

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)**



**TESIS DOCTORAL**

**Diseños de investigación en la evaluación de formulaciones para el control químico del biofilm dental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**M<sup>a</sup> del Sagrario Santos Beneit**

Directores

Mariano Sanz Alonso  
David Herrera González

Madrid, 2016

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA BUCO-FACIAL**



**DISEÑOS DE INVESTIGACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE FORMULACIONES  
PARA EL CONTROL QUÍMICO DEL BIOFILM DENTAL**

**MEMORIA PARA OPTAR A GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR:**

**M<sup>a</sup> del Sagrario Santos Beneit**

**Bajo la dirección de los doctores:**

**Mariano Sanz Alonso, David Herrera González**

**Madrid, 2015**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA BUCO-FACIAL**



**DISEÑOS DE INVESTIGACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE FORMULACIONES  
PARA EL CONTROL QUÍMICO DEL BIOFILM DENTAL**

**M<sup>a</sup> del Sagrario Santos Beneit**

**Tesis doctoral**

**Dirigida por: Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso**  
**Prof. Dr. D. David Herrera González**

**Madrid, 2015**



*A mis hijos, Óscar y Blanca*



## **Agradecimientos**

A mis padres, Antonio y Gloria, y a mis abuelos, quienes siempre han sido ejemplo para mi del trabajo bien hecho y han sabido inculcarme la perseverancia en toda disciplina.

A mis hermanos, Toñín y Marigó, por su ayuda incondicional e imprescindible para que el trabajo de años llegase a ser, al igual que lo fue en cada uno de ellos, una tesis doctoral.

A todos mis familiares, amigos y compañeros, que me han animado en todo el desarrollo del trabajo, en especial al Dr. Óscar Martín Arroyo, cuya inspiración y experiencia me sirvió de mucha ayuda en momentos difíciles.

A mis directores, el Dr. Mariano Sanz Alonso y el Dr. David Herrera González, por su confianza en que sería capaz de abordar todo este trabajo y por su constante refuerzo en mi ánimo, así como por instruirme en la incansable lucha por la investigación, cualidad de ambos que es reconocida en todo el mundo.

A todo el personal clínico y de laboratorio, especialmente a Itziar González y Ana O'Connor, que tantas enseñanzas me han proporcionado, siempre con cariño y profesionalidad.

A mi marido, Norberto, y a mis hijos, Óscar y Blanca, porque gracias a tantos momentos privados de su compañía, he podido satisfacer este importante reto académico y porque han sido mi fuente de energía durante todo este largo proceso.



## ÍNDICE

RESUMEN .....	13
SUMMARY .....	19
INTRODUCCIÓN .....	25
1- Las enfermedades periodontales .....	28
1.1. Etiología.....	29
1.2. Epidemiología.....	31
1.3. Evolución y Co-Morbilidad.....	35
1.4. Tratamiento .....	39
2. Biofilm microbiano y bacterias periodontales.....	41
2.1. Biofilm .....	41
2.2. Especies bacterianas.....	44
3. Prevención de enfermedades periodontales .....	47
3.1. Control de placa mecánico .....	50
3.2. Control de placa químico .....	53
3.2.1. Modo de acción .....	54
3.2.2. Actividad.....	55
3.2.3. Sustantividad .....	56
4. Productos de higiene oral .....	57
4.1. Formulaciones de productos de higiene oral químicos.....	58
4.2. Desarrollo de la formulación.....	63
4.2.1. Vehículos .....	65
4.2.2. Liberación .....	66
4.2.3. Aclaramiento.....	67
4.2.4. Requerimientos de la forma farmacéutica.....	67
4.2.5. Tipos de formas farmacéuticas.....	68
4.3. Evaluación de los productos químicos de higiene oral.....	69
4.3.1. Métodos <i>in vitro</i> .....	70
Test (o pruebas) antimicrobianos.....	70
Estudios sobre bacterias aisladas.....	71
Estudios sobre bacterias en biofilm .....	73
4.3.2. Métodos <i>in vivo</i> .....	78
Estudios de retención oral.....	78
Test antimicrobianos <i>in vivo</i> .....	79
Estudios de placa experimental.....	80
Estudios de gingivitis experimental .....	81
Estudios de uso en casa. Principios de su diseño.....	81
a. Diseño del estudio .....	82
b. Cumplimiento.....	84
c. Tamaño muestral.....	85
d. Unidad de análisis .....	85

e. Controles .....	86
f. Protección del paciente.....	88
5. Resultados de la evaluación de productos de higiene oral.....	88
5.1. Prueba de eficacia .....	89
5.2. Prueba de seguridad .....	93
6. Pautas de evaluación de productos de higiene oral en España .....	98
6.1. Medicamentos.....	101
6.2. Cosméticos .....	105

JUSTIFICACIÓN .....	109
---------------------	-----

HIPÓTESIS .....	113
General .....	115
Específicas.....	115

OBJETIVOS .....	117
General.....	119
Específicos .....	119

MATERIAL Y MÉTODO. RESULTADOS .....	121
-------------------------------------	-----

Artículo 1: Herrera D, Roldan S, SantaCruz I, **Santos S**, Masdevall M, Sanz M. “Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study”. *Journal of Clinical Periodontology* 2003; 30 (4): 307-314.

Artículo 2: **Santos S**, Herrera D, López E, O'Connor A, González I, Sanz M. “A randomized clinical trial on the short-term clinical and microbiological effects of the adjunctive use of a 0.05% chlorhexidine mouth rinse for patients in supportive periodontal care”. *Journal of Clinical Periodontology* 2004; 31 (1): 45-51.

Artículo 3: Herrera D, **Santos S**, Ferrús J, Barbieri G, Trombelli L, Sanz M. “Efficacy of a 0.15% benzydamine hydrochloride and 0.05% cetylpyridinium chloride mouth-rinse on 4-day de novo plaque formation”. *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32(6): 595-603.

DISCUSIÓN .....	129
Diseño .....	135
Muestra poblacional.....	137
Estratificación .....	139
Aleatorización .....	139
Régimen de uso .....	140

Duración .....	142
Controles .....	144
Ciego.....	145
Variables.....	146
Efecto de tratamiento y precisión de resultados .....	148
Aplicabilidad.....	149
Evaluación específica de formulaciones para el control químico de placa .....	150
<b>CONCLUSIONES</b> .....	157
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	161



RESUMEN



**Título:** Diseños de investigación en la evaluación de formulaciones para el control químico del biofilm dental.

**Introducción:**

Las enfermedades periodontales son patologías infecciosas, altamente prevalentes, que afectan a los tejidos que sostienen los dientes, y que tienen importantes consecuencias a nivel bucodental y sistémicas. El control eficaz de las enfermedades periodontales depende de la identificación y tratamiento de la infección establecida y la consiguiente prevención de recurrencias. En la actualidad, el mercado ofrece una gran cantidad de productos para el control químico del biofilm dental y, por tanto, se hace imprescindible la validación, a través de estudios científicos, de dichos productos, tanto para comprobar su eficacia y su seguridad, como su ajuste a la legislación vigente.

**Objetivos:**

Analizar la validez e idoneidad de cuatro modelos experimentales diferentes para comparar los efectos de distintas formulaciones en el control químico de la placa.

En el modelo experimental 1.1, el objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro*, mediante un test de contacto, de enjuagues comerciales que incluyen 0.12% de clorhexidina en su formulación.

En el modelo experimental 1.2, el objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo*, mediante un modelo de recuentos salivales, de enjuagues comerciales que incluyen 0.12% de clorhexidina en su formulación.

En el modelo experimental 2, el objetivo fue evaluar la eficacia clínica y microbiológica a corto plazo de una nueva formulación en enjuague oral, con una baja concentración de clorhexidina (0.05%), y cloruro de cetilpiridinio, utilizado como método adicional de higiene oral en pacientes en cuidado periodontal de soporte.

Por último, en el modelo experimental 3, el objetivo fue evaluar el efecto de una formulación de colutorio que combina bencidamina más cloruro de cetilpiridinio en la prevención de la formación de nueva placa, en comparación con colutorios de cloruro de cetilpiridinio solo y placebo. Y también, determinar el

efecto de la asociación de bencidamina más cloruro de cetilpiridinio sobre los tejidos gingivales y la microflora periodontal y comparar la tolerabilidad de estas formulaciones.

### **Material y métodos:**

El modelo 1.1 evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* a través de una modificación de la prueba de contacto, para la que se seleccionaron veinte especies bacterianas, con un contacto de un minuto de duración con cada producto a evaluar. Después del contacto, el inóculo se cultivó y los resultados se expresaron en términos de supervivencia/resistencia y el porcentaje de supervivencia en comparación con una solución salina control.

El modelo 1.2. fue un ensayo *in vivo* que consistió en un estudio de recuentos bacterianos en saliva a doble ciego, aleatorizado y cruzado en una población de muestra de 10 voluntarios que se enjuagaron durante un minuto con cada producto probado. Las muestras de saliva se obtuvieron antes del enjuague y después, transcurridos cinco minutos, una, tres, cinco y siete horas. Estas muestras se cultivaron tanto en atmósfera aeróbica como anaeróbica. Se calculó el porcentaje de supervivencia bacteriana. Las comparaciones entre los productos fueron realizadas mediante ANOVA y la prueba de la t de Student pareada.

El modelo 2 consistió en un ensayo clínico aleatorizado, controlado con placebo, con dos grupos: grupo de prueba, enjuague dos veces al día con el producto de prueba (con clorhexidina al 0.05% y cloruro de cetilpiridinio al 0.05%) y el grupo control, con un placebo. Se incluyeron 33 pacientes con periodontitis crónica ya tratados, y se establecieron dos visitas, la basal y tras 15 días. Las variables de resultados clínicos que se incluyeron fueron los índices de placa y gingivales, así como la profundidad de la bolsa. Se procesaron muestras subgingivales mediante cultivo. También se evaluaron las variables basadas en los pacientes y los efectos adversos. Los resultados se compararon mediante la prueba t de Student, chi-cuadrado, y la prueba de Mann-Whitney.

El modelo 3 fue un ensayo clínico en fase I, en un solo centro, con observador ciego, cruzado, aleatorizado, controlado con al menos 10 días de aclaramiento entre dos tratamientos consecutivos. Se usaron dos controles, un control positivo, que contenía cloruro de cetilpiridinio, y un control negativo

(placebo). A los sujetos se les asignó de forma aleatorizada recibir una de las seis posibles secuencias de tratamiento tras una sesión de profilaxis oral y la retirada de cualquier medida de higiene oral para los siguientes 4 días, a excepción del enjuague asignado. Se programaron siete visitas. Por cada periodo de tratamiento, los sujetos se enjuagaron 3 veces al día durante 4 días. Los productos de tratamiento fueron bencidamina al 0.15% más cloruro de cetilpiridinio al 0.05% en colutorio; cloruro de cetilpiridinio en colutorio al 0.05%; y colutorio placebo (incluyendo 8.1% de alcohol). Las variables fueron índices de placa y gingivitis, recuentos bacterianos y tolerabilidad. Se llevó a cabo una comparación intergrupo de los índices de placa y los índices gingivales mediante el análisis de la varianza seguido de un diseño de cuadrado latino incluyendo periodo, secuencia, sujeto dentro de la secuencia y efectos de tratamiento como fuentes de variación. Las unidades formadoras de colonias anaeróbicas total fueron comparadas mediante un ANOVA, identificando diferencias mediante el test de rangos múltiples.

### **Resultados:**

En el modelo 1.1, la prueba de contacto *in vitro* no mostró supervivencia en ninguna de las especies ensayadas con clorhexidina más cloruro de cetilpiridinio, mientras que tres especies (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis* y *Parvimonas micra*) fueron resistentes a los otros tres productos. El producto que contenían clorhexidina sola así como el formulado con clorhexidina más fluoruro sódico demostraron resistencias adicionales (tres y cuatro especies, respectivamente).

En el modelo 1.2, la prueba de recuentos bacterianos salivales *in vivo* mostró mayores reducciones para clorhexidina más cloruro de cetilpiridinio y para clorhexidina con alcohol en bacterias aerobias y anaerobias, con una duración de cinco horas. Se detectaron diferencias significativas en múltiples momentos, cuando estos dos productos eran comparados tanto con el control como con los otros productos probados.

En el modelo 2, los índices de placa y gingivales, así como el registro de recuentos bacterianos totales se redujeron en el grupo test, pero las diferencias entre grupos fueron sólo estadísticamente significativas para los registros de placa y bacterias. Se observó una reducción significativa en las proporciones de flora y en la frecuencia de detección de *Porphyromonas gingivalis* en el grupo test.

En el modelo 3, la formulación que contenía bencidamina 0.15% más cloruro de cetilpiridinio al 0.05% mostró una eficacia en los niveles de placa estadísticamente significativa respecto a los otros dos grupos, mientras que tanto desde el punto de vista microbiológico, como de eficacia en índice gingival y otros parámetros clínicos, así como los efectos adversos, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

### **Conclusiones:**

Como conclusión general, se señala que el tipo de modelo de investigación aplicado en los estudios incluidos, no resta validez a los resultados que se derivan de los mismos.

Tanto el test de contacto breve como el modelo *in vivo* de recuentos salivales han permitido comparar la actividad microbiana de enjuagues comerciales que incluyen clorhexidina al 0.12% en su formulación. De ellos, el que combina clorhexidina al 0.12% y cloruro de cetilpiridinio al 0.05% fue el único que demostró eficacia *in vitro* contra todas las cepas evaluadas y el que mostró la mayor eficacia *in vivo* para mantener la disminución de bacterias en saliva.

Un diseño de ensayo clínico aleatorizado a corto plazo permitió concluir que un colutorio con una baja concentración de clorhexidina (0.05%) y cloruro de cetilpiridinio, tenía actividad inhibitoria de placa, así como efecto sobre la microflora anaeróbica subgingival total.

Para evaluar la formación de nueva placa, un diseño de modelo cruzado permitió concluir que el producto que combinaba bencidamina y cloruro de cetilpiridinio demostró una actividad inhibitoria de la placa superior comparado con una formulación con cloruro de cetilpiridinio solo, y un menor incremento de diferentes patógenos bacterianos específicos asociados con gingivitis.

SUMMARY



**Title:** Research designs for the evaluation of chemical biofilm control antimicrobial agents.

**Introduction:**

Periodontal diseases are highly prevalent infections affecting the tooth supporting tissues and their progression may have important consequences for the affected subject's oral and general health. Effective control of periodontal diseases depends on the identification and treatment of this infectious process and the subsequent prevention of its recurrence. Currently, the market offers a huge variety of products for the chemical control of dental biofilm and therefore, it is essential to validate these products through scientific studies, both in terms of effectiveness as well as safety and adherence to current legislation.

**Objectives:**

Evaluate the validity and appropriateness of four different experimental models that compare the effects of different formulations in chemical plaque control. In the experimental model 1.1, the objective was the *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of different commercially available 0.12% chlorhexidine mouth rinse formulations using a contact test.

In the experimental model 1.2, the aim was to evaluate the *in vivo* antimicrobial activity of different commercially available 0.12% chlorhexidine mouth rinse formulations using a model based on salivary counts.

In the experimental model 2, the objective was to evaluate the clinical and microbiological short-term efficacy of a new oral rinse formulation with a low concentration of chlorhexidine (0.05%) and cetylpyridinium chloride, when used adjunctive to oral hygiene measures in patients in supportive periodontal care.

Finally, in the experimental model 3, the objective was to evaluate the effect of a mouth rinse formulation combining benzydamine and cetylpyridinium chloride, compared with cetylpyridinium chloride alone and placebo, in preventing de novo plaque formation and assess the effect of the combination of benzydamine and cetylpyridinium chloride on gingival tissues and the periodontal microflora and compare the tolerability of these formulations.

## Material and methods:

Model 1.1 assessed the *in vitro* antimicrobial activity by means of a modified contact test. Twenty bacterial species were selected, and contact was applied during one minute with each product to be assessed. After the contact, the inoculum was cultured and the results were expressed in terms of survival/resistance and survival percentage as compared to a saline control.

Model 1.2 was an *in vivo* study based on bacterial saliva counts with a double-blind, randomized crossover design in a sample population of 10 volunteers who rinsed for one minute with each of the tested products. Saliva samples were obtained before and after rinsing (after five minutes, one, three, five and seven hours). These samples were cultured in both aerobic and anaerobic environments. The percentage of bacterial survival was calculated. The comparisons between the products were carried out through the ANOVA test and Student's paired *t*-test.

Model 2 was a randomized and placebo controlled clinical test, with two groups: test group, with two daily rinses with the test product (chlorhexidine 0.05% and cetylpyridinium 0.05%) and control group, which was treated with a placebo. 33 patients with already treated chronic periodontitis were included and two appointments were scheduled: baseline and 15 days later. The clinical outcome variables included plaque and gingival indices, as well as probing pocket depth. Subgingival samples were processed through culturing. Also patient-based variables and adverse effects were calculated. Results were compared by means of Student's *t*-test,  $\chi^2$  and Mann-Whitney test.

Model 3 was a single-centre, blinded, crossover randomized controlled phase I clinical study with at least 10 days of wash-out between two consecutive treatments. Two controls were used: one positive control, which contained cetylpyridinium and a negative one (placebo). The subjects were randomly assigned to receive one of the six possible treatment sequences after a session of oral prophylaxis and the avoidance of any oral hygiene measure during the following four days, with exception of the mouth rinse assigned. Seven visits were scheduled. During each treatment period, the volunteers rinsed three times a day for four days. The treatment products were the following mouth rinses: 0.15% benzydamine plus 0.05% cetylpyridinium chloride; 0.05% cetylpyridinium

chloride; and placebo mouth rinse (with 8.1% alcohol). The outcome variables were plaque and gingivitis indices, bacterial counts and tolerability. An intergroup comparison was carried out of plaque and gingival indices through variance analysis, followed by a Latin-square design, including the following sources of variation: period, sequence, subject within the sequence and treatment effects. The total anaerobic colony-forming units were compared through the ANOVA test, identifying differences by means of the multiple rank test.

**Results:**

In model 1.1, the *in vitro* contact test showed no survival in either species tested with chlorhexidine and cetylpyridinium chloride, while three species (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis* and *Parvimonas micra*) were resistant to the other three products. The product containing only chlorhexidine and also the chlorhexidine products that were formulated with sodium fluoride showed more additional resistant strains (three and four species, respectively).

In model 1.2, the *in vivo* salivary bacterial counts test showed greater reductions for chlorhexidine with cetylpyridinium chloride and chlorhexidine with alcohol for aerobic and anaerobic bacteria, during five hours. Significant differences were detected at multiple time points when these two products were compared with both the control and the other tested products.

In model 2, the plaque and gingival indices, as well as total bacterial counts were reduced in the test group, but the differences between groups were statistically significant only for plaque and bacteria scores. A significant reduction in the proportions of flora and frequency of detection of *Porphyromonas gingivalis* in the test group was observed.

In model 3, the formulation containing 0.15% benzydamine and 0.05% cetylpyridinium chloride was significantly more effective in the inhibition of plaque formation, when compared to the other two groups, while in terms of microbiological outcomes, efficacy on gingival index and other clinical parameters, as well as adverse effects, no statistically significant differences were observed among the groups.

## **Conclusions:**

As general conclusion, the type of research model applied in the included studies does not undermine the validity of the results provided by them.

Both the short contact test as the salivary counts *in vivo* model have proved their validity to compare microbial activity of commercial mouth rinses including 0.12% chlorhexidine in its formulation. From these, the mouthwash that combines 0.12% chlorhexidine and 0.05% cetylpyridinium chloride was the only one that demonstrated efficacy *in vitro* against all tested strains and showed the highest *in vivo* efficacy in maintaining the reduction of bacterial counts in saliva.

A randomized clinical trial design with short term follow-up led to the conclusion that a mouthwash with a low concentration of chlorhexidine (0.05%) and cetylpyridinium chloride had plaque inhibitory activity as well as effect on total anaerobic subgingival microflora.

A cross pattern design, evaluating the formation of new plaque, led to the conclusion that the product that combined benzydamine and cetylpyridinium chloride showed greater plaque-inhibitory activity compared to a formulation with cetylpyridinium chloride alone and showed a smaller increase in different specific bacterial pathogens associated with gingivitis.

## INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

El papel que desempeña la placa bacteriana (biofilm dental) en la etiología de las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis) es bien conocido y aceptado. Desde el punto de vista patológico, la gingivitis es reversible, siempre y cuando se elimine la placa bacteriana que se encuentra alrededor de los dientes. Este hecho es tan importante que puede controlar el proceso inflamatorio de gingivitis, evitando además que tenga lugar pérdida de los tejidos de soporte, es decir, la progresión a periodontitis. Por tanto, el mantenimiento de un adecuado control del biofilm supragingival, mediante la higiene oral, es esencial para la prevención de las enfermedades bucales asociadas a la placa, como son las enfermedades periodontales y la caries.

Durante décadas, las recomendaciones sobre higiene bucal se han centrado principalmente en un régimen mecánico, que ha demostrado ser altamente efectivo en ayudar a controlar la caries y las enfermedades periodontales. Sin embargo, estudios epidemiológicos han demostrado que una buena parte de la población no lleva a cabo un adecuado control de higiene mecánico (Barnett 2006). Debido a que la alta prevalencia de caries y enfermedades periodontales constituye un problema de alcance mundial, se ha hecho necesario la búsqueda y aplicación de otras estrategias, además de los métodos mecánicos, para eliminar la placa. En este sentido, se ha considerado que los agentes quimioterapéuticos pueden desempeñar una función clave como coadyuvantes de los métodos mecánicos para la prevención y tratamiento de las enfermedades periodontales. Aproximadamente hace tres décadas, los investigadores y clínicos determinaron que las recomendaciones de los profesionales de la salud oral debían estar basadas en una evidencia científica clínicamente relevante. Existe gran cantidad de literatura científica sobre la eficacia de este tipo de productos quimioterapéuticos. Sin embargo, dada la multiplicidad de los productos probados y la variabilidad de los diseños de estudios y medidas de resultado utilizadas, a menudo es difícil para los profesionales de la salud bucodental hacer llegar a los pacientes recomendaciones científicamente fundamentadas (García 2008).

## 1. Las enfermedades periodontales

El término enfermedad periodontal se refiere a una enfermedad inflamatoria que afecta a las estructuras blandas y duras que soportan los dientes (AAP 2015).

En este grupo de cuadros clínicos de origen infeccioso se produce la afectación de las estructuras de soporte del diente y se clasifican en dos grandes grupos: gingivitis y periodontitis. La gingivitis es un proceso inflamatorio de los tejidos blandos alrededor de los dientes (la encía), sin migración apical del epitelio de unión y, por tanto, sin destrucción de los tejidos de soporte del diente. La periodontitis es también un proceso inflamatorio que se extiende a las estructuras de soporte del diente y se caracteriza por la migración apical de la inserción epitelial y la destrucción progresiva del ligamento periodontal y del hueso alveolar (Lindhe 2008).

La enfermedad periodontal también está influenciada por la respuesta inflamatoria e inmune individual. Así mismo, puede verse modificada mediante una serie de factores, como el tabaco, ciertas drogas y cambios hormonales que tienen lugar en la pubertad y el embarazo (Kinane 2001).

No todos los pacientes con gingivitis desarrollarán una periodontitis. La etiología primaria de ambas es el biofilm microbiano subgingival. El control de este biofilm o placa dental es la manera más eficaz de prevenir y tratar ambas enfermedades. En este proceso de enfermedad inflamatoria persistente tiene lugar una destrucción tisular. La variación en la expresión de la enfermedad es el resultado de la interacción de la genética del hospedador, el entorno y los factores microbianos. A este respecto, los componentes moleculares y celulares implicados en la destrucción de los tejidos periodontales derivan predominantemente del hospedador (Kinane y Attstrom 2005).

## 1.1. Etiología

La gingivitis se produce por la acumulación inespecífica de la placa bacteriana, que inicia ese proceso inflamatorio. En la periodontitis, otros factores, además de las bacterias, determinan el inicio y la evolución de la enfermedad (Lindhe 2008).

Löe y cols. (Löe y cols. 1965) y Theilade y cols. (Theilade y cols. 1966) demostraron que la placa dental causaba gingivitis. En un estudio de 28 días, con 21 días sin cepillado dental, observaron gingivitis entre el día 10 y 21 en todos los sujetos de su muestra de individuos inicialmente sanos.

La periodontitis es considerada como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte dentales causada por microorganismos específicos que conducen a la destrucción progresiva del ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento, con la formación de bolsas y pérdida de inserción o ambas, que conlleva a corto o largo plazo la pérdida dentaria, con las consiguientes implicaciones funcionales, sistémicas y estéticas.

