Invasive *Candida* Infections in Liver Transplant Recipients: Clinical Features and Risk Factors for Mortality. *Transplant Direct*. 2017 Apr 18;3(5):e156. doi: 10.1097/TXD.0000000000000673. PMID: 28573191; PMCID: PMC5441987.
90. Rubio NA, Puia S, Toranzo S, Brusca MI. Fungal invasion of connective tissue in patients with gingival-periodontal disease. *Rev Iberoam Micol*. 2015 Jan-Mar;32(1):20-4. Spanish. doi: 10.1016/j.riam.2012.07.002. Epub 2012 Jul 21. PMID: 22824245.
91. Zakaria MN, Furuta M, Takeshita T, Shibata Y, Sundari R, Eshima N, Ninomiya T, Yamashita Y. Oral mycobiome in community-dwelling elderly and its relation to oral and general health conditions. *Oral Dis*. 2017 Oct;23(7):973-982. doi:10.1111/odi.12682. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28419681
92. Jain M, Shah R, Chandolia B, Mathur A, Chauhan Y, Chawda J, Mosby S, Bhagalia S. The Oral Carriage of *Candida* in Oral Cancer Patients of Indian Origin Undergoing Radiotherapy and/or Chemotherapy. *J Clin Diagn Res*. 2016 Feb;10(2):ZC17-20. doi: 10.7860/JCDR/2016/15702.7180. Epub 2016 Jan 2. PMID: 27042578; PMCID: PMC4800644.
93. Verran J., Maryan C.J. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* . 1997; 77: 535-9.

94. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida Krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. . *APMIS* . 1995; 103:707-713.
95. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part I. Factors influencing distribution of *Cándida* species in the oral cavity. *Aust Dent J* . 1998; 43:45-50.
96. Pereira CA, Domingues N, Araújo M, Junqueira JC, Back-Brito GN, Olavo Cardoso JA. Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.014
97. Addy M, Shaw WC, Hansford P, Hopkins M. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. *British Journal of Orthodontics*. 1982; 9:158-163
98. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. . *J Clin Microbiol*. 2001;39:2971-4.
99. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* . 2004; 38:161-189.  
Kumamoto, C.A. *Candida* biofilms. . s.l. : *Curr. Opin. Microbiol*. 2002;5, 608–611.
100. Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. . *J Med Microbiol* . 2007;56:1393-8.
101. Costa F, Manaia CM, Figueiral MH, Pinto E. Genotypic analysis of *Candida albicans* isolates obtained from removable prosthesis wearers. . *Lett Appl Microbiol*. 2008; 46:445-449.
102. Song X, Eribe ER, Sun J, Hansen BF, Olsen I. Genetic relatedness of oral yeasts within and between patients with marginal periodontitis and subjects with oral health. *J Periodontal Res*. 2005; 40:446-452.
103. Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Kirkpartrick WR, Perea S, Patterson TF. Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. .*Rev Iberoam Micol* . 2000; 17: 49-54.
104. Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, Madden JF, Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. . *Journal of Clinical Microbiology* . 1999; 37:3835-3843.

105. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindós G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses*. 2011;54:10-6.
106. Fidel PL Jr., Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12:80-96.
107. Redding SW, Kirkpatrick WR, Dib O, Fothergill Aw, Rinakli MG, Patterson TF. The epidemiology of non-*albicans* *Candida* in oropharyngeal candidiasis in HIV patients. *Spec Care Dentist*. 2000; 20:178-181.
108. Westbrook SD, Kirkpatrick WR, Freytes CO, Toro JJ, Bernardo S, Patterson TF, Redding SW, Lee SA. *Candida Krusei* sepsis secondary to oral colonization in a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Med Mycol*. 2007; 45:187-190.
109. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 20:133-163.

## 10. Anexos

### 10.1 Anexo I: Formulario de consentimiento informado

Las pacientes involucradas para participar en el trabajo de investigación: “Evaluación de la presencia de especies de *Candida* spp. en las bolsas periodontales de pacientes peri y post-menopáusicas.”, fueron citadas en el consultorio de las Od Elba Beatriz Secreto y Od Claudia Liliana Secreto, cito en el barrio de Parque de los Patricios, Comuna 4, C.A.B.A, donde habitualmente se atienden.

#### A .Propósito y Antecedentes

Se estudiará la presencia de microorganismos en su boca. Ud. colaborará con este estudio permitiendo que con un pequeño instrumental se le extraiga material para realizar un estudio micológico relacionado con la presencia del implante. En caso de encontrar esos microorganismos, se lograrán establecer mejores tratamientos en el futuro.

## B. Procedimientos que se le aplicarán

Para participar en este estudio usted no debe haber tomado antibióticos en las últimas tres semanas, ni haber recibido tratamiento periodontal en los últimos seis meses y completará un cuestionario sobre su Historia Médica que no le demandará más de diez minutos.

Previo a la sesión de toma de material se le medirán indicadores clínicos con sonda periodontal para ver si su encía sangra.

Para su atención se aplicarán las normas de bioseguridad en vigencia Resol (CD) N°897/05 como uso de guantes, barbijo, babero y vasos descartables e instrumental debidamente esterilizado y controlado. Este examen demandará aproximadamente cinco minutos.

**Colección de la muestra:** Antes de iniciar la toma de material se acondicionará su boca eliminando la placa dental, si la hubiera.

Se tomará una pequeña muestra con cureta periodontal, que es la misma clase de cureta que se utiliza para tratar la enfermedad periodontal. La misma demandará aproximadamente otros diez minutos.

