



Eficacia del propóleo mexicano de *Apis mellifera* en el tratamiento de la estomatitis protésica. Ensayo clínico controlado aleatorizado

Emiliano Jurado Castañeda,* Carla Monserrat Ramírez Martínez,* Liborio Carrillo Miranda,§ Arceo Sandra Díaz-Barriga,¶ Israel Adair Cabrera Contreras,|| Javier Portilla Robertson**

* Adscrito al Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología.

§ Jefe del Módulo de Apicultura y adscrito al Centro de Enseñanza Agropecuaria Campo Cuatro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

¶ Investigadora del Departamento de Ciencias Biológicas Campo Uno de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

|| Adscrito al Centro de Enseñanza Agropecuaria Campo Cuatro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

** Coordinador del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología.

Universidad Nacional Autónoma de México.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la eficacia terapéutica del gel de propóleos mexicanos a 1.5% comparado con el miconazol gel a 2% (Daktarin®) en el tratamiento de la estomatitis protésica (EP). **Material y métodos:** Se realizó un ensayo clínico controlado aleatorizado doble ciego en una muestra de 58 pacientes con EP según la escala de Newton. La muestra fue dividida por muestreo aleatorio simple en dos grupos: «miconazol» (N = 30) y «propóleos» (N = 28). Se determinó la incidencia acumulada (IA) y el riesgo relativo (RR) de la resolución de EP. **Resultados:** Los resultados no mostraron significancia estadística ($p < 0.05$) ya que el gel de propóleos mexicanos tuvo una eficacia similar (IA = 80%) al miconazol (IA = 89.2%) en la resolución clínica de EP. En todos los casos hubo ausencia total de colonias de *Candida sp* al finalizar la intervención. **Conclusiones:** El gel de propóleos mexicanos demostró poseer potencial para el tratamiento de la EP; sin embargo, se requieren nuevos estudios para evaluar el rol que juegan otras variables como el flujo salival, así como el estado y tipo de prótesis.

Palabras clave: Propóleos mexicanos, estomatitis protésica, *Candida sp*, miconazol, ensayo clínico.

Recibido: Septiembre 2019. Aceptado: Octubre 2021.

Citar como: Jurado CE, Ramírez MCM, Carrillo ML, Díaz-Barriga AS, Cabrera CIA, Portilla RJ. Eficacia del propóleo mexicano de *Apis mellifera* en el tratamiento de la estomatitis protésica. Ensayo clínico controlado aleatorizado. Rev Odont Mex. 2021; 25 (3): 204-214.

© 2021 Universidad Nacional Autónoma de México, [Facultad de Odontología]. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam

INTRODUCCIÓN

La estomatitis protésica (EP) es una forma crónica de infección por *Candida albicans* (*C. albicans*) que afecta la mucosa alveolar y palatina en portadores de prótesis dentales removibles (PDR) con una prevalencia de 70%.^{1,2} La higiene nula o deficiente, así como el contacto por largos periodos con la mucosa son las principales causas asociadas a EP^{1,3} donde *C. albicans* encuentra las condiciones para provocar infección localizada.⁴⁻⁸ El tratamiento se basa en la estandarización de medidas higiénicas posterior al diagnóstico,⁹ además de antimicóticos como nistatina en suspensión o miconazol en gel (Daktarin® gel).^{2,10} Este último es utilizado desde hace 40 años con resultados favorables.¹¹ Sin embargo, se han descrito fracasos en la terapia antifúngica,^{2,12} por lo que es necesario investigar sobre nuevas alternativas.

El propóleo es una fitomedicina con propiedades terapéuticas,⁷ incluso es sujeto de investigación en el campo odontológico como un agente útil en materiales dentales por su potencial analgésico y biocida.^{7,8} Es una resina natural con una variedad de propiedades biológicas desarrollada por abejas de la especie *Apis mellifera* para protección de la colmena¹² y posee actividad antifúngica, motivo por el cual se ha utilizado en investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo* en el manejo terapéutico de infecciones micóticas.¹²⁻¹⁵ México posee zonas donde el propóleo tiene las propiedades biológicas necesarias para su apli-

cación como un agente natural alternativo en el tratamiento de EP.^{12,16} En nuestro conocimiento, no hay investigaciones sobre su eficacia terapéutica de uso clínico en nuestro país, por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar la eficacia terapéutica de un preparado en gel de propóleos mexicanos a 1.5% en el tratamiento de la EP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo clínico controlado aleatorizado paralelo doble ciego en hombres y mujeres de 40 a 60 años portadores de PDR con diagnóstico clínico de EP evaluados en la Clínica de Medicina Bucal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación Facultad de Odontología Universidad Nacional Autónoma de México (DEPeI FO UNAM) en un periodo comprendido de agosto del año 2016 a febrero del año 2017. Los voluntarios debieron ser portadores de PDR parcial o total de acrílico, metal acrílico, o de nylon (flexibles) sin importar el tiempo de vida útil y que enfáticamente siguieran los hábitos y medidas higiénicas recomendadas. Previamente, la presente

investigación fue avalada y aprobada por el comité de bioética de la FO UNAM. Fue indispensable la entrega de una hoja de información acerca de las ventajas y desventajas de ambas terapias, así como la firma de un consentimiento informado para la participación voluntaria de los potenciales candidatos. Por otro lado, fueron excluidos los candidatos que presentaron enfermedad sistémica descompensada, tratamiento antimicótico en el último mes, también aquéllos con periodontitis crónica, inmunodeprimidos, así como a aquellas personas con antecedentes de alergias frecuentes o sensibles al propóleo.

Se evaluó clínicamente la cavidad bucal para identificar eritema asociado a EP mediante la escala Newton¹⁷ (grado III = hiperplasia papilar, grado II = eritema generalizado, grado I = eritema leve/focal y 0 = ausencia). Paralelamente, a cada voluntario seleccionado se le tomó una muestra mediante un hisopo estéril; este fue deslizado sobre la mucosa afectada y subsecuentemente fue sumergido en un tubo de ensayo con infusión cerebro-corazón y colocado durante 36 horas en estufa de cultivo microbiológico a 37 °C. Después con un asa se tomó de la zona turbia

Tabla 1: Resumen basal (t0) de las principales variables estudiadas en la muestra de forma global y entre los grupos posterior a la aleatorización.
Baseline summary (t0) of the main variables studied in the sample globally and between groups after randomization.