La etiopatogenia de las distintas formas de periodontitis suele seguir un patrón común, aunque la participación de cada uno de los factores implicados tiende a modificar la presentación clínica y su clasificación. Se ha demostrado que el factor etiológico principal es la placa microbiana dental, principalmente aquella que se localiza a nivel subgingival, constituyendo un medio ecológico con predominio de especies anaerobias o aerobias facultativas, debido al bajo potencial de oxidorreducción existente (Kinane 2001).

La placa subgingival está íntimamente relacionada con la placa supragingival de superficies lisas, especialmente con la que se acumula en el margen gingival. Son los microorganismos supragingivales los que, por continuidad, colonizan el surco gingival. Sin embargo, las condiciones especiales de este último y los estados de salud o enfermedad periodontal determinan, al menos en parte, que la placa subgingival difiera de la supragingival (Noguerol 2002).

La placa existe en armonía con el individuo en salud. El mantenimiento de la salud depende del equilibrio entre la agresión bacteriana y la respuesta de ese individuo. La enfermedad es consecuencia de la ruptura de ese equilibrio, producida por cambios en la naturaleza o cantidad de las bacterias o bien en la respuesta del individuo (Socransky y cols. 1998). Sin embargo, la secuencia temporal de los acontecimientos es incierta actualmente. El cambio resultante en las condiciones del entorno influye en la organización, composición y expresión genética del biofilm, todo lo cual puede contribuir a modificar la agresión microbiana. Otros factores que pueden afectar al equilibrio incluyen los cambios en la conducta, el comienzo de otras enfermedades, o los cambios en la respuesta inmune del individuo (Sanz y Quirynen 2005).

Dependiendo del individuo, la progresión de gingivitis a periodontitis requiere distintos períodos de tiempo. Brex y cols. (Brex y cols. 1988) sugirieron que, en una situación normal, son necesarios más de 6 meses para que la lesión de gingivitis cambie a periodontitis. Además, este paso de gingivitis a periodontitis solo ocurre en un subgrupo de población (Albandar y cols. 1999). La razón por la que algunos pacientes desarrollan una periodontitis más fácilmente que otros es muy difícil de describir y se cree que es multifactorial. Debería tenerse en cuenta que los cambios durante la gingivitis, incluso en lesiones de gingivitis establecida prolongada son, en gran parte reversibles, mientras que los cambios durante la periodontitis, la pérdida de hueso y la migración apical de la inserción epitelial, son irreversibles. La periodontitis es una patología con daños acumulativos y una vez que el hueso se ha perdido es muy complejo recuperarlo, y muchos pacientes van incrementando la pérdida de hueso de soporte dentario durante años.

El proceso patogénico de las enfermedades periodontales es, en gran medida, el resultado de la respuesta del individuo a la destrucción tisular inducida por las bacterias. Estos procesos destructivos son iniciados por las bacterias pero son propagados por las propias células del individuo, de forma que es la respuesta del hospedador la que resulta en una destrucción tisular, es decir, es éste quien produce enzimas que afectan al tejido (Kinane 2001).

## 1.2. Epidemiología

La medida de enfermedad más habitual en estudios epidemiológicos es la prevalencia. Es la proporción de individuos en un grupo que muestran una enfermedad en un momento determinado. El estado periodontal de un individuo, mucho menos de un grupo, es difícil de describir de forma concisa. Es difícil comparar los resultados de estudios que utilizan diferentes métodos de medida y, por tanto, compararlos puede ser erróneo si se ignoran los efectos de estas metodologías (Brown y Löe 1993).

Los índices y los métodos que se utilizan para describir la presencia de periodontitis han cambiado en las últimas décadas (Haisman-Welsh y Thomson 2012), evolucionando desde el enfoque de índices periodontales como el de Russell (Russell 1956), pasando por el Índice Periodontal Comunitario de Necesidades de Tratamiento (CPITN) (Ainamo y cols. 1982), hasta llegar al enfoque actual de pérdida de inserción. A pesar de haber sido una evolución necesaria complica las comparaciones epidemiológicas, sobre todo debido a la heterogeneidad que implica persistir en métodos con el uso de índices obsoletos en algunos estudios. También hay indicios recientes de que los protocolos de registros parciales que se utilizan para recopilar los datos disponibles pueden haber dado lugar a una subestimación de la verdadera prevalencia y gravedad del trastorno (Papapanou 2012). No obstante, es posible contar con una visión general del estado periodontal en las personas adultas a partir de los datos epidemiológicos limitados que están disponibles. Estos datos tienden a ser de los países desarrollados. La base de datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2015) no arroja mucha claridad a partir de las estimaciones de los 38 países que figuran en ella, ya que se basan en un sistema de registro informativo que puntúa las distintas estimaciones entre países con unas variaciones muy considerables (Murray 2014).

La dificultad en el análisis de la epidemiología de las enfermedades periodontales radica en que la totalidad de la literatura en este campo se encuentra plagada de definiciones de casos de enfermedad periodontal. Los estudios han utilizado un impresionante conjunto de síntomas y signos clínicos

como gingivitis, sangrado al sondaje, profundidad de bolsa, pérdida de inserción clínica, así como determinaciones radiológicas de pérdida de hueso alveolar (Beck y cols. 1990, Machtei y cols. 1992, Locker y Leake 1993). Debido a la inconsistencia en el uso de estos indicadores de enfermedad, son inevitables grandes variaciones en la definición de periodontitis. Para complicar más este punto en cuestión, hay una amplia variación en los valores umbrales de los indicadores utilizados en la definición de un “caso”, así como en las definiciones de incidencia y progresión de la enfermedad. Existen estudios que también han utilizado la pérdida de dientes – último estadio de la periodontitis- como una variable de resultado adicional en el contexto de la determinación de riesgo (Krall y cols. 1994, Krall y cols. 1997, Machtei y cols. 1999, Chen y cols. 2001). Otro aspecto a tener en cuenta en términos de definición de casos es el uso del registro de parámetros de boca parcial o completa (Albandar y Kingman 1999, Albandar y cols. 1999, Elter y cols. 1999, Beck 1994, Beck y cols. 1995). Varios estudios han documentado que el uso de registros de boca-parcial generalmente conduce a una subestimación tanto de la prevalencia como de la severidad de la enfermedad (Hunt 1987, Hunt y Fann 1991, Kingman y cols. 1988, Kingman y Albandar 2002).

Por todas las razones indicadas, parece esencial una decisión de consenso sobre la adopción de un criterio uniforme tanto para la prevalencia como para la incidencia de la periodontitis con el fin de avanzar en la investigación epidemiológica analítica de la periodontitis (Sanz y Quirynen 2005).

Debido a esta razón, la OMS elaboró un documento (OMS 1997) en el que se determinaban los criterios diagnósticos utilizados para “encuestas de salud bucodental”, en el cual, el estado periodontal queda evaluado con el índice CPI y el registro de la pérdida de inserción. El índice CPI utiliza las mismas categorías y criterios diagnósticos que el antiguo CPITN, lo cual permite hacer una comparación de resultados con encuestas anteriores (Bravo-Pérez 2005, Llodrá-Calvo 2012).

A pesar de todas estas limitaciones en cuanto al análisis epidemiológico de los datos disponibles, autores como Albandar y Tinoco (Albandar y Tinoco 2002)

han ido extrayendo conclusiones generales a cerca de la prevalencia global de periodontitis.

Así, la prevalencia de periodontitis es más baja en poblaciones de raza caucásica del oeste de Europa y en Norteamérica. Las poblaciones jóvenes de otras etnias presentan una mayor prevalencia de periodontitis. Las formas de periodontitis crónica, no agresivas, son más de diez veces más prevalentes que las periodontitis agresivas, siendo la forma no agresiva una enfermedad principalmente asociada a placa dental, mientras que las formas agresivas están iniciadas por la placa pero están además asociadas con factores de modificación sistémicos que incrementa la predisposición de los sujetos a la enfermedad. Otros estudios epidemiológicos indican que el 5-20% de poblaciones de todo el mundo sufren diferentes formas severas de periodontitis (Brown y Löe 1993, Hugoson y Jordan 1982).

La placa dental y la inflamación de los tejidos gingivales están presentes en la población y fuertemente ligadas, independientemente de la edad, sexo y raza o etnia. Más del 82% de los adolescentes estadounidenses presentan gingivitis y signos de sangrado gingival. Esta prevalencia es similar o mayor para niños y adolescentes en otras partes del mundo.

Parece existir una relación menos pronunciada entre placa dental y periodontitis avanzadas, según datos de epidemiología global. Las formas avanzadas de periodontitis afectan habitualmente solo a un subgrupo de población global. Así, subgrupos de población relativamente pequeños en todo el mundo exhiben formas avanzadas de pérdida de inserción periodontal con formación de bolsas periodontales profundas. La relativamente baja prevalencia de periodontitis avanzada en muchas de las poblaciones estudiadas puede ser en parte atribuido a la falta de estandarización de los diseños de estudio y de los criterios de medida utilizados (Albandar y Rams 2002). Sin embargo, de forma general, se calcula que la periodontitis afecta a más de 50% de la población adulta y su forma grave afecta a 11% de los adultos, siendo la periodontitis severa la sexta enfermedad más prevalente de la humanidad (Kassebaum y cols. 2014, Tonetti y cols. 2015a).

Respecto a España, en el periodo 1993-2000 se produjo una reducción de la prevalencia de gingivitis y de presencia de cálculo en las edades jóvenes. Mientras que en 1993 tan solo el 25% de los adolescentes de 15 años estaban periodontalmente sanos; en el 2000 el 55% no presentaba ni sangrado ni cálculo. En el periodo 2000-2005 asistimos a una estabilización de patología. Las cifras son totalmente superponibles, por ejemplo, a la edad de 15 años, la prevalencia de cálculo ha pasado del 28,2% en el 2000 al 28,6% en 2005.

En el grupo de 35-44 años, si se analiza la prevalencia de bolsas periodontales (ya sean moderadas o severas), se encuentran unas cifras totalmente superponibles a las halladas en la anterior encuesta de 2000 (25.4% actual versus 25.6% en 2000). Las cifras para la encuesta de 1993 eran del 49.2%. Por lo tanto, después de una clara mejoría en el periodo 1993-2000, en el periodo 2000-2005 la situación parece estabilizada. En el grupo de 65-74 años, la prevalencia de bolsas, ya sean moderadas o severas, se encuentra en unas cifras similares para las dos últimas encuestas (38% en 2005 versus 44% en 2000). Desde el estudio de 1993, los criterios de diseño y tamaño muestral y la preparación de los exploradores son totalmente idénticos, facilitando la comparación de los hallazgos obtenidos. Vuelve a reafirmarse que tan solo una mínima parte de la población desarrolla formas más severas de procesos periodontales, cuya prevalencia podemos situar entre el 4-11% en la actualidad según la “Encuesta de Salud Oral 2010” de la Universidad de Granada (Bravo-Pérez 2005, Llodrá-Calvo 2012).

Puesto que, en general, ni el nivel social ni el tipo geográfico (urbano, periurbano, rural) intervienen en la prevalencia de los procesos periodontales, se debe señalar que este hecho tiene una gran repercusión en términos de salud pública, ya que por una parte, se trata de un proceso muy prevalente (aunque en estadios iniciales, que es imprescindible interceptar a tiempo) y por otra parte, es un proceso muy sensible a tratamientos básicos, sencillos y de bajo coste, con una clara repercusión en lo que a recursos humanos y planificación sanitaria se refiere. Los esfuerzos para la prevención y tratamiento de estas enfermedades deben continuar dirigiéndose a la concienciación de la población sobre la necesidad de la higiene oral y el diagnóstico precoz de las mismas y a la formación de

profesionales, odontólogos e higienistas para tratar las formas moderadas, más prevalentes, de periodontitis (Bravo-Pérez 2005, Llodrá-Calvo 2012).

### 1.3. Evolución y Co-Morbilidad

La periodontitis es la mayor causa de mortalidad dentaria en muchos países industrializados y en muchas naciones desarrolladas (Ong 1998, Chapple y cols. 2015).

Las enfermedades periodontales iniciadas por la placa supragingival son evitables en gran medida. Sin embargo, algunos pacientes pierden los dientes por periodontitis, a pesar de acudir regularmente a citas de mantenimiento (Hirschfeld y Wasserman 1978, Hirschfeld y Wasserman 1978, McFall, Jr. 1982, Haffajee y cols. 1997). La morbilidad a nivel dentario y bucal tiene implicaciones en la estética y psicología del paciente y también está demostrado que puede tener consecuencias a nivel sistémico (Chapple y cols. 2015).

A pesar de los 3000 años de historia en los que se lleva demostrando la influencia del estado oral sobre la salud general, es solo en las décadas recientes cuando se ha demostrado científicamente la asociación entre enfermedades periodontales y condiciones sistémicas como enfermedades cardiovasculares, diabetes, así como mayor riesgo de resultados adversos del embarazo (Seymour y cols. 2007).

La periodontitis puede aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares en sujetos susceptibles. Se necesitan ensayos de intervención y estudios caso-control longitudinales potentes para identificar cómo la periodontitis y las intervenciones periodontales pueden tener un impacto sobre las enfermedades cardiovasculares (Persson y Persson 2008). De forma similar, el reconocimiento de la amenaza que supone la enfermedad periodontal para individuos con enfermedades crónicas como la diabetes, enfermedades respiratorias y osteoporosis es relativamente reciente (Seymour y cols. 2007).

La diabetes mal controlada puede considerarse un factor de riesgo para el incremento de la severidad de la periodontitis. Los efectos de la terapia

periodontal sobre el control de la inflamación y la glucemia sistémica, necesitan confirmarse en ensayos clínicos controlados aleatorizados a gran escala (Salvi y cols. 2008).

A pesar de estas relaciones epidemiológicas, los mecanismos para explicar varias de estas asociaciones no son totalmente conocidos. Sin embargo, se han postulado algunas hipótesis, que incluyen susceptibilidad común, inflamación sistémica con incremento de mediadores y citoquinas circulantes, infección directa y reactividad cruzada o mimetismo molecular entre antígenos bacterianos y antígenos propios. Con estos datos, está claro que la infección oral puede representar un factor de riesgo significativo para enfermedades sistémicas y, por lo tanto, el control de la infección oral es esencial en la prevención y el manejo de estas condiciones sistémicas (Seymour y cols. 2007).

Analizando críticamente las asociaciones establecidas entre las enfermedades periodontales y algunas patologías sistémicas, parece claro que la evidencia reciente justifica la proposición de la periodontitis como un factor de riesgo para una respuesta metabólica alterada en diabéticos. Menos clara parece la asociación con enfermedades en el aparato respiratorio, aunque se haya demostrado asociación entre una mala higiene oral y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y con neumonías por aspiración. La asociación entre infecciones periodontales y enfermedades cardiovasculares parece mostrar de manera fiable una relación de causalidad, aunque con una fuerza de asociación de baja a moderada, existiendo gran cantidad de factores de confusión que pueden afectar a estos estudios. Entre los mecanismos propuestos para justificar estas asociaciones, pero que no se han demostrado, se han sugerido factores genéticos comunes que pueden interactuar como factores de riesgo, al ser activados por la presencia continua de estímulos bacterianos (Sanz-Alonso 2001).

Para actualizar la situación sobre la asociación entre las enfermedades periodontales y las patologías sistémicas es fundamental referirse al consenso de expertos de todo el mundo. La Federación Europea de Periodoncia (EFP) y la Academia Americana de Periodoncia (AAP) organizaron el 9º *Workshop* Europeo

en Periodoncia, que tuvo lugar en España en 2012, con el objetivo de establecer una base de conocimientos de consenso sobre la evidencia científica a cerca de la asociación entre la periodontitis y enfermedades sistémicas. Más de 70 expertos en la especialidad de periodoncia fueron invitados a participar en el taller y fueron asignados a uno de estos tres grupos de trabajo: diabetes y enfermedad periodontal; enfermedades cardiovasculares y enfermedad periodontal; resultados adversos del embarazo y enfermedad periodontal. Los grupos de trabajo revisaron la evidencia científica en sus respectivas áreas y desarrollaron una declaración de consenso sobre cada tema.

De este grupo de trabajo se pudo concluir que, respecto a la evidencia entre la asociación entre diabetes y periodontitis, los datos epidemiológicos disponibles demuestran que la periodontitis severa afecta negativamente al control glucémico en la diabetes y también a la glucemia en pacientes no diabéticos. Además, en pacientes con diabetes existe una relación directa entre la gravedad de la periodontitis y las complicaciones de la diabetes. Existe incluso evidencia inicial que indica un mayor riesgo de aparición de diabetes en pacientes con periodontitis severa. La diabetes tipo 2 es precedida por inflamación sistémica, lo cual lleva a la célula  $\beta$  pancreática a reducir su función, a la resistencia a la insulina y a la apoptosis. Se constata un aumento de la evidencia científica que apoya que puede elevarse la inflamación sistémica como resultado de la entrada a la circulación de microorganismos periodontales y sus factores de virulencia, lo que proporciona mecanismos biológicos que sustentan el impacto adverso de la periodontitis sobre la diabetes y sus complicaciones. En las revisiones de la literatura que se llevaron a cabo existen ensayos clínicos aleatorizados que demuestran de forma consistente que la terapia periodontal mecánica se asocia con una reducción de aproximadamente un 0.4% en la HbA1c a los 3 meses, lo que supone un impacto clínico equivalente a añadir un segundo medicamento en un régimen farmacológico indicado para la diabetes (Chapple y Genco 2013, Taylor y cols. 2013, Borgnakke y cols. 2013, Engebretson y Kocher 2013).

En cuanto a la relación entre enfermedad cardiovascular y periodontitis, y a través de la misma vía de entrada de bacterias en el torrente sanguíneo, la

respuesta inflamatoria inmune se activa por múltiples mecanismos. Varios modelos animales han demostrado que dicha respuesta favorece la formación de ateromas, su maduración y exacerbación. También existe evidencia epidemiológica consistente de que la periodontitis supone un riesgo mayor de futuras enfermedades cardiovasculares, independientemente de otros factores evaluados. El tratamiento periodontal reduce la inflamación sistémica, como se evidencia por la reducción de la proteína C-reactiva y el estrés oxidativo, lo que conduce a mejoras en las medidas clínicas y bioquímicas de sustitución de la función endotelial vascular (Tonetti y Van Dyke 2013, Reyes y cols. 2013, Schenkein y Loos 2013, Dietrich y cols. 2013, D'Aiuto y cols. 2013).

Por último, el grupo que elaboró el informe de consenso sobre la evidencia de la asociación entre resultados adversos del embarazo y periodontitis también señaló que la entrada de los microorganismos orales a la circulación sanguínea hace posible su llegada al medio ambiente fetal, donde causan respuestas inflamatorias e inmunes que afectan a la unidad feto-placentaria. Además, dichas bacterias en su recorrido pueden llegar al hígado, donde se producen como respuesta agentes inflamatorios que, a su vez, llegarán al feto en desarrollo. Los estudios clínicos demuestran que existe una asociación entre el bajo peso al nacer, el parto prematuro y la preeclampsia con la presencia de periodontitis en la madre, una vez que todos los demás factores de riesgo han sido tenidos en cuenta. No obstante, la fuerza de asociación varía entre los distintos estudios y algunos no muestran asociación, lo cual puede deberse a diferencias en el diseño de los estudios, sus poblaciones y los diferentes métodos de evaluación y clasificación de enfermedad periodontal. Los resultados de los ensayos clínicos han demostrado que, en general, el raspado y alisado radicular llevado a cabo durante el segundo trimestre del embarazo no mejora significativamente resultados adversos del embarazo, como parto prematuro y bajo peso al nacer. Una de las razones para ello, pudiera ser que la interacción entre periodontitis y embarazo sea más compleja de lo que entendemos en la actualidad (Sanz y Kornman 2013, Madianos y cols. 2013, Engebretson y Kocher 2013, Michalowicz y cols. 2013).

#### 1.4. Tratamiento

Está generalmente aceptado que la terapia anti-infecciosa es la piedra angular del tratamiento periodontal. El control eficaz de las enfermedades periodontales depende de la identificación y tratamiento de la infección establecida y la consiguiente prevención de recurrencias (Slots 2002). Como mínimo, el tratamiento periodontal inicial y preventivo debe tener como objetivo el control de los microorganismos capaces de afectar la integridad del tejido conjuntivo periodontal. Ya que casi todos los casos de enfermedad periodontal son desórdenes infecciosos, pueden ser prevenidos básicamente o tratados eficazmente a través del control de los microorganismos patógenos de la placa supragingival y subgingival.

La mayoría de las opciones terapéuticas para tratar gingivitis o periodontitis deben elegirse según la extensión y la gravedad de la enfermedad y con un claro conocimiento de los riesgos y beneficios del tratamiento. Normalmente, el odontólogo ha contado en gran medida con el desbridamiento mecánico (raspado y alisado radicular) para combatir las infecciones periodontales. En ocasiones, parece necesario emplear además estrategias antimicrobianas alternativas o adicionales y/o acceso quirúrgico para un eficaz desbridamiento de las lesiones periodontales profundas (Slots y Jorgensen 2002).

Ya a mediados del siglo pasado, Ramfjord propuso un plan general de tratamiento que constaba de cuatro fases: sistémica, higiénica, correctiva y de mantenimiento o terapia periodontal de soporte (Ramfjord 1953). Aunque en cada fase se ha hecho necesario actualizar detalles específicos según la nueva información disponible, las líneas generales básicas de la terapia siguen siendo válidas. Teniendo en cuenta el tipo de tratamiento proporcionado, la terapia periodontal podrá fracasar o ser menos efectiva en la ausencia de un adecuado seguimiento periodontal de soporte (Pihlstrom 2001).

*Fase sistémica:* incluye la consideración apropiada de las enfermedades sistémicas -diabetes, discrasias sanguíneas, entre otras- y su impacto en la causa o

tratamiento de la enfermedad. De igual forma, debe contemplarse en esta fase el tabaquismo como hábito que condiciona la respuesta al tratamiento.

*Fase higiénica:* el propósito de esta fase es eliminar las causas locales de enfermedad periodontal que sean posibles, incluyendo placa bacteriana y cálculo, restauraciones defectuosas y otras que pudieran estar asociadas a la inflamación periodontal. Incluye también la educación del paciente y las instrucciones de higiene oral, extracción de dientes de pronóstico imposible, colocación de prótesis provisionales, tratamiento endodóntico, raspado y alisado radicular y uso de agentes antimicrobianos locales o sistémicos. Es una práctica común evaluar los resultados de la fase higiénica tras aproximadamente 6-8 semanas y tomar decisiones en ese momento sobre el tratamiento posterior.

*Fase correctiva:* incluye procedimientos dirigidos a corregir los efectos de la enfermedad periodontal sobre los tejidos periodontales, dientes y sistema masticatorio. Comprende ajustes oclusales, fabricación de férulas oclusales, tratamiento ortodóncico, cirugía periodontal para desbridamiento, resección o regeneración y colocación de implantes. Como norma general, la cicatrización inicial ocurre seis semanas después de la cirugía periodontal, pero para asegurar la estabilidad de los contornos tisulares, es deseable posponer las restauraciones finales hasta 5-6 meses tras la cirugía periodontal.

*Fase de mantenimiento:* parece ser efectiva una profilaxis dentaria profesional cada 3-4 meses. Durante estas citas de terapia periodontal de soporte se actualiza la historia médica y los dientes y tejidos orales se examinan para detectar signos de enfermedad o trauma oclusal. Si los registros de los parámetros periodontales muestran evidencia de progresión de la enfermedad, debe instaurarse el tratamiento adicional adecuado. Además, debe reforzarse la motivación en los procedimientos de higiene así como administrar flúor tópico a los pacientes susceptibles a caries (Pihlstrom 2001).

## 2. Biofilm microbiano y bacterias periodontales

### 2.1. Biofilm

De acuerdo con Dawes y cols. (Dawes 1963), placa dental es “el material blando tenazmente unido a la superficie de los dientes que no se elimina fácilmente mediante enjuague con agua”. Más tarde, la placa dental se describió como una especie de membrana biológica o biofilm, definido como una comunidad sénil de microorganismos interdependientes organizados entre un exopolímero que está unido a superficies sólidas (Davey y O'toole 2000). Muy similar es la definición que describe la placa dental como la comunidad de microorganismos que se encuentra en la superficie de los dientes en forma de biofilm, embebida en una matriz extracelular de polímeros de origen microbiano y del hospedador (Marsh 2004). Se estima que 1mm<sup>3</sup> de placa dental, que pesa cerca de 1mg, contiene más de 200 millones de células bacterianas (Scheie 1994, Socransky 1970). Otros microorganismos, como micoplasmas, levaduras y protozoos, también aparecen en la placa madura. Los polisacáridos y otros productos forman la llamada matriz de la placa, la cual representa un 10% a 40% del volumen total de la placa supragingival (Scheie 1994).

