



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
GRADO EN ODONTOLOGÍA
CURSO ACADÉMICO 2020-2021**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**AISLADOS CLÍNICOS DE HONGOS *CANDIDA* Y
MALASSEZIA EN DIFERENTES NICHOS ORALES EN
MENOPAUSIA**

**CLINICAL ISOLATES OF FUNGI *CANDIDA* AND
MALASSEZIA IN DIFFERENT ORAL NICHES IN
MENOPAUSE**

AUTORA: Marta Calderer Ortiz

TUTORA: Aurea Simón Soro.

COTUTORA: Jennifer Martín González.

SEVILLA, 2021

Máster Oficial en Odontología Restauradora, Estética y Funcional

Universidad de Sevilla



Facultad de Odontología



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

La Dra. Áurea Simón Soro, Profesora Contrato de Acceso al Sistema Español de Ciencia, Investigación y Tecnología y, la Dra. Jenifer Martín González, Profesora Titular Patología y Terapéutica, adscritas al departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla, como tutora del trabajo fin de máster.

CERTIFICAN: que el presente trabajo titulado “AISLADOS CLÍNICOS DE HONGOS *CANDIDA* Y *MALASSEZIA* EN DIFERENTES NICHOS ORALES EN MENOPAUSIA” ha sido realizado por MARTA CALDERER ORTIZ bajo nuestra dirección y cumple a nuestro juicio, todos los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como trabajo de fin de máster.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado, en Sevilla a 6 de junio de 2021.

D^a Áurea Simón Soro
TUTORA

D^a Jenifer Martín González
CO-TUTORA



Facultad de Odontología



D/Dña. MARTA CALDERER ORTIZ con DNI 77551755X alumno/a del Máster Universitario en Odontología Restauradora, Estética y Funcional de la Facultad de Odontología (Universidad de Sevilla), autor/a del Trabajo Fin de Máster titulado: “AISLADOS CLÍNICOS DE HONGOS CANDIDA Y MALASSEZIA EN DIFERENTES NICHOS ORALES EN MENOPAUSIA”

DECLARO:

Que el contenido de mi trabajo, presentado para su evaluación en el Curso 2020-2021 es original, de elaboración propia, y en su caso, la inclusión de fragmentos de obras ajenas de naturaleza escrita, sonora o audiovisual, así como de carácter plástico o fotográfico figurativo, de obras ya divulgadas, se han realizado a título de cita o para su análisis, comentario o juicio crítico, incorporando e indicando la fuente y el nombre del autor de la obra utilizada (Art. 32 de la Ley 2/2019 por la que se modifica el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, BOE núm. 53 de 2 de Marzo de 2019).

APERCIBIMIENTO:

Quedo advertido/a de que la inexactitud o falsedad de los datos aportados determinará la calificación de NO APTO y que asumo las consecuencias legales que pudieran derivarse de dicha actuación.

Sevilla a 6 de junio de 2021

Fdo.: MARTA CALDERER ORTIZ

Índice:

1.	Resumen.....	4
2.	Abstract	4
3.	Introducción	5
	3.1. Microbioma oral	5
	3.2. Microtipos orales	6
	3.3. Nichos orales	7
	3.4. Hongos: Candida y Malassezia.....	9
	3.5. Climaterio.....	11
4.	Hipótesis y objetivos	12
5.	Metodología	12
	5.1. Población de estudio	12
	5.2. Muestras	12
	5.3. Cultivos.....	13
	5.4. Análisis de datos	13
	5.5. Estadística	14
6.	Resultados.....	15
	6.1. Presencia de hongos en las etapas del climaterio.....	15
	6.2. Prevalencia de las especies según el nicho oral (o Relación de las especies con los nichos orales).....	15
	6.3. Abundancia de las especies según la localización y la etapa del climaterio.	16
	6.4. Características fisiológicas relacionadas con la menopausia: flujo salival y pH	17
7.	Discusión.....	19
8.	Conclusiones.....	23
9.	Bibliografía.....	24
10.	Anexo	29

1. Resumen

El microbioma humano es dinámico, entre individuos y dentro de uno mismo. En la mujer, las etapas reproductivas y los cambios hormonales impactan en la microbiota. En función de las especies microbianas orales más abundantes se han descrito microtipos orales como clasificación de los grupos de individuos. Sin embargo, el estudio del microbioma oral se ha centrado principalmente en bacterias, empleando la saliva como muestra representativa de la boca. Cuando hay otros nichos orales además de la saliva, y el estudio de los hongos ofrecería una mayor demarcación de la población. **Objetivos:** El objetivo de este estudio es describir los aislados clínicos de especies *Candida* y *Malassezia* en los diferentes nichos orales, de mujeres en el climaterio. **Material y Métodos:** Para ello se tomaron muestras de cinco nichos orales incluyendo saliva, diente, encía, lengua, mucosa bucal y saliva en 36 mujeres agrupadas en función de la etapa del climaterio en peri, pero y postmenopausia. Las muestras biológicas se cultivaron en el medio selectivo CHROMagar™ *Malassezia*. **Resultados:** Se observó la mayor presencia y variabilidad de especies en la postmenopausia. Encontrándose una mayor prevalencia en saliva. *C. albicans* se identificó como la especie predominante en todas las etapas de la menopausia. Aunque se observó una mayor variabilidad de especies fúngicas en la postmenopausia, independientemente del flujo y pH salival. Observándose especificidad de *C. albicans* por los nichos orales: saliva, encía, mucosa y lengua; mientras *C. tropicalis* y *M. sympodialis* solo por saliva. **Conclusiones:** La mayor prevalencia y diversidad de especies en los nichos orales, se da en la postmenopausia. Por todo ello, un mayor conocimiento de la relación microbioma-huésped y la incorporación del diagnóstico microbiológico a la práctica clínica diaria en odontología, podría guiar el plan del tratamiento, y advertir del riesgo de aparición de enfermedades antes de su manifestación clínica.

2. Abstract

The human microbiome is dynamic, between individuals and within oneself. In women, reproductive stages and hormonal changes impact the microbiota. Depending on the most abundant oral microbial species, oral microtypes have been described as a classification of groups of individuals. However, the study of the oral microbiome has focused mainly on bacteria, using saliva as a representative sample of the mouth. When there are other oral niches besides saliva, and the study of fungi would offer a greater demarcation of the

population. **Objectives:** The objective of this study is to describe the clinical isolates of *Candida* and *Malassezia* species in the different oral niches, of women in the climacteric. **Material and Methods:** For this purpose, samples were taken from five oral niches including saliva, tooth, gum, tongue, buccal mucosa and saliva in 36 women grouped according to the stage of the climacteric in peri-menopause, menopause and post-menopause. The biological samples were cultured in the selective medium CHROMagar™ *Malassezia*. **Results:** The greatest presence and variability of species was observed in post-menopause. Finding the highest prevalence in saliva. *C. albicans* was identified as the predominant species in all stages of climacteric. Although a greater variability of fungal species was observed in the post-menopause, regardless of salivary flow or pH. Observing specificity of *C. albicans* for the oral niches: saliva, gum, mucosa and tongue; while *C. tropicalis* and *M. sympodialis* only for saliva. **Conclusions:** The highest prevalence and diversity of species in oral niches occurs in postmenopausal women. Therefore, a greater knowledge of the microbiome-host relationship and the incorporation of mycobiological diagnosis into daily clinical practice in dentistry, could guide the treatment plan, and alert of the risk of disease before its clinical manifestation.

3. Introducción

3.1. Microbioma oral

El microbioma humano es el conjunto de microorganismos que habitan en el cuerpo ¹. Los microorganismos que nos cohabitan proporcionan funciones beneficiosas en la digestión de ciertos alimentos, producción de metabolitos necesarios para mantener la salud (ej. nitrato en boca o serotonina en intestino)^{2,3}. Las superficies del cuerpo están colonizadas por distintas comunidades microbianas conformadas por bacterias, hongos y virus⁴. Ciertos microorganismos presentan especificidad por determinadas zonas en función de la interacción con el hospedador y el ambiente⁵.