Variables (t0)	Propóleos, N = 28 n (%)	Miconazol, N = 30 n (%)	Total, N = 58 n (%)
EP Newton			
Grado I	13 (46.4)	13 (43.3)	26 (44.8)
Grado II	15 (53.1)	17 (56.7)	32 (55.2)
<i>Candida sp</i> (SDC)			
1-9 colonias	8 (28.6)	9 (30.0)	17 (29.3)
10 a 100 colonias	13 (46.4)	13 (43.3)	26 (44.8)
Más de 100 colonias	5 (17.9)	4 (13.3)	9 (15.5)
Incontable	2 (7.1)	4 (13.3)	6 (10.3)
Flujo salival			
FSN	21 (75.0)	23 (76.7)	44 (75.9)
FSBo	7 (25.0)	7 (23.3)	14 (24.1)
Estabilización prótesis			
Sin maniobra	16 (57.1)	18 (60.0)	34 (58.6)
Pulido	6 (21.4)	6 (20.0)	12 (20.7)
Rebase/pulido	4 (14.3)	2 (6.7)	6 (10.3)
Inmediata	2 (7.1)	4 (13.3)	6 (10.3)
Material protésico			
Base acrílica rígida	14 (50.0)	13 (43.3)	27 (46.5)
Base metálica	4 (14.3)	5 (16.7)	9 (15.5)
Base metal/acrílica	6 (21.4)	7 (23.3)	13 (22.4)
Flexible	4 (14.3)	5 (16.7)	9 (15.5)

t0 = basal, EP = estomatitis protésica, SDC = Sistema de Densidad de Colonias, FSN = flujo salival normal, FSBo = flujo salival bajo.
Fuente directa.

y se sembró en una caja de petri con Agar sabouraud® mediante la técnica de estricción simple para nuevamente ser colocada en estufa de cultivo a 37 °C durante 36 horas. Pasado este tiempo se cuantificaron las colonias de *Candida sp* mediante un cuantificador de colonias. Para ello, nos basamos en el *Sistema de Densidad de Colonias* (SDC: 0 = ausencia, 1 = de uno a nueve colonias, 2 = 10 a 100 colonias, 3 = más de 100 colonias y 4 = incontables) utilizado por Amanlou y colaboradores en el año 2006.¹⁸

Con respecto a las prótesis, se evaluaron aquellas que podían ser estabilizadas en cuanto a su calidad en la superficie, retención y funcionalidad, así como aquellas que debían sustituirse por completo debido al mal estado. La *Tabla 1* resume las maniobras realizadas a las PDR con la finalidad de que todos los voluntarios presentaran las mismas condiciones previo a las intervenciones. Después se determinó el flujo salival basal (FSB) y estimulado (FSE) obtenido a partir de la saliva total por la técnica de escupir.¹⁹ Esto permitió identificar a los participantes con flujo salival normal (FSN), bajo (FSBo) y alto (FSA). Un dato de interés para la presente investigación ya que se presume que un flujo bajo puede ser un factor que desfavorezca la resolución de la EP.

Protocolo de intervención y enmascaramiento

Los voluntarios fueron sometidos a los tratamientos experimental «propóleos» y control «miconazol» durante 21 días. Los fármacos fueron vertidos en cilindros metálicos dosificadores idénticos con capacidad de 200 mL. Para fines de enmascaramiento, cada uno de los cilindros fue colocado en una caja con presentación única, para que los voluntarios y el investigador desconocieran el fármaco al que estaban sometidos. Fue fundamental la entrega de una hoja con instrucciones higiénicas estandarizadas (incluyendo la colocación en solución de bicarbonato durante las noches) y un itinerario posológico para garantizar la aplicación en tiempo y forma. Por otro lado, cada caja fue etiquetada con un color previamente establecido para los dos grupos. Una persona ajena a las intervenciones preestableció el color azul para el grupo «miconazol» y el blanco para el grupo «propóleos».

Finalmente, los voluntarios que cumplieron los criterios de selección fueron ubicados en uno de los grupos siguiendo un orden determinado mediante aleatorización simple con una moneda. Se indicó una posología estándar paralela que consistió en tres aplicaciones al día por diez minutos durante 21 días. Los voluntarios debían distribuir los geles sobre la base

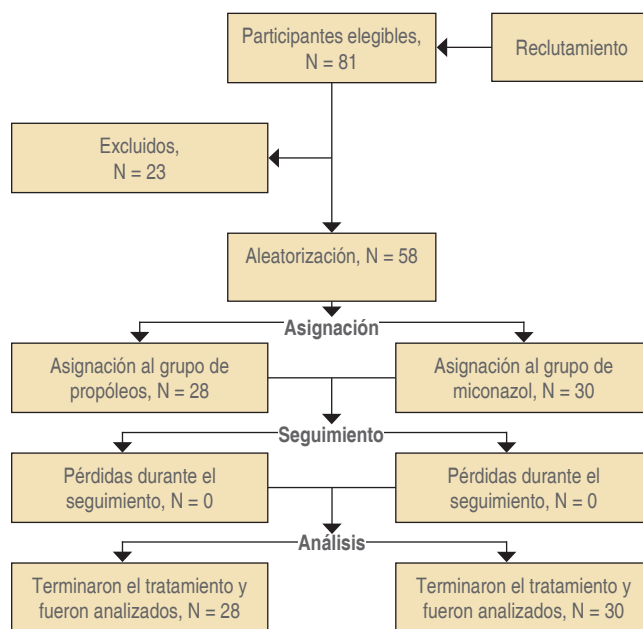


Figura 1: Diagrama CONSORT que muestra el flujo de los 58 participantes hasta que concluyeron el tratamiento.