La formación de placa dental humana se inicia mediante la deposición de una fina biopelícula, principalmente derivada de glicoproteínas salivales, sobre la superficie del diente (Sonju y Rolla 1973). Los aspectos físico-químicos de la inserción bacteriana son complejos (Wade y Slayne 1997) y parece implicar muchos y diversos procesos y factores, incluidos la energía libre superficial y la rugosidad de la superficie (Quirynen y cols. 1990). Cuando una o dos capas de bacterias están presentes sobre la superficie del diente en individuos sanos, el sistema inmune del sujeto puede hacer frente a esos microorganismos pudiendo así presentar salud gingival. Por tanto, interrumpir la acumulación de placa es de gran importancia. La vitalidad de la placa dental humana temprana es relativamente baja comparada con la de la placa más tardía; mientras que solo el 20% de las bacterias son vitales una hora tras la profilaxis, un 70% de ellas son vitales un día tras la limpieza (Weiger y cols. 1995a). El promedio de acumulación

de bacterias es más corto durante las primeras horas que durante las siguientes (Weiger y cols. 1995b). Durante los primeros días de acumulación de placa, la composición bacteriana puede cambiar de flora simple, primariamente cocos, a una más compleja, con un número aumentado de organismos filamentosos y, más tarde, espiroquetas (Löe y cols. 1965, Theilade y cols. 1966). Sin embargo, no está claro si es el incremento en la masa de placa, su complejidad o ambas lo que se necesita para que la gingivitis se desarrolle (Brecx 1997). Lo que sí está claro es que la relevancia de los microorganismos en el desarrollo de prácticamente todos los tipos de enfermedad periodontal es indiscutible (Slots y Jorgensen 2002).

Las bacterias orales no existen como entidades independientes sino que funcionan como una comunidad microbiana coordinada, organizada espacialmente y metabólicamente integrada. La gran mayoría de los microorganismos en la naturaleza se encuentran adheridos a las superficies, donde crecen en forma de biofilms (Marsh 2005). El concepto de biofilm fue definido en 1978 por Costerton y cols. Lo describen como poblaciones microbianas embebidas en una matriz, adheridas unas a las otras y/o a variadas superficies (Costerton y cols. 1995). Además, la capacidad de adherirse y ser retenida en una superficie es una estrategia de supervivencia fundamental para muchos organismos procariotas. Las especies bacterianas que lo componen se encuentran espaciadas y organizadas funcionalmente y, en muchos casos, cuentan con una microflora muy diversa. Estos microorganismos están involucrados en un amplio rango de interacciones físicas, metabólicas y moleculares, las cuales son esenciales para su crecimiento y supervivencia, permitiéndoles persistir en lo que a menudo aparece como un entorno hostil. Este estilo de vida en comunidad proporciona enormes beneficios potenciales a los organismos participantes (Caldwell y cols. 1997, Shapiro 1998).

El microscopio de barrido de láser confocal ha revelado que la placa supragingival puede tener una arquitectura estructurada. Pueden observarse las distintas comunidades bacterianas organizadas en forma de seta o torre separadas entre sí por microcanales de agua (Costerton y cols. 1995, Socransky y Haffajee 2002, Sbordone y Bortolaia 2003). Estos canales o “poros” se observan también en la interfase placa/entorno oral con la superficie del diente (Wood y cols. 2000,

Auschill y cols. 2001, Zaura-Arite y cols. 2001). Esta técnica de microscopía también ha aportado hallazgos como que la vitalidad bacteriana varía en las distintas zonas del biofilm, con la presencia de más bacterias viables en la parte central de la placa y tapizando los canales (Auschill y cols. 2001). Debido a las dificultades de acceso a la visión directa con el microscopio confocal, la información sobre la arquitectura de la placa subgingival es limitada. Secciones histológicas examinadas con microscopía óptica convencional sugieren una organización compleja de microorganismos en las que pueden existir distintos biofilms asociados a dientes y asociados a células epiteliales, con la posibilidad de una zona menos densa entre ambos (Socransky y Haffajee 2002). Estas regiones pueden diferir en su composición microbiana, en su estado fisiológico y, en consecuencia, en su respuesta al tratamiento antimicrobiano.

Las especies microbianas que viven en este tipo de comunidad tienen mayor capacidad de obtener nutrientes del ecosistema, así como de tolerar los factores ambientales no microbianos, como pH, niveles de oxígeno, temperatura, presión osmótica, potencial de óxido-reducción. Cuentan también con mecanismos para hacer frente a la resistencia ambiental atribuible al hospedador (Socransky y Haffajee 2005).

Estudios *in vitro* han demostrado que la placa como biofilm es menos susceptible a los agentes antimicrobianos, ya que el agente puede ser neutralizado o unido a otras bacterias, con lo que puede resultar en una menor penetración del mismo; las bacterias además, pueden expresar un nuevo fenotipo salvaguardando la comunidad microbiológica ante condiciones adversas (Socransky y Haffajee 2002, Boles y cols. 2004). Los antimicrobianos llegan en menores concentraciones (concentraciones no efectivas frente a las bacterias) a las zonas profundas del biofilm, ya que estarían protegidas por la matriz de exopolisacáridos. Al ser atacadas con dosis subletales, las bacterias tienen capacidad para desarrollar resistencia frente a los antimicrobianos. Al crecer en forma sésil, las bacterias activan genes que proporcionan mayor resistencia frente a los antimicrobianos en comparación con las formas planctónicas. En las zonas profundas del biofilm, que tienen un menor aporte de nutrientes, las bacterias estarían en forma quiescente,

que es un estado bacteriano no susceptible a los antimicrobianos (Donlan y Costerton 2002, Fine y cols. 2001). Esta mayor resistencia de las bacterias cuando crecen en biofilm se traduce en que, para que sea efectivo, se deben multiplicar incluso por mil las concentraciones necesarias del antimicrobiano. Esto explicaría en parte por qué a veces no concuerdan los resultados clínicos con los obtenidos *in vitro* (Serrano-Granger y Herrera 2005).

Sin embargo, se han publicado estudios sobre colutorios de clorhexidina y colutorios de aceites esenciales en los que queda demostrada, en ambos casos, la capacidad de los mismos para penetrar en el biofilm y producir una acción bactericida suficiente (Fine y cols. 2001).

## 2.2. Especies bacterianas

Muchas especies bacterianas actualmente implicadas en las periodontitis pueden encontrarse en sujetos periodontalmente sanos en bajo número (van Winkelhoff y cols. 2002). Existen suficientes datos como para considerar como patógenos periodontales a las especies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (antes *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Tannerella forsythia* (antes *Bacteroides forsythus*) y *Porphyromonas gingivalis*, ya que cumplen unos criterios establecidos (criterios de Socransky) como bacterias fuertemente asociadas a la etiología de la periodontitis (Slots y Rams 1991, Socransky y Haffajee 1992, Socransky y cols. 1998).

Los organismos que habitan en una localización determinada constituyen una comunidad. Los constituyentes orgánicos e inorgánicos que caracterizan esa localización particular junto con el ensamblaje de especies bacterianas que coexisten en ese lugar forman una ecosistema (Socransky y Haffajee 2005). En el desarrollo de un ecosistema ciertas especies bacterianas son las pioneras en colonizar. Estas especies son a menudo reemplazadas por otras especies después de que hayan alterado el hábitat, haciendo posible una sucesión bacteriana. Muchos estudios ya demostraron la sucesión bacteriana en el desarrollo de la placa dental humana (Ritz 1967, Socransky y cols. 1977, Zee y cols. 1996).

Ciertas especies son colonizadores tempranos en el desarrollo del biofilm. Se establecen y actúan como receptores para la colonización de otros microorganismos. Respecto a los mecanismos que gobiernan la especificidad de estas interacciones entre especies, existe un papel crítico de co-agregación en la organización interespecies (Kolenbrander y cols. 2006). Se han descrito las bases moleculares de esas interacciones para pares definidos de especies, detallando la naturaleza de los receptores y adhesinas específicos involucrados. Según se demostró, muchas especies tienen un grupo limitado de especies asociadas, mientras que otras posibles especies “puente”, como *Fusobacterium nucleatum*, se adhieren a un amplio rango de especies. Mientras que la adhesión a una superficie sólida y la co-agregación pueden ser críticas en la selección de especies colonizadoras para un biofilm dado, otros factores desempeñan un importante papel en el desarrollo de estas estructuras. Por ejemplo, las señales entre las bacterias parecen ser importantes reguladores de genes que controlan el desarrollo del biofilm (Haffajee y Socransky 2006).

Como estimación, se sugiere que más de 700 especies pueden colonizar la cavidad oral y más de 400 especies diferentes pueden colonizar los biofilms subgingivales (Haffajee y Socransky 2006).

Además de identificarse bacterias periodontales como potenciales factores de riesgo de iniciación y progresión de periodontitis, se han identificado combinaciones de especies que se han denominado “clusters”. Estas combinaciones pueden actuar de manera sinérgica, sobre todo mediante su capacidad de evasión de las defensas del hospedador. Utilizando técnicas de biología molecular para identificación bacteriana mediante hibridación ADN-ADN (Socransky y cols. 1994), las cuales permiten analizar un gran volumen de muestras y un gran número de especies bacterianas, se han identificado cinco grupos, que han demostrado una asociación estadísticamente significativa (Socransky y cols. 1998):

**Grupo rojo:** *T.forsythia*, *P.gingivalis* y *Treponema denticola*. Este grupo se asocia claramente a condiciones clínicas con mayor grado de sangrado y profundidad de bolsa.

**Grupo naranja:** Con un núcleo central bastante estable, formado por *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *F.nucleatum* (subespecies *vicentii*, *nucleatum* y *polymorphum*) y *Fusobacterium periodonticum*, y un grupo de bacterias asociadas a ellas, como *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, y *Streptococcus constellatus*. Además, el grupo naranja tiene una estrecha relación con el rojo.

**Grupo amarillo:** Dentro de este grupo *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguis* presentan una relación muy fuerte, incluyéndose también *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius* y otras especies de *Streptococcus*.

**Grupo verde:** Con *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga ochracea*, *Campylobacter concisus* y *A. actinomycetem comitans* serotipo a.

**Grupo púrpura:** Solo *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*, muy asociados entre sí, y algo menos con los grupos naranja, verde y amarillo.

**Sin grupo:** Especies sin asociaciones claras eran *A. actinomycetem comitans* serotipo b, *Actinomyces naeslundii 2* (*Actinomyces viscosus*) y *Selenomonas noxia*.

La distribución y asociaciones dentro y entre grupos señalan, junto con otros datos, la secuencia de sucesión bacteriana en la formación de placa (Kolenbrander y cols. 2006). Parece que *A.viscosus* y el grupo amarillo serían los colonizadores tempranos. Luego llegaría el grupo verde, especies puente para la llegada del grupo naranja y, finalmente, el grupo rojo.

Existe, pues, una reorganización en el desarrollo del biofilm que lleva un tiempo antes de que ocurra la maduración. Aunque este tiempo varía mucho de

una superficie de diente a otra, los datos que se conocen indican que siete días probablemente no sea tiempo suficiente como para que se complete el desarrollo de la comunidad clímax final (Haffajee y cols. 2008) Quizá las comunidades más estrechamente unidas sean aquellas de los grupos amarillo y de *Actinomyces* spp. Estos grupos se encuentran incluso más relacionados con los biofilms supragingivales que con los subgingivales. Las especies de *Streptococcus* dominan la formación del biofilm temprano supragingival y son reemplazadas con el tiempo por especies de *Actinomyces*.

Existe una fuerte relación entre la composición de las muestras de placa supragingival y las medidas clínicas de inflamación. Muchas especies están significativamente elevadas en sitios que exhibían eritema gingival o sangrado al sondaje. Las especies que más se incrementan en localizaciones adyacentes a zonas inflamadas son miembros de los complejos naranja y rojo. Esta relación de especies del grupo naranja y del grupo rojo con la inflamación está en concordancia con los hallazgos de biofilms subgingivales.

Además de la adhesión selectiva de especies específicas a superficies dentarias o a la película adquirida y debido a distintos patrones de co-agregación que ocurren entre especies bacterianas, el estatus clínico de las estructuras periodontales adyacentes también influye en la composición del biofilm supragingival, posiblemente proporcionando uniones moleculares interespecies y contribuyendo al enriquecimiento de ciertas comunidades por medio de nutrientes (Haffajee y cols. 2008).

### 3. Prevención de enfermedades periodontales

Los resultados detallados y recomendaciones específicas del 11<sup>º</sup> *Workshop* Europeo sobre Periodoncia se presentan en cuatro informes de consenso (Chapple y cols. 2015, Jepsen y cols. 2015, Sanz y cols. 2015, Tonetti y cols. 2015a) dentro de los principios de prevención de enfermedades periodontales y enfermedades peri-implantarias, tanto primarios como secundarios, así como las complicaciones de la periodontitis. Los informes se basan en 16 revisiones sistemáticas de la literatura

relevante y meta-análisis, que proporcionan una guía para los profesionales, los pacientes y la población general. Representan la opinión de expertos en Europa, respaldada por representantes de la AAP. Se abordan sistemáticamente las bases científicas de la prevención primaria y secundaria (Tonetti y cols. 2015a). El propósito de los programas de prevención primaria es evitar el inicio y desarrollo de enfermedades periodontales. Dichos programas deberían ir dirigidos a poblaciones de individuos sanos, generalmente niños y adultos jóvenes, con el fin de conseguir un tejido periodontal sano inmediatamente después de la erupción de los dientes temporales y permanentes (Axelsson y cols. 2002). Un diagnóstico periodontal adecuado junto a una evaluación de los factores a nivel del paciente (factores de riesgo y actitudes) debe determinar la selección del tipo más adecuado de atención preventiva profesional. La eliminación de la placa mecánica a nivel profesional como el único elemento de la atención preventiva profesional, es un enfoque inapropiado, ya que la educación y el cambio de comportamiento son fundamentales para que el estado de salud mantenga una mejora sostenida (Tonetti y cols. 2015a). Una vez que la enfermedad se ha instaurado, la prevención secundaria tiene por finalidad evitar la recurrencia de la enfermedad tras un tratamiento exitoso, lo que se consigue a través de programas de mantenimiento periodontal (Axelsson y cols. 2002). Se ha puesto énfasis en la necesidad de comunicar al público la importancia crítica de sangrado gingival como una señal temprana de la enfermedad, así como que el control de los factores de riesgo para la periodontitis tales como el tabaquismo y la diabetes son una parte integral de los enfoques de prevención primaria y secundaria. Los programas de prevención secundaria, por tanto, se dirigen a un grupo de alto riesgo, como lo demuestra un diagnóstico previo de la periodontitis. Los pacientes deben entrar en un programa de prevención secundaria una vez que han completado la fase activa de la terapia y se han alcanzado los objetivos finales de la terapia. Hay consenso, por tanto, en que estos pacientes deben seguir un régimen de cuidado periodontal de apoyo específico (Tonetti y cols. 2015a). La prevención terciaria tiene por finalidad evitar que, una vez que ya está instaurada la enfermedad, empeore y se produzcan complicaciones y por tanto, es la instauración de tratamiento, ya sea por medios quirúrgicos o no quirúrgicos (Axelsson y cols. 2002).

La prevención primaria es la mejor estrategia en el cuidado de la salud. Respecto a las enfermedades periodontales, incluye intervenciones educativas sobre enfermedades periodontales y factores de riesgo relacionados, así como la eliminación de la placa regularmente por parte del individuo y por parte del profesional. Está bien documentado que la gingivitis siempre precede a la periodontitis, por tanto parece plausible aceptar que la mejoría en las condiciones de higiene oral que conducen a prevención o reducción de la gingivitis es un beneficio en la prevención de la transición de gingivitis a periodontitis (Lang y cols. 2005, Chapple y cols. 2015). Aunque se reconoce que la higiene oral personal es el componente clave de la prevención de la enfermedad periodontal y que, a largo plazo, los resultados exitosos de la terapia periodontal están supeditados a las prácticas de higiene oral eficaces y coherentes, la población no alcanza, en general, adecuadamente el control de la placa correspondiente (Petersen y cols. 2005). Por tanto, es necesario facilitar los cambios de comportamiento que conduzcan a un mayor control de la placa. Los profesionales de la salud bucodental necesitan identificar y adoptar técnicas eficaces que ayuden a los pacientes a cambiar el comportamiento de la salud oral, pero hay consenso en que, en general, los proveedores de atención de la salud oral carecen de un enfoque estructurado y demostrado para facilitar los cambios de comportamiento que mejoran el control de placa (Tonetti y cols. 2015b). Una revisión sistemática (Newton y Asimakopoulou 2015) sobre los enfoques psicológicos de un cambio de comportamiento para mejorar el control de la placa en los pacientes con periodontitis indica que el cambio en los hábitos de higiene oral está dirigido a comunicarles las consecuencias nocivas del mal control de placa, la susceptibilidad suya propia a la periodontitis y los beneficios del cambio, facilitado todo ello, mediante la fijación de objetivos (es decir, la identificación del cambio con el paciente), la planificación (es decir, trabajar con el paciente para decidir cuándo, dónde y cómo se llevarán a cabo el cambio de comportamiento) y la auto-monitorización (es decir, el aprendizaje del paciente para evaluar su propio comportamiento en relación con los objetivos).

Por otro lado, muchos de los factores de riesgo modificables pueden ser controlados mediante intervenciones para cambiar una conducta utilizando

técnicas de entrevista motivacional (Moyers y Rollnick 2002). Se ha descrito un modelo integrado de cambio de conducta (Prochaska y DiClemente 1983) e introducido para su uso en la profesión dental (Ramseier 2003). Sin embargo, de los factores de riesgo modificables, solo se ha documentado el cese del hábito de fumar como medida preventiva en pacientes periodontales (Ramseier 2005). En general, una breve conversación con el paciente de hasta 5 minutos, que ofrezca consejos e incluya un grado de asesoramiento en relación con el consumo de tabaco aumenta la tasa de abandono del hábito de fumar (Ramseier y Suvan 2015). La evidencia demuestra que los pacientes aceptan y esperan la participación de profesionales de la salud oral en el abandono del tabaco (Tonetti y cols. 2015b).

Pero sin duda, el elemento preventivo más estudiado en las enfermedades periodontales es el denominado control de placa o control del biofilm supragingival. Se han investigado numerosos métodos y agentes por su capacidad para reducir la placa supragingival y por tanto, prevenir o controlar las enfermedades periodontales (Ciancio 1995, Fine 1995, Mandel 1988, Newman 1986). Destacan dos grandes grupos, mecánicos y químicos.

### 3.1. Control de placa mecánico

La eliminación de placa supragingival a través del cepillado manual es el método principal de mantener una buena higiene oral en la mayoría de las poblaciones (Fischman 1997). Las instrucciones de higiene oral deben basarse en la cuidadosa selección de herramientas (tipo de cepillo de dientes y utensilios interdetales) y de técnicas para su uso adaptado a las necesidades y preferencias del paciente (Tonetti y cols. 2015b).

Se han realizado múltiples estudios que intentan determinar los factores involucrados en la eficacia del cepillado manual. Los dos factores claves parecen ser el tiempo empleado y la frecuencia del cepillado (Cummins 1997). Otros factores importantes son la destreza del paciente, su motivación y la toma de conciencia de los beneficios de una buena higiene oral (Cummins 1997). Las percepciones de los beneficios de un cambio de comportamiento y de la gravedad de la enfermedad periodontal (incluyendo el riesgo de padecerla) están

relacionadas con el cumplimiento de las instrucciones de higiene oral en pacientes periodontales adultos. Las intervenciones facilitadas por parte del profesional que están basadas en el uso de la fijación de metas, apoyo para el seguimiento de su progresión y planificación del cambio de comportamiento, son eficaces para mejorar las conductas relacionadas con la mejora de la salud oral (Newton y Asimakopoulou 2015).

Se han realizado diseños muy diversos de cepillos tanto manuales como eléctricos y, tras la evaluación de su eficacia, se ha concluido de forma general que tanto el cepillo convencional como el eléctrico eliminan de manera efectiva los depósitos de placa de las superficies vestibulares, linguales y oclusales, siempre que el paciente haya recibido las instrucciones adecuadas. Es un hecho claro que el cepillo más efectivo es el que se utiliza apropiadamente (Cancro y Fischman 1995). Hasta la fecha, ningún método de cepillado de dientes en particular ha sido determinado como claramente superior a los demás (Van der Weijden y Slot 2015). Sin embargo, el cepillo no accede de forma apropiada al espacio interdental. Por tanto, el uso de instrumentos como la seda dental, cepillos interproximales, palillos o puntas de goma, se hace aconsejable como complemento al cepillado para una higiene dental efectiva (Cummins 1997, Chapple y cols. 2015, Salzer y cols. 2015).

La revisión sistemática de la literatura científica permite afirmar que el cepillo eléctrico con oscilación rotatoria reduce más la placa y la gingivitis que el cepillado manual (Yaacob y cols. 2014, Chapple y cols. 2015, Van der Weijden y Slot 2015). A este respecto, se insiste en que una mayor estandarización de los diseños y observación de las pautas metodológicas podría beneficiar tanto a futuros ensayos clínicos como a la realización de meta-análisis (Robinson y cols. 2005, Chapple y cols. 2015). Además, en la actualidad no existen aún meta-análisis que exploren el impacto del diseño del cepillo de dientes en la inflamación gingival (Chapple y cols. 2015).

Existe evidencia de que las instrucciones de higiene oral parecen ser un elemento importante en la prevención de la periodontitis (Worthington y cols.

2013). Es decir, hasta tal punto es importante el cepillado mecánico que el hecho de combinar el raspado y alisado radicular con instrucciones de higiene oral más que efectuar raspado y alisado solamente, puede lograr mayores cambios en las medidas de la placa dental y sangrado o inflamación gingival que ningún tratamiento (Needleman y cols. 2015).

A pesar de ser el control de placa mecánico el método más ampliamente utilizado, se dan situaciones en que es insuficiente para lograr los objetivos de salud dentaria y gingival. Existe actualmente consenso en que, a pesar de ser la eliminación mecánica de la placa la piedra angular de la gestión exitosa de la enfermedad periodontal, en pacientes de alto riesgo, parece que el umbral crítico de la acumulación de placa para desencadenar la periodontitis es bajo, y estos pacientes se pueden beneficiar de los agentes coadyuvantes para la prevención primaria de la periodontitis. Cuando se utiliza como un tratamiento adyuvante al cepillado, el uso de agentes químicos antimicrobianos en enjuague bucal o incorporado en el dentífrico fluorado, solo o en combinación, ofrece mejoras claras y significativas en el manejo de la inflamación gingival y la prevención de la acumulación de placa (Chapple y cols. 2015).

Las indicaciones para el uso de productos químicos coadyuvantes al control mecánico se pueden resumir en las siguientes (Addy y Moran 1997a), ya que se siguen citando con posterioridad (Van Strydonck y cols. 2008):

- en la fase higiénica del tratamiento periodontal;
- tras cirugía oral como prevención secundaria;
- tras cirugía de fijación intermaxilar;
- en pacientes disminuidos físicos o mentales;
- en aquellos médicamente comprometidos, con propensión a infecciones;
- en úlceras aftosas recurrentes;
- en pacientes con ortodoncia;
- en pacientes ancianos, con períodos de hospitalización largos o con una enfermedad terminal.

También hay que tener en cuenta, cuando se hace referencia al uso de coadyuvantes químicos, que en la cavidad oral existen muchos nichos no accesibles a los medios mecánicos para el control del biofilm (Quirynen y cols. 1995, Greenstein 2004).

### 3.2. Control de placa químico

Además de las distintas situaciones mencionadas, en las que sería útil el empleo de agentes quimioterapéuticos, pueden darse problemas de higiene en áreas de difícil acceso, como ya se ha mencionado, o carencias en cuanto a la habilidad manual, constituyendo así una serie de limitaciones del control mecánico de la placa (Quirynen y cols. 1995, Greenstein 2002, Greenstein 2004). Desde un punto de vista puramente epidemiológico, la capacidad de los pacientes para mantener la higiene oral apropiada es a veces limitada (Artnik y cols. 2008). La discapacidad física o falta de coordinación adecuada de las manos pueden limitar la capacidad de algunos pacientes para limpiar sus dientes correctamente (Bizarra y Ribeiro 2009). Además, los factores de retención de placa, tales como lesiones de caries, obturaciones o mal ajuste de coronas pueden presentar obstáculos que reducen la accesibilidad y la limpieza adecuada (Litonjua y cols. 2011).