La detección de estos microorganismos podría hacerse mediante técnicas de secuenciación masiva, las cuales permiten obtener secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) a una gran velocidad, caracterizando así la diversidad de poblaciones microbianas. Pero la tecnología para ello tiene un elevado coste y al ser comparado con una base de datos preexistente puede dar lugar a que ciertas especies no estén incluidas y por ello no identificadas⁶. En contraposición, podemos emplear las

técnicas dependientes de cultivo, específicas de especie. Las cuales, aunque están sujetas a la técnica del operador, permiten identificar en muestras clínicas los microorganismos de interés^{7,8}.

3.2. Microtipos orales

Aunque hay variaciones entre el microbioma de distintos individuos e incluso dentro de cada individuo en diferentes momentos; hay especies de microorganismos comunes a la mayoría de la población ante determinadas condiciones^{9,10}. Esto es lo que se conoce como microtipos, conjuntos de bacterias y hongos, que se relacionan entre ellos y con el medio, formando grupos que predominan en unas personas u otras. Así pueden agruparse poblaciones humanas por sus comunidades microbianas relacionados a características como nacionalidad, localización, sexo, edad, genética, hábitos y características ambientales. De modo que los microtipos se conforman por una mezcla compleja de propiedades funcionales.

Los microtipos se han sugerido como modo de clasificar a la población. El primer estudio que estableció microtipos se basó en el estudio de la microbiota bacteriana intestinal de la cohorte europea MetaHIT¹¹. En este estudio se identificaron tres microtipos bacterianos a nivel intestinal o “enterotipos” donde existía un género dominante: *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*.¹² De este modo se observó que los microtipos permiten la clasificación de la población en función del equilibrio óptimo global que se dé en una zona del cuerpo, viéndose que varios grupos determinados de géneros coexistían y presentaban interacciones con el medio subyacente.

Esta clasificación también puede realizarse mediante el microbioma de otras zonas del cuerpo, y además podría ayudarnos a distinguir situaciones de salud o enfermedad. Concretamente a nivel oral, se han podido distinguir dos microtipos principales, en situación de salud, a partir de la saliva, empleando muestras de enjugues bucales. Estos “estomatotipos” o microtipos orales, presentaban una composición y abundancia microbiana diferentes. Dividiéndose a la población según el predominio de las bacterias: *Neisseria-Haemophilus* o *Prevotella-Veillonella*¹³. Mientras que en situación de enfermedad, puede observarse un mayor predominio de *Streptococcus*, en un pH ácido, frente a *Prevotella*, en un pH más básico¹⁰. También se identificaron comunidades bacterianas subyacentes, que podían ser específicas o compartidas para cada

estomatotipo¹³. Observándose que había asociación entre ciertas comunidades microbianas en saliva y determinados cuadros clínicos de enfermedad; proponiéndose en consecuencia esas comunidades como marcadores de riesgo de enfermedades orales¹⁰.

De este modo se concluyó que la población podía distinguirse según las bacterias que predominaran, tanto en situación de salud como enfermedad. Pero no sólo podemos encontrar bacterias en el microbioma oral, sino también hongos, que podrían permitirnos separar a la población en función de cuál sea el dominante. El estudio “Mycobiome Salivary Types”⁴ se distinguieron dos comunidades bien demarcadas por los micotipos encontrados en saliva (Fig. 1), predominando *Candida albicans* o, en contraposición, distintas especies de *Malassezia*. De este modo, la posibilidad de poder distinguir a la población por su microbioma ha revolucionado la manera de entender el equilibrio microbioma-huésped en relación con el desarrollo de enfermedades^{14,15}.

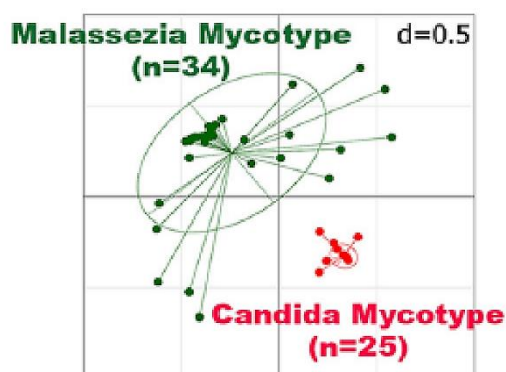


Fig. 1. Micotipos salivares. Plot escalado multidimensional no-métrico, mostrando la demarcación de las especies de *Candida* y *Malassezia* en saliva⁴.

3.3. Nichos orales

A nivel oral se han distinguido esos microtipos según las bacterias predominantes en saliva, tomándose ésta como una muestra representativa de la boca ya que baña todos los tejidos. Sin embargo, en la cavidad oral se pueden distinguir zonas o “nichos orales” diferentes (Fig. 2), con determinadas características de pH, oxígeno, temperatura, potencial redox⁹, hidratación y factores inmunológicos del hospedador¹ específicos. Zonas en las que podemos encontrar comunidades de microorganismos específicamente adaptadas a esos tejidos, conformándose un “biomapa” oral¹⁶⁻¹⁸.

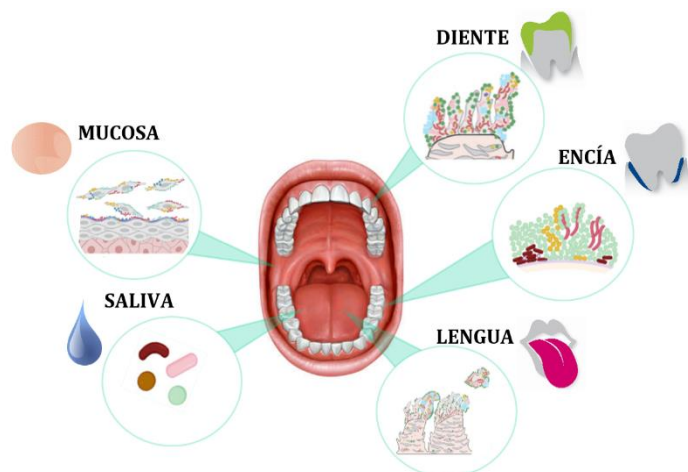


Fig. 2. Nichos orales. Representación de la microbiota asociada a los nichos orales incluidos en el estudio.

Por ejemplo, las coronas dentarias son superficies más o menos lisas, expuestas a abundante oxígeno y en contacto con los tejidos orales (mucosa y lengua) facilitando su limpieza mecánica, o cepilladas en la rutina de higiene¹⁹. Por tanto, no se da lugar a que las comunidades microbianas se establezcan, ni a que se acumulen metabolitos microbianos, por lo que la mayoría de los microorganismos que se encuentren en ellas serán las que tengan una mayor capacidad de adhesión y se observarán como biofilm, estando próximos entre sí para comunicarse.

De un modo similar, la mucosa yugal, un epitelio no queratinizado, fino, y con un ciclo de renovación del epitelio de 2,7 horas¹⁷, tampoco permite que la microbiota alcance mayor grado de especialización o madure, por lo que se observarán aquellas que sean de rápida colonización y presenten glicoproteínas de transmembrana²⁰. Sin embargo, en la placa supragingival dental, lo que nosotros tomaremos como encía, se da lugar a que proliferen microorganismos con ciertas características, como que puedan crecer en una zona anóxica, o que incorporen proteínas en su metabolismo, como las que se exudan al fluido crevicular. En cuanto a la lengua, es una mucosa especializada, con características diversas según la zona: el dorso es más anaerobio; la cara ventral presenta diferentes papilas repartidas en su extensión y entre algunas pueden encontrarse microambientes anaerobios; y los laterales están en contacto con los dientes. En sus zonas anaerobias, pueden observarse biofilms maduros, estructuralmente más complejos²¹.

Finalmente, la saliva también la distinguiremos como un nicho oral, aunque no es una zona en sí. Ésta baña y comunica los ecosistemas, tiene capacidad de limpieza, pH

reguladora y varia su velocidad de posterior a anterior. Siendo un factor muy influyente en la proliferación de determinados microorganismos.

Por tanto, no solo podemos distinguir microtipos (entre individuos), sino que además debemos tener en cuenta la influencia de las características de cada nicho. Se ha observado que, en condiciones de salud, podemos encontrar un microbioma con más de 700 especies bacterianas a nivel oral, repartidas en las diferentes localizaciones, dando lugar a la biogeografía oral. Pero esto mismo podría realizarse con los hongos del género *Candida* y *Malassezia*, ya que su presencia, proporción y distribución podría variar según las condiciones del ambiente y la situación de salud y enfermedad²².