CONSORT diagram showing the flow of the 58 participants until they concluded treatment.

protésica y posteriormente colocarla en boca. Las mediciones se llevaron a cabo al inicio (t_0), a los siete (t_1), a los 14 (t_2) y a los 21 días (t_3). Al finalizar la administración terapéutica se evidenció el color correspondiente a cada grupo para el análisis estadístico. El gel de propóleos a 1.5% se elaboró *exprofeso* y fue proporcionado por el Departamento de Apicultura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM.

Análisis estadístico

Se realizó un cálculo tamaño de muestra para diferencia de proporciones asumiendo una diferencia del 15%. Para determinar la eficacia del propóleos se estableció una hipótesis de superioridad con un valor de significancia de 0.05 mediante la incidencia acumulada (IA), riesgo relativo (RR) y χ^2 con intervalos de confianza. Lo anteriormente tomando como base el análisis por intención de tratar.

RESULTADOS

En el periodo comprendido entre agosto del año 2016 a enero de 2017 fueron 81 los potenciales candidatos de los cuales se excluyeron 23 debido a que

presentaban algún criterio de exclusión o conocían los beneficios del propóleo. Finalmente, la (n) para el presente estudio fue de 58 participantes (Figura 1).

La Tabla 1 muestra los datos basales de los 58 participantes que constituyeron la muestra total previo, y posterior a ser ubicados en los respectivos grupos. Los casos de EP grado II predominaron con 53.4%, sólo se presentó un caso de grado III (1.7%) incorporándose a este grupo para facilitar el análisis estadístico; por otro lado, se presenta el SDC basal de *Candida sp* en la muestra total y entre los grupos. Con respecto a los resultados basales del FS, 75.8% de los voluntarios fueron identificados con FSN, mientras que 24.1% presentaron FSBo. Los resultados basales relacionados a la estabilización de las prótesis evidenciaron que 58.3% de la muestra total no requirieron maniobra alguna debido al buen estado, mientras que el porcentaje restante requirió ser pulido (20.6%). En ese sentido, 46.6% fueron prótesis de base acrílica rígida. El análisis en t1 reveló una incidencia acumulada (IA) de resolución clínica de EP de 25.05 y 23.3% respectivamente en los grupos del «miconazol» y «propóleos».

La Tabla 2 resume los resultados a los siete días de exposición sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05). En t2 se observó una IA de resolución clínica de 82.1% en el grupo «miconazol» mientras que en el grupo «propóleos» fue de 76.6% teniendo un porcentaje de resolución de 79.3% en la muestra total. En t3 el porcentaje de resolución en el grupo «miconazol» fue de 89.2% mientras que en el grupo «propóleos» fue de 80%. Los resultados muestran que ambos fármacos tienen una eficacia similar sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05/IC 0.71-1.1) que indiquen que el propóleo es inferior al miconazol en la resolución de EP. Por otro lado, los resultados del SDC de *Candida sp* en t3 fueron contundentes con una ausencia total en ambos grupos de intervención.

La Tabla 3 resume los resultados del análisis del FS, la estabilización de prótesis, el tipo de material, sexo y su relación con el resultado final. Es de destacar que 92.8% de los 14 casos con FSBo resolvieron satisfactoriamente en t2 mantenido en t3 el mismo porcentaje sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. Con respecto al material protésico, la-

Tabla 2: Análisis bivariado de estomatitis protésica Newton y del Sistema de Densidad de Colonias de *Candida sp* con los fármacos empleados en los diferentes tiempos establecidos.

Bivariate analysis of Newton denture stomatitis and Candida sp. Colony Density System with the drugs used at the different established times.

EP Newton	Propóleos, N = 28 n (%)	Miconazol, N = 30 n (%)	IA%	Análisis bivariado	IC 95%
(t1)					
Ausencia	7 (25)	7 (23.3)	Miconazol (25.0)	$\chi^2 = 0.02$	(0.43-2.6)
Presencia	21 (75)	23 (76.7)	Propóleos (23.3)	$p = 0.88$ RR = 1.07	
(t2)					
Ausencia	23 (82.1)	23 (76.7)	Miconazol (82.0)	$\chi^2 = 0.26$	(0.82-1.3)
Presencia	5 (17.9)	7 (23.3)	Propóleos (76.0)	$p = 0.60$ RR = 1.07	
(t3)					
Ausencia	25 (89.3)	24 (80)	Miconazol (89.0*)	$\chi^2 = 0.95$	(0.71-1.1)
Presencia	3 (10.7)	6 (20)	Propóleos (80.0)	$p = 0.32$ RR = 1.11	
SDC (t2)					(0.81-1.1)
Ausencia	25 (89.3)	28 (93.3)	Miconazol (89.0)	$\chi^2 = 0.30$	
Presencia	3 (10.7)	2 (6.7)	Propóleos (93.0)	$p = 0.58$ RR = 0.95	
SDC (t3)					
Resolución	28 (100.0)	30 (100.0)	100[‡]	RR = 1	

EP = estomatitis protésica, t1 = a los siete días, t2 = a los catorce días, t3 = a los veintidós días, SDC (t2) = Sistema de Densidad de Colonias a los catorce días, SDC (t3) = Sistema de Densidad de Colonias a los veintidós días, IA = incidencia acumulada, RR = riesgo relativo, IC = intervalo de confianza, p = significancia estadística al 95%. * La IA en t3 mostró una resolución del 89% para el grupo del miconazol y un 80% para el grupo del propóleos. ‡ La decisión de medir el SDC únicamente en t0 y t3 se debió a que no se esperó una tasa de respuesta a ambos fármacos en t1 y t2.

Fuente directa.

Tabla 3: Resultados de la incidencia acumulada y del análisis bivariado global en *t2* y *t3* del flujo salival bajo y normal, estabilización protésica, tipo de material y sexo.
Results of cumulative incidence and global bivariate analysis at t2 and t3 of low and normal salivary flow, prosthetic stabilization, type of material and sex.