La utilización de diversos productos químicos que han demostrado cierta acción sobre el biofilm dental debe considerarse como un complemento al control mecánico de la placa (Rugg-Gunn y Macgregor 1978, Lavstedt y cols. 1982, Addy 1986, Wennstrom y Lindhe 1986, Slots y Rams 1990, Wennstrom 1992, Rams y Slots 1992, Goodson 1994, Albandar y cols. 1995, Van der Weijden y Hioe 2005, Chapple y cols. 2015), puesto que este reduciría el grosor del biofilm y alteraría su estructura, haciéndolo más susceptible a la acción de los distintos sistemas de control químico (Reich 2002, Van der Weijden y Slot 2011). Recientemente, como consecuencia de la celebración del 11º *Workshop* Europeo en Periodoncia, se ha publicado una revisión sistemática y meta-análisis que sigue corroborando que el uso de formulaciones con agentes específicos para el control químico de la placa proporcionan mejoras estadísticamente significativas en términos de reducción en los índices de placa, gingivales y de sangrado (Serrano y cols. 2015). De esta forma,

el control de placa mecánico puede no ser suficiente por sí solo para prevenir la aparición o reaparición de enfermedades periodontales en una amplia proporción de la población. Para apoyar este hecho se han defendido varias justificaciones, que incluyen el tiempo limitado de utilización de dichos medios mecánicos (Beals y cols. 2000), la práctica limitada también de la higiene interdental (Lang y cols. 1995, Stewart y cols. 1997, Macgregor y cols. 1998), la tendencia a volver a los niveles basales de placa en pacientes ya instruidos en higiene oral (Stewart y cols. 1997) y, en definitiva, la incapacidad de eliminar eficazmente las biopelículas supragingivales de una parte considerable de la población (Serrano y cols. 2015).

### 3.2.1. Modo de acción

Según su modo de acción, los agentes químicos para el control de placa se pueden dividir en las siguientes categorías (Addy y Moran 1997b):

- Agentes antimicrobianos: tienen efecto bacteriostático y bactericida *in vitro* que no puede extrapolarse a una eficacia probada *in vivo* contra la placa.
- Agentes inhibidores o reductores de placa: solo han demostrado reducir la cantidad y/o que afecta a la calidad de la placa *in vitro* e *in vivo*, lo cual puede o no ser suficiente para influenciar a la gingivitis y/o a la caries. En EE.UU. se denominan agentes antiplaca.
- Agentes antiplaca: tienen un efecto sobre la placa suficiente para producir un efecto reductor en los niveles de gingivitis y/o caries. En EE.UU. se denominan agentes antigingivitis.
- Agentes antigingivitis: reducen la inflamación gingival sin necesariamente influenciar a la placa bacteriana (incluye agentes antiinflamatorios).

Sin embargo, a lo largo de toda la presente tesis, los términos “inhibidores de placa”, “antiplaca” y “antigingivitis” se han decidido utilizar de acuerdo con la aclaración de terminología sugerida por la Federación Europea de Periodoncia (Addy 1994):

- Agente inhibidor de placa: reduce la placa a niveles suficientes para prevenir el desarrollo de gingivitis.

- Agente antiplaca: reduce de forma prolongada y profunda la placa de manera suficiente para prevenir el desarrollo de gingivitis.
- Agente antigingivitis: efecto anti-inflamatorio en la salud gingival mediada no necesariamente a través de un efecto sobre la placa.

De hecho, el último *Workshop* Europeo en Periodoncia divide en dos subcategorías principales los agentes adicionales al tratamiento mecánico cuya finalidad es contribuir a la resolución de la inflamación gingival, siendo dichas categorías: agentes anti-placa y agentes anti-inflamatorios (Polak y cols. 2015).

### 3.2.2. Actividad

Los efectos de las sustancias químicas para el control bacteriano se clasifican en cuatro categorías.

**Antiadhesivos:** Evitan la adhesión bacteriana (antiadhesivos). Los agentes antiadhesivos actúan sobre la película superficial para prevenir la fijación inicial de las bacterias formadoras de la placa primaria. Estos agentes se utilizan también en la industria, en el hogar y en el medio ambiente.

**Antimicrobianos:** Inhiben la división bacteriana (antimicrobianos). Pueden inhibir la formación de placa por uno de los dos mecanismos siguientes o su combinación. El primero es la inhibición de la proliferación bacteriana, dirigido contra las bacterias formadoras de la placa primaria. Es decir, ejercen su acción impidiendo su crecimiento, antes o después de la fijación de las bacterias, pero antes de su división. Se trata de un efecto bacteriostático. El segundo efecto es de tipo bactericida, por medio del cual el agente antibacteriano destruye todos los microorganismos que se están adhiriendo o están ya adheridos.

**Eliminadores de placa** (“cepillado químico”): Como los detergentes, que serían potencialmente tóxicas si se aplicasen dentro de la cavidad oral.

**Efecto sobre la matriz:** Las enzimas, como las proteasas, dirigidas contra las matrices bacterianas podrían ser potencialmente eficaces, pero carecen de comprobación dentro de la cavidad oral.

**Antipatogénicos:** Alterarían la ecología de la placa. Desde el punto de vista teórico es posible que un agente pueda tener un efecto inhibitor de la expresión patogénica de los microorganismos de la placa, pero es un enfoque no aplicado en la cavidad oral (Lindhe 2008).

Muchas sustancias antibacterianas tienen efectos bactericidas y bacteriostáticos combinados, muy pocos solo poseen efecto bacteriostático *per se*, como el fluoruro sódico (Brecx 1997).

### 3.2.3. Sustantividad

Los compuestos utilizados como antisépticos también han sido divididos de acuerdo con su sustentividad, que es la asociación prolongada entre un material y su sustrato. Es decir, debe liberarse a su sitio de acción durante el tiempo de uso y quedar retenido ahí durante un periodo de tiempo lo suficientemente prolongado tras el uso del producto como para que ejerza su efecto biológico. Esta definición se modificó por “duración de acción *in vivo*”, como así aparece en el segundo *Workshop* Europeo en Periodoncia (Lang 1997).

Los agentes que exhiben poca sustentividad (solo minutos) se categorizaron como **agentes antimicrobianos de primera generación**, incluyéndose ciertos antibióticos, compuestos de amonio cuaternario, compuestos fenólicos de aceites esenciales, fluoruros, incluyendo monofluorurofosfato y fluoruro sódico, agentes oxidantes, alcaloides de plantas, y finalmente, iodinas como povidona iodada.

Los **agentes antimicrobianos de segunda generación** se caracterizan por una alta sustentividad, retención de 25-30% tras el enjuague. Dichos compuestos permanecen activos *in situ* durante horas. Se incluyen en esta categoría las bisbiguanidas, como la clorhexidina, enjuagues de amino fluoruros y fluoruro estañoso y el triclosán cuando se asocia con un copolímero de polivinilmetileter y copolímero de ácido maleico.

Los **agentes antimicrobianos de tercera generación** se han caracterizado por su capacidad para inhibir o interrumpir la formación de placa mientras que no presentan un efecto demostrable sobre las bacterias (Addy y cols. 2007). El morfolinoetanol derivado del delmopinol es un ejemplo de esta categoría de

agentes químicos de control de placa. El delmopinol ha mostrado inhibición de placa y gingivitis (Collaert y cols. 1992, Moran y cols. 1992, Hase y cols. 1995). Los hallazgos sobre el delmopinol sugieren que puede interferir con la formación de la matriz de la placa, reduciendo la adherencia de las bacterias que forman la placa en primer término o de las bacterias que se suceden (Simonsson y cols. 1991). La eficacia del delmopinol al 0.2% en el control de la placa y la gingivitis está confirmada a partir de los datos de más de 1000 pacientes analizados en meta-análisis (Addy y cols. 2007). Sin embargo, aunque parece tener una sustantividad menor que otros antimicrobianos de segunda generación (Moran y cols. 1992), al no tener el delmopinol un efecto directo sobre las bacterias, es difícil cuantificar su sustantividad a través de los métodos empleados habitualmente en estudios comparativos con otros antisépticos.

A pesar de seguir siendo el control mecánico de la placa el método de referencia, el uso combinado con el control químico puede ofrecer, en las distintas limitaciones de las prácticas de higiene cotidianas, una mayor eficacia, ya que la utilización de medios mecánicos reduce el volumen de la placa, lo que facilita una mayor reducción posterior por medios químicos (Ramberg y cols. 1992).

#### 4. Productos de higiene oral

El término “producto para la higiene oral” describe tanto dispositivos mecánicos como formulaciones químicas diseñados para proporcionar salud oral y beneficios cosméticos al usuario. En cuanto a salud, su objetivo es la prevención de enfermedades debidas a la placa bacteriana, como son la caries, gingivitis y periodontitis (Addy y Moran 1997b).

Entre los productos de higiene oral mecánicos se encuentran el cepillo, que puede ser manual -convencional e interproximal- o eléctrico y el hilo dental. Llevar a cabo una adecuada higiene bucal es muy difícil para muchos pacientes. Aunque los pacientes periodontales reconozcan la importancia de la eliminación diaria de la placa dental, muy pocos pacientes se ciñen a regímenes prescritos de higiene bucal. Las instrucciones utilizadas para la higiene bucal han puesto énfasis en el

uso de un cepillo de dientes suave complementado con seda dental o cepillos interdentes. Al utilizar seda dental o cepillos interdentes se puede deshacer la placa interproximal y la mayoría de la placa subgingival coronal y, si se utilizan diariamente, pueden ayudar a prevenir el desarrollo progresivo de la enfermedad periodontal (Slots y Jorgensen 2002).

En las últimas décadas, las revisiones de los agentes para el control químico de la placa parecen arrojar pruebas sólidas para apoyar el beneficio de aumentar los métodos mecánicos de cepillado y uso de hilo dental en adultos con agentes quimioterapéuticos para el control de la placa y la gingivitis (Serrano y cols. 2015). Entre otros, los enjuagues bucales que contienen 0.12% de clorhexidina o aceites esenciales, y los dentífricos que contienen triclosán con 2% de copolímero Gantrez o fluoruro de estaño con hexametáfosfato de sodio, reducen el nivel de inflamación gingival (Gunsolley 2006, Drisko 2013).

#### 4.1. Formulaciones de productos de higiene oral químicos

La preferencia de una u otra formulación de compuestos químicos para el control de placa por parte de los fabricantes está influenciada en gran medida por la elección de los ingredientes activos, ya que con frecuencia interactúan con ciertos compuestos comúnmente utilizados (Forward y cols. 1997).

Dentro de las formas de presentación de las distintas formulaciones, los dentífricos y los colutorios son los más utilizados por los pacientes en general. Desde una perspectiva coste-beneficio, la forma farmacéutica ideal para la liberación de agentes químicos de control de placa es la pasta dentífrica, ya que se usará en todo caso con el cepillado, pero las preferencias del público y la facilidad para su formulación han favorecido el uso de colutorios (Addy y cols. 2007).

Los ingredientes más comúnmente utilizados que se emplean en las pastas y los colutorios comercializados son los que a continuación se exponen (Fauli 1993).

*En pastas dentífricas:*

**Agentes abrasivos o de pulido:** Se debe resaltar la importancia de cumplir con el índice de abrasividad permitido, que viene dado por el tamaño (<10-20µm), forma y dureza de sus partículas, puesto que su propósito es una acción abrasiva suave contra la placa y la eliminación de tinciones. Comúnmente se utilizan el carbonato cálcico, el bicarbonato sódico micronizado, el fosfato dicálcico dihidratado, la alúmina y silicatos.

**Espesante:** Controla la estabilidad y consistencia de la pasta. Pueden ser hidrosolubles (carragenatos, alginatos, carboximetilcelulosa sódica) o no hidrosolubles (silicato de aluminio y magnesio, silicato de magnesio y sodio y sílica coloidal).

**Agente surfactante o detergente:** Proporciona la espuma que facilita la retirada de restos alimentarios y ayuda a la dispersión del producto en la boca.

**Gelificantes:** Aglutinan en forma de suspensión estable los diferentes componentes sólidos de la pasta dentífrica.

**Humectante:** Ayuda a reducir la pérdida de humedad e incluyen, entre otros, glicerina, sorbitol, xilitol y propilen glicol.

**Saborizantes:** El sabor, así como la presentación, son características determinantes para la aceptación de una formulación u otra. El saborizante ideal generalmente deja sensación de frescor. Se utilizan para este fin: aceite de menta, metilsalicilato, anís, canela, fresa, timol, aceite de limón y eucalipto. Además, como edulcorante, con el fin de aportar un sabor dulce, se utiliza sacarosa, sacarina (benzosulfamida), xilitol y ciclamatos.

**Conservantes:** Protegen la formulación del efecto de los microorganismos. Su dificultad de elección es que muchos de ellos no son efectivos a los diferentes pH

útiles. Los benzoatos pertenecen a este grupo de agentes. También se emplean otros como silicato sódico o diclorofenol.

**Colorantes:** La gama que se utiliza está regulada por la Unión Europea.

**Blanqueadores del producto:** Dióxido de titanio.

**Blanqueadores de los dientes:** Peróxido de carbamida, bicarbonato sódico micropulverizado, trifosfatopentassódico.

**Principios activos:** Las diferentes formulaciones llevan vehiculados una serie de productos con el fin de mejorar la calidad y las propiedades profilácticas orales de las mismas. Entre ellos se encuentran:

- **Bacteriostáticos:** Se han utilizado, entre otros: hexoclorofeno, cloruro de benzetonio, clorhexidina.
- **Compuestos metálicos:** Pueden tener diversos fines, como aumentar el efecto de los fluoruros (sales de indio), astringentes (sales de aluminio), bactericidas (sales de estaño).
- **Enzimas:** Con el fin de ayudar a descomponer las proteínas, los lípidos y los almidones. Actúan sobre el metabolismo de la placa bacteriana y el sistema glucolactoperoxidasa. Un ejemplo son las dextranasas.
- **Fluoruros:** La inclusión de flúor en las pastas dentífricas data del principio de la década de los años cincuenta. En la actualidad, se utilizan en forma de fluoruros inorgánicos simples (fluoruro sódico, fluoruro de estaño, monofluorofosfato sódico), fluoruros orgánicos (fluoruro de aminas) y fluoruros metálicos (fluoruro de zirconio, fluoruro de zirconio e indio, fluoruro de manganeso, fluoruro de aluminio). Dentro de este grupo destaca el fluoruro de estaño puesto que la incorporación de un ión metálico al flúor, el estaño (Sn), le confiere importantes propiedades bactericidas y bacteriostáticas. Su principal mecanismo frente a la gingivitis es la inhibición de varias enzimas proinflamatorias (Paraskevas y Van der Weijden 2006, Gunsolley 2006).

- **Ingredientes anticálculo:** Dificultan la adherencia del cálculo a las superficies dentarias. Se han utilizado: etridonatodisódico, sales de zinc y titanatos orgánicos. Dentro de los agentes que inhiben la formación y crecimiento de cristales, tienen especial relevancia los fosfatos, como el hexametáfosfato de sodio, que ha mostrado su efectividad en retrasar la velocidad de precipitación del fosfato cálcico de la placa y es, además, muy resistente a la inactivación por parte de las enzimas salivales (White y cols. 2002).
- **Ingredientes remineralizantes:** Favorecen las condiciones de remineralización del esmalte. Son distintos iones, flúor, fosfato y calcio.
- **Inhibidores enzimáticos:** Reducen la producción de los ácidos procedentes del metabolismo del azúcar al inhibir las enzimas implicadas en la glucólisis (N-laurilsarcosinato sódico).

*En colutorios:*

Los ingredientes con los que se pueden formular permiten adjudicarles muy diversas funciones, algunas muy próximas a las que se consideran medicamentosas. Por este motivo, el formulador debe prestar una especial atención a las normativas legales vigentes en la Unión Europea (Parra Juez 1995). Básicamente, contienen los siguientes ingredientes junto con el ingrediente activo:

**Alcohol:** Los colutorios son generalmente soluciones acuosas en las que puede existir un contenido variable de alcohol etílico. Éste aumenta el impacto del sabor, solubiliza el agente activo y algunos otros ingredientes y proporciona también algún poder de preservación de microorganismos. Durante años se ha considerado que un 25% de alcohol era adecuado para una óptima solubilización de los componentes aromáticos. Por diversos motivos, las formulaciones actuales han reducido notablemente la presencia de alcohol, que se sitúa entre un 15 y un 7% o menos en la mayoría de los colutorios (Parra Juez 1995). La preocupación por el contenido de alcohol en ciertas formulaciones se justifica sobre la base de la asociación establecida entre el consumo de alcohol y el riesgo de desarrollar cáncer orofaríngeo (Teles y Teles 2009). Sin embargo, no hay apoyo en la literatura

científica (Elmore y Horwitz 1995, Cole y cols. 2003) que concluya que hay una asociación entre los enjuagues orales que contienen alcohol y el desarrollo de cáncer orofaríngeo (La 2009, Gandini y cols. 2012).

**Surfactantes:** Elimina los detritus de la boca, proporciona efectos antibacterianos y también ayuda a la solubilidad de los demás agentes. Esta incorporación de un agente tensoactivo a las formulaciones debe cumplir los requisitos de ser insípido, atóxico y no irritante para la mucosa oral. Son detergentes sintéticos, de los cuales el más utilizado por su seguridad y eficacia durante décadas en todo el mundo es el tensoactivo aniónico lauril sulfato sódico. Son, así mismo, especialmente adecuados laurilsarcosinato (que preserva la actividad enzimática de la saliva) y el laurilsulfoacetato sódico (Parra Juez 1995). Los más usados son lauril sulfato sódico (aniónico) y cloruro de cetilpiridinio (catiónico), que puede utilizarse este último como surfactante, aunque tienen más utilidad como antiséptico debido a sus propiedades antibacterianas y antiplaca.

**Agentes de sabor:** Proporciona las propiedades de sensación de aliento fresco. Son los mismos que en las pastas y algunos incluyen aceites esenciales (eucalipto, mentol, timol y metilsalicilato). Con los nombres de aceite esencial, aceite etéreo o aceite volátil se identifican las mezclas complejas de sustancias orgánicas volátiles, de muy diversa composición química, que se hallan presentes en ciertas plantas. Los componentes aromáticos de un colutorio no suelen superar el 2% de la fórmula acabada.

**Humectantes:** Algunos colutorios los contienen (glicerina, sorbitol, propilenglicol) con la finalidad de evitar que una rápida evaporación pueda provocar cristalizaciones en la abertura del envase (Parra Juez 1995).

**Principios activos:** Pueden actuar en calidad de antisépticos, astringentes o calmantes, entre otros.

- Antisépticos: cineol, cloramina, cloruro de benzalconio, creosota, cresol, eugenol, fenol, guayacol, hexitidina, povidona, resorcinol, timol, triclosán, fluoruros.

- Antibióticos, antifúngicos, sulfamidas: bacitracina, neomicina, nistatina, sulfanilamida.
- Astringentes: acetato de aluminio, cloruro de zinc.
- Antiinflamatorios: bencidamina, hidrocortisona.
- Anestésicos locales: benzocaína, lidocaína, para-aminobenzoato de etilo, procaína, tetracaína.
- Sedantes: eugenol o esencia de clavo, hidrato de cloral.
- Anticaries: derivados del flúor. El contenido en flúor no debe superar el 0.15% de la fórmula acabada, aunque está autorizado el uso de mezclas de distintas sales.
- Anticálculo: se utilizan para este fin agentes quelantes (capaces de secuestrar calcio) que pueden interferir en el proceso de mineralización. Pertenecen a este grupo los pirofosfatos tetrasódico y tetrapotásico.

#### 4.2. Desarrollo de la formulación

El desarrollo de una formulación consta de cuatro fases:

##### *Elección del ingrediente activo para la salud gingival*

Este primer paso se encuentra muy ligado a la vía de administración que se pretende. En el caso de la vía de administración de medicamentos o agentes activos sin perfusión de tejidos y dentro de la vía digestiva, se encuentra la administración oral, que puede realizarse a través de la deglución o bien de la mucosa bucal. Para una misma vía de administración, en la mayoría de los casos, se puede obtener un efecto local o sistémico. Si se busca un efecto local, éste debe producirse en una zona próxima al lugar de administración, no interesa que el agente se absorba, es decir, que se incorpore a una célula del organismo con destino a la circulación sistémica, aunque se absorba en células locales.

La pasta y el enjuague bucal son utilizados, generalmente, no más de un minuto dos veces al día. Después, muchos de los ingredientes activos que no se han absorbido se debilitan. Los que se prefieren son los de alta sustentividad (clorhexidina) o los de rápida acción (cloruro de cetilpiridinio).

### *Identificación de excipientes compatibles*

La posibilidad de interacción de los ingredientes activos comúnmente utilizados en las formulaciones necesita ser comprobada durante todo el proceso del desarrollo del producto. En la pre-formulación, puede ser efectivo un simple proceso de barrido, como sería comprobar la creación de un precipitado de soluciones mezcladas entre el excipiente test y el ingrediente activo. Sería, por tanto, necesario variar la concentración de los excipientes en este momento del proceso. Empleando diseños experimentales correctos se pueden encontrar sinergismos, efectos antagónicos, indiferentes o aditivos entre los distintos ingredientes (Pons y cols. 1992).

### *Confirmación de la biodisponibilidad del agente activo*

Numerosos exámenes de laboratorio validan la actividad previsible del agente. En esta fase también se utilizan métodos de laboratorio para medir la retención de los ingredientes, así como para determinar la concentración mínima inhibitoria del agente contra un panel de microorganismos orales en cultivo puro (Forward y cols. 1997).

Se entiende por biodisponibilidad la fracción de fármaco o ingrediente activo que alcanza inalterado la circulación sistémica. Este concepto se considera tanto en magnitud (cantidad real que alcanza el torrente circulatorio) como en velocidad (tiempo que tarda esa fracción en alcanzar la concentración máxima).

Se denomina liberación al paso del fármaco o agente activo no disponible en el lugar de absorción (es decir, antes de abandonar la formulación que lo vehiculiza) a agente disponible y disuelto capaz de atravesar membranas. En las formas líquidas convencionales el principio activo se puede encontrar en disolución, suspensión o emulsión. Si se administra disuelto estará plenamente disponible para ser absorbido.

### *Obtención de la prueba final de eficacia en ensayos clínicos*

Como se explicará más adelante.

#### 4.2.1. Vehículos

El vehículo más común en los colutorios actualmente es el agua, junto con el glicerol o propilenglicol como coadyuvantes (Fauli 1993). Se emplean en las formulaciones para diluir el compuesto total hasta un volumen o peso determinado.

Los factores generales que rigen la liberación y el aclaramiento de los agentes en boca son la solubilidad, la unión iónica, el pH y la estabilidad (Cummins 1997):

##### *Solubilidad*

En presentaciones de productos donde el tiempo de aplicación es corto, la liberación del agente desde el vehículo se favorece generalmente si el agente está en forma soluble. Por ejemplo, la sal digluconato de clorhexidina se utiliza en enjuague debido a su alta solubilidad en agua. Del mismo modo, el triclosán, que es poco soluble en medio acuoso, se solubiliza en el ingrediente que da sabor o en el surfactante del dentífrico.

Las disoluciones de mayor interés en tecnología farmacéutica son las de sólidos en líquidos, dado que en la elaboración de estas formulaciones líquidas, la etapa de disolución de algunos componentes puede ser determinante para la obtención de una formulación óptima.

Como ejemplo, uno de los recursos para solubilizar solutos escasamente solubles en agua es la adición de agentes tensoactivos, los cuales son sustancias anfífilas, es decir, presentan en su estructura una parte lipófila y otra hidrófila, de manera que al introducir un agente tensoactivo en un medio acuoso, sus moléculas se orientan de forma que permite a un soluto poco hidrosoluble unirse a la zona apolar del tensoactivo, aumentando así su solubilidad en agua.

A este respecto, la clorhexidina es el antiséptico más efectivo del grupo de las biguanidas. Es importante considerar que se trata de una base fuerte muy poco soluble en agua, por lo que en la práctica clínica se utiliza como digluconato, ya que es la sal que presenta mayor solubilidad. El digluconato de clorhexidina se comercializa como materia prima en solución acuosa al 20%. A partir de esta

concentración se elaboran todas las diluciones utilizadas como antisépticos tanto para especialidades farmacéuticas como para fórmulas magistrales (SEFH 2013).

#### *Unión iónica*

Los agentes cargados eléctricamente, como los iones metálicos, los compuestos de amonio cuaternario y la clorhexidina, se unen a sus sitios receptores mediante fuertes interacciones iónicas.

#### *pH*

Ya que el pH del vehículo de liberación rige el estado de ionización del agente y en menor extensión del sitio de recepción expuesto al vehículo, el pH es crítico para la maximización de la retención y liberación del agente. Es habitual que se utilicen agentes estabilizantes de pH, puesto que se aconseja que la formulación esté lo más cerca posible de la neutralidad: 6,5 a 7. Para la clorhexidina, tanto un pH bajo como la presencia de iones metálicos como el calcio, reducen la retención y por tanto, la eficacia clínica del agente.