A partir de este momento los datos obtenidos y las muestras señaladas serán identificados con un código, quedando así su identidad protegida.

## C. Riesgos y molestias

La recolección de índices es poco probable que produzca alguna molestia ya que se realiza con sonda de presión controlada, evitando así fuerzas excesivas y /o lesión de sus tejidos gingivales.

La toma de la muestra ocasionará una pequeña molestia. Si su encía es fibrosa, no habrá sangrado. Si su encía es edematosa presentará sangrado, similar al que presenta al cepillar sus dientes; en este caso se colocará, si fuese necesario, un hemostático local.

## D. Confidencialidad

Su nombre no se publicará en ningún documento, informe o publicación resultante de este estudio.

Los archivos con sus datos se guardarán bajo estricta confidencialidad, sólo los doctores que intervienen en ésta investigación tendrán acceso a la información. Se usarán códigos de identificación.

#### E. Beneficios

Se espera que la información obtenida a través de este estudio permita un mejor diagnóstico de las enfermedades de la encía y de los tejidos de soporte dentarios ya que este trabajo permitirá obtener nuevos datos acerca del origen de dichas lesiones.

Esta información puede llevar a importantes avances en el tratamiento de la enfermedad periodontal, que podría contribuir a un tratamiento más efectivo de dicha enfermedad.

#### F. Consideraciones financieras

Usted no pagará por ninguno de los procedimientos del estudio, de la toma de muestras o pruebas de laboratorio asociadas a esta investigación. Tampoco recibirá pago o beneficio financiero.

#### G. Preguntas

Si tiene algún tipo de pregunta podrá comunicarse con la Odontóloga Elba Beatriz Secreto, en el mismo consultorio donde ha sido atendida y donde se tomaron las muestras, o con la Dra. Jewtuchowicz Virginia Marta, Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, TEL 4950 9500 (Área Micología Piso 11). De lunes a viernes de 8.00 a 14.00 horas.

La participación en esta Investigación es voluntaria. Usted tiene derecho a declinar su participación o retirarse en cualquier momento de este estudio. Su retiro no influirá en su atención como paciente.

Si Ud. ha comprendido esta explicación y está de acuerdo en participar en este estudio, Ud. y un testigo acompañante pueden firmar a continuación.

----- Nombre y Apellido	----- Fecha
----- Firma del paciente	----- Fecha
----- Nombre y Apellido del Testigo	----- Fecha

-----

Firma del Testigo

-----

Fecha

10.2 Anexo II: Ficha de recolección de datos personales y clínicos generales de los pacientes

<u>Historia Clínica</u>	
<b>Datos Personales</b>	
Apellido(s) y Nombre(s) _____	
Tipo y Número de documento _____	Sexo _____
Domicilio _____	
Localidad _____	Teléfono/celular _____
Lugar y Fecha de Nacimiento _____	
Ocupación _____	
<b>Antecedentes Familiares de Salud General</b>	
_____	
_____	
_____	
<b>Antecedentes Personales de Salud General</b>	
Diabetes ____ Tipo ____ HTA ____ Hipota ____ Hipotiroidismo ____ Hipertiroidismo ____	
Alergias _____	
Enf. Cardíacas _____	
Enf. Renales _____	
Enf. Hepáticas _____	
Enf. Oncológicas _____	
<b>Enf. Infectocontagiosas</b>	
HIV ____ Hepatitis ____ Chagas ____ Sífilis ____ Tuberculosis ____ ETS ____ Otras _____	
Afecciones de la coagulación _____	
Afecciones neurológicas _____	
Asma _____ EPOC _____ Otras af. Respiratorias _____	
Embarazos _____ Anticonceptivos _____ Lactancia _____ Emb. actual _____	
Úlcera gastroduodenal ____ Otras _____	
_____	
_____	
<b>Medicación</b>	
_____	
_____	
_____	
Indicada por: _____	
<b>Hábitos</b>	
Tabaco ____ Cigarrillos por día ____ Tiempo de evolución ____ Otros _____	
Alcohol ____ Vasos por día ____ Tipo de bebida _____	
Drogas _____	
Onicofagia ____ Tiempo de evolución ____ Otros hábitos _____	
_____	
_____	
<b>Otra Información</b>	
_____	
_____	
Obra Social/Prepaga _____ Nro _____	
_____	



#### 10.4 Anexo IV: Medios de Cultivos y Soluciones

<b>Agar Sabouraud glucosado</b>	
Glucosa	40 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Mezclar los componentes y fundir en baño María. Esterilizar a 121° C, 15 min.

<b>Agar Leche-Tween 80</b>	
Agar agar	2 g
Tween 80	1 ml
Agua destilada	100 ml

Mezclar los componentes y esterilizar a 120°C, 20 min. Enfriar a 56° C y agregar 1 ml de leche descremada estéril.

<b>Agar Staib</b>	
Glucosa	1 g
Creatinina	0.75 g
Agar agar	18 g
Extracto de semillas de alpiste negro*	359 ml

Ajustar a pH 7 con NaOH 1N. Disolver todos los ingredientes calentando hasta disolución del agar. Distribuir 7 ml por cada tubo. Autoclavar a 115° C, 15 minutos.

\*Extracto de semilla de alpiste negro: Pulverizar las semillas de girasol, pesar 70 g y colocarlo en 350 ml de agua destilada. Hervir 5 minutos. Filtrar por gasa. Distribuir en frascos.

Autoclavar 15 min a 115° C. Mantener en la heladera hasta su uso.

<b>Caldo YPD</b>	
Extracto de levadura	1%
Glucosa	2%
Peptona de carne	2%
Agua destilada	100 ml