	Incidencia Acumulada			Incidencia Acumulada		
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
	Flujo salival bajo (t2)	Flujo salival normal	Análisis bivariado	Flujo salival bajo (t3)	Flujo salival normal	Análisis bivariado
Resolución	13 (92.8)	33 (75)	$\chi^2 = 2.06$ $p = 0.15$ RR = 1.23 IC 95% (0.99-1.6)	13 (92.8)	36 (84.3)	$\chi^2 = 0.987$ $p = 0.32$ RR = 1.10 IC95% (0.62-1.2)
Presencia	1 (7.1)	11 (25)		1 (7.1)	8 (18.1)	
	Estabilización	Sin estabilización	Análisis bivariado	Estabilización	Sin estabilización	Análisis Bivariado
Resolución	30 (88.24)	16 (66.6)	$\chi^2 = 3.98$ p = 0.04* RR = 1.32 IC 95% (0.97-1.8)	31 (91.1)	18 (75)	$\chi^2 = 2.81$ $p = 0.09$ RR = 1.2 IC95% (0.94-1.5)
Presencia	4 (11.7)	8 (33.3)		3 (8.82)	6 (25)	
	Material flexible	Otros materiales	Análisis bivariado	Material flexible	Otros materiales	Análisis bivariado
Resolución	0	46 (93.8)	$\chi^2 = 40.80$ p = 0.000[†] RR = 0 IC 95% = 0	2 (22.2)	47 (95.9)	$\chi^2 = 31.50$ $p = 0.000^*$ RR = 0.23 IC95% (0.06-0.78)
Presencia	9 (100)	3 (6.1)		7 (77.8)[§]	2 (4.0)	
	Base metálica	Otros materiales	Análisis bivariado	Base metálica	Otros materiales	Análisis bivariado
Resolución	8 (88.8%)	6 (12.2%)	$\chi^2 = 24.39$ p = 0.000[†] RR = 7.3 IC 95% (1.2-50)*	9 (100)	40 (81.6)	$\chi^2 = 1.95$ $p = 0.16$ RR = 1.2 IC95% (1.0-1.3)
Presencia	1 (11.1%)	46 (87.7%)		0	9 (18.9)	
	Sexo femenino	Sexo masculino	Análisis bivariado	Sexo femenino	Sexo masculino	Análisis bivariado
Resolución	37 (80.4)	9 (75)	$\chi^2 = 0.17$ $p = 0.67$ RR = 1.07 IC 95% (0.75-1.5)	40 (86.9)	9 (75)	$\chi^2 = 1.04$ $p = 0.308$ RR = 1.15 IC95% (0.82-1.6)
Presencia	9 (19.5)	3 (25)		6 (13.4)	3 (25)	

t2 = a los catorce días, t3 = a los veintidós días, RR = riesgo relativo, IC = intervalo de confianza, p = significancia estadística al 95%. * Material con énfasis en las flexibles, † Las prótesis metálicas en donde hubo resultados significativos, que sugieren que el material podría jugar un rol en el desenlace de la EP dado que el 77.8% de los portadores de PDR con material flexible, aún persistió el eritema. § Finalmente el sexo que predominó fue el femenino sin jugar un rol específico en el desenlace.
Fuente directa.

mó la atención que la prevalencia de eritema en *t3* se mantuvo en siete (77.8%) de nueve casos en aquellos participantes que portaban prótesis dentales flexibles. Los resultados de la estabilización protésica tanto en *t2* como en *t3* mostraron una resolución equivalente con respecto a las que no habían recibido estabilización ($p < 0.05$ /IC95% 0.97-1.7). En cuanto al sexo, fue predominante el femenino sin jugar un rol específico

en el desenlace. Finalmente, ningún participante reportó efectos secundarios e informaron una buena aceptabilidad en ambos tratamientos.

DISCUSIÓN

En nuestro conocimiento, son pocos los estudios que abordan el mecanismo de acción del propóleo

contra *C. albicans*, los resultados de Quintero Mora y colaboradores en el año 2011¹⁶ mostraron que el propóleos mexicano de la región de Cuautitlán Izcalli, Estado de México inhiben los genes ADH1 y PIK1 implicados en la patogénesis de *C. albicans*, motivo por el cual se decidió utilizar el propóleos de esta región, procurando su obtención, procesamiento y control de calidad como lo exige la norma oficial del propóleo (NOM-003-SAG/GAN-2017). Por otro lado, también son escasos los estudios clínicos que demuestran su aplicación para el tratamiento de la EP.²⁰⁻²³ Este ensayo es el primero en su tipo en México y también es el de mayor tamaño muestral ($n = 58$) a diferencia de los estudios previos, cuyas muestras fueron de 45,²⁰ 12,²¹ 30²² y 40²³ participantes con resultados favorables en más de 80% como en nuestro estudio. Nuestra investigación coincidió con las de Santos²¹ y Pina²³ en intervenir a dos grupos de estudio con vehículos similares (gel). En cuanto a la distribución por sexo, fue predominante el sexo femenino con 79.3%, similar a otros estudios²⁰⁻²³ en los que el porcentaje fue de 60, 65, 84.4 y 85% respectivamente; sin embargo, no se identificaron diferencias, por lo que consideramos necesario realizar estudios con una proporción homogénea para poder identificar si existe o no alguna diferencia.