Las especies bacterianas en los microtipos salivares no separan entre individuos, sino que son altamente homogéneas. En cambio, microbiomas dominados por géneros de hongos *Malassezia* y *Candida* pueden diferenciar dos microtipos claramente representados en saliva (Fig. 2). Hay que resaltar que la saliva no tiene microbioma propio, sino que contiene los microorganismos dispersos de las superficies orales; no siendo realmente representativa. La diferenciación de microtipos basado en hongos como biomarcadores ofrecería mayor resolución según estudios realizados en saliva. Entonces, se debería tener en cuenta la muestra oral para describir las poblaciones de hongos en los distintos nichos orales, además de las bacterias para así establecer la relación con salud y enfermedad oral.

3.4. Hongos: *Candida* y *Malassezia*

El estudio del microbioma oral se ha centrado fundamentalmente en las bacterias, hasta ahora. Pero en la boca también se encuentran hongos y virus, cuya interacción entre ellos, con las bacterias presentes y con el medio en que se encuentran, tiene un impacto sobre el microbioma oral, y el estado de salud o enfermedad del hospedador¹⁶. Estos hongos o “micobioma”, aunque se encuentren en pequeña proporción, pueden tener un gran efecto sobre el microbioma, por lo que se ha sugerido que algunas especies podrían ser “keystone species” o “especies clave”.²³

Una boca sana puede albergar más de 75 géneros, siendo *Candida* de los más abundantes, y *Malassezia* un género frecuente en un micobioma oral sano²⁴. Los hongos tienen un mayor tamaño celular, capacidad de generar hifas filamentosas, pudiendo formar estructuras para biopelículas con múltiples especies, incluyendo hongos y bacterias; y al

ser eucariotas, pueden estimular el sistema inmune del hospedador de un modo diferente a las bacterias.

El género *Candida* es el más estudiado y frecuente en la cavidad oral. Concretamente, la especie *Candida albicans*, en la que se ha observado un papel dominante frente al resto de especies de *Candida*, llevando a una menor diversidad. *Candida albicans* es un microorganismo que puede encontrarse como comensal en la cavidad oral en condiciones de salud. Pero es una levadura que, ante la disrupción del equilibrio en las condiciones del hospedador, se vuelve altamente patógena, con factores de virulencia como tigmotropismo (el crecimiento orientado de su tubo germinativo, mediante producción de una matriz extracelular de polisacáridos o glicoproteínas, en respuesta a estímulos químicos o de contacto superficial), y adhesión a células epiteliales (por sus manoproteínas y capa fibrilar). Puede proliferar y comportarse como oportunista ante situaciones de inmunosupresión, medicación, xerostomía, presencia de prótesis y tabaquismo, entre otros.

Parece haber una asociación entre la presencia de *Candida* y una mayor incidencia de caries, por sus propiedades acidúricas, acidógenas y acidófilas, además de una aparente sinergia con la bacteria *Streptococcus mutans*. Formando un biofilm conjunto, induciendo *Candida albicans* la expresión de ciertos factores de virulencia de *S. mutans*, y actuando como soporte estructural²³ para una placa dental más cariogénica²⁵, potenciando una mayor disminución del pH.

El género *Malassezia* está formado por levaduras, lipofílicas y en su mayoría lipodependientes (siendo incapaces de sintetizar lípidos por sí mismas); con carácter dimórfico, pudiendo encontrarse como micelas y levaduras de forma simultánea. Son hongos comensales y a menudo oportunistas, teniendo una relación paradójica con el hospedador²⁶, pudiendo suprimir o estimular el sistema inmune para provocar reacciones inflamatorias de forma directa (por acción de sus lipasas) o indirecta (por la capacidad de expresar citoquinas, provocando una reacción inmune)²⁷. Se encuentran de forma más frecuente en la piel, como hongo comensal. Pero pueden actuar como patógeno ante un aumento de humedad y temperatura, junto con factores predisponentes del hospedador, principalmente que haya una enfermedad sistémica subyacente. Han sido asociadas a desórdenes en la piel (pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica, ...) y enfermedades autoinmunes. Pero no es frecuente que se asocie su concepto a la cavidad oral, donde

podría estar relacionado con la enfermedad periodontal y a su vez, con bacterias anaerobias que predominan en ésta, favoreciendo la inflamación gingival y un pH más básico²⁸. Concretamente, *Malassezia* presenta especies, como *M. globosa* o *M. restricta*, que se relacionan con bacterias que dependen de la degradación de aminoácidos, siendo estas *Porphyromonas spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* o *Treponema lecithinolyticum*.

Hay estudios que, mediante técnicas de secuenciación de ADN, han identificado con una alta frecuencia *Malassezia* en saliva²⁴. Sin embargo, no ha sido frecuente su aislamiento y proliferación al estudiar el microbioma oral mediante cultivos, por la baja sensibilidad de estos, puesto que requiere unas condiciones del medio específicas, concretamente que tenga un alto contenido en lípidos.

3.5. Climaterio

El climaterio es la etapa de la vida de una mujer que comienza al disminuir la actividad ovárica ²⁹. En ella podemos distinguir tres fases marcadas en relación al nivel de hormonas sexuales y la transición de la etapa reproductiva hacia la no reproductiva. La primera o premenopausia, es la etapa donde se periodos regulares³⁰. Es seguida por la perimenopausia, el tiempo cercano a la última menstruación, en el que los periodos comienzan a ser deficitarios y espaciar su frecuencia. La postmenopausia es el periodo donde ha cesado la menstruación de manera permanente por más de 12 meses, y en el que más cambios a nivel sistémico se experimentan. En ella pueden distinguirse claramente dos fases: temprana y tardía. La temprana, marcada por cambios en la hormona folículo estimulante y el estradiol, elevándose hasta que logran estabilizarse a los 3-6 años²⁹. La tardía, caracterizada por el envejecimiento de los tejidos y mayor sintomatología.

La mujer no sólo pierde su capacidad reproductiva, sino que se dan una serie de cambios endocrinos que repercuten a nivel general³¹, provocando sintomatología vasomotora, alteraciones psicológicas y musculoesqueléticas, cambios de humor y sueño, atrofia del aparato genitourinario, cambios metabólicos, enfermedades cardiovasculares y osteoporosis ³². A nivel oral concretamente, algunos estudios han observado que se asocia a un descenso del flujo salival y el pH.³³ Cambios que pueden favorecer alteraciones en el microbioma y facilitar el crecimiento de especies oportunistas, como *C. albicans*.

4. Hipótesis y objetivos

La hipótesis de partida es que los hongos *Candida* y *Malassezia* tienen especificidad por nichos específicos de la cavidad oral (diente, encía, mucosa bucal, lengua y saliva), y a su vez, relacionados a su vez con parámetros clínicos orales.

Por ello describimos los siguientes objetivos del estudio:

Objetivo principal: Describir los aislados clínicos de *Candida* y *Malassezia* en los diferentes nichos orales, de mujeres en el climaterio.

Objetivos secundarios:

1. Observar la prevalencia de los géneros *Candida* y *Malassezia* en la cavidad oral en la menopausia.
2. Distinguir según la presencia de estas especies en los nichos, si son especialistas o generalistas.
3. Observar la influencia del pH y flujo salival en la prevalencia de los hongos.

5. Metodología

5.1. Población de estudio

Para este estudio se seleccionó una cohorte de 36 individuos, mujeres, mayores de 40 años, que acudieron a las prácticas clínicas del Máster Oficial de Restauradora, Estética y Funcional, de la Universidad de Sevilla, así como a las prácticas clínicas de las asignaturas de Integrada de Adultos y Gerodontología de quinto curso. Clasificándose en la etapa de premenopausia a aquellas que seguían teniendo el periodo de forma regular. En premenopausia/menopausia a las que se encontraban en periodo de transición, teniendo cambios en los periodos, pero sin tener faltas de 12 meses de una vez. Y en postmenopausia a todas aquellas que llevaran 12 meses o más sin menstruar.

5.2. Muestras

Toma de muestras:

A continuación, se tomaron muestras de los 5 nichos orales previamente diferenciados (Fig. 2). La colección de muestras biológicas se realizó en el siguiente orden: saliva no estimulada por babeo, placa supragingival (diente) ayudándonos de una sonda periodontal, placa subgingival (encía) con una cureta, superficie de la mucosa oral, y dorso lingual con swabs. Las muestras (2 swaps y 3 tubos por paciente) se conservaron

en un contenedor refrigerado en clínica y trasladadas al laboratorio para su cultivo sin romper la cadena de frío.