#### *Estabilidad*

Es necesaria, por último, una estabilidad intrínseca del agente en sí mismo, así como dentro de la formulación, de forma que una vez liberado a la boca, los procesos enzimáticos salivales o bacterianos no conlleven su desactivación y consecuente pérdida de actividad clínica. Los agentes antiplaca orgánicos, como la clorhexidina o el triclosán, son muy estables a la degradación enzimática.

#### 4.2.2. Liberación

Existen dos fases secuenciales respecto a la retención de un agente en la boca: liberación desde el vehículo a la saliva (liberación supragingival) o al fluido crevicular gingival (liberación subgingival) y la subsiguiente canalización hacia las áreas receptoras orales. Ambas fases se rigen por cinéticas de primer orden, en las cuales, la retención del agente está dirigida por su concentración.

La retención y distribución inicial de un agente en la cavidad oral viene determinada por dos factores: la fuerza de unión del agente a su variedad de sitios

receptores y el ratio de formación de estas interacciones de unión entre agentes y receptores (Cummins 1997).

Las formas de unión al receptor oral consisten, generalmente, en moléculas de alto peso molecular, proteínas de unión, mientras que en saliva y fluido crevicular pueden existir moléculas de bajo peso molecular (Cummins y Creeth 1992).

Los agentes antimicrobianos efectivos clínicamente parecen liberarse a múltiples localizaciones en la cavidad oral, siendo retenidos en la placa supragingival, la película dentaria y los tejidos blandos orales. Dependiendo del modo de acción específico, pueden ser sitios de acción biológica o reservorios del agente. Los tejidos blandos orales son, probablemente, los sitios de mayor retención, pero posiblemente no desempeñen un papel directo significativo en la acción antimicrobiana. Una gran cantidad de datos sugiere que la saliva es el principal sitio de acción de los agentes antimicrobianos; sin embargo, también existen datos que otorgan esa importancia respecto al sitio de mayor actividad del agente, a la placa o a la película dentaria (Cummins 1997).

#### 4.2.3. Aclaramiento

El aclaramiento de un agente en la boca está también controlado por dos factores: la fuerza de unión del agente a los receptores y el ratio de liberación de ese agente desde los sitios receptores. Por tanto, el aclaramiento se relaciona directamente con el equilibrio entre saliva y agente unido al receptor (supra o subgingival). En este equilibrio influye de una manera importante la composición y el flujo salival (Cummins y Creeth 1992).

#### 4.2.4. Requerimientos de la forma farmacéutica

Los requerimientos propuestos para una forma farmacéutica con el propósito de beneficiar la salud periodontal son seis (Cummins y Creeth 1992).

- Debe proporcionar un entorno estable para el agente desde el punto de vista físico, químico y microbiológico.

- La formulación debe realizarse cuidadosamente para asegurar una óptima liberación y biodisponibilidad del agente desde el vehículo al sitio de acción durante su uso.
- Debería ser confortable para el paciente.
- Su uso no debería producir efectos adversos, como tinción, irritación mucosa o descamación, ni inducir cambios patogénicos en la flora oral.
- Debe cumplir los requerimientos de la legislación vigente así como las recomendaciones de las organizaciones profesionales.
- Por último, debe ofrecer una relación coste-beneficio favorable.

#### 4.2.5. Tipos de forma farmacéutica

Las formas farmacéuticas para liberación supragingival son: pasta, colutorio, gel, spray, chicle, tableta, hilo dental, barniz e irrigador. De ellas, el colutorio es la forma de dosificación más simple. Generalmente, esta presentación farmacéutica consta de una base de agua o de agua y alcohol, junto con humectantes, surfactantes e ingredientes de sabor. Una gran parte de agentes son compatibles con este vehículo, aunque no lo son los compuestos estañosos por su alta susceptibilidad a la inactivación por hidrólisis. Normalmente se aplican por periodos cortos de tiempo, entre 30 y 60 segundos.

Los agentes para el control de placa subgingival o para modular la respuesta de los tejidos periodontales en lesiones establecidas, pueden aplicarse de forma sistémica mediante cápsulas o tabletas o de forma local mediante irrigadores o fibras subgingivales.

Según la literatura científica reciente revisada, los enjuagues bucales logran consistentemente mejores resultados, en general, que los dentífricos, mientras que también hay que señalar que la combinación de un dentífrico y un enjuague no se ha podido evaluar adecuadamente. Esto es debido al número limitado de estudios disponibles, ya que ninguna de las revisiones sistemáticas disponibles ha analizado una amplia variedad de agentes. La mayoría de dichas publicaciones acaban centrándose en un agente específico o un grupo limitado de agentes. Sin embargo,

el formato ideal para la administración de una formulación parece ser el dentífrico, ya que su uso es común en la población junto con el cepillado de dientes, reduciendo el coste añadido de la utilización de otro agente (Serrano y cols. 2015).

#### 4.3. Evaluación de los productos químicos de higiene oral

La comunidad científica, los profesionales y algunas agencias de gobierno han sentado los principios para el diseño de estudios necesarios para evaluar productos orales preventivos y terapéuticos (Addy y Moran 1997b).

Respecto a la evaluación científica, uno de los primeros estudios cruzados a doble ciego de una droga para uso dental se publicó en 1960 (Cooke y Armitage 1960), teniendo en cuenta que la primera referencia a un enjuague oral, como práctica formal para el tratamiento de enfermedades de la encía, se remonta a la medicina china de los años 2700 a.C. Sin embargo, no fue hasta 1530, en Alemania, cuando se publicó el primer trabajo impreso dedicado en exclusiva a la terapéutica dental. Recomendaba realizar enjuagues orales tras las comidas para eliminar cualquier adherencia a los dientes que pudiese destruirlos y producir mal olor (Fischman 1997).

Las formulaciones, en muchos casos, son posibilidades lógicas en su concepción pero podrían carecer de actividad biológica. Algunas formulaciones utilizadas en la primera mitad del siglo pasado tenían potencial para causar daño local o toxicidad sistémica (Addy y Moran 1997b). El control de la formulación y la evaluación científica de su eficacia son cuestiones relativamente recientes. La legislación médica en muchos países demanda una amplia documentación toxicológica acerca de los ingredientes utilizados en los productos de higiene oral, generándose listas de ingredientes aprobados que son revisados continuamente.

Ningún protocolo puede contestar todas las cuestiones relativas a la eficacia de un agente o formulación. De la misma forma, sería imposible aplicar algunos de los métodos recomendados a todos los agentes disponibles o, más en particular, al enorme número de formulaciones disponibles. La evaluación es necesario que sea

un proceso paso a paso, del cual se espera que proporcione una gran cantidad de datos que apoyen la eficacia del producto final para uso público.

Los métodos de evaluación incluyen métodos *in vitro* e *in vivo* (Addy y Moran 1997b). Se han utilizado modelos animales pero, excepto para evaluación toxicológica, pueden ser cuestionados por motivos éticos y científicos, por lo que no se considerarán en adelante.

El diseño de protocolos para evaluar agentes y productos químicos de higiene oral ha sido desarrollado, en algún grado, atendiendo a su modo de acción.

#### 4.3.1. Métodos *in vitro*

La naturaleza dinámica de la boca y los numerosos factores endógenos y exógenos pueden afectar al uso y a la acción de los productos de higiene oral. Por tanto, estas variables no pueden ser imitadas *in vitro*. Sin embargo, cuando se interpretan con cuidado, los datos *in vitro* pueden proporcionar información útil, de apoyo o explicatoria respecto a los agentes de higiene oral y sus formulaciones.

##### *Test (o pruebas) antimicrobianos*

Las propiedades antimicrobianas de agentes específicos pueden determinarse a través de la medición de la concentración mínima inhibitoria y de curvas de crecimiento o supervivencia usando cepas bacterianas o aislamientos frescos. Se pueden determinar los perfiles antibacterianos para un agente en particular o una familia de agentes contra un rango de microorganismos orales relevantes y estos datos usarse para interpretar hallazgos de formulaciones que contengan los mismos agentes (Moran y Addy 1984). Generalmente, los test antimicrobianos para productos o formulaciones utilizan la dilución máxima inhibitoria de la formulación contra organismos test (Moran y cols. 1988). Combinando los datos de concentración mínima inhibitoria y dilución máxima inhibitoria se puede determinar la biodisponibilidad proporcional del ingrediente activo para algunos agentes y formulaciones.

### *Estudios sobre bacterias aisladas*

La actividad *in vitro* de los diversos agentes se puede valorar con los siguientes métodos (Organización Mundial de Sanidad Animal 2012):

- Difusión en agar (disco-placa):

Sobre el medio de cultivo incluido en una placa de Petri con un inóculo bacteriano estandarizado se coloca un disco de antimicrobiano de una concentración determinada. Según el diámetro del halo de inhibición medido en milímetros y de acuerdo con parámetros previamente establecidos, se obtiene una zona de inhibición del crecimiento que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria frente al antimicrobiano presente en el disco.

Cuando su concentración llega a ser tan diluida que no logra inhibir el crecimiento de la bacteria ensayada, termina la zona de inhibición. El diámetro de esta zona de inhibición alrededor del disco antimicrobiano se corresponde con la concentración mínima inhibitoria (CMI) para esa combinación concreta de bacteria y antimicrobiano. En otras palabras, la zona de inhibición se correlaciona de modo inversamente proporcional con el valor de la CMI para la bacteria ensayada. En general, cuanto mayor es la zona de inhibición, menor es la concentración del antimicrobiano que se requiere para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

- Dilución en medio líquido y en medio sólido:

La finalidad de estos métodos es determinar la concentración más baja del antimicrobiano ensayado que es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria analizada. Los métodos para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos que se basan en diluciones parecen ser más reproducibles y fáciles de cuantificar que los basados en difusión.

- Dilución en caldo:

Puede hacerse en forma de macrodilución o microdilución. Se emplea un inóculo bacteriano estandarizado y diluciones dobles progresivas del antimicrobiano. Tras la incubación se hacen subcultivos en placas y de esta forma se calculan las CMI (concentración mínima inhibitoria ) y CMB (concentración mínima bactericida) en relación a un control sin antimicrobiano.

El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 ml (macrodilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de microtitulación (microdilución).

Debido a que en la actualidad la mayor parte de las pruebas para antimicrobianos mediante microdilución en medio líquido se preparan comercialmente, este método es menos flexible que el basado en la dilución en medio sólido o en la difusión en disco en cuanto a su capacidad para admitir cambios necesarios derivados del programa de control y seguimiento.

- Dilución en medio sólido agar:

Se inoculan varias cepas bacterianas definidas en un medio solidificado con agar contenido en placas que incorporan concentraciones dobles progresivas de antimicrobiano y una testigo sin antimicrobiano. Tras la incubación pertinente se determinará la CMI de acuerdo con los criterios ya expuestos.

Los test de contacto *in vitro* se han utilizado para evaluar diferentes agentes antimicrobianos (Goldenheim 1993, D'Arcangelo y Varvara 1998). Se ha desarrollado una modificación, el test de letalidad en intervalo corto con el fin de evaluar la eficacia *in vitro* de agentes activos y diferentes formulaciones. Se trata de una modificación de los test de contacto estándar que han sido utilizados para determinar los tiempos de letalidad de antimicrobianos. Esta modificación surge debido a que el tiempo de contacto debe ser más corto para un antimicrobiano utilizado como colutorio, ya que el tiempo de contacto usual de estos productos en la cavidad oral es alrededor de 1 minuto (Herrera y cols. 2003).

- Actividad bactericida del suero (ABS):

Sirve para determinar la eficacia de un tratamiento antimicrobiano en procesos graves. El método es muy similar al de las macrodiluciones empleando un inóculo bacteriano estandarizado y diluciones de suero; se calcula la concentración inhibitoria y bactericida del mismo.

#### *Estudios sobre bacterias en biofilm*

Tradicionalmente, el recuento de bacterias en placas de agar ha sido el método *in vitro* de elección para la determinación de la viabilidad bacteriana. Este método tiene limitaciones claras, como los tiempos relativamente largos necesarios para el crecimiento de la colonia o las diferencias en el medio de crecimiento utilizado, entre otras (Breeuwer y Abee 2000). El uso de métodos morfológicos, como la microscopía confocal láser, es útil para evaluar la estructura y fisiología de biofilms, pero no permite la evaluación de los cambios en la viabilidad bacteriana cuando los biofilms están expuestos a compuestos antisépticos (Takenaka y cols. 2008). Los métodos moleculares independientes de los cultivos para la identificación y cuantificación de las bacterias orales se han desarrollado ampliamente durante los últimos años, pero todavía no son muy utilizados en los laboratorios de rutina, debido a la persistencia relativamente elevada del ADN después de la muerte celular, entre un día y 3 semanas, lo que puede sobrestimar el número de células vivas después de un tratamiento antiséptico (Josephson y cols. 1993). Una posible alternativa es el método de bioluminiscencia trifosfato de adenosina (ATP), que ha sido utilizado como un ensayo cuantitativo para evaluar bacterias viables en diferentes muestras biológicas, así como en la placa dental (Chen y Cushion 1994, Arakawa y cols. 2004, Pan y cols. 2010). Este método se basa en la actividad de la ATP de los nucleótidos como un elemento clave en el intercambio de energía de todos los sistemas biológicos. El ATP está presente en todas las células metabólicamente activas, ya que vincula los procesos catabólicos y anabólicos. Cuando se lisan las células, el ATP liberado se puede medir por bioluminiscencia. Con esta técnica se logra una evaluación cuantitativa rápida de las bacterias viables en muestras de biofilm,

pudiéndose probar la eficacia de los enjuagues bucales antisépticos (Sanchez y cols. 2013). Varios estudios han intentado estudiar, a través de distintos métodos, el efecto de los enjuagues bucales en biofilms *in vitro* (Zaura-Arite y cols. 2001, Shapiro y cols. 2002, Hope y Wilson 2004, Takenaka y cols. 2008, Sliepen y cols. 2010). Existen, por tanto, métodos rápidos tales como la evaluación directa de biofilms bajo el microscopio con el uso de la tinción específica, que son capaces de discriminar entre las bacterias vivas y muertas, pero que no proporcionan suficiente especificidad o sensibilidad. Por el contrario, los métodos basados en cultivos pueden ser muy específicos, pero son lentos, requieren límites de detección más altos y dependen en gran medida de las habilidades técnicas del operador. En este contexto, se desarrollan metodologías que demuestran no sólo una alta sensibilidad y especificidad, sino también una velocidad suficiente para la detección de eficacia antimicrobiana cuando se utiliza un agente antibacteriano bien conocido. Tales técnicas engloban los procedimientos de diagnóstico microbiológico con técnicas basadas en los ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cuales han sido ampliamente empleados para la identificación y cuantificación de las bacterias orales (Sanz y cols. 2004, Boutaga y cols. 2007, Boutaga y cols. 2006), pero no generalmente utilizados para evaluar la eficacia antimicrobiana, puesto que el ADN bacteriano puede persistir en el ambiente por mucho tiempo después de la muerte celular y, por lo tanto, el diagnóstico basado en el ADN puede sobreestimar el número de bacterias vivas después de un tratamiento antimicrobiano, como se señaló anteriormente (Nocker y cols. 2006, Sanchez y cols. 2014). Para superar este problema, se han desarrollado métodos basados en el uso de tinciones, tales como monoazida de propidio (PMA). Este compuesto es impermeable a las membranas celulares intactas, y por lo tanto, sólo puede reaccionar con el ADN en las células que están muertas o con la integridad de su membrana comprometida. Se trata de aplicar la capacidad de estos colorantes para detectar integridad de la membrana celular, y por lo tanto distinguir entre células viables e irreversiblemente dañadas (Nocker y Camper 2009, Nocker y cols. 2007). Este compuesto (PMA) es capaz de localizarse en el interior de las células muertas, e intercalarse en el ADN cuando se expone a la luz, pero no es posible su ubicación en el interior de células vivas para reaccionar con el ADN de dichas células vivas. Por lo tanto, en las mezclas tratadas con

monoazida de propidio en células vivas y muertas, el ADN de las células muertas no puede ser amplificado en la PCR (Nocker y cols. 2006), es decir, solo es capaz de detectar bacterias vivas. Los resultados que aportan estudios realizados con esta técnica están de acuerdo con aquellos que demuestran que el número de bacterias viables se reduce con el envejecimiento del biofilm (Sanchez y cols. 2014).

Un biofilm inmaduro alberga aproximadamente el 80% de células bacterianas vivas, mientras que uno maduro presenta aproximadamente el 50% (Branda y cols. 2005).

Las bacterias en el medio oral crecen en forma sésil, presentando con esta forma una mayor resistencia a los antimicrobianos. De esta manera, los resultados obtenidos de modelos artificiales de biofilms orales se asemejan más a la realidad que los procedentes de modelos sobre bacterias aisladas (Xu y cols. 2000, Shapiro y cols. 2002, Haffajee y cols. 2003). Se han publicado estudios que demuestran la capacidad de los aceites esenciales y de la clorhexidina para penetrar en el biofilm y producir una acción bactericida (Netuschil y cols. 1995, Pan y cols. 2000, Arweiler y cols. 2003, Shapiro y cols. 2002, Ouhayoun 2003). Se ha observado que la supervivencia bacteriana después de distintos tratamientos antimicrobianos es mucho menor cuando las bacterias se cultivan en su forma planctónica que cuando se realiza sobre biofilms (Zaura-Arite y cols. 2001, Davies 2003, Sedlacek y Walker 2007, Filoche y cols. 2010, Bridier y cols. 2011, Sanchez y cols. 2013, Blanc y cols. 2014).

En el desarrollo y validación de modelos de biofilm de laboratorio (Pan y cols. 2004, Guggenheim y cols. 2001, Filoche y cols. 2010) deben considerarse varios criterios, como película salival; inóculo bacteriano; nutrientes específicos; pH; temperatura; potencial redox o sustantividad de agentes activos, entre otros (Pan y cols. 2004, Guggenheim y cols. 2001, Filoche y cols. 2010, Pan y cols. 2010).

La dificultad que existe en el estudio de las bacterias orales está relacionada, entre otras consideraciones, con el gran número de interacciones que tienen lugar entre dichas bacterias y la complejidad técnica para el análisis de los procesos internos del biofilm. Se han desarrollado, por tanto, sistemas *in vitro* -

modelos de laboratorio-, en los que se simula el ambiente oral (Tang y cols. 2003, Blanc y cols. 2014). Una amplia variedad de técnicas de análisis molecular y de microscopía se utilizan para estudiar las condiciones bioquímicas y microbiológicas presentes durante la formación y maduración de biofilms orales. Estos sistemas han utilizado principalmente placa subgingival dispersa o una selección de bacterias subgingivales o supragingivales específicas en ensayos con placa de microtitulación -múltiples pocillos que se utilizan como pequeños tubos de ensayo-, o también el sistema fermentador de profundidad constante (Guggenheim y cols. 2001, Foster y Kolenbrander 2004, Sedlacek y Walker 2007). Con el fin de describir la estructura, la viabilidad y la cinética de bacterias dentro del biofilm oral, se han desarrollado modelos *in vitro* utilizando especies bacterianas de la microbiota subgingival que se cultivan en discos de hidroxiapatita recubiertos por saliva durante 72 horas y expuestos por inmersión durante un minuto al antimicrobiano evaluado (Sanchez y cols. 2011, Sanchez y cols. 2013). Debido a que estos modelos desarrollados en placas de microtitulación no contemplan la dinámica de fluidos encontrada *in vivo* y además carecen de algunos nutrientes esenciales y condiciones físico-químicas, como pH y potencial redox, que tienen lugar en la cavidad oral, se han investigado otros modelos de biofilm *in vitro* que reproducen con mayor precisión las complejas condiciones del entorno oral (Blanc y cols. 2014). Basado en un modelo de colonización espacio-temporal, algunos autores han trabajado con especies múltiples en sus modelos (Foster y Kolenbrander 2004, Wei y cols. 2006, Helmerhorst y cols. 1999, Corbin y cols. 2011). El objetivo de utilizar un modelo de flujo (Blanc y cols. 2014) es simular las condiciones que las bacterias normalmente encuentran en el entorno oral, como pH, temperatura, atmósfera y flujo, ya que dichos biofilms están expuestos en boca a un constante flujo de saliva, así como de fluido crevicular gingival, lo que determina las propiedades fisiológicas, de estructura y composición del biofilm a través de modificaciones en la expresión genética bacteriana cuando se someten a diversas condiciones. Los modelos estáticos no son capaces de simular estas condiciones. De hecho, varios estudios han demostrado que la estructura y propiedades del biofilm son diferentes dependiendo si se formaron bajo condiciones estáticas o de flujo (Vaughan, Jr. y cols. 2010, Drescher y cols. 2011).

A través del conocimiento de las características y etapas de desarrollo de los biofilms se posibilita la búsqueda de enfoques novedosos para el tratamiento y prevención, tanto en el ámbito médico como el industrial. Otras terapias potenciales incluyen enzimas que disuelvan los polímeros de la matriz, reacciones químicas que bloqueen la síntesis de la matriz del biofilm y el empleo de análogos de proteínas y péptidos señalizadores que interfieran con la comunicación célula-célula, indispensables para la formación de un biofilm (Stewart y Costerton 2001).

En cuanto a establecer la eficacia de los agentes *in vivo*, los datos antimicrobianos *in vitro* de productos que contienen los mismos agentes pueden proporcionar una predicción limitada de la actividad *in vivo*. Por ejemplo, los iones metálicos parecen aumentar la actividad de algunos antisépticos (Giertsen y cols. 1987) mientras que las proteínas y la saliva reducen su actividad (Hjeljord y cols. 1973, Roberts y Addy 1981). Sin embargo, en principio, los tests antimicrobianos *in vitro* son malos predictores de actividad *in vivo*, particularmente respecto a la inhibición de placa (Gjermeo y cols. 1970, Gjermeo y cols. 1973). Esta deficitaria correlación entre acción *in vitro* y efecto *in vivo* surge debido a que las pruebas de laboratorio no pueden medir la persistencia de acción de un agente antimicrobiano, llamada sustentividad. Esta propiedad parece ser crucial para que un agente sea efectivo. De todas formas, es importante lograr optimizar metodologías para evaluar y cuantificar las comunidades microbianas, así como para estudiar el impacto en estos biofilms de las diferentes estrategias antimicrobianas preventivas y terapéuticas, tanto mecánicas como farmacológicas (Claydon 2008, Teles y Teles 2009, Barnett 2006, Gunsolley 2010). Con este objetivo y dirigidos principalmente al control químico de la placa, se han desarrollado modelos de biofilm *in vitro* (Guggenheim y cols. 2001, Shapiro y cols. 2002, Hope y Wilson 2006, Walker y Sedlacek 2007, Sanchez y cols. 2011). Estas investigaciones han demostrado que la eficacia de los agentes antimicrobianos se reduce por las propiedades físicas y biológicas bien establecidas de los biofilms orales maduros. De hecho, cuando los mismos agentes se prueban con las mismas células bacterianas en crecimiento planctónico, han demostrado una mayor actividad antimicrobiana (Filoche y cols. 2010, Fine y cols. 2001, Davies 2003).

Las perspectivas de futuro en la investigación de la sensibilidad/resistencia a los antimicrobianos tienen en cuenta el constante desarrollo de los métodos que utilizan la genómica comparativa, pruebas genéticas, micromatrices, técnicas de amplificación de ácido nucleico (PCR) y de secuenciación del ADN, ya que ofrecen la promesa de un aumento de la sensibilidad, especificidad y velocidad en la detección de genes de resistencia específica conocidos (Perreten y cols. 2005).

#### 4.3.2. Métodos *in vivo*

Una vez que un determinado agente muestra su eficacia en los estudios *in vitro*, se pone a prueba para observar su efectividad en modelos de estudio *in vivo* con el fin de analizar las posibles interacciones del producto con el medio bucal (con la saliva, con otros productos utilizados en la higiene oral).

##### *Estudios de retención oral*

Los niveles de agente antimicrobiano en placa y en saliva pueden medirse como indicadores de la retención oral (Bonesvoll y cols. 1974). Sin embargo, hay que interpretarlo con precaución, ya que la retención es solo un aspecto de la sustentividad y no necesariamente sinónimo de actividad.

La manera de analizar químicamente la retención en las expectoraciones es calculando la diferencia entre la dosis inicial y la dosis que retorna en la expectoración, deduciéndose lo que ha quedado en boca restando de la dosis original. Esta forma de calcular la retención de un agente no aporta datos sobre la diferencia entre la absorción y la adsorción del producto ni determina cuánto se ha tragado. Para intentar mejorar este cálculo de retención de un agente se diseñaron, por ejemplo, estudios con clorhexidina radiomarcada.