Se seleccionó con especial cuidado a los participantes desde la perspectiva protésica, algo sin precedente, derivado de ello, se identificó que 58.3% de las prótesis se encontraba en buen estado mientras que 41.2% necesitaba estabilización. La alta prevalencia de la EP (70%) en portadores de PDR está asociada a múltiples factores que juegan un rol en su patogenia como son la higiene deficiente y el contacto ininterrumpido con la mucosa;²⁴ sin embargo, se requieren nuevos estudios que describan el probable rol que pudieran desempeñar el estado o condiciones de dichos aparatos en la patogenia de la EP, es por este motivo que se tomó la decisión de estabilizar las prótesis debido a que es indispensable que se encuentren en buen estado para que la eficacia de la terapia antifúngica se realice con éxito en el tratamiento de la EP.^{1,2,24} El éxito del tratamiento de la EP también depende de las medidas higiénicas,^{1,24} por lo que estudios previos optan por estandarizar a los participantes antes de realizar las intervenciones, para la higiene bucal y de la prótesis. Consideramos que, si bien los hábitos higiénicos son indispensables para el éxito del tratamiento, no todas las personas afectadas presentan prótesis con las mismas características, de ahí la necesidad de evaluar el aparato protésico desde el punto de vista físico y funcional. Nuestros resultados indican que no existen diferencias estadísticamente

significativas en la resolución de EP con respecto a los que sí se les realizó la estabilización ($p < 0.05$ /IC95% 0.97-1.7). En cuanto al tiempo de uso de la prótesis, sólo en el estudio de Pina y colaboradores²³ se realizó un análisis del tiempo medio de uso en sus grupos de estudio siendo 11 ± 9 y 15 ± 15 años. En nuestra muestra no se consideró el tiempo de uso debido a la gran discrepancia que presentaron los participantes al momento de la selección.

La asociación de método mecánico, cepillado, método químico, soluciones astringentes y detergentes se describen como los elementos más eficaces en la limpieza y reducción de microorganismos.^{3,5,10,25} Se decidió indicar el uso de bicarbonato en dilución para colocar la prótesis durante las noches durante el tiempo que se indicó el tratamiento, lo cual no se reporta en los estudios previos. Se sabe que la saliva juega un rol fundamental en la homeostasis bucal, por lo que una disminución en el flujo de esta favorece las infecciones oportunistas,^{2,10} en ese sentido, en los estudios previos se descartaron personas con dicha condición (xerostomía).²⁰⁻²³ A pesar de ello, se consideraron participantes con disminución del flujo salival debido a que sólo 24.1% de la muestra presentó flujo bajo, además, no se pudo demostrar que esta condición pudiera interferir con la eficacia terapéutica en ambos tratamientos ($p < 0.05$) aunque sería pertinente revisarlo en estudios posteriores como uno de los objetivos principales de investigación. La formulación en gel del propóleos a 1.5% mostró una eficacia similar con respecto a la resolución clínica de EP (cerca de 90% de la muestra total en t_2), así como de la eliminación de colonias de *Candida sp* ($p < 0.05$). El garantizar que los participantes se apliquen los tratamientos de acuerdo con la posología establecida, siempre es un reto en los ensayos clínicos, por lo que se proporcionó a cada participante un itinerario para controlar las aplicaciones con ayuda de los familiares, así como un instructivo de aplicaciones, mismos que se encontraban en los paquetes con el fármaco correspondiente al grupo al que pertenecían. Santos y su equipo²¹ reportaron una resolución total de la EP tras 14 días de exposición al propóleos en gel a 20% al compararse con la nistatina 100,000 UI; sin embargo, no tomaron en cuenta variables como la condición protésica y el tipo de material, mismos que pudieran jugar un rol en la eficacia terapéutica. En este sentido, sólo se ha reportado el diseño de la prótesis (parcial o total) como una característica en su población de estudio, más no como un factor de sesgo o confusor. Nuestros resultados revelan que el tipo de material protésico pudiera estar relacionado con la eficacia terapéutica en ambos tratamientos como un con-

fusor ya que al analizar el resultado global controlando por el tipo de material como son las prótesis flexibles en el que prevaleció la EP en siete de nueve casos (77.8%) pese a los 21 días de exposición, podría suponerse que las prótesis flexibles perpetúan la EP, aún con la ausencia de colonias de *Candida sp* ($p < 0.05$).

La aceptabilidad del producto es importante para la adherencia del paciente al tratamiento, en nuestro estudio se reportó una buena aceptación por parte de los participantes al gel de propóleos, coincidiendo con los estudios previos.²⁰⁻²³

CONCLUSIONES

El gel de propóleos mexicanos a 1.5% demostró poseer una eficacia similar que el miconazol (Daktarin® gel a 2%) en el tratamiento de la estomatitis protésica; sin embargo, existen distintos factores que interactúan o juegan un rol en el manejo de esta condición, consideramos que se requiere promover nuevas investigaciones para obtener resultados más fiables que nos permitan garantizar la eventual implementación de esta terapia prometedora como una alternativa para el tratamiento de la EP.

AGRADECIMIENTOS

C.D. Esp. Gisela Dagmar Aguilar Kleimann por su valiosa participación en el proceso de aleatorización y asignación a los grupos de intervención.

Original research

Efficacy of mexican propolis from *Apis mellifera* in the treatment of prosthetic stomatitis. Randomized controlled clinical trial

Emiliano Jurado Castañeda,*
Carla Monserrat Ramírez Martínez,*
Liberio Carrillo Miranda,[§] Arceo Sandra Díaz-Barriga,[†]
Israel Adair Cabrera Contreras,^{||}
Javier Portilla Robertson**

* Adscrito al Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología.

§ Jefe del Módulo de Apicultura y adscrito al Centro de Enseñanza Agropecuaria Campo Cuatro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

† Investigadora del Departamento de Ciencias Biológicas Campo Uno de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

|| Adscrito al Centro de Enseñanza Agropecuaria Campo Cuatro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

** Coordinador del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología.

Universidad Nacional Autónoma de México.

ABSTRACT

Objective: To determine the therapeutic efficacy of 1.5% Mexican propolis gel compared to 2% miconazole gel (Daktarin®) in the treatment of denture stomatitis (DS). **Material and methods:** A double-blind randomized controlled clinical trial was carried out in a sample of 58 patients with DS according to the Newton scale. The specimens were divided by simple random sampling into two groups: «miconazole» (N = 30) and «propolis» (N = 28). The cumulative incidence (CI) and relative risk (RR) of the resolution of DS were determined. **Results:** The results showed no statistical significance ($p < 0.05$) since the Mexican propolis gel had an efficacy (CI = 80%) similar to miconazole (CI = 89.2%) in the clinical resolution of DS. In all cases, there was total absence of *Candida sp* at the end of the intervention. **Conclusions:** Mexican propolis gel proved to have potential for the treatment of DS. However, new studies are required to evaluate the role played by other variables such as salivary flow, as well as the state and type of prosthesis.