Datos clínicos:

Tras rellenar un cuestionario de salud básico y complementario en el que se incluyeron la edad, la edad de la primera menstruación y el estadio de la menopausia. Posteriormente, se recogieron datos clínicos orales de los pacientes en una exploración inicial, midiéndose el flujo y pH salival.

5.3. Cultivos

Las muestras fueron inoculadas en el medio selectivo CHROMagar™ Malassezia, preparado siguiendo las especificaciones del fabricante. Se cultivaron dos réplicas de cada muestra, dividiendo las placas; y fueron incubadas 4 días a 37°C, con CO₂ al 5%. Posteriormente se identificaron las especies de los hongos *Candida* (*albicans*, *parapsilosis*, *glabrata*, *tropicalis*) y *Malassezia* (*sympodialis*); diferenciándose por sus características macroscópicas: coloración, aspecto y textura (Anexo 1). Las colonias fueron fotografiadas a 10 aumentos; y una representación de cada especie hallada, fue fotografiada con un aumento de 30X en el microscopio.

5.4. Análisis de datos

Se hizo un conteo proporcional del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada réplica. Los datos obtenidos se recogieron en tablas de Excel, en las que se indicó: la edad de las pacientes, la edad de la primera menstruación, la etapa del climaterio, el pH salival, flujo salival, la presencia de crecimiento positivo, y se especificó el número de UFC de cada especie en las réplicas.

Empleando Excel, se calcularon el porcentaje de pacientes con crecimiento positivo y la proporción en la que se presentó cada especie.

Para hacer un análisis detallado de la presencia de las diferentes especies en los cinco nichos orales se elaboró un diagrama de Venn en Word, teniendo en cuenta la presencia absoluta en cada nicho. Pero para observar si las especies eran especialistas o generalistas, se elaboró una tabla con la presencia absoluta, considerándose presencia cuando hubiese crecimiento en más de 5 placas por localización (Anexo 2).

Se clasificó a la población según la etapa del climaterio en la que se encontrara, y se analizó la prevalencia de las diferentes especies en cada nicho oral. Tras distinguir por: premenopausia, perimenopausia o postmenopausia, se calculó en Excel el porcentaje de cada especie en los distintos nichos orales. Con los resultados se elaboró un gráfico de columnas 100% apiladas.

Por último, se evaluó la relación del flujo salival con las etapas del climaterio, y posteriormente con la prevalencia de *C. albicans*. Para ello, se emplearon las muestras de saliva tomada en reposo. Considerándose como flujo salival normal las secreciones de 0,25 - 0,35 mL/min, y como flujo reducido 0,1 - 0,25 mL/min. Se elaboró una gráfica de dispersión con regresión, relacionando el flujo salival con una media del recuento de UFC de *C. albicans* en saliva.

Para determinar si había diferencias significativas entre los niveles de pH en las distintas etapas del climaterio se analizó la distribución de frecuencia. Para elaborar los gráficos y realizar los análisis estadísticos se usó Graphpad Prism 9.0.

5.5. Estadística

Para estudiar la relación entre el flujo salival en reposo y el número de UFC de *C. albicans* en los 5 nichos orales, en las tres etapas del climaterio, realizamos un análisis de correlación de Spearman. Para eliminar los valores extremos y permitir una visión más clara de los resultados, a aquellos valores del flujo salival que fuesen mayores de 0,35 mL/min (el límite del rango seleccionado como flujo salival normal) se les dio el valor de 0,35 mL/min. Del mismo modo, en los casos en los que el recuento de UFC fuese mayor de 50, se les otorgó el valor de 50 (Anexo 3).

Para analizar la distribución de la frecuencia con la que se daban los distintos niveles de pH en las etapas del climaterio aplicamos el test de Kruskal Wallis. Ya que la muestra no presentaba una distribución normal, y eran varias muestras independientes.

6. Resultados

6.1. Presencia de hongos en las etapas del climaterio.

Para observar la presencia de hongos a nivel oral en relación con la menopausia, se tomaron y cultivaron muestras de cinco localizaciones orales a 36 mujeres. Las cuales fueron clasificadas según la etapa del climaterio en la que se encontraran.

De las 36 pacientes incluidas en el estudio, 24 (el 66,67%) fueron positivas en presencia de hongos. De esas 24 mujeres, el 12,5% se encontraban en la premenopausia, el 16,67% en la perimenopausia y el 70,83% en la postmenopausia (Fig.3). Por ello, observamos una alta frecuencia en la presencia de hongos en pacientes en etapa de postmenopausia en comparación con

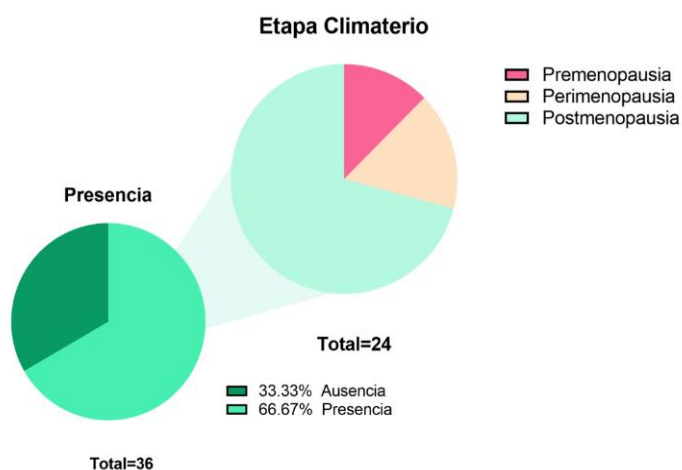


Fig.3. Presencia de hongos en el climaterio. Gráficos circulares indicando la presencia de hongos y su proporción en las distintas etapas del climaterio.

las fases previas. Estos datos sugieren una asociación entre las etapas del climaterio y la presencia de hongos.

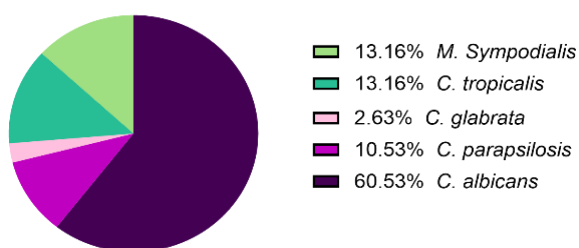


Fig. 4. Especies presentes en el climaterio. Gráfico circular mostrando la proporción de las especies halladas en el climaterio.

Concretamente, las especies que proliferaron fueron *C. albicans* (60,53%), siendo la más abundante; seguida de *C. tropicalis* y *M. sympodialis* en la misma proporción (13,16%), *C. parapsilosis* (10,53%) y, por último, *C. glabrata* (2,63%) (Fig. 4).

6.2. Relación de las especies fúngicas con los nichos orales.

Una vez observada la presencia de hongos, en cada localización (Fig. 5); con el objetivo de observar si las distintas especies de hongos incluidas en el estudio tenían especificidad por alguno de los nichos orales seleccionados, se hizo un recuento de la presencia absoluta en cada localización. De este modo observamos que cuando *C. albicans* se halla en la

mucosa oral, también se encuentra en lengua, encía y saliva. Mientras que *C. tropicalis* y *M. Sympodialis* solo están en saliva.

Relacionándose la presencia de *C. albicans* en una de esas zonas (encía, mucosa oral, lengua y saliva), con una mayor probabilidad de que se encuentre en las cuatro. Y observándose una mayor prevalencia de *C. tropicalis* y *M. Sympodialis* en saliva, del 21% cada una. Teniendo por tanto cada especie, especificidad por la localización (Anexo 2).

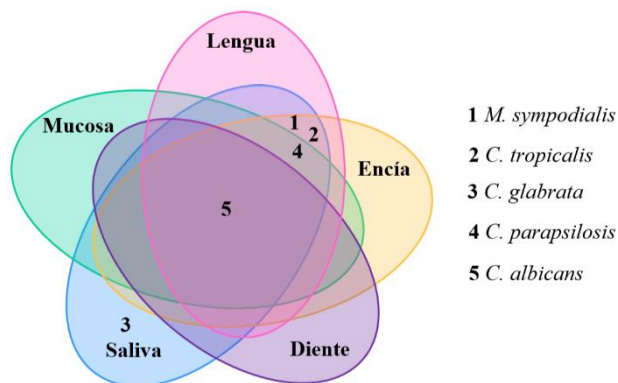


Fig. 5. Especies de hongos en los nichos orales. Diagrama de Venn mostrando los nichos en los que hay presencia de las especies de estudio.