Dichos estudios de retención oral con clorhexidina radiomarcada (Bonesvoll y cols. 1974) indican una retención oral inicial del 30% del antiséptico con una dosis de 20 mg. Los niveles salivales de clorhexidina demostraron persistir durante varias horas, considerándose que representaba una liberación lenta del antiséptico. Sin embargo, la idea de que una liberación lenta de los agentes

antimicrobianos proporciona un ambiente bacteriostático en saliva (Gjermeo y cols. 1974) parece no del todo lógica ya que parte del agente se perdería tragando.

En la mayoría de las series publicadas, la determinación de la actividad antimicrobiana de clorhexidina en la saliva se llevó a cabo mediante técnicas microbiológicas de cultivo en placa (Moran y cols. 1992, Jenkins y cols. 1994c, Elworthy y cols. 1996, Balbuena y cols. 1998, Tomas y cols. 2008).

Sin embargo, algunos autores han cuestionado la fiabilidad de estos métodos y, como alternativa, han propuesto el uso de métodos basados en fluorescencia, es decir, que utilizan fluorocromos específicos para marcar bacterias vivas y muertas (Weiger y cols. 1998).

Los primeros estudios que evaluaban la clorhexidina como un agente antimicrobiano establecieron la importancia de la persistencia de acción de dichos agentes en la boca para interferir con la formación de placa (Roberts y Addy 1981, Schiott y cols. 1970). La clorhexidina ha demostrado, no solamente retención, sino lo que es más importante, persistencia de acción en boca medida durante horas (Schiott y cols. 1970). Esta persistencia de acción se deriva, al menos para antisépticos catiónicos, de la adsorción a superficies orales sin pérdida de acción antimicrobiana.

Después de un enjuague con clorhexidina, la saliva ejerce una acción antimicrobiana durante solo una a dos horas (Addy y Wright 1978), aunque la supresión de bacterias salivales persiste hasta 14 horas (Schiott y cols. 1970). Esto indica que la supresión de la multiplicación de bacterias sobre las superficies orales persiste, ya que la saliva no tiene su propia flora natural, sino que deriva de las superficies mucosas que forman parte de la boca.

#### *Test antimicrobianos in vivo*

El método incluye voluntarios que reciben un único enjuague por la mañana, con recuentos bacterianos salivales tomados inmediatamente antes del

enjuague y en determinados períodos de tiempo a lo largo del día tras el enjuague. Mediante este método, se pueden evaluar múltiples agentes, generalmente en un diseño cruzado (Elworthy y cols. 1996, Addy y Moran 1997b). Para evaluar agentes antimicrobianos, la medida de la magnitud y duración en la disminución de bacterias salivales que se produce mediante una única exposición al producto es un elemento útil de predicción de sustentividad (Schiott y cols. 1970). A esto se puede añadir que los datos son útiles para predecir la inhibición de placa: los agentes que muestran la mayor y más duradera supresión de bacterias salivales son generalmente los más efectivos (Roberts y Addy 1981).

Durante las últimas décadas, el recuento de bacterias salivales ha sido un método aceptado por la comunidad científica para investigar el efecto antibacteriano *in vivo* de la clorhexidina (Addy y Moran 1997b, Pitten y Kramer 1999, Sekino y cols. 2003, Cousido y cols. 2010).

#### *Estudios de placa experimental*

Los estudios de crecimiento de placa a corto plazo se utilizan más comúnmente para seleccionar productos de higiene oral. El diseño del estudio generalmente utiliza la medida de crecimiento de placa bajo la influencia de un agente test como único método de control de placa, desde un punto de partida de placa cero. El método fue originalmente utilizado para colutorios (Löe y Schiott 1970), pero también se puede usar con dentífricos transformándolos en una textura denominada “slurry” o “compuesto acuoso”. Los períodos de estudio tienen un rango de 16 horas a varios días (Addy y cols. 1983, Harrap 1974). Son diseños generalmente cruzados, por tanto permiten poner a prueba múltiples productos. Es necesario que se den consideraciones sobre la duración del período de aclaramiento debido al potencial remanente de algunos agentes como la clorhexidina (Newcombe y cols. 1995), aunque equilibrar en la aleatorización el orden de uso puede ayudar a evitar los efectos acumulados de usos previos de otros productos (Newcombe 1992). En vista del corto período de tiempo de estos estudios, es posible generalmente monitorizar la dosis para asegurar un cumplimiento perfecto.

### *Estudios de gingivitis experimental*

Los estudios de gingivitis experimental (Løe y Schiott 1970) se derivan de una modificación del protocolo de Løe y cols. (Løe y cols. 1965) utilizado para demostrar la relación causal entre placa y gingivitis. El método se usó primero para demostrar las propiedades reductoras de placa de la clorhexidina (Løe y Schiott 1970). En dicha modificación, los períodos de estudio generalmente se extienden de 12 a 28 días, y se registra el desarrollo de placa y también de gingivitis desde cero o cerca de cero al inicio respectivamente, bajo la influencia de un agente a prueba (Wennstrom 1988). Los estudios pueden ser paralelos o cruzados en cuanto a su diseño. Se requieren largos períodos de aclaramiento para evitar la gingivitis remanente. En este tipo de estudios no es posible una supervisión total debido a los fines de semana.

### *Estudios de uso en casa. Principios de su diseño*

Muchos, si no todos los productos de higiene oral, se usan de manera conjunta con el cepillado. Los estudios de uso en casa pueden variar en cuanto a duración desde unos pocos días (Clerehugh y cols. 1989), semanas (Moran y Addy 1991) o varios meses (Johansen y cols. 1975). Los estudios a más largo plazo se diseñan en paralelo invariablemente y tanto la duración del estudio como los parámetros medidos generalmente dependen de la fase de evaluación del producto y del número de formulaciones a prueba.

Sin embargo, en el presente, para cualquier producto, las pautas que se imponen finalmente son que la eficacia contra placa y gingivitis y, más particularmente, la seguridad en el uso deberían derivar de estudios de uso en casa a seis meses. Estos estudios a largo plazo, en concreto de nuevos agentes o compuestos, generalmente determinan los efectos secundarios locales y cualquier cambio en la ecología microbiana oral. Todos ellos obligan a aumentar los costes en personal, materiales y complejidad del estudio. Dicha complejidad lleva consigo la existencia de una serie de variables que influyen en el resultado de los estudios de uso en casa (Addy y Moran 1997b) y que se explican a continuación.

a. Diseño del estudio

Todos los estudios que evalúan la eficacia de un agente, formulación o producto deberían conformarse según principios científicos. Es importante que antes de comenzar la investigación, el estudio tenga un diseño apropiado, para lo cual la pregunta a la que debe contestar el estudio debería anticiparse y de esta forma ayudar a determinar el diseño (Chilton y Fleiss 1986). Concretamente, en los ensayos que analizan productos químicos de higiene oral, debería considerarse de antemano cómo va a ser utilizado el agente: estrictamente controlado, su uso ordinario, si va a ser aplicado por el profesional o por el sujeto.

La estratificación tiende a incrementar la eficiencia del estudio y proporciona más información sobre la eficacia del agente. Los sujetos deberían estratificarse por edad, sexo y niveles basales de placa y gingivitis. Los examinadores deberían calibrarse para reducir el error intra-examinador. La duración de estos estudios debería ser al menos de 6 meses para dar información relevante en cuanto a efectividad y seguridad (Chilton y Fleiss 1986), aunque son también posibles estudios de más corta duración, que pueden aportar información interesante.

El ensayo clínico ciego, aleatorizado y controlado es la base desde la que evaluar todas las formulaciones, incluyendo los productos de higiene oral (Chilton y Fleiss 1986). Los datos epidemiológicos pueden proporcionar asociaciones útiles de variables, por ejemplo, entre placa y severidad de la gingivitis, llevando a los estudios clínicos a probar la eficacia clínica de una variable particular (Löe y cols. 1965).

Los estudios pueden ser paralelos, por grupos de individuos asignados a una formulación particular. La asignación de los sujetos al producto es generalmente aleatorizada. Se intenta hacer que los grupos estén equilibrados para hacer cada grupo lo más similar posible a los otros. Dicho equilibrio puede establecerse, tal y como se ha señalado, con variables como la edad, el sexo, la higiene oral y el ser o no fumador, entre otras.

Un diseño alternativo es el estudio cruzado, en el cual todos los sujetos utilizan todos los agentes que se ponen a prueba durante períodos separados, generalmente de igual duración. El orden del uso del producto es aleatorizado, siendo el sujeto su propio control. Los estudios cruzados, comparado con los estudios paralelos, tienen considerablemente mayor poder de detectar la significación estadística de las diferencias. Sin embargo, existen limitaciones logísticas para su uso, particularmente cuando los períodos de estudio son largos o se esperan resultados terapéuticos duraderos. Los efectos remanentes de un tratamiento hasta el siguiente es un problema potencial de los diseños cruzados (Wade y Addy 1992) y los períodos de aclaramiento necesitan ser suficientemente largos para solventarlo.

En todo caso, para validar el uso de un determinado colutorio de uso domiciliario sería conveniente realizar ensayos clínicos que sigan criterios aceptados de manera generalizada, como los propuestos por la Asociación Dental Americana, (Council on Dental Therapeutics 1986), es decir:

- La población de estudio debe representar a los usuarios típicos del producto.
- El producto de estudio debe ser usado en un régimen normal y comparado con un control, placebo –control negativo- u otro producto activo si es posible –control positivo-.
- Debe ser un estudio paralelo o cruzado.
- Los estudios deben tener como mínimo, seis meses de duración.
- Se requieren, por lo menos, dos estudios realizados por investigadores independientes, que encuentren beneficios significativos en el control de la placa y/o la gingivitis, para avalar el uso del producto.
- Deben tomarse muestras microbiológicas para estudiar la placa no solo cuantitativamente, sino también cualitativamente.
- Deben tomarse índices de placa y gingivitis y muestras microbiológicas al inicio, a los seis meses y en un periodo intermedio.
- El perfil microbiológico debería demostrar que los microorganismos patógenos u oportunistas no muestran sobrecrecimientos ni resistencias

durante el estudio, es decir, hay seguridad desde el punto de vista microbiológico.

- El perfil toxicológico de los productos debería incluir la valoración carcinogénica y mutagénica.
- Deben comprobarse los posibles efectos secundarios que pudieran surgir.

#### b. Cumplimiento

Todos los métodos clínicos sufren problemas potenciales de cumplimiento, y esto solo se puede intentar solventar en este tipo de estudios de uso en casa si se supervisa la dosis, sin embargo no evita el fracaso en cuanto a dicho cumplimiento.

En lo que respecta al paciente, el fraude en la investigación médica tiene características especiales, ya que el fallo de la observancia de la prescripción aunque, desde luego no constituye un delito, puede influir decisivamente en los resultados de un ensayo clínico.

El problema de la falta de observancia de la prescripción induce a exponer un aspecto de las normas de buena práctica clínica que da lugar a un elevado porcentaje de irregularidades en caso de auditorías o de inspecciones por parte de las autoridades sanitarias: la supervisión de la distribución de las muestras de un producto en desarrollo clínico. En primer lugar, el investigador está obligado a registrar, con toda exactitud, la prescripción que efectúa a cada paciente incluido en un ensayo clínico y, además, debe efectuar un recuento de las unidades que éste debe devolverle una vez terminado el período de tratamiento. La finalidad de este registro estriba, lógicamente, en comprobar el grado de cumplimiento de la prescripción. Aunque en realidad parece que este método exagera ampliamente el grado de cumplimiento (Pullar y cols. 1989), sigue siendo exigido porque se trata del procedimiento más simple de los disponibles para dicha finalidad, en todo caso mucho más simple que añadir marcadores biológicos a las muestras, efectuar determinaciones de niveles plasmáticos o utilizar dispensadores que registran electrónicamente cada abertura de frasco u otro contenedor que el paciente efectúe. Por otra parte, el investigador debe devolver al promotor todas las

muestras que no han sido utilizadas; esta medida tiene por objeto asegurar que los productos en fase de desarrollo clínico sean administrados exclusivamente a pacientes incluidos en ensayos clínicos.

c. Tamaño muestral

En el diseño de un ensayo clínico, los tamaños de la muestra deberían ser lo suficientemente grandes como para detectar diferencias estadísticamente significativas si es que existieran. Un gran número de sujetos, es decir, un gran tamaño muestral, permite generalmente aproximarse a una distribución normal, dando como resultado el uso de análisis estadísticos paramétricos.

Se plantea también la confusa cuestión de significación clínica versus significación estadística. Idealmente, los grupos deberían ser lo suficientemente numerosos como para demostrar que las diferencias son tanto estadísticamente como clínicamente significativas. La significación clínica puede evaluarse como sigue:

- Eficacia de referencia: lograr un efecto similar al de otros productos establecidos.
- Eficacia positiva: lograr un efecto similar o mayor que el de la formulación más eficaz hasta la fecha.
- Eficacia de enfermedad: lograr un efecto sobre un factor causal que reduzca una enfermedad o condición.
- Eficacia proporcional: lograr una reducción proporcional previamente convenida en un parámetro comparado con el control.

d. Unidad de análisis

En el análisis de los efectos de los productos de higiene oral el paciente es la unidad de análisis, ya que los dientes individuales situados en la misma boca no pueden considerarse como una respuesta independiente a un producto de higiene oral. El análisis de la localización incrementa en gran medida la posibilidad de encontrar falsos positivos o errores alfa, ya que los tamaños muestrales están efectivamente incrementados por el número de localizaciones. Además, los

estudios son comparaciones entre formulaciones y/o un control. Las comparaciones intergrupos son los únicos análisis significativos. Los análisis intragrupo que estudian los cambios desde los datos basales dentro de un grupo de tratamiento, pueden ser de interés en evaluar el patrón de un cambio, pero no debe usarse para describir diferencias aparentes entre formulaciones.

#### e. Controles

Respecto al uso de controles, éstos aseguran que los efectos de la formulación son necesariamente debidos a la formulación a prueba. Una serie de factores podrían también explicar las mejoras (Addy 1995):

- Una mejoría espontánea en un estado de salud.
- Pérdida del ciego del examinador que predisponga a una preferencia intencional o no intencional.
- Respuesta al placebo: una mejoría percibida por el paciente.
- El efecto Hawthorne: acciones de mejora del paciente durante el período de observación del estudio.
- El efecto de otro ingrediente en la formulación igual o mejor que el supuesto ingrediente activo.

Una serie de factores pueden influenciar la elección de controles para ensayos clínicos sobre productos de higiene oral. Es importante si está siendo evaluado un agente o la totalidad de un producto programado para uso público. Estas categorías de investigación son importantes ya que la evidencia sostiene que un agente no tiene necesariamente que contar con el grado de eficacia de un producto que contenga ese agente. Por ejemplo, el triclosán solo tiene una acción inhibitoria de la placa limitada, pero, junto a otros ingredientes contenidos en productos comerciales, incrementa su actividad.

Dependiendo de los factores indicados, los siguientes controles pueden utilizarse en ensayos clínicos solos o en combinación (Addy 1995):

- Control placebo: aquel sin actividad alguna esperada contra la condición bajo investigación.
- Control ingrediente activo negativo: aquel que es idéntico al producto en prueba o formulación sin el ingrediente o ingredientes activos.
- Control de referencia: un producto ya en uso por el público o un agente ya evaluado.
- Control positivo: una formulación efectiva aceptada o la formulación más efectiva disponible hasta la fecha.

Idealmente, todos los controles deberían tener características similares a la formulación a prueba, incluyendo color, gusto y consistencia. Esto posibilita el doble ciego -sujeto y examinador- durante el estudio pero, por una serie de razones, no siempre es posible.

El placebo puede proporcionar información sobre el efecto químico máximo de formulaciones en estudios sin cepillado o, por el contrario, en estudios con cepillado puede ser valioso para evaluar la magnitud del efecto Hawthorne.

Entre los agentes de control de placa, la clorhexidina tiende a considerarse como control positivo o control de referencia, con el que poder comparar otros químicos (Addy 1986). Sin embargo, solo se acepta este hecho respecto a la clorhexidina en enjuague y, por tanto, solo es válida como control positivo en estudios de colutorios. Se usa a menudo en estudios clínicos de barrido que utilizan un control positivo y un control placebo. Esto tiene dos ventajas (Harper y cols. 1995). En primer lugar, la actividad de la formulación a prueba puede posicionarse entre los dos extremos de eficacia y en segundo lugar, en estudios ciegos aleatorizados, los datos de los controles proporcionan información sobre si el estudio está siendo realizado de manera adecuada, comparando con los resultados de estudios previos que hayan usado controles similares.

f. Protección del paciente

El paciente o sujeto debe estar protegido como lo define la Declaración de Helsinki, que es una propuesta de principios éticos promulgada por la Asociación Médica Mundial cuya finalidad es orientar a los médicos y a otras personas que realizan investigación médica en seres humanos. Los protocolos deben revisarse y acordarse con un comité ético independiente o una junta de análisis institucional y compilarse de acuerdo con las regulaciones locales (ISCIII 2013).

Por último, respecto a los estudios de uso en casa, señalar que el número de posibles agentes que pueden ser útiles como productos de higiene oral es considerable y por tanto, el número de posibles formulaciones resulta enorme. Por este motivo, embarcarse en primera instancia en estudios de uso en casa a largo plazo para todas las formulaciones posibles sería imposible.

La investigación clínica, por tanto, tiende a ser un proceso paso a paso que culmina en la evaluación final de una formulación o producto simple dentro de protocolos de estudio conformados con las pautas para evaluar productos de higiene oral. Los estudios *in vivo* pueden, además, utilizarse para demostrar que el agente conocido es un ingrediente activo tanto en una formulación nueva como en una formulación establecida que contenga el mismo ingrediente. Así mismo, no se puede obviar la necesidad de llevar a cabo estudios de uso en casa a largo plazo con una nueva formulación para probar también su seguridad.

5. Resultados de la evaluación de productos de higiene oral

Como se ha detallado anteriormente, la asociación entre placa dental y gingivitis ha sido bien establecida y por tanto, la importancia del control de placa eficaz se ha enfatizado en el transcurso de los años (Slots y cols. 1978, Stamm 1986, Tanner y cols. 1996, Theilade y cols. 1966). Hasta la fecha, la eliminación mecánica de la placa sigue siendo el medio primario y más ampliamente aceptado de mantener una buena higiene oral (Axelsson y Lindhe 1978, Bakdash 1995, Lang y cols. 1973, Loe 1979). Como coadyuvantes a los métodos mecánicos, los

productos de higiene oral contienen agentes quimioterapéuticos con una variedad de mecanismos antimicrobianos beneficiosos y deseables (Axelsson y Lindhe 1987, DePaola y cols. 1989, Lobene y cols. 1979).

En el mercado global, los productos de higiene oral con objetivos terapéuticos se han vendido con y sin pautas apropiadas o control para su seguridad y eficacia.

### 5.1. Prueba de eficacia

La Federación Dental Internacional estableció en 1999 (FDI Commission. 1999) unas pautas para evaluar la eficacia de las pastas dentales. Proporcionaba métodos para evaluar la eficacia de una pasta dentífrica en relación a la demanda de prevención y control de caries dental, tratamiento de la hipersensibilidad y otras condiciones orales que afectan a las estructuras de soporte de los dientes para el mantenimiento de la salud oral (Wu y Savitt 2002).

Las pautas para la evaluación de los productos quimioterapéuticos sin receta para el control de la placa y gingivitis ya se habían establecido, como se ha visto previamente según la ADA (Council on Dental Therapeutics 1986).

Sin embargo, aparte de dichas pautas o recomendaciones, la FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos) no ha publicado reglas para la evaluación y regulación de dichos productos. Según este organismo oficial estadounidense, el concepto actual de droga es “cualquier artículo propuesto para el uso en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad” o cualquier artículo “propuesto para afectar a la estructura o alguna función del cuerpo”.

En 1999, la FDA publicó un monográfico final sobre los productos y drogas anticaries que se dispensan sin receta médica (FDI Commission. 1999). Dicho organismo llegó a percatarse de la fuerte promoción de productos que se adquieren sin receta con un atributo antiplaca, concepto éste que como se explicó

anteriormente engloba efecto antigingivitis en la nomenclatura americana. Es decir, todos estos atributos incluían la reducción o prevención de la placa, tártaro, cálculo, película, depósitos pegajosos, bacterias en crecimiento, gingivitis, encías enfermas, inflamadas o hinchadas, piorrea, etc. Se presentaron a la FDA para ser revisados datos de más de 45 productos de higiene oral comercializados que contenían 31 ingredientes activos manufacturados por 22 compañías. Los miembros del subcomité también revisaron la literatura actualizada y los datos pertinentes sobre los ingredientes individuales a prueba.

Tal y como se señaló con anterioridad, la evidencia de la eficacia de un producto requiere, según la ADA (Council on Dental Therapeutics 1986) un mínimo de dos estudios dirigidos por investigadores independientes o grupos de investigación. Estos estudios deben seguir las pautas que ya se indicaron anteriormente, en el apartado en el que se especificaban los principios de diseño de estudios de uso en casa. En resumen, la duración debería ser, al menos de 6 meses y se le da preferencia al diseño del estudio aleatorizado doble ciego. Los métodos de análisis estadístico deberían determinarse antes del estudio.

Debido a que la clorhexidina es considerada como medicamento en Estados Unidos y por tanto, dispensada con necesidad de receta, no se encuentra incluida en el monográfico final de la FDA. A pesar de ello, ya que en España es considerada la clorhexidina para uso oral un cosmético y, puesto que además se trata del compuesto que se considera el estándar de referencia en colutorio respecto a su eficacia como reductor de placa en estudios de evaluación de productos de higiene oral (Addy 1986), se incluye a continuación un resumen de las distintas finalidades de uso en las que la clorhexidina ha demostrado su eficacia.

La clorhexidina, como molécula catiónica, se une a la pared de la célula bacteriana cargada negativamente y tiene una acción bacteriostática mediante la alteración del balance osmótico de la pared celular, provocando la liberación de moléculas de bajo peso molecular (potasio y fósforo). También posee una acción bactericida a altas concentraciones, ya que provoca la muerte celular por citolisis, es decir altera la permeabilidad celular bacteriana, de manera que se liberan los

principales componentes celulares causando la precipitación de las proteínas plasmáticas (Puig y cols. 2008). La adhesión de clorhexidina a la superficie dentaria es facilitada por un cepillado previo para dispersar el biofilm dental. Esto facilita la acción antibacteriana del agente a la vez que reduce sus efectos locales adversos sobre la superficie dentaria (Zanatta y cols. 2010).

Se encuentran disponibles diferentes concentraciones en el mercado (desde 0.02% a 0.3%). Al contrario que con otras preparaciones, los colutorios permiten actuar en la cavidad oral entera. El tipo de acción es dosis dependiente: 0.02%-0.06% bacteriostático y 0.1%-0.2% bactericida (Puig y cols. 2008).

El uso continuado de un colutorio que contenga clorhexidina no ha sido asociado a resistencias bacterianas o a la proliferación excesiva de organismos oportunistas (Eick y cols. 2011).

Se ha demostrado que el uso de colutorios de clorhexidina a concentraciones de 0.12% o 0.2% implica una mejora significativa en los índices de placa (Koljalg y cols. 2002, Gunsolley 2006), en los índices de inflamación gingival (Chaves y cols. 1994, Stookey y cols. 2005) y en los índices de sangrado gingival (Gunsolley 2006, Chaves y cols. 1994). Todos estos índices son considerados indicadores indirectos de progresión de la enfermedad periodontal.

Dentro de los antimicrobianos, la clorhexidina y los aceites esenciales parecen tener una validez equivalente para reducir los depósitos de placa, la gingivitis y el sangrado gingival (Chaves y cols. 1994, Lang y cols. 1998, Charles y cols. 2004).

La actividad *in vitro* de la clorhexidina contra *Candida albicans* y otras especies de *Candida* hace posible recomendar su uso para la prevención de candidiasis en las formas leves y moderadas de la enfermedad, especialmente en la estomatitis subplaca. Su uso también es recomendado para limpiar las prótesis sumergiéndolas en la solución unos minutos (Giuliana y cols. 1999).

De forma similar, otros sujetos con elevado riesgo de desarrollar enfermedades estomatológicas o dentales, como los pacientes irradiados de cabeza y cuello o bajo quimioterapia también pueden beneficiarse del uso de productos con clorhexidina, ya que la inhibición de la formación de placa puede reducir moderadamente el riesgo de mucositis y sobreinfecciones (Nashwan 2011).

Varios estudios han puesto su objetivo en determinar la eficacia de la clorhexidina en reducir la presentación de una alveolitis tras la extracción del tercer molar. Su uso en gel al 0.2% cada 12 horas 7 días es considerada actualmente la mejor solución para la prevención de esta complicación común en las extracciones dentales (Caso y cols. 2005).