Keywords: Mexican propolis, denture stomatitis, *Candida sp*, miconazole, clinical trial.

INTRODUCTION

Denture stomatitis (DS) is a chronic infection caused by *Candida albicans* that affects the alveolar and palatal mucosa in people with removable dental prostheses (RDP) with a prevalence of 70%.^{1,2} Null or poor hygiene, as well as long term contact with the mucosa are the main causes associated with DS^{1,3} where *C. albicans* finds the conditions to cause localized infection.⁴⁻⁸ Treatment is based on the standardization of hygiene measures after diagnosis,⁹ in addition to antifungals such as nystatin suspension or miconazole gel (Daktarin gel®).^{2,10} The latter has been used for 40 years with favorable results.¹¹ However, failures in antifungal therapy have been described,^{2,12} so it is necessary to research new alternatives.

Propolis is a phytomedicine with therapeutic properties⁷ and due to its analgesic and biocidal potential, its usefulness in dental materials is a subject of research.^{7,8} It is a natural resin with a variety of biological properties developed by bees of the *Apis mellifera* species for the protection of the hive¹² and it also has antifungal activity, which is why it has been used in both *in vitro* and *in vivo* research in the therapeutic management of fungal infections.^{12,13-15} Mexico has areas where propolis has the necessary biological properties for its application as an alternative

natural agent in the treatment of DS.^{12,16} As far as we know, in this country there has been no research on its therapeutic efficacy for clinical use. The aim of this research was to determine the therapeutic efficacy of a 1.5% Mexican propolis gel in the treatment of DS.

MATERIAL AND METHODS

From August 2016 to February 2017A, a parallel double-blind randomized controlled clinical trial was conducted in men and women aged 40 to 60 years with RDP with a clinical diagnosis of DS evaluated at the Oral Medicine clinic of the División de Estudios de Posgrado e Investigación Facultad de Odontología Universidad Nacional Autónoma de México (DEPeI FO UNAM). Volunteers had to be carriers of partial or total RDP of acrylic, acrylic metal, or nylon (flexible) regardless of the useful lifetime and that they emphatically followed the recommended habits and hygienic measures. This research was endorsed and approved by the bioethics committee of the FO UNAM. It was essential to inform about the advantages and disadvantages of both therapies, as well as the signing of the informed consent for the voluntary participation of potential candidates. Candidates, who suffered from a decompensated systemic disease, with antifungal treatment during the last month, immunosuppressed, those with chronic periodontitis, as well as those with a history of frequent allergies or sensitive to propolis, were excluded.

The oral cavity was clinically evaluated to identify erythema associated to DS using the Newton scale¹⁷ (III = papillary hyperplasia, II = generalized erythema, I = mild/focal erythema, and 0 = absence). At the same time, a microbiological sample was taken from each selected volunteer using a sterile swab, which was slipped over the affected mucosa, then immersed in a test tube with brain-heart infusion and left, in a microbiological culture oven at 37 °C to stand for 36 hours. Subsequently, with a loop, it was taken from the cloudy area and sown in a Petri dish with sabouraud® Agar using the simple striation technique to be left in a culture oven at 37 °C again for 36 hours. After this time, the *Candida sp* colonies were counted, using a colony quantifier. For this, we used the Colony Density System (CDS: 0 = absence, 1 = from 1 to 9 colonies, 2 = 10 to 100 colonies, 3 = more than 100 colonies and 4 = uncountable) used by Amanlou et al. in 2006.¹⁸

Related to prostheses, those that could be stabilized in terms of their surface quality, retention and functionality were evaluated, as well as those that had to be completely replaced due to their poor condition. **Table 1** summarizes the maneuvers performed at the

RDP in order that all the volunteers presented the same conditions prior to the interventions. Subsequently, the basal salivary flow (BSF) and stimulated salivary flow (SSF) obtained from total saliva by the spitting technique were determined.¹⁹ This made it possible to identify those participants with normal salivary flow (NSF), low (LSF) and high (HSF), which is of interest for the present research since it is presumed that a low flow may be a factor that hinders the resolution of DS.

Intervention and masking protocol

The volunteers underwent the experimental (propolis) and control (miconazole) treatments for twenty-one days. The drugs were poured into identical dosing metal cylinders with a capacity of 200 mL. For masking purposes, each of the cylinders was placed in a box with a unique presentation, so that neither the researcher nor the volunteers knew the drug being administered. It was essential to provide standardized hygiene instructions (including placement in bicarbonate solution overnight) in writing, as well as a dosage schedule to ensure that it was applied in a timely and proper manner. Each box was labeled with a color previously established for the two groups. A person outside the interventions preset the color blue for miconazole group, and white for propolis group.

Finally, the volunteers who met the selection criteria were placed in one of the groups following an order determined by simple randomization with a coin. A parallel standard posology was indicated that consisted of applying the treatment three times a day for ten minutes, twenty-one days. The volunteers had to spread the gels on the prosthetic base and later place it in the mouth. Measurements were carried out at the beginning (t0), at seven (t1), at fourteen (t2) and at twenty-one days (t3). At the end of the therapeutic administration, the color corresponding to each group was evidenced for statistical analysis. The 1.5% propolis gel was made for the purpose of this research and was provided by the Beekeeping Department of the Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Statistical analysis

A sample size calculation was performed for the difference in proportions, assuming a difference of 15%. To determine the efficacy of propolis, a superiority hypothesis was established with a significance value of 0.05 using the cumulative incidence (CI), relative risk (RR) and chi-square with confidence intervals. The above based on intention-to-treat analysis.

RESULTS

In the period from August 2016 to January 2017, there were 81 potential candidates of which 23 were excluded because they presented some exclusion criteria or were aware of the benefits of propolis. Finally, the (n) for the present study was 58 participants (Figure 1).