6.3. Abundancia de las especies según la localización y la etapa del climaterio.

Habiendo observado que, en nuestra población de estudio, hay presencia de hongos, pudiendo relacionarse a la etapa del climaterio en la que se encontraran las pacientes; y que las especies de estos hongos, presentan especificidad por nichos orales concretos; quisimos evaluar qué especies de los géneros de estudio (*Candida* y *Malassezia*) se daban en cada nicho oral, según la etapa del climaterio. Para ello analizamos la abundancia de las distintas especies en los diferentes nichos seleccionados, dividiendo previamente a la población según se encuentren en: premenopausia, perimenopausia y postmenopausia.

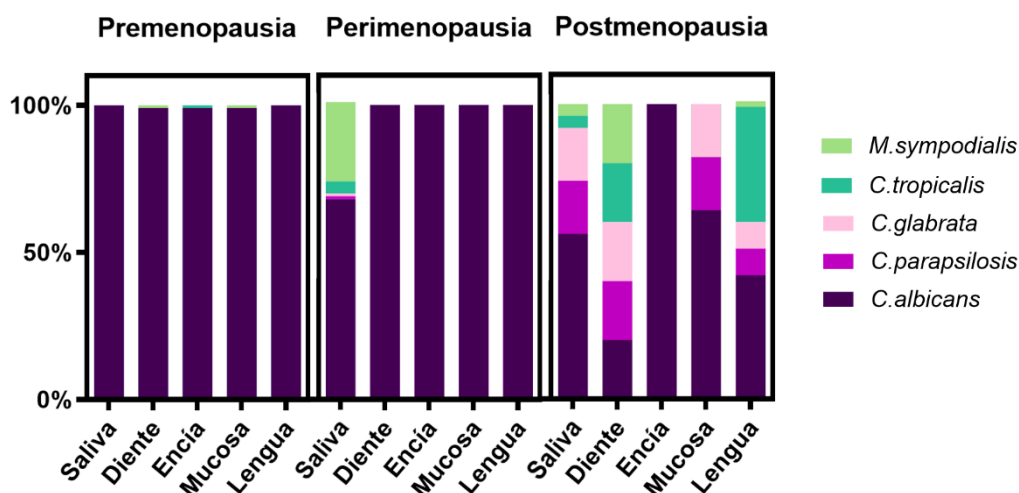


Fig. 6. Especies fúngicas en los nichos orales según la etapa del climaterio. Gráfico de barras apiladas 100% para observar la abundancia de las diferentes especies de *Candida* y *Malassezia* en las diferentes etapas del climaterio.

En las pacientes en la premenopausia se observó *C. albicans* como la especie más abundante en las cinco localizaciones. Distinguiéndose un 1% de *C. tropicalis* en encía, y un 1% de *M. sympodialis* en diente y mucosa oral. En aquellas en perimenopausia, aunque en diente, encía, mucosa y lengua sigue predominando *C. albicans*. En saliva se dio mayor variedad, estando *C. albicans* en un 68%, seguida por *M. Sympodialis* en un 27%, *C. tropicalis* en un 4%, y *C. parapsilosis* y *C. glabrata* en un 1%.

Por último, en las que se encontraban en la etapa de postmenopausia se observó la mayor variabilidad en cada zona. En diente, se dieron las 5 especies en la misma proporción (un 20% de cada una). En encía, prevaleció el dominio de *C. albicans*. En mucosa el 64% fue *C. albicans*; y *C. parapsilosis* y *C. glabrata* se encontraron en un 18% cada una. En lengua *C. albicans* estaba en un 42%, *C. parapsilosis* en un 9%, así como *C. glabrata*, *C. tropicalis* en un 39% y *M. sympodialis* en un 2%. Y en saliva, el 56% es *C. albicans*; estando *C. parapsilosis* y *C. glabrata* en un 18%, y *C. tropicalis* y *M. Sympodialis* en un 4% cada una (Fig. 6). Observándose un gran predominio de *C. albicans* en las etapas previas a la menopausia. Y la mayor diversidad de especies y por localización en la postmenopausia.

6.4. Características fisiológicas relacionadas con la menopausia: flujo salival y pH.

Tras encontrar que había variabilidad de especies fúngicas según el nicho oral, en relación con las etapas del climaterio; quisimos observar si, del mismo modo, características fisiológicas como son el flujo salival y el pH, ejercían alguna influencia sobre el desarrollo de hongos, en las diferentes etapas. Concretamente, nos centramos en *C. albicans* al ser la más abundante.

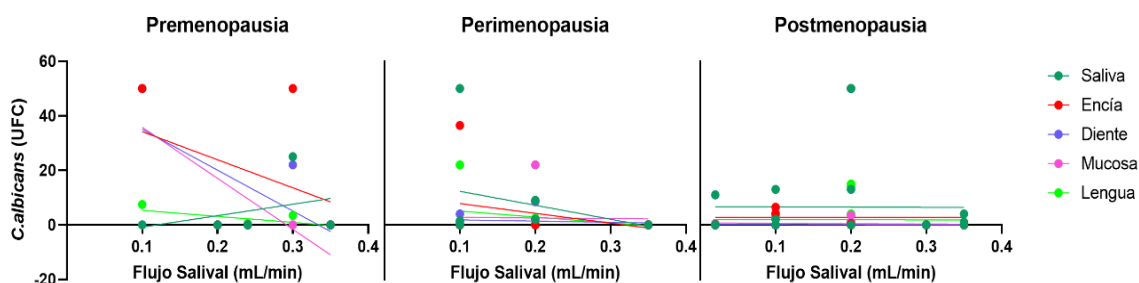


Fig. 7. Relación flujo salival y *C. albicans* en el climaterio. Gráfica de dispersión observando la correlación entre el flujo salival y las UFC de *C. albicans* en cada nicho oral en las tres etapas del climaterio. Estadística en Tabla. 1.

Estudiamos si había dependencia lineal entre el flujo salival en reposo (considerando flujo salival normal: 0,25 a 0,35 mL/min, y reducido: 0,1 a <0,25 mL/min) y las unidades

formadoras de colonias (UFC) de *C. albicans* en cada nicho oral, en las tres etapas del climaterio (Fig. 7) (Tabla.1).

En la premenopausia, observamos que en la saliva se daba una correlación positiva entre el flujo salival y el número de UFC. Mientras que, en el resto de nichos, había una correlación negativa, dándose la mayor en la mucosa ($r = -0,8034$), la que más se acercó a una relación inversa de dependencia. En cambio, en la perimenopausia, en todos los nichos se presentó una correlación negativa, aunque en mucosa era prácticamente nula ($-0,03369$). Por último, en la postmenopausia, excepto en diente y mucosa, en los que se dio una ligera correlación negativa, en el resto de los nichos apenas existía relación (r era prácticamente 0), acercándose más a

ser variables independientes. Pero ninguno de estos datos fue estadísticamente significativo ($P > 0,05$). La reducción del flujo salival en reposo tuvo la mayor relación con el aumento de UFC de *C. albicans* en la encía en la perimenopausia; pero de forma estadísticamente no significativa.

Tabla. 1. Correlación flujo salival y *C. albicans* en el climaterio. Coeficiente de correlación de Pearson entre las UFC de *C. albicans* en cada nicho oral y el flujo salival, en las distintas etapas del climaterio. Y su significación estadística.