Continuando en el área de implicación oral, la clorhexidina puede desempeñar un importante papel en el tratamiento de la halitosis, especialmente en reducir los niveles de colonización de bacterias relacionadas con esta afección en el dorso de la lengua. Colutorios que contienen 0.05% de clorhexidina, 0.05% de cetilpiridinio y 0.14% de lactato de zinc parecen reducir significativamente los registros organolépticos, así como los niveles de compuestos sulfurosos volátiles en pacientes con halitosis (Fedorowicz y cols. 2008).

Por último, también en el terreno de la endodoncia, diferentes concentraciones de clorhexidina en solución se han sugerido para la irrigación de los canales radiculares durante los tratamientos de conductos, específicamente la solución de clorhexidina al 0.12% muestra un efecto antibacteriano similar al hipoclorito sódico (de Assis y cols. 2011). Estas irrigaciones no parecen interferir con el sellado apical, incluso a largo plazo (Ferguson y cols. 2003). Por todo ello la irrigación con clorhexidina se puede recomendar como irrigación final antes de la obturación del canal radicular (Haapasalo 2011).

En áreas extraorales, en estudios que evalúan la antisepsia preoperatoria de operador y paciente, se ha demostrado que reduce la carga bacteriana de la piel, disminuyendo así el riesgo de infección del sitio quirúrgico (Tanner y cols. 2008). Además, también la utilidad de la clorhexidina es particularmente significativa en

el caso de la prevención de la recolonización bacteriana en el sitio quirúrgico durante el período postoperatorio, cuando el área es difícil de limpiar siguiendo los procedimientos normales de higiene (Cortellini y cols. 2008).

Así mismo, las enfermedades periodontales y la mala higiene oral han sido asociadas con la neumonía nosocomial. La neumonía asociada a la ventilación en pacientes intubados endotraqueales es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (Scannapieco y cols. 2003). A partir de la literatura disponible y analizada a través de un meta-análisis se concluye que, en general, la descontaminación con clorhexidina puede reducir la incidencia de la neumonía asociada a ventilación mecánica en un 30% (Chlebicki y Safdar 2007).

## 5.2. Prueba de seguridad

La FDA requiere que la prueba de seguridad sea llevada a cabo antes de emprender cualquier ensayo clínico. Después, los ingredientes activos, incluidos en un monográfico de drogas sin receta médica, deben estar caracterizados adecuadamente y descritos en un compendio oficial, como la Farmacopea de los Estados Unidos o el Formulario Nacional (*Nacional Formulary*). La descripción de dichos ingredientes activos debe proporcionar, entre otras, características físicas y químicas o de estabilidad.

Pueden excluirse de la prueba aquellos ingredientes que se han utilizado previamente en productos dentales aprobados. También puede excluirse un ingrediente que ya está incluido en un monográfico de drogas sin receta médica y que actualmente se vaya a usar en una concentración similar para un propósito y período de tiempo similar.

La ADA (ADA 2007) determina criterios de seguridad basándose en los siguientes aspectos:

- Riesgos de reacciones adversas y efectos secundarios significativos cuando el ingrediente se usa de acuerdo con las instrucciones.
- Potencial de producir efectos secundarios inesperados, como irritación, ulceración, erosión y decoloración de estructuras orales.

- Margen de seguridad y potencial para un uso incorrecto.
- Valoración del ratio riesgo-beneficio.

La prueba toxicológica debería incluir subpoblaciones animales que reflejen poblaciones humanas y requiere que hubiese disponibles estudios *in vivo* adecuados de toxicidad aguda y crónica en varias especies animales. Estos estudios pueden incluir: introducción de una dosis por sonda gástrica, introducción de dosis de repetición, estudios de irritación oral, estudios de farmacocinética y biodistribución, así como estudios de sensibilización dérmica entre otros.

Para ingredientes que vayan a ser utilizados diariamente y a largo plazo, deberían considerarse:

- Estudios del potencial toxicológico reproductivo y carcinogénico.
- Estudios clínicos y microbiológicos, ya que el uso a largo plazo de un colutorio y/o pasta dentífrica puede alterar el equilibrio de la microflora en la cavidad oral.

Estos últimos incluyen cambios monitorizados en poblaciones microbianas representativas para asegurar que no tienen lugar sobrecrecimientos de patógenos con potencial de resistencia intrínseca en condiciones que, se espera, sean de uso sin receta. Se deberían monitorizar especies microbianas orales representativas y su proporción relativa de microflora oral cultivable en placa subgingival y saliva, por encima de un período de 6 meses de uso continuo del producto. Los patógenos evaluados pueden incluir, pero no limitarse, a especies de *Candida* y otras levaduras, *Staphylococcus aureus* y otras especies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico y bacilos entéricos gram-negativos. Se deberían realizar evaluaciones microbiológicas de cambios en la flora asociados con enfermedad gingival, previas al comienzo del uso, en un intervalo de tiempo inmediato y a la conclusión del estudio. Además, deberían evaluarse las concentraciones inhibitorias mínimas *in vitro* de una variedad de microorganismos orales para determinar si se ha desarrollado un incremento en la resistencia debido al uso prolongado del producto.

Como conclusión del informe de la ADA (Council on Dental Therapeutics 1986), se admite que solo unos pocos de los ingredientes activos en el mercado satisfacen los criterios ya indicados y se recomiendan como seguros y eficaces para el control de la placa y la gingivitis. Estos incluyen: cloruro de cetilpiridino (colutorio), una combinación de aceites esenciales (colutorio Listerine®), y fluoruro estañoso (dentífrico, para gingivitis solo). Debido a que el triclosán no se eligió para su inclusión en el monográfico de drogas dispensadas sin receta médica, este ingrediente se aprobó como agente antiplaca y antigingivitis mediante una nueva aplicación de la droga.

Como se ha señalado anteriormente, la clorhexidina se considera un antimicrobiano de prescripción médica en Estados Unidos (FDA 2011) y la bencidamina es un medicamento tanto allí como en España y por tanto, quedan fuera del informe de la ADA para drogas sin receta (ADA 2007).

Sin embargo, de la misma manera y por el mismo motivo –considerarse el estándar de referencia-, que en el apartado anterior sobre eficacia, a continuación también se detallan aspectos evaluados sobre la seguridad de la clorhexidina.

Distintos ensayos clínicos han descrito la presentación de efectos secundarios asociados al uso de la clorhexidina, sin embargo, todos ellos son completamente reversibles una vez que se suspende el tratamiento (Addy y cols. 2005).

El efecto secundario más común es un incremento de la pigmentación de los dientes, materiales de restauración, bases protésicas acrílicas y dorso lingual. La pigmentación de la superficie dentaria parece ser más evidente en la presencia de placa que no se había eliminado previamente y cuando se asocia con la presencia de compuestos cromógenos particulares de la dieta, como iones metálicos y polifenoles, primariamente encontrados en el café y té (Watts y Addy 2001). Se han propuesto productos con bajas concentraciones de clorhexidina (0.05-0.06%) debido a cierta capacidad de efecto antiplaca mientras reduce la probabilidad de pigmentación (Hoffmann y cols. 2001). Hasta la fecha, la eficacia de soluciones

antisépticas que contienen 0.2% de clorhexidina con metabisulfitos o ácido ascórbico como medio para evitar la alteración del color dentario, se ha investigado en pocos estudios y, por tanto, estos medios no han sido completamente clarificados (Cortellini y cols. 2008, Bernardi y cols. 2004, Solis y cols. 2011).

Aunque no está clara si la formación de cálculo subgingival se ve afectada por la presencia de clorhexidina, sí parece estar involucrada en el incremento de la formación de cálculo supragingival, lo cual es debido a la capacidad de la clorhexidina de formar precipitados tanto con las proteínas salivales como con las sales inorgánicas sobre la superficie de los dientes (Zanatta y cols. 2010, Hase y cols. 1998). Sin embargo, estos depósitos de cálculo pueden ser eliminados mediante higiene oral profesional.

De manera circunstancial, se ha descrito disgeusia temporalmente (Helms y cols. 1995). De igual forma, las sensaciones de ardor y sequedad en mucosa oral también han tenido lugar de modo temporal (Stookey y cols. 2005, Hase y cols. 1998). Ocasionalmente, se han descrito lesiones descamativas y eritematosas (Ellepola y Samaranayake 2001).

En los informes postventa, las condiciones más comúnmente señaladas son estomatitis, gingivitis, glositis, úlceras y edema de lengua (FDA 2011).

Respecto a los efectos adversos sistémicos, estudios animales preclínicos sobre ratas y otros mamíferos descartaron la presencia de efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos. Así mismo, estos estudios determinaron la dosis letal máxima (NLM 2015).

Algunos autores han informado de reacciones de hipersensibilidad tras aplicación tópica sobre mucosa. Incluyen algunos casos de shock anafiláctico, incluso a muy baja dosis (Krautheim y cols. 2004). Sin embargo, no existen datos disponibles de la frecuencia de presentación de estos episodios.

La mayoría de los casos publicados de hipersensibilidad a clorhexidina en la literatura se refieren a aplicaciones cutáneas o a través de catéteres de vías endovenosas, siendo los episodios de dermatitis de contacto los más frecuentes, sobre todo en pacientes con episodios previos de hipersensibilidad a la clorhexidina (Ebo y cols. 1998). Por este motivo, ciertos autores recomiendan realizar pruebas preoperatorias de sensibilidad a clorhexidina (Nakonechna y cols. 2014).

En lo que respecta al uso de colutorios con clorhexidina, la revisión de la literatura aporta un caso de eritema fijo (Moghadam y cols. 1991) y otro de urticaria (Sharma y Chopra 2009).

No se han reportado casos de toxicidad sistémica causada por aplicaciones tópicas o ingestión accidental en adultos. Sin embargo, sí existen casos de ingestión accidental en niños, los cuales han resultado en signos y síntomas de intoxicación aguda tales como gastralgia o vómitos (Kurtoglu y cols. 2000). Los datos de seguridad para la mayoría de los productos que contienen clorhexidina no se han establecido para los menores de 18 años, por tanto su uso en este grupo de población no está aprobado por la FDA (Milestone y cols. 2008).

La clorhexidina es pobremente absorbida a través de la piel intacta del adulto. Sin embargo, se ha publicado que cierta absorción percutánea se produce a nivel de trazas, en particular en recién nacidos prematuros (Mullany y cols. 2006).

La clorhexidina es una sustancia de clase B en lo que respecta a su potencial efecto teratogénico durante el embarazo, lo que significa que los estudios en animales no han demostrado daño alguno para el feto, aunque no se han llevado a cabo adecuados ensayos clínicos en humanos. En cuanto a la lactancia, no hay datos disponibles sobre si la clorhexidina se excreta a través de la leche materna (FDA 2011).

## 6. Pautas de evaluación de productos de higiene oral en España

El primer intento de la era moderna de establecer normas éticas para la experimentación en el ser humano lo constituyó el llamado Código de Nuremberg, elaborado al final de la Segunda Guerra Mundial en respuesta a los crímenes cometidos (en ocasiones bajo la apariencia de investigación clínica) en campos de concentración nazis. Este código, no obstante, hacía más hincapié en los intereses de la sociedad que en los del propio paciente y se refería a los riesgos de carácter vital, pero no a las molestias que puede sufrir un paciente al ser incluido en un ensayo clínico. Por este motivo, en 1964 la Asociación Médica Mundial adoptó la denominada Declaración de Helsinki sobre investigación biomédica en el ser humano, posteriormente modificada en Tokio en 1975 y ratificada en las reuniones de la Asamblea Médica Mundial de Venecia en 1983, de Hong Kong en 1989, de Somerset West (Sudáfrica) en 1996 y de Edimburgo en 2000. Los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki estriban en la necesidad de que el protocolo de un ensayo clínico sea aprobado por un Comité Ético y la necesidad de consentimiento previo, libre e informado del paciente incluido en el mismo.

Ni el Código de Nuremberg ni la Declaración de Helsinki gozan de fuerza legal en Europa. Pero hay que tener en cuenta que el Comité de Ministros del Consejo de Europa aprobó en 1990 una recomendación sobre "Investigación médica en el ser humano", que recoge los elementos básicos de la Declaración de Helsinki.

Por otra parte, las agencias de regulación y las asociaciones de la industria farmacéutica de la Unión Europea, Estados Unidos y Japón han promovido la Conferencia Internacional de Armonización, cuyo objetivo es facilitar el desarrollo y la disponibilidad de nuevos medicamentos. Entre los múltiples temas abordados, se encuentran las normas de buena práctica clínica, que se detallan en el reglamento elaborado por la Unión Europea en 2014 (R (UE) nº 536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de abril de 2014) y que fueron aprobadas

por primera vez por el Comité de Especialidades Farmacéuticas de la Unión Europea en enero de 1996 (Reglamento UE 2014).

En conclusión, la calidad de un ensayo clínico depende de un protocolo correcto, de unos formularios de registro de casos adecuadamente diseñados y de que el investigador clínico esté realmente interesado en la pregunta planteada en el ensayo clínico. Las normas de buena práctica clínica pueden contribuir a que se cumplan estas premisas pero, fundamentalmente, se trata de un instrumento diseñado para demostrar que el ensayo se ha efectuado de acuerdo con las más estrictas exigencias científicas, respetando los derechos de los pacientes incluidos en el mismo y asegurando la validez de los datos y de los resultados obtenidos.

Los límites entre distintas categorías de productos no siempre están claros. Aunque están determinadas las definiciones de lo que es un medicamento, un producto sanitario, un cosmético y un producto de higiene personal, los límites no siempre están claros y hay zonas de frontera entre las diferentes categorías. A veces, estas zonas de frontera son aprovechadas por algunas empresas para hacer alegaciones de salud en productos que no pueden tenerlas. Sin embargo, la Ley de Garantías y Uso Racional del Medicamento soluciona en buena medida el problema de los productos frontera, porque establece que, en caso de duda, el producto en cuestión será considerado medicamento y se le aplicará la legislación que regula la fabricación, distribución y uso de fármacos.

Por tanto, respecto a la distinción entre cosmético y medicamento, aunque los dos se encuentran definidos en la Ley 29/2006 (Ley de Garantías), hay que tener en cuenta varios elementos clave resumidos a grandes rasgos. Uno de ellos es el lugar de aplicación: en los cosméticos es en las partes superficiales del cuerpo, dientes y mucosas bucales, mientras que los medicamentos se extiende a cualquier zona del organismo.

El modo de administración es otra premisa a tener en cuenta: tópico en el caso del primero y cualquiera si es medicamento. El lugar de acción también es importante: superficial si hablamos de cosmético y local o sistémica si nos

referimos al segundo. Y, por último, la acción: si la finalidad es proteger será un cosmético, mientras que si el objetivo es la prevención, será medicamento.

La frontera entre cosméticos y biocidas es la frontera que más discusiones implica. Por ejemplo, si se habla de un gel de ducha o jabón que tiene como finalidad la limpieza o higiene, se trata de un cosmético pero, por el contrario, si el objetivo es la desinfección de las manos por el personal sanitario, entonces es biocida.

Según la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS 2015), la valoración de decidir si es un medicamento o un cosmético corresponde a las autoridades nacionales, que considerarán caso a caso teniendo en cuenta todas las características del producto, en particular su composición, sus propiedades farmacológicas, el conocimiento científico, la forma de uso, su apreciación por los consumidores y su riesgo.

En absoluto es lo mismo un cosmético que un medicamento, aunque un producto puede ser ambos. La diferencia puede llegar a ser importante. Un cosmético mejora la apariencia sin alterar la estructura o funciones del cuerpo; un medicamento sí tiene este efecto, y por tanto tiene principios activos de los que carece un cosmético que no sea también un medicamento.

Las diferencias son muy notables. En el cosmético, los conceptos básicos son limpiar, perfumar, modificar aspecto, corregir olores, proteger y mantener en buen estado. En la definición de medicamento se habla de enfermedades o dolencias, mientras en la definición de cosmético queda muy claro que la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades no entran dentro de sus funciones. Por todo ello, encontramos una clara diferencia entre cosmético y medicamento a nivel de función.

## 6.1. Medicamentos

En nuestro país, todo medicamento, entendido como cualquier sustancia de origen mineral, animal o vegetal con efectos medicinales, se autoriza y registra en el Ministerio de Sanidad y Consumo. La autorización se realiza a través de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), que evalúa la documentación que presenta un laboratorio farmacéutico. Después, autoriza su marca, su prospecto, con indicaciones, contraindicaciones, y se le asigna un número en el registro, que figura en el envase.

Cuando los medicamentos llegan al mercado son razonablemente seguros, no obstante siguen sometidos a un control permanente, la fármaco-vigilancia.

El Sistema Español de Fármaco-vigilancia de medicamentos de uso humano está integrado por los 17 Centros Autonómicos y la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). La AEMPS se coordina con las Agencias de los Estados miembros de la Unión Europea y con la Agencia Europea del Medicamento (EMA).

La seguridad de un medicamento se persigue en todas sus fases, en la investigación, en el desarrollo, en las pruebas con animales y personas y después de la comercialización. Un proceso que se lleva a cabo durante mucho tiempo y cuyo objetivo final es producir un fármaco de calidad, eficaz y seguro. Sin embargo, los estudios obligados y previos a la comercialización de un fármaco tienen algunas limitaciones. El resultado es la llegada al mercado de un producto farmacéutico que debe considerarse “razonablemente” seguro para el uso recomendado.

El desarrollo de un medicamento a partir de una nueva entidad química de síntesis o de un extracto natural, o a partir de un producto biotecnológico, es un proceso complejo que implica la participación conjunta de diferentes disciplinas. De media, se tardan unos 10 años desde el descubrimiento hasta la comercialización y solo uno entre 10.000 compuestos probados llega al mercado.

Dos son las etapas más importantes que debe superar un nuevo compuesto antes de ser autorizado como medicamento:

– Una etapa preclínica de investigación y desarrollo.

Durante las pasadas décadas ha existido un rápido desarrollo de la tecnología, lo cual permite producir una gran cantidad de moléculas y comprobar su actividad biológica en bastante menos tiempo que el tradicionalmente empleado para ese fin. Estas tecnologías comprenden la llamada “química combinatoria” y el “cribado de alto rendimiento”. El desarrollo de estas tecnologías ha supuesto aumentar la síntesis de nuevos compuestos desde aproximadamente 50 moléculas por investigador al año hasta decenas de miles, además de poder probar la actividad biológica de todas ellas muy rápidamente. En esta etapa se comprueba que la sustancia funciona correctamente según para lo que se ha diseñado y que es segura, experimentando *in vitro* (cultivo celular) e *in vivo* con animales. En esta fase se presta especial atención para comprobar que la sustancia no sea tóxica y, en particular, que no sea cancerígena, mutagénica (que puede producir cambios en el material genético) o teratogénica (que puede causar malformaciones fetales). También se comprueba cómo se absorbe y cómo se elimina la sustancia en los organismos vivos (animales). Es importante seleccionar un compuesto de entre las moléculas candidatas con características químicas y biofarmacéuticas (de formulación y administración del fármaco) preferibles para cada caso en concreto.

– Una etapa clínica, una vez superada la anterior, en la que las pruebas se hacen con personas voluntarias. Suele ser la parte más larga (de 2 a 10 años) y se compone de cuatro fases:

- Fase I. Las pruebas se hacen con grupos pequeños de voluntarios sanos (entre 20 y 80 participantes), excepto con sustancias oncológicas o potencialmente tóxicas, que se hacen directamente con enfermos que pueden beneficiarse de los efectos terapéuticos (Mendoza 2008).

En esta fase se valora cómo actúa el organismo sobre el fármaco y también lo que la sustancia produce al organismo. Es decir, se busca conocer el mecanismo de acción, los parámetros farmacocinéticos y la tolerabilidad.

- Fase II. Las pruebas se hacen con un número mayor de pacientes (20 a 300 sujetos) diagnosticados pero sin tratamiento. En este caso lo que se quiere comprobar es la eficacia, la dosis adecuada y ampliar datos de la seguridad, según los efectos secundarios que se presenten cuando se administra, al menos, durante dos semanas. Puede durar de varios meses a varios años (Mendoza 2008). Durante esta fase la formulación comercial debe ser desarrollada para permitir una producción a escala comercial.
  
- Fase III. Se hacen pruebas aleatorias y controladas con un placebo (sustancia sin efecto) o con una sustancia frecuentemente usada para tratar la enfermedad. De esta manera se compara la eficacia del nuevo fármaco con otro ya existente o, si se hace con un placebo, con el hecho de no tratar. Se hace con un amplio número de pacientes (300-3000) y a doble ciego. Permite, por tanto, confirmar estadísticamente la eficacia y seguridad del compuesto. Esta fase puede durar varios años. En España, todos los datos sobre la información (ficha técnica, prospecto, informes de expertos...), la calidad (características de la materia prima...), la seguridad y la eficacia (resultados de los estudios realizados) se envían a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios o a la Agencia Europea de Medicamentos (cuando se trata de ámbito europeo) para obtener la licencia de comercialización. Allí los revisan y en caso necesario solicitan más datos, en un proceso que puede llegar a un año o más. Si no existen problemas y se demuestra que el medicamento cumple los requisitos, se registra para que haga su entrada en el mercado. Una vez que el nuevo medicamento ha pasado todos los controles previos y recibe la autorización para ser comercializado, empieza una nueva etapa de control.
  
- Fase IV. Vigilancia postcomercialización. En estos momentos se pone a prueba la efectividad y seguridad del fármaco cuando se emplea en un gran

número de pacientes durante un largo periodo de tiempo. Para controlar este proceso se pone en marcha la fármaco-vigilancia, que se ocupa de las actividades relacionadas con la detección, valoración, conocimiento y prevención de los efectos adversos o cualquier otro problema relacionado con el fármaco. La fármaco-vigilancia es un concepto amplio que abarca la vigilancia postcomercialización, la gestión de los posibles riesgos, la prevención de los fallos, la comunicación de la información y la promoción de un uso racional y adecuado del fármaco. Los problemas más frecuentes relacionados con el fármaco se refieren al uso inadecuado, sobredosis, dependencia, ineficacia, interacciones con otros fármacos o alimentos y reacciones adversas.

En el sistema de fármaco-vigilancia participan:

- Los laboratorios farmacéuticos, que tienen la responsabilidad de seguir recogiendo datos sobre la seguridad del medicamento, una vez comercializado.
- Las agencias reguladoras, que se encargan de autorizar los medicamentos, siendo también responsables de la seguridad después de la comercialización y de la gestión de la información que reciben, tanto de las compañías farmacéuticas como de los profesionales sanitarios.

La AEMPS es quien tiene en España las competencias en materia de regulación de medicamentos. Por tanto, es quien debe cambiar el uso y las condiciones de autorización de un producto sanitario cuando lo considera necesario.

La mayoría de las agencias reguladoras, incluida la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), la Agencia de Control del Medicamento (MCA) del Reino Unido y la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA) consideran que estas fases de los ensayos clínicos aportan datos suficientes para demostrar que un nuevo producto puede ser certificado como seguro y eficaz.

## 6.2. Cosméticos

Puesto que la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) se coordina con las Agencias de los Estados miembros de la Unión Europea y con la Agencia Europea del Medicamento (EMA), conviene detallar que es el Reglamento publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea en 2009 el que armoniza íntegramente las normas comunitarias a fin de lograr un mercado interior para los productos cosméticos, garantizando al mismo tiempo un elevado nivel de protección de la salud humana. Dicho Reglamento (R (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009) es de obligado cumplimiento desde 2013 y se refiere solo a los productos cosméticos y no a los medicamentos, los productos sanitarios o los biocidas (Reglamento UE 2009).

La delimitación se deriva, fundamentalmente, de la definición detallada de los productos cosméticos, la cual contiene indicaciones tanto de los lugares de aplicación de estos productos como de las finalidades que se persiguen con su empleo, tal y como se señaló anteriormente. Los productos para cuidados bucales o dentales, por tanto, quedan incluidos en lo que se consideran cosméticos.

Procede precisar qué datos deben ponerse a disposición de las autoridades competentes. Estos datos deben incluir todos los elementos necesarios relacionados con la identidad, la calidad, la seguridad para la salud humana y los efectos reivindicados por el producto cosmético. En particular, esta información sobre el producto debe incluir un informe del producto cosmético que acredite que se ha realizado una evaluación de la seguridad.

Procede respaldar el principio general de que el fabricante es responsable de la seguridad de su producto.

Para abordar las preocupaciones de seguridad es necesaria la evaluación de riesgos de determinadas sustancias por el Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (CCSC), creado en 2008. Se crea una estructura consultiva de Comités científicos y expertos en el ámbito de la seguridad de los consumidores, la

salud pública y el medio ambiente. Se trata de un organismo de evaluación de riesgos independiente.

A fin de informar a los consumidores, los productos cosméticos deben incluir los ingredientes de su composición, así como indicaciones precisas y fácilmente comprensibles en cuanto al plazo para su utilización. En el caso de los productos cosméticos importados, cada importador será la persona responsable para el producto cosmético específico que introduzca en el mercado.