Table 1 shows the baseline data of the 58 participants who constituted the total sample before and after being placed in the respective groups. Grade II DS cases predominated with 53.4%. Only one case of grade III (1.7%) was included in this group to facilitate statistical analysis. The baseline CDS of *Candida sp* in the total sample and between groups are summarized in the second row of Table 1. Regarding baseline SF results, 75.8% of volunteers were identified with NSF while 24.1% presented LSFo. The baseline results related to the stabilization of the prostheses showed that 58.3% of the total sample did not require any maneuver due to their good condition while the remaining percentage required polishing (20.6%). In this sense, 46.6% were rigid acrylic-based prostheses. The *t*1 analysis revealed a cumulative incidence (AI) of clinical resolution of PS of 25.05% and 23.3% respectively in the «miconazole» and «propolis» groups.

Table 2 summarizes the results at seven days of exposure without showing statistically significant differences ($p < 0.05$). At *t*2, an AI of 82.1% clinical resolution was observed in the «miconazole» group while in the «propolis» group it was 76.6%, with a resolution percentage of 79.3% in the total sample. At *t*3 the percentage of resolution in the «miconazole» group was 89.2% while in the «propolis» group it was 80%. The results show that both drugs have similar efficacy without showing statistically significant differences ($p < 0.05/CI 0.71-1.1$) indicating that propolis is inferior to miconazole in PS resolution. On the other hand, the results of the CDS of *Candida sp* at *t*3, were conclusive with a total absence in both intervention groups.

Table 3 summarizes the results of the FS analysis, prosthesis stabilization, type of material, sex, and its relationship with the final result. It is noteworthy that 92.8% of the 14 cases with LSFo resolved satisfactorily at *t*2 and the same percentage was maintained at *t*3, with no statistically significant differences. Concerning the prosthetic material, it was noteworthy that the prevalence of erythema at *t*3 was maintained in 7 (77.8%) of 9 cases in those participants who wore flexible dental prostheses. The results of prosthetic stabilization at both *t*2 and *t*3 showed equivalent resolution for those who had not received stabilization

($p < 0.05/95\% CI 0.97-1.7$). As for sex, female sex was predominant without playing a specific role in the outcome. Finally, no participant reported side effects and reported good acceptability in both treatments.

DISCUSSION

In our knowledge, few studies address the mechanism of action of propolis against *C. albicans*, the results of Quintero Mora and collaborators in 2011¹⁶ showed that Mexican propolis from the region of Cuautitlán Izcalli, State of Mexico inhibit the ADH1 and PIK1 genes involved in the pathogenesis of *C. albicans*, which is why it was decided to use propolis from this region, ensuring its procurement, processing, and quality control as required by the official propolis standard (NOM-003-SAG/GAN-2017). On the other hand, clinical studies demonstrating its application for the treatment of DS are also scarce.²⁰⁻²³ This trial is the first of its kind in Mexico and is also the one with the largest sample size (n 58) unlike previous studies whose samples were forty-five,²⁰ twelve,²¹ thirty,²² and forty²³ participants with favorable results in more than 80% as in our study. Our research coincided with those of Santos²¹ and Pina²³ in intervening two study groups with similar vehicles (gel). Regarding the distribution by sex, the female sex was predominant with 79.3%, similar to other studies²⁰⁻²³ in which the percentage was 60, 65, 84.4 and 85% respectively, however, no differences were identified. Therefore, we consider it necessary to carry out studies with a homogeneous proportion to identify whether or not there is any difference.

The participants were selected with special care from the prosthetic perspective, something unprecedented, and as a result, 58.3% of the prostheses were found to be in good condition while 41.2% needed stabilization. The high prevalence of DS (70%) in RDP carriers is associated with multiple factors that play a role in its pathogenesis, such as poor hygiene and uninterrupted contact with the mucosa,²⁴ however, new studies are required to describe the probable role that the state or conditions of these devices could play in the pathogenesis of DS, it is for this reason that the decision was made to stabilize the prosthesis because it is indispensable that the prosthesis is in good condition for the efficacy of antifungal therapy to be successfully carried out in the treatment of DS.^{1,2,24} The success of DS treatment also depends on hygienic measures,^{1,24} which is why previous studies choose to standardize participants before performing interventions, for oral and prosthesis hygiene. We consider that, although hygienic habits are indispensable for the success of the

treatment, not all affected persons present prostheses with the same characteristics, hence the need to evaluate the prosthetic appliance from the physical and functional point of view. Our results indicate that there are no statistically significant differences in the resolution of DS concerning those who underwent stabilization ($p < 0.05/95\%$ CI 0.97-1.7). Regarding the time of use of the prosthesis, only in the study by Pina et al.²³ did they perform an analysis of the meantime of use in their study groups, being 11 ± 9 and 15 ± 15 years. In our sample, the time of use was not considered due to the great discrepancy presented by the participants at the time of selection.

The association of mechanical method, brushing, chemical method, astringent solutions, and detergents are described as the most effective elements in cleaning and reduction of microorganisms.^{3,5,10,25} It was decided to indicate the use of bicarbonate in dilution to place the prosthesis at night during the time the treatment was indicated, which is not reported in previous studies. It is known that saliva plays a fundamental role in oral homeostasis, so a decrease in its flow favors opportunistic infections,^{2,10} in that sense, in previous studies people with this condition (xerostomia) were discarded.²⁰⁻²³ Despite this, participants with the decreased salivary flow were considered because only 24.1% of the sample presented low flow, in addition, it could not be demonstrated that this condition could interfere with the therapeutic efficacy in both treatments ($p < 0.05$) although it would be pertinent to review it in subsequent studies as one of the main research objectives. The 1.5% propolis gel formulation showed similar efficacy concerning the clinical resolution of DS (about 90% of the total sample at t_2), as well as the elimination of *Candida sp* colonies ($p < 0.05$). Ensuring that participants apply the treatments according to the established dosage is always a challenge in clinical trials, so each participant was provided with an itinerary to control the applications with the help of family members, as well as application instructions, which were found in the packets with the drug corresponding to the group to which they belonged. Santos et al.²¹ reported a total resolution of DS after 14 days of exposure to 20% propolis gel when compared to nystatin 100,000 IU, however, they did not take into account variables such as prosthetic condition and type of material, which could play a role in the therapeutic efficacy. In this sense, only the prosthesis design (partial or total) has been reported as a characteristic in their study population, but not as a biasing or confounding factor. Our results reveal that the type of prosthetic material could be related to the therapeutic efficacy in both treatments as a confounder

since when analyzing the overall result controlling for the type of material such as flexible prostheses in which DS prevailed in 7 of 9 cases (77.8%) despite 21 days of exposure, it could be assumed that flexible prostheses perpetuate PS, even with the absence of *Candida sp* colonies ($p < 0.05$).