Nicho		Premenopausia	Perimenopausia	Postmenopausia
Saliva	r	0,3610	-0,3618	-0,005287
	R ²	0,1303	0,1309	2,795x10 ⁻⁰⁰⁵
	P	0,5506	0,3387	0,9814
Encía	r	-0,3613	-0,3419	0,001289
	R ²	0,1305	0,1169	1,661x10 ⁻⁰⁰⁶
	P	0,5502	0,3678	0,9955
Diente	r	-0,6533	-0,1703	-0,1692
	R ²	0,4268	0,02899	0,02862
	P	0,2319	0,6614	0,4517
Mucosa	r	-0,8034	-0,03369	-0,1304
	R ²	0,6455	0,001135	0,01699
	P	0,1015	0,9314	0,5631
Lengua	r	-0,6541	-0,3481	-0,005562
	R ²	0,4279	0,1212	3,093x10 ⁻⁰⁰⁵
	P	0,2311	0,3586	0,9804

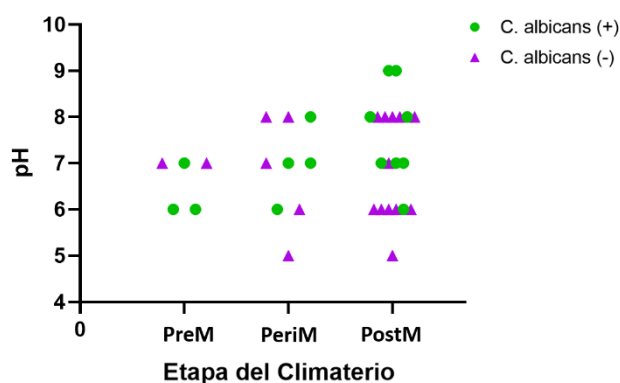


Fig. 8. El pH y la presencia de *C. albicans* en las etapas del climaterio. Análisis de la distribución de la frecuencia del nivel de pH en las tres etapas del climaterio, y su relación a la presencia de *C. albicans*.

Por último, estudiamos las variaciones del pH en las distintas etapas del climaterio, y su relación con la presencia o ausencia de *C. albicans* (Fig. 8). Se detectó una variación del pH de 1,286 entre las tres etapas, pero de forma estadísticamente no significativa ($P = 0,5258$). Por lo que no podemos rechazar la hipótesis nula de que no hay

diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de pH en las diferentes etapas del climaterio.

7. Discusión

En el climaterio se dan cambios hormonales y fisiológicos que favorecen alteraciones en el microbioma. Se ha observado que en función de las especies que predominen en éste, los microtipos, puede clasificarse a la población. Estudios anteriores se han focalizado mayoritariamente en especies bacterianas. Tan solo uno²⁸ se centró en que los hongos podrían ofrecer una demarcación más clara dentro de la población. Concretamente, los géneros *Candida* y *Malassezia*. Sin embargo, sólo se basaron en muestras de saliva como representación de la boca, cuando pueden distinguirse claramente cinco nichos orales. Del mismo modo, muy pocos son los que han tenido en cuenta las diferentes fases que se presentan en el climaterio, y la variabilidad entre ellas. En este estudio se evaluó la presencia de hongos de los géneros *Candida* y *Malassezia*, en las diferentes etapas del climaterio distinguiendo cinco nichos orales.

La diferenciación de las etapas del climaterio ha permitido identificar la postmenopausia como la fase con mayor presencia de hongos. En la menopausia la proliferación de hongos aumenta, además de por el envejecimiento del sistema, acentuado por el desajuste hormonal y los cambios fisiológicos que tienen lugar³². Esas alteraciones, provocan una disbiosis, favoreciendo la proliferación de especies oportunistas como *C. albicans*²⁹. Y es la postmenopausia, la etapa del climaterio en la que esta sintomatología se asienta de forma más intensa²⁹. Esto podría justificar la mayor presencia de hongos a nivel oral en la postmenopausia en nuestro estudio. La presencia de hongos fue de un 70,83% en nuestra cohorte, un valor mayor al 42,1% que se detectó en el estudio de Güevara-Cervantes²⁹, que también diferenciaron las tres etapas del climaterio. Aunque en nuestra población de estudio, la mayor parte de las participantes se encontraba en la postmenopausia, y por ello, el porcentaje podría ser mayor. Sin embargo, en el estudio de Güevara-Cervantes, distinguieron las fases por grupos de edad generalizados, sin tener en cuenta la edad en la que tuviesen las pacientes la última menstruación y sólo se centraron en el género *Candida*. Lo que podría haber provocado un recuento menor de las pacientes en postmenopausia.

Del mismo modo, la mayor variabilidad entre especies en los diferentes nichos orales estudiados los hallamos en la postmenopausia. Es común encontrar *C. albicans* en mayor abundancia, debido a la variedad de factores de virulencia que presenta³⁴. Sin embargo, habría que estudiar hasta qué punto depende esta diversidad en la postmenopausia de la acentuación de los cambios fisiológicos. Estando, por tanto, relacionada la proliferación de las otras especies con algún o algunos cambios específicos propios de esa etapa. O que, de otro modo, esté ligado a que el establecimiento de *C. albicans* en las etapas anteriores, provoque con el tiempo un desequilibrio a nivel oral, que favorezca la proliferación de esas otras especies.

De las especies identificadas, *C. albicans* es la especie más abundante. Seguida por *C. tropicalis* y *M. sympodialis*, como las segundas más prevalentes; y en menor medida *C. parapsilosis*, y *C. glabrata*. En recientes estudios se ha descrito *C. glabrata* como patógeno oportunista, atribuyéndosele la responsabilidad de infecciones mucosas y sistémicas³⁵. Pero en nuestra cohorte hemos obtenido *C. glabrata* como la especie menos prevalente. *C. glabrata* suele encontrarse en pacientes mayores de 65 años, inmunodeprimidos y está considerada como una infección asociada a atención en Salud (IAAS). Podría deberse a que en la postmenopausia, coincidiendo con etapas de envejecimiento, pudieran tener reducida su capacidad de respuesta inmune, aunque esto no hemos podido comprobarlo. La asociación de esta especie a ámbitos sanitarios puede deberse a su gran capacidad de colonizar distintas superficies. Sin embargo, las clínicas de la Facultad de Odontología de Sevilla no presentan las condiciones de una UCI, donde se ha descrito esta especie³⁶. Pudiendo radicar la diferencia en el tiempo de exposición más que en el tipo de servicio sanitario.

Aunque hay estudios que soporten la afirmación de que *C. glabrata* es la segunda especie aislada más frecuente³⁵, otros sostienen que este puesto lo ocupa *C. parapsilosis*³⁷. En cambio, en la población de estudio, aunque la presencia de *C. parapsilosis* ha sido mayor que la de *C. glabrata*, son *C. tropicalis* y *M. sympodialis*, las segundas más aisladas. Esto podría deberse a que *C. parapsilosis* suele encontrarse en adultos jóvenes³⁷. Sin embargo, la competición por la segunda posición en prevalencia de *C. tropicalis* y *M. sympodialis* es, cuanto menos, llamativo. *C. tropicalis* es genéticamente la más similar a *C. albicans*³⁸, por lo que podría tener factores de virulencia similares. No se sabe con seguridad, puesto que a pesar de ser común su proliferación en pacientes inmunodeprimidos, y edades avanzadas, hay poca información sobre ella. Pero en los últimos años, su aislamiento ha

aumentado en un 2,9%³⁹. Por ello, no es inusual que *C. tropicalis* sea la que tiene una mayor prevalencia de las *Candidas* no *albicans* en la cavidad oral.

La presencia de *Malassezia sympodialis* en un 13%, podría suponer que parte de esa población pertenezca a un microtipo distinto. Aunque en varias pacientes en las que se encontró *M. sympodialis* también se halló *Candida*. En el primer estudio en el que se distinguieron los microtipos *Candida* y *Malassezia*, se observó que no se distinguían por cuál estaba presente sino por el que se diera en mayor abundancia²⁸. Por tanto, la presencia de *Candida* en la muestra no sería un factor excluyente para el microtipo *Malassezia*, sino el número en el que se encontrara. De todos modos, el número de pacientes que presentan *Malassezia*, es menor al que se esperaría para separar por microtipos. Pudiendo deberse a que la población pertenezca en su mayoría al microtipo *Candida*; ya sea por la localización geográfica o porque en la menopausia se den características que favorezcan la proliferación de *Candida*. Sin embargo, la presencia de *Malassezia* puede haber sido subestimada. A pesar del empleo de un medio específico para su cultivo, su identificación resulta difícil por el reducido tamaño de las colonias. Por ello, es posible que, si se realizase la identificación mediante técnicas moleculares independientes de cultivo podría encontrarse una mayor prevalencia de *Malassezia* que la hallada mediante cultivo.

Al observar la relación entre las especies y los nichos orales, se distinguió que la extensión de *C. albicans* abarca la mayoría de los nichos orales. Cuando *C. albicans* se encuentra en saliva, también se da en lengua, mucosa y encía. Un hallazgo que cabría esperarse, ya que uno de sus principales factores de virulencia es su alta capacidad para adherirse a las células. Pero esta extensión puede llevar a confusión con el Síndrome de la boca ardiente (SBA), una patología que se da de forma predominante en mujeres postmenopáusicas⁴⁰. Las candidiasis crónicas, pueden dar lugar a una sensación de ardor en la boca⁴¹, la sintomatología característica del SBA. Y ambos comparten factores significativos como el uso crónico de drogas y la presencia de prótesis removibles con imperfecciones. Por lo que se ha planteado si *C. albicans* es un factor asociado al SBA. Pero, aunque en estudios en mujeres en la postmenopausia, *C. albicans* estaba presente en un 45,16% de las afectadas con el síndrome⁴⁰, no puede confirmarse que su presencia sea un factor asociado a su etiología.

La presencia de *C. albicans*, no se vio influenciada por parámetros fisiológicos como el pH o el flujo salival de forma significativa. La distribución de especies de *Candida* varía

según la muestra analizada, al igual que en otros estudios⁴². Pero los cambios fisiológicos podrían estar favoreciendo la proliferación de hongos, por ello, se relacionó la posible correlación del pH y flujo salival con el número de UFC de *C. albicans*. En la postmenopausia no llegó a observarse asociación entre el flujo salival y el aumento de la invasión por *C. albicans* al contrario de lo que se describe en la literatura⁴³. En la premenopausia, se observó que cuanto más reducido el flujo salival, más UFC de *C. albicans* hay en la mucosa, lo que podría explicarse por la facilidad que tiene *C. albicans* para adherirse a las células epiteliales de la mucosa, mediante adhesinas o reconociendo los receptores celulares. Mientras que en la perimenopausia se da al contrario en la mucosa. Al reducirse el flujo salival, aumentan las UFC en todos los nichos, menos en mucosa. Estos datos pueden deberse a casos aislados o a que el reducido número de pacientes pre y perimenopáusicas no permitiesen realizar correctamente el análisis estadístico. Debido a la pequeña población de estudio, no es posible distinguir si las relaciones observadas entre un descenso del flujo salival y el aumento de UFC de *C. albicans* en los distintos nichos, fueron aleatorias o si realmente hay una asociación.

Del mismo modo, no se observó una variación significativa entre los valores de pH en las diferentes etapas del climaterio. Al estudiar la influencia del pH, observamos que entre cada etapa de la menopausia llegaron a darse variaciones de pH de 1,28; presentándose la mayor variedad dentro de una misma etapa en la postmenopausia. En la postmenopausia, la fase en la que se espera un pH más ácido, efectivamente se encontraron pacientes con un pH más ácido, pero otras con un pH más básico. Esto podría deberse a que las pacientes pudieran tomar inhibidores de la bomba de protones que podrían impactar en la microbiota⁴⁴.

Esta primera aproximación al estudio de la micogeografía oral en las distintas etapas del climaterio, podría comenzar a revolucionar la forma de entender la relación salud-enfermedad con el microbioma en la menopausia. Acercándonos a una Oontología personalizada, y a encontrar biomarcadores de riesgo de enfermedades. En el futuro se podría hacer un estudio longitudinal, preferiblemente prospectivo, para observar si hay relación de causalidad. De modo que permita observar la evolución de las pacientes en cada etapa de la menopausia, y observar si hay relación con las patologías orales que presenten. Incidiendo en el estudio de las variaciones en las especies fúngicas, si su especificidad por zona varía según la etapa y haciendo un seguimiento de los cambios de pH y flujo salival en el tiempo, y su influencia o relación con la proliferación de hongos.

8. Conclusiones

En este estudio se han descrito los aislados clínicos de *Candida* y *Malassezia* en cinco nichos orales en mujeres en el climaterio. Una cohorte, que se ha clasificado según la fase de la menopausia en la que se encontraran. Observando:

1. La mayor prevalencia de hongos y variabilidad de especies, en los nichos orales, en la postmenopausia. Mientras las etapas de pre y perimenopausia se ven dominadas por *C. albicans*.
2. Advirtiéndose una presencia general de las especies *C. tropicalis* y *M. sympodialis*, mientras *C. albicans* se da como especialista, en los nichos: encía, lengua, mucosa y saliva.
3. La reducida cohorte no ha permitido determinar si el aumento de UFC de *C. albicans* ante un pH ácido y flujo salival reducido, es significativo.

Conocer la “micogeografía” oral, sus relaciones con los parámetros clínicos del hospedador y asociación a determinadas patologías; podría significar un gran avance hacia la odontología personalizada. Suponiendo la implementación del diagnóstico microbiológico a la práctica clínica diaria, un avance en el diseño del plan del tratamiento. Además de un biomarcador que permitiría la detección precoz del riesgo de desarrollar diversos desórdenes. En una época en la que ser conservador está a la orden del día, tenemos que fomentar la prevención.

9. Bibliografía

1. Knight, R. *et al.* The Microbiome and Human Biology. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **18**, 65–86 (2017).
2. Rosier, B. T., Moya-Gonzalvez, E. M., Corell-Escuin, P. & Mira, A. Isolation and Characterization of Nitrate-Reducing Bacteria as Potential Probiotics for Oral and Systemic Health. *Front. Microbiol.* **11**, 555465 (2020).
3. Yano, J. M. *et al.* Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* **161**, 264–276 (2015).
4. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).
5. Lloyd-Price, J. *et al.* Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature* **550**, 61–66 (2017).
6. Kim, D. *et al.* Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome* **5**, 52 (2017).
7. Browne, H. P. *et al.* Culturing of ‘unculturable’ human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* **533**, 543–546 (2016).
8. Tanner, A. C. R. *et al.* Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1464–1474 (2011).
9. Zaura, E., Keijser, B. J. F., Huse, S. M. & Crielaard, W. Defining the healthy ‘core microbiome’ of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* **9**, 259 (2009).
10. Zaura, E. *et al.* On the ecosystemic network of saliva in healthy young adults. *ISME J.* **11**, 1218–1231 (2017).
11. Ehrlich, S. D. MetaHIT: The European Union Project on Metagenomics of the Human Intestinal Tract. in *Metagenomics of the Human Body* (ed. Nelson, K. E.) 307–316 (Springer, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-7089-3_15.

12. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180 (2011).
13. Willis, J. R. *et al.* Citizen science charts two major ‘stomatotypes’ in the oral microbiome of adolescents and reveals links with habits and drinking water composition. *Microbiome* **6**, 218 (2018).
14. Xun, Z., Zhang, Q., Xu, T., Chen, N. & Chen, F. Dysbiosis and Ecotypes of the Salivary Microbiome Associated With Inflammatory Bowel Diseases and the Assistance in Diagnosis of Diseases Using Oral Bacterial Profiles. *Front. Microbiol.* **9**, 1136 (2018).
15. Simon-Soro, A. *et al.* Upper Respiratory Dysbiosis with a Facultative-dominated Ecotype in Advanced Lung Disease and Dynamic Change after Lung Transplant. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **16**, 1383–1391 (2019).
16. Simón-Soro, A. *et al.* Microbial geography of the oral cavity. *J. Dent. Res.* **92**, 616–621 (2013).
17. Mark Welch, J. L., Ramírez-Puebla, S. T. & Borisy, G. G. Oral Microbiome Geography: Micron-Scale Habitat and Niche. *Cell Host Microbe* **28**, 160–168 (2020).
18. The Landscape Ecology and Microbiota of the Human Nose, Mouth, and Throat - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28407480/>.
19. Kim, D. *et al.* Spatial mapping of polymicrobial communities reveals a precise biogeography associated with human dental caries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 12375–12386 (2020).
20. Kullaa, A. M., Asikainen, P., Herrala, M., Ukkonen, H. & Mikkonen, J. J. W. Microstructure of oral epithelial cells as an underlying basis for salivary mucosal pellicle. *Ultrastruct. Pathol.* **38**, 382–386 (2014).