Product acceptability is important for patient adherence to treatment, in our study we reported a good acceptance by the participants to propolis gel, coinciding with previous studies.²⁰⁻²³

CONCLUSIONS

The 1.5% Mexican propolis gel was shown to have similar efficacy to that of miconazole (Daktarin® 2% gel) in the treatment of denture stomatitis; however, there are different factors that interact or affect this condition. We consider it necessary to promote new research to obtain reliable results that guarantee the eventual implementation of this promising therapy as an alternative for the treatment of denture stomatitis.

ACKNOWLEDGEMENTS

CD. Esp. Gisela Dagmar Aguilar Kleimann for her valuable participation in the randomization process and assignment to intervention groups.

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Gendreau L, Zvi GL. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20 (4): 251-260.
2. Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. *Fitoterapia.* 2010; 81 (5): 323-328.
3. Evren BA, Uludamar A, Iseri U, Ozkan YK. The association between socioeconomic status, oral hygiene practice, denture stomatitis and oral status in elderly people living different residential homes. *Arch Gerontol Geriatrics.* 2011; 53 (3): 252-257.
4. Ponton J. Microbiological diagnosis of mycoses. *Rev Iberoam Micol.* 2002; 19 (1): 25-29.
5. Karakis D, Akay C, Oncul B, Rad AY, Dogan A. Effectiveness of disinfectants on the adherence of *Candida albicans* to denture base resins with different surface textures. *J Oral Sci.* 2016; 58 (3): 431-437.
6. Coronado CL, Jiménez SY. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent.* 2013; 5 (5): e279-286.
7. Estrada-Barrazaa D, Dávalos-Martínez A, Flores-Padillab L, Mendoza-De Eliasa R, Sánchez-Vargas LO. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar *Candida*® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol.* 2011; 28 (1): 36-42.
8. Sumitra Devi L, Maheshwari M. Speciation of *Candida* species isolated from clinical specimens by using chrom agar and conventional methods. *Int J Sci Res Publ.* 2014; 4 (3): 1-5.
9. Baran I, Nalcaci R. Self-reported denture hygiene habits and oral tissue conditions of complete denture wearers. *Arch Gerontol Geriatr.* 2009; 49 (2): 237-241.

10. Garcia-Cuesta C, Sarrion-Perez M-G, Bagan JV. Current treatment of oral candidiasis: a literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014; 6 (5): e576-582.
11. de Castro PA, Bom VL, Brown NA, de Almeida RS, Ramalho LN, Savoldi M et al. Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*. 2013; 60: 74-86.
12. Quintero MML, Londono OA, Hernandez HF, Manzano GP, Lopez MR, Soto ZCI et al. Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* *in vitro* growth. *Rev Iberoam Micol*. 2008; 25 (1): 22-26.
13. Possamai MM, Honorio-Franca AC, Reinaque AP, Franca EL, Souto PC. Brazilian propolis: a natural product that improved the fungicidal activity by blood phagocytes. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 541018.
14. S VK. Propolis in dentistry and oral cancer management. *N Am J Med Sci*. 2014; 6 (6): 250-259.
15. Sforcin JM. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother Res*. 2016; 30 (6): 894-905.
16. Quintero MML, Lodoño OA, Soto ZCI, García TCG, Carrillo ML, Penieres CJG et al. *Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican propolis*. In: Méndez-Vilas A (Ed). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Spain: FORMATEX; 2011, 1068-73.
17. Newton AV. Denture sore mouth. *Br Dental J*. 1962; 112: 357-360.
18. Amanlou M, Beitollahi JM, Abdollahzadeh S, Tohidast-Ekrad Z. Miconazole gel compared with zataria multiflora boiss. Gel in the treatment of denture stomatitis. *Phytother Res*. 2006; 20 (11): 966-969.
19. Morales de la Luz M, Aldape Barrios BC. Flujo salival y prevalencia de xerostomía en pacientes geriátricos. *Rev ADM*. 2013;70 (1): 25-29.
20. Capistrano HM, de Assis EM, Leal RM, Alvarez-Leite ME, Brener S, Bastos EM. Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 947980.
21. Santos VR, Gomes RT, De Mesquita RA, De Moura MD, Franca EC, De Aguiar EG et al. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytother Res*. 2008; 22 (11): 1544-1547.
22. Santos VR, Pimenta FJ, Aguiar MC, do Carmo MA, Naves MD, Mesquita RA. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. *Phytother Res*. 2005; 19 (7): 652-654.
23. Pina G, Lia E, Berreta A, Nascimento A, Torres E, Buszinski A et al. Efficacy of propolis on the denture stomatitis treatment in older adults: a multicentric randomized trial. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017; 2017: 8971746.
24. Koch C, Burgers R, Hahnel S. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. *Gerodontology*. 2013; 30 (4): 309-313.
25. Kraft-Bodi E, Jorgensen MR, Keller MK, Kragelund C, Twetman S. Effect of probiotic bacteria on oral *Candida* in frail elderly. *J Dent Res*. 2015; 94 (9 Suppl): 181s-186s.

Correspondencia/Correspondence:

Emiliano Jurado Castañeda

E-mail: juce2730@gmail.com