21. Kullaa-Mikkonen, A. & Sorvari, T. E. A scanning electron microscopic study of the dorsal surface of the human tongue. *Acta Anat. (Basel)* **123**, 114–120 (1985).
22. Sparber, F., Ruchti, F. & LeibundGut-Landmann, S. Host Immunity to *Malassezia* in Health and Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, (2020).
23. Baker, J. L., Bor, B., Agnello, M., Shi, W. & He, X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* **25**, 362–374 (2017).
24. Dupuy, A. K. *et al.* Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PloS One* **9**, e90899 (2014).
25. Klinke, T., Guggenheim, B., Klimm, W. & Thurnheer, T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res.* **45**, 100–106 (2011).
26. Ashbee, H. R. Update on the genus *Malassezia*. *Med. Mycol.* **45**, 287–303 (2007).
27. Grice, E. A. & Dawson, T. L. Host-microbe interactions: *Malassezia* and human skin. *Curr. Opin. Microbiol.* **40**, 81–87 (2017).
28. Hong, B. Y. *et al.* The Salivary Mycobiome Contains 2 Ecologically Distinct Mycotypes. *J. Dent. Res.* **99**, 730–738 (2020).
29. Guevara Cervantes, J. F., Vásquez, del M., Canales Falcón, Y. & Arenas, R. Micosis superficiales en el climaterio. Estudio en pacientes premenopáusicas, menopáusicas y posmenopáusicas. *Dermatol. Cosmética Médica Quirúrgica* **13**, 194–200 (2015).
30. Taechakraichana, N., Jaisamrarn, U., Panyakhamlerd, K., Chaikittisilpa, S. & Limpaphayom, K. K. Climacteric: concept, consequence and care. *J. Med. Assoc. Thail. Chotmai het Thangphaet* **85 Suppl 1**, S1-15 (2002).
31. Schneider, H. P. G. & Birkhäuser, M. Quality of life in climacteric women. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* **20**, 187–194 (2017).
32. Menopause. *Nat. Rev. Dis. Primer* **1**, 1–1 (2015).




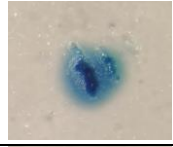

33. D R, M. *et al.* Evaluation of Salivary Flow Rate, pH and Buffer in Pre, Post & Post Menopausal Women on HRT. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **8**, 233–236 (2014).
34. Panizo, M. M. & Reviákina, V. Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.* **21**, 38–45 (2001).
35. Valle, G. M. M. del. Candida glabrata: un patógeno emergente. *Biociencias* **10**, 89–102 (2015).
36. Gupta, A., Gupta, A. & Varma, A. Candida glabrata candidemia: An emerging threat in critically ill patients. *Indian J. Crit. Care Med. Peer-Rev. Off. Publ. Indian Soc. Crit. Care Med.* **19**, 151–154 (2015).
37. Trofa, D., Gácsér, A. & Nosanchuk, J. D. Candida parapsilosis, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 606–625 (2008).
38. Silva, S. *et al.* Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 288–305 (2012).
39. Pfaller, M. A. *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of Candida and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5848–5859 (2005).
40. Cavalcanti, D. R., Birman, E. G., Migliari, D. A. & da Silveira, F. R. X. Burning mouth syndrome: clinical profile of Brazilian patients and oral carriage of Candida species. *Braz. Dent. J.* **18**, 341–345 (2007).
41. Baumgardner, D. J. Oral Fungal Microbiota: To Thrush and Beyond. *J. Patient-Centered Res. Rev.* **6**, 252–261 (2019).

42. Cornistein, W., Mora, A., Orellana, N., Capparelli, F. J. & del Castillo, M. Candida: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* **31**, 380–384 (2013).
43. Nadig, S. D. *et al.* A relationship between salivary flow rates and Candida counts in patients with xerostomia. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP* **21**, 316 (2017).
44. Imhann, F. *et al.* Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut* **65**, 740–748 (2016).

10. Anexo

10.1. Anexo 1

Anexo 1. Características macroscópicas especies de *Candida* y *Malassezia*. Tabla con las características macroscópicas de tamaño, coloración y aspecto, para la diferenciación de las especies de *Candida* y *Malassezia* en el medio CHROMagar™ Malassezia.

	<p><u><i>Candida albicans</i></u></p> <p>Color verde, brillante, borde regular, halo verde.</p>
	<p><u><i>Candida parapsilosis</i></u></p> <p>Color rosa, brillante, bordes regulares. 4º día: bordes pueden ser irregulares, halo rosa claro, diámetro 4 mm.</p>
	<p><u><i>Candida glabrata</i></u></p> <p>Centro rosa oscuro, brillante, bordes regulares, halo rosa claro, diámetro 3 mm.</p>
	<p><u><i>Candida tropicalis</i></u></p> <p>Azul metálico, halo malva.</p>
	<p><u><i>Malassezia sympodialis</i></u></p> <p>Color morado oscuro, mate, bordes regulares. 4º día: diámetro 1 mm.</p>

10.2. Anexo 2

Anexo 2. Presencia de las especies de estudio en los nichos orales. Tabla para analizar la relación de la presencia absoluta de las especies, con los nichos orales. Considerando presencia absoluta cuando se diera en más de cinco placas.

Presencia absoluta ($\geq 5 = 1$; $< 5 = 0$)					
	<i>C.albicans</i>	<i>C.parapsilopsis</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>M.sympodialis</i>
Mucosa	1	0	0	0	0
Diente	0	0	0	0	0
Lengua	1	0	0	0	0
Encía	1	0	0	0	0
Saliva	1	0	0	1	1

10.3. Anexo 3

Anexo 3. Relación entre el flujo salival en reposo y las UFC de *C. albicans*, en los cinco nichos orales. Tabla para mostrar la eliminación de los valores extremos al estudiar la relación del flujo salival y las UFC de *C. albicans* en los 5 nichos orales, en las tres etapas del climaterio. a) Tabla inicial. b) Tabla cumpliendo las condiciones: 1) flujo salival > 0,35 mL/min = 0, 35; 2) UFC > 50 = 50.

a)	C. albicans (UFC)				
	Flujo Salival (mL/min)	Saliva	Encía	Diente	Mucosa
Premenopausia					
0,1	0	107	60,5	79	7,5
1,2	0	0	0	0	0
0,3	25	100	22	0	3,5
0,2	0	0	0	0	0
0,24	0	0	0	0	0,5
Perimenopausia					
0,2	9	0	8,5	22	2,5
0,1	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,1	1,5	0	0	0	0
0,4	0	0	0	0	0
0,2	2	0	0	0	0,5
0,5	0	0	0	0	0
0,1	100	36,5	4	1	22
1	0	0	0	0	0
Postmenopausia					
0,3	0	0	0	0	0
0,2	100	106	0	1	15
0,2	0	0	0	0	0
0,1	2	4	2	4,5	4
0,3	0	0	0	0	0
0,2	0	0	0	3,5	4
0,1	0	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0	0
1,2	4	0	0	0	0
0,02	0	0	0	0	0
0,02	0	0	0	0	0
0,02	11	0	0	0,5	0,5
0,2	13	0,5	0	1	14
0,3	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,56	1	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,2	100	0	0	0	1
0,1	13	6,5	0	0	3
0,1	0	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0	0
0,4	0	0	0	0	0

b)	C. albicans (UFC)				
	Flujo Salival (mL/min)	Saliva	Encía	Diente	Mucosa
Premenopausia					
0,1	0	50	50	50	7,5
0,35	0	0	0	0	0
0,3	25	50	22	0	3,5
0,2	0	0	0	0	0
0,24	0	0	0	0	0,5
Perimenopausia					
0,2	9	0	8,5	22	2,5
0,1	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,1	1,5	0	0	0	0
0,35	0	0	0	0	0
0,2	2	0	0	0	0,5
0,35	0	0	0	0	0
0,1	50	36,5	4	1	22
0,35	0	0	0	0	0
Postmenopausia					
0,3	0	0	0	0	0
0,2	50	50	0	1	15
0,2	0	0	0	0	0
0,1	2	4	2	4,5	4
0,3	0	0	0	0	0
0,2	0	0	0	3,5	4
0,1	0	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0	0
0,35	4	0	0	0	0
0,02	0	0	0	0	0
0,02	0	0	0	0	0
0,02	11	0	0	0,5	0,5
0,2	13	0,5	0	1	14
0,3	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,35	1	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,2	50	0	0	0	1
0,1	13	6,5	0	0	3
0,1	0	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0	0
0,35	0	0	0	0	0