### *Evaluación de la seguridad*

Antes de la introducción de un producto cosmético en el mercado, la persona responsable velará por que haya sido sometido a una evaluación de la seguridad sobre la base de la información pertinente, y por que se elabore un informe sobre la seguridad del producto cosmético. La persona responsable se asegurará de que:

- El uso previsto para el producto cosmético y la exposición sistémica anticipada a los ingredientes particulares de la formulación final se tengan en cuenta en la evaluación de la seguridad.
- Se utilice un enfoque apropiado sobre el valor de la evidencia en la evaluación de seguridad para examinar los datos procedentes de todas las fuentes existentes.
- El informe sobre la seguridad del producto cosmético se actualice con la información pertinente que se genere tras la introducción del producto en el mercado.
- La evaluación de la seguridad del producto cosmético será efectuada por una persona que posea un diploma u otro título de cualificaciones oficiales reconocidas tras la finalización de un título universitario de estudios teóricos y prácticos de Farmacia, Toxicología, Medicina o una disciplina similar, o estudios reconocidos como equivalentes por un Estado miembro.

### *Reivindicaciones del producto*

La Comisión establecerá, en cooperación con los Estados miembros, un plan de acción para las reivindicaciones (por parte del fabricante) o atributos utilizadas y fijará prioridades para determinar criterios comunes que justifiquen la utilización de una reivindicación. A más tardar, el 11 de julio de 2016, la Comisión presentará al Parlamento Europeo y al Consejo un informe sobre el uso de las reivindicaciones o atributos que se le otorga a un producto con arreglo a los criterios comunes establecidos por la Comisión. Si en el informe se concluyera que las declaraciones de propiedades utilizadas en los productos cosméticos no se ajustan a los criterios comunes, la Comisión, en cooperación con los Estados miembros, adoptará las medidas apropiadas para velar por su cumplimiento.

### *Control del mercado*

Los Estados miembros revisarán y evaluarán periódicamente (cada cuatro años como mínimo) el funcionamiento de sus actividades de control.



JUSTIFICACIÓN



## JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades periodontales son patologías infecciosas, altamente prevalentes, que afectan a los tejidos que sostienen los dientes y que tienen importantes consecuencias a nivel bucodental (p. ej. pérdida de dientes) y sistémico (p. ej. asociación con diabetes o enfermedades cardiovasculares). El control eficaz de las enfermedades periodontales depende de la identificación y tratamiento de la infección establecida y la consiguiente prevención de recurrencias.

El abordaje mecánico del biofilm bacteriano causante de las enfermedades periodontales ha demostrado ser efectivo tanto en el tratamiento como en la prevención de estas patologías.

Sin embargo, el control de placa mecánico puede no ser suficiente por sí solo para prevenir la aparición o reaparición de enfermedades periodontales en una amplia proporción de la población. De hecho, recientemente, en el 11<sup>o</sup> *Workshop* Europeo en Periodoncia, se sigue corroborando que el uso de formulaciones con agentes específicos para el control químico de la placa proporciona mejoras en la eliminación de las biopelículas supragingivales de una parte considerable de la población, debido a diversos aspectos que limitan la eficacia de la higiene oral mecánica.

En la actualidad, el mercado ofrece una inmensa variedad de productos para el control químico del biofilm dental y, por tanto, se hace imprescindible la validación, a través de estudios científicos, de dichos productos, tanto para comprobar su eficacia y su seguridad, como su ajuste a la legislación vigente, ya sea como cosméticos o productos sanitarios o, eventualmente, como medicamentos.

En la literatura existe una gran cantidad de ensayos clínicos aleatorizados que establecen, si están bien diseñados, una relación de causalidad, pero sin detenerse a estudiar la posibilidad de que un diseño experimental distinto pudiera afectar a la validez interna de los resultados.



HIPÓTESIS



## HIPÓTESIS

### General

La validez de los resultados de los estudios de investigación para evaluar productos de higiene oral es independiente del tipo de diseño del modelo experimental aplicado.

### Específicas

#### Modelo experimental 1.1:

El test de contacto *in vitro* es útil para, analizando los recuentos bacterianos de las distintas cepas, diferenciar los efectos de los distintos productos evaluados.

#### Modelo experimental 1.2:

La evaluación de los recuentos bacterianos salivales *in vivo*, en un ensayo clínico cruzado, aleatorizado, a doble ciego, como modelo de estudio, también permite discriminar entre los efectos de diferentes formulaciones.

Ambos modelos de estudio serían aptos para corroborar que la presencia del mismo agente a la misma concentración dentro de distintos colutorios patentados no garantiza una eficacia antimicrobiana similar, ya que las modificaciones en la formulación podrían afectar a su actividad.

La presencia o no de alcohol en las formulaciones podría ser un factor principal para la actividad de estos productos. De manera que la hipótesis se concreta en que si el alcohol se eliminase de la formulación se realizarían modificaciones mayores para mantener una alta actividad antimicrobiana, como es la introducción de un agente activo adicional.

### Modelo experimental 2:

Mediante un ensayo clínico aleatorizado, a doble ciego, prospectivo, controlado por placebo en grupos paralelos comparados, se podría poner de relieve que con la reducción en la concentración del agente activo debería decrecer la incidencia y severidad de los efectos adversos del uso del producto evaluado. Sin embargo, para evitar una reducción en su eficacia clínica, la composición del enjuague bucal necesitaría ser reformulada, tal y como añadiéndole otro agente antimicrobiano.

### Modelo experimental 3:

El diseño experimental en fase I consistente en un ensayo clínico aleatorizado, a doble ciego, cruzado y controlado, sería útil para comparar la prevención de la formación de nueva placa de distintas formulaciones y sus efectos sobre tejidos gingivales y su microflora, así como su tolerabilidad.

Los cuatro modelos experimentales que se plantean se presentan de menor a mayor evidencia científica, comenzando por el modelo *in vitro* y finalizando con ensayos clínicos aleatorizados.

OBJETIVOS



## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Analizar la validez e idoneidad de cuatro modelos experimentales diferentes para comparar los efectos de distintas formulaciones en el control químico de la placa.

### Objetivos específicos:

Los cuatro modelos experimentales llevados a cabo (puesto que la primera publicación contiene dos), se exponen de manera secuencial con evidencia creciente, comenzando con el modelo *in vitro* y finalizando con ensayos clínicos aleatorizados.

#### Modelo experimental 1.1:

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro*, mediante un test de contacto, de enjuagues comerciales que incluyen 0.12% de clorhexidina en su formulación.

#### Modelo experimental 1.2:

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo*, mediante un modelo de recuentos salivales, de enjuagues comerciales que incluyen 0.12% de clorhexidina en su formulación.

#### Modelo experimental 2:

Evaluar la eficacia clínica y microbiológica a corto plazo de una nueva formulación en enjuague oral, con una baja concentración de clorhexidina (0.05%) y cloruro de cetilpiridinio, utilizado como método adicional de higiene oral en pacientes en cuidado periodontal de soporte.

**Modelo experimental 3:**

Evaluar el efecto de una formulación de colutorio que combina bencidamina más cloruro de cetilpiridinio en la prevención de la formación de nueva placa, en comparación con colutorios de cloruro de cetilpiridinio solo y placebo.

Determinar el efecto de la asociación de bencidamina más cloruro de cetilpiridinio sobre los tejidos gingivales y la microflora periodontal y comparar la tolerabilidad de estas formulaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS. RESULTADOS



Herrera D, Roldan S, SantaCruz I, **Santos S**, Masdevall M, Sanz M.

“Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study”.

*Journal of Clinical Periodontology* 2003; 30 (4): 307-314.

## Resumen

**Objetivo.** Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de cuatro enjuagues comerciales con clorhexidina 0.12%.

**Material y métodos.** El primer experimento consistió en evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* a través de una modificación de la prueba de contacto, para la que se seleccionaron veinte especies bacterianas, con un contacto de un minuto de duración con cada producto a evaluar. Después del contacto, el inóculo se cultivó y los resultados se expresaron en términos de supervivencia/resistencia y el porcentaje de supervivencia en comparación con una solución salina control. La segunda evaluación o experimento fue un ensayo *in vivo* que consistió en un estudio de recuentos bacterianos en saliva a doble ciego, aleatorizado y cruzado en una población de muestra de 10 voluntarios que se enjuagaron durante un minuto con cada producto probado. Las muestras de saliva se obtuvieron antes del enjuague y después, transcurridos cinco minutos, una, tres, cinco y siete horas. Estas muestras se cultivaron tanto en atmósfera aeróbica como anaeróbica. Se calculó el porcentaje de supervivencia bacteriana con respecto a la línea base para cada momento evaluado en el tiempo. Las comparaciones entre los productos fueron realizadas mediante ANOVA y la prueba de la t de Student pareada.

**Resultados.** La prueba de contacto *in vitro* no mostró supervivencia en ninguna de las especies ensayadas con clorhexidina más cloruro de cetilpiridinio, mientras que tres especies (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis* y *Parvimonas micra*) fueron resistentes a los otros tres productos. El producto que contenían clorhexidina sola así como el formulado con clorhexidina más fluoruro sódico demostraron resistencias adicionales (tres y cuatro especies, respectivamente). La prueba de

recuentos bacterianos salivales *in vivo* mostró mayores reducciones para clorhexidina más cloruro de cetilpiridinio y clorhexidina con alcohol en bacterias aerobias y anaerobias, con una duración de cinco horas. Se detectaron diferencias significativas en múltiples momentos, cuando estos dos productos eran comparados tanto con el control como los otros productos probados.

**Conclusiones.** Se detectaron importantes diferencias, tanto *in vitro* como *in vivo* en la actividad antimicrobiana entre productos con clohexidina 0.12%. La formulación con alcohol fue más activa que aquellas sin alcohol, a excepción de la formulada con clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio, en la que la adición de cloruro de cetilpiridinio no solo compensaba sino que aumentaba la actividad antimicrobiana.

# Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study

David Herrera<sup>1,2</sup>, Silvia Roldán<sup>1</sup>, Isabel Santacruz<sup>1</sup>, Sagrario Santos<sup>1</sup>, Mireia Masdevall<sup>3</sup> and Mariano Sanz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Section of Graduate Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Department of Microbiology, Dentaid, SL, Sant Cugat del Vallés, Barcelona, Spain

Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M: Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 307–314. © Blackwell Munksgaard 2003.

## Abstract

**Aim:** To evaluate the in vitro and in vivo antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinses.

**Material and methods:** The in vitro antimicrobial activity test consisted in a modified contact test where 20 selected bacterial species were tested during 1 min with each test product. After the contact, the inoculum was cultured, and the results were expressed in terms of survival/resistance and the percentage of survival as compared to a saline control. The in vivo test consisted of a double-blind, randomized, crossover salivary bacterial counts study. 10 volunteers rinsed during 1 min with each tested product. Saliva samples were obtained before rinsing, and after 5 min, and 1, 3, 5 and 7 h. These samples were cultured both aerobically and anaerobically. Percentages of survival, in regard to baseline, were calculated for each time point. Comparisons among products were tested using ANOVA and selected paired *t*-test.

**Results:** The in vitro contact test showed no survival in any tested species with CHX+CPC, while three species (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis* and *Peptostreptococcus micros*) were resistant to the other three products. CHX and CHX+NaF demonstrated additional resistant species (three and four species, respectively). The in vivo salivary bacterial counts test showed higher reductions of CHX+CPC and CHX+ALC in aerobic and anaerobic bacteria, lasting for 5 h. Significant differences were detected at multiple time points, when these two products were compared both with the control and the other tested products.

**Conclusion:** Important differences in activity, among 0.12% CHX products, were detected by both in vitro and in vivo tests. The formulation with alcohol was more active than those without alcohol, excepting the formulation with CHX+CPC, in which the reformulation and addition of CPC not only compensate but rather increase the antimicrobial activity.

Key words: mouthrinses; chlorhexidine; alcohol; cetylpyridinium chloride; salivary bacteria; contact test

Accepted for publication 4 April 2002

Chlorhexidine (CHX) is, beyond a doubt, the most studied and efficacious antimicrobial agent in the chemical control of dental plaque, being considered as the positive control (gold-

standard), to which all other antiplaque agents should be compared (Jones 1997). It is a cationic bis-biguanide, with a wide antibacterial activity, low toxicity to mammalian cells, and a high

affinity to attach to skin and mucous membranes. Its mechanism of action includes direct damage to the internal cytoplasmic membrane, being bacteriostatic at low dosages and bactericidal

**Santos S**, Herrera D, López E, O'Connor A, González I, Sanz M.

“A randomized clinical trial on the short-term clinical and microbiological effects of the adjunctive use of a 0.05% chlorhexidine mouth rinse for patients in supportive periodontal care”.

*Journal of Clinical Periodontology* 2004; 31 (1): 45-51.

## Resumen

**Objetivo.** Evaluar la actividad clínica y microbiológica de una nueva formulación para enjuague bucal, utilizada como un complemento a la higiene oral, para los pacientes en cuidados periodontales de soporte.

**Material y métodos.** Se realizó un ensayo clínico aleatorizado, controlado con placebo, con dos grupos: grupo de prueba, enjuague dos veces al día con el producto de prueba (con clorhexidina al 0.05% y cloruro de cetilpiridinio al 0.05%) y el grupo control, con un placebo. Se incluyeron 33 pacientes con periodontitis crónica ya tratados, y se establecieron dos visitas, la basal y tras 15 días. Las variables de resultados clínicos que se incluyeron fueron los índices de placa y gingivales, así como la profundidad de la bolsa. Se procesaron muestras subgingivales mediante cultivo. También se evaluaron las variables basadas en los pacientes y los efectos adversos. Los resultados se compararon mediante la prueba t de Student, chi-cuadrado, y la prueba de Mann-Whitney.

**Resultados.** Los índices de placa y gingivales, así como el registro de recuentos bacterianos totales fueron reducidos en el grupo test, pero las diferencias entre grupos fueron sólo estadísticamente significativas para los registros de placa y bacterias. Se observó una reducción significativa en las proporciones de flora y en la frecuencia de detección de *Porphyromonas gingivalis* en el grupo test.

**Conclusiones.** A nivel clínico, los índices de placa mostraron una eficacia estadísticamente significativa a favor de la formulación test, mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos respecto a eficacia en índices gingivales, cambios en niveles de inserción ni efectos adversos.

Existen diferencias estadísticamente significativas favorables a la formulación clorhexidina al 0.05% más cloruro de cetilpiridinio al 0.05% respecto al control en cuanto a resultados microbiológicos.

# A randomized clinical trial on the short-term clinical and microbiological effects of the adjunctive use of a 0.05% chlorhexidine mouth rinse for patients in supportive periodontal care

Sagrario Santos<sup>1</sup>, David Herrera<sup>1,2</sup>,  
Elsa López<sup>1</sup>, Ana O'Connor<sup>2</sup>,  
Itziar González<sup>2</sup> and Mariano Sanz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Section of Graduate Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, Faculty of Odontology, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Santos S, Herrera D, López E, O'Connor A, González I, Sanz M: A randomized clinical trial on the short-term clinical and microbiological effects of the adjunctive use of a 0.05% chlorhexidine mouth rinse for patients in supportive periodontal care. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 45–51. © Blackwell Munksgaard, 2004.

## Abstract

**Objective:** To evaluate the clinical and microbiological activity of a new mouth rinse formulation, used as an adjunct to oral hygiene, for patients in supportive periodontal care.

**Patients and Methods:** This was a randomized, placebo-controlled clinical trial with two groups: test group, rinsing twice per day with the test product (with 0.05% chlorhexidine and 0.05% cetylpyridinium chloride); and control group, rinsing with a placebo. Treated chronic periodontitis patients were included, and two visits were rendered, baseline, and after 15 days. Clinical outcome variables included plaque and gingival indices, and probing pocket depth. Subgingival samples were processed by culturing. Patient-based variables and adverse effects were also assessed. Outcome variables were compared by *t*-test,  $\chi^2$ , and Mann–Whitney test.

**Results:** The results belonged to 33 patients. Plaque and gingival indices, and the log of bacterial total counts were reduced in the test group ( $p \leq 0.01$ ), but differences between groups were only statistically significant ( $p < 0.05$ ) for plaque and bacterial counts. A significant reduction in the proportions of flora ( $p < 0.05$ ) and frequency of detection ( $p = 0.01$ ) of *Porphyromonas gingivalis* was observed in the test group.

**Conclusions:** The newly formulated mouth rinse demonstrated short-term plaque-inhibitory activity. This was associated with a reduction in the total load of anaerobic subgingival microflora.

Key words: cetylpyridinium chloride; chlorhexidine; microbiology; mouth rinses; oral hygiene product; RCT; supportive periodontal care

Accepted for publication 20 March 2003

Based on the evident limitations of mechanical plaque control, there has been a broad search for many years on chemical agents that could supplement patient-dependent mechanical plaque control (Mandel 1988). In this manner,

both mechanical and chemical antimicrobial intervention becomes the basis of both primary and secondary prevention of periodontal diseases.

In secondary prevention, successful supportive periodontal care depends

upon the ability of oral health professionals to treat periodontal infections successfully, and on the patient compliance with the prescribed follow-up care (Jorgensen & Slots 2001). Since patient compliance is not always as

Herrera D, **Santos S**, Ferrús J, Barbieri G, Trombelli L, Sanz M.

“Efficacy of a 0.15% benzydamine hydrochloride and 0.05% cetylpyridinium chloride mouth-rinse on 4-day de novo plaque formation”.

*Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32(6): 595-603.

## Resumen

**Objetivo.** Evaluar el efecto de una formulación de colutorio que combina bencidamina más cloruro de cetilpiridinio en la prevención de la formación de nueva placa, en comparación con colutorios de cloruro de cetilpiridinio solo y placebo. También se estableció como objetivo determinar el efecto de la asociación de bencidamina más cloruro de cetilpiridinio sobre los tejidos gingivales y la microflora periodontal y comparar la tolerabilidad de estas formulaciones.

**Material y métodos.** Fue un diseño en fase I, en un solo centro, con observador ciego, cruzado, aleatorizado, controlado con al menos 10 días de aclaramiento entre dos tratamientos consecutivos. Se usaron dos controles, un control positivo, que contenía cloruro de cetilpiridinio, y un control negativo (placebo). A los sujetos se les asignó de forma aleatorizada recibir una de las seis posibles secuencias de tratamiento tras una sesión de profilaxis oral y la retirada de cualquier medida de higiene oral para los siguientes 4 días, a excepción del enjuague asignado. Se programaron siete visitas. A los sujetos se les trató durante 4 días en cada sesión, con un periodo de aclaramiento de 10 días. La duración del período experimental fue de 43 días, incluyendo la primera visita. Por cada periodo de tratamiento, los sujetos se enjuagaron 3 veces al día durante 4 días, de acuerdo con el siguiente régimen diario: 15ml durante 1min por la mañana (tras el desayuno); 15ml durante 1 min por la tarde (tras la comida) y 15ml durante 1min por la noche (tras la cena). El enjuague se llevó a cabo tras las comidas y no se permitió comer nada inmediatamente después (hasta 30 minutos). Los productos de tratamiento fueron bencidamina al 0.15% más cloruro de cetilpiridinio al 0.05% en colutorio; cloruro de cetilpiridinio en colutorio al 0.05%; y colutorio placebo (incluyendo 8.1% de alcohol). Las variables que se evaluaron fueron índices de placa y gingivitis, recuentos bacterianos y tolerabilidad. Se llevó a cabo una comparación intergrupo

de los índices de placa y los índices gingivales mediante el análisis de la varianza seguido de un diseño de cuadrado latino incluyendo periodo, secuencia, sujeto dentro de la secuencia y efectos de tratamiento como fuentes de variación. Las unidades formadoras de colonias anaeróbicas total fueron transformadas en logaritmo para ajustarse a una distribución normal y procesada mediante un ANOVA para comparar todos los grupos, identificando diferencias mediante el test de rangos múltiples. En segundo lugar, se compararon pares de grupos mediante la t-test pareada. Ambos tests se llevaron a cabo tras evaluar la distribución normal de las muestras. Si la normalidad no estaba presente, se elegía un test de Kruskal-Wallis (en vez de ANOVA) o un test de rangos señalados. Las unidades formadoras de colonias de cada patógeno se transformaron en logaritmo. Solo se llevaron a cabo comparaciones intragrupo mediante la t-test pareada.

Se calculó el porcentaje de flora por cada patógeno. Se llevaron a cabo comparaciones intragrupo usando el test de Kruskal-wallis y la determinación intragrupo mediante un test de rangos señalados. La frecuencia de detección para cada patógeno se comparó (sólo intragrupo) mediante el test chi-cuadrado. El ratio de tolerabilidad clínica y la tolerabilidad subjetiva se evaluaron mediante el test Wilcoxon de rangos señalados.

**Resultados.** La formulación que contenía bencidamina 0.15% más cloruro de cetilpiridinio al 0.05% mostró una eficacia en los niveles de placa estadísticamente significativa respecto a los otros dos grupos, mientras que tanto desde el punto de vista microbiológico, como de eficacia en índice gingival y otros parámetros clínicos, así como los efectos adversos, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

**Conclusiones.** La combinación de bencidamina al 0.15% más cloruro de cetilpiridinio al 0.05% mostró una capacidad inhibitoria de la placa estadísticamente significativa respecto al placebo y un efecto aditivo respecto a la formulación con cetilpiridinio 0.05% como único agente antimicrobiano. Los efectos adversos clínicos y microbiológicos fueron irrelevantes para las formulaciones evaluadas.

# Efficacy of a 0.15% benzydamine hydrochloride and 0.05% cetylpyridinium chloride mouth rinse on 4-day de novo plaque formation

David Herrera<sup>1,2</sup>, Sagrario Santos<sup>1</sup>, Jorge Ferrús<sup>1</sup>, Germán Barbieri<sup>1</sup>, Leonardo Trombelli<sup>3</sup> and Mariano Sanz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Section of Graduate Periodontology, Faculty of Odontology; <sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Department of Periodontology, School of Dentistry, University of Ferrara, Ferrara, Italy

Herrera D, Santos S, Ferrús J, Barbieri G, Trombelli L, Sanz M. Efficacy of a 0.15% benzydamine hydrochloride and 0.05% cetylpyridinium chloride mouth rinse on 4-day de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 595–603. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00718.x. © Blackwell Munksgaard, 2005.

## Abstract

**Objective:** To evaluate the effect of a mouth-rinse formulation combining benzydamine hydrochloride and cetylpyridinium chloride (BNZ+CPC) in preventing de novo plaque formation, in comparison with CPC and placebo mouth rinses.

**Patients and Methods:** This was a controlled, observer-blind, cross-over study. In this model of plaque re-growth, subjects received a session of oral prophylaxis and were directed to withdraw oral hygiene measures for the next 4 days, using only the mouth rinse assigned. The outcome parameters were the plaque index (PII) and gingival index (GI). In addition, microbiological evaluation of the subgingival microflora, by means of culture, was performed, as well as patient-based variables. Data analysis was carried out using ANOVA for Latin-square design.

**Results:** The analysis of variance showed a significant statistical difference between the BNZ+CPC association and placebo ( $p < 0.0001$ ). No differences between CPC and placebo were detected considering multiple comparisons between treatments. The 90% confidence interval of the differences between BNZ+CPC and CPC showed no equivalence between treatments, being the PII lower in the BNZ+CPC group. No significant difference between groups in GI was observed. Mean anaerobic colony-forming units (CFU) demonstrated a significant increase between visits in all groups ( $p < 0.001$ ) and differences among groups were not significant. Subjects treated with BNZ+CPC frequently reported “tingling mouth” and “numbness mouth”.

**Conclusion:** Within the limitations of the study model, the BNZ+CPC combination showed a statistically significant plaque-inhibitory capacity, as compared with the placebo mouth rinse, and an additive effect as compared with CPC. No relevant clinical or microbiological adverse effects were detected.

Key words: antiseptics; benzydamine; cetylpyridinium chloride; dental plaque; de novo plaque formation; microbiology

Accepted for publication 11 October 2004

Dental plaque is a bacterial biofilm adhering to the tooth surfaces. It is mainly composed of complex bacterial populations organized in a carbohydrate matrix also containing a small number of epithelial cells, leukocytes, macrophages and inorganic components such as calcium and phosphorus. This biofilm

structure confers these bacterial populations a high resistance to most chemical anti-bacterial compounds and makes the use of mechanical oral hygiene procedures such as tooth brushing, dental flossing and inter-dental brushing the most effective method for plaque removal. However, the use of anti-micro-

bial compounds in mouth-rinse formulations can play an important role in maintaining oral health by preventing plaque formation, and thus, preventing gingivitis and caries.

Both benzydamine hydrochloride (BNZ) and cetylpyridinium chloride (CPC) are well-known drugs that are



## DISCUSIÓN

El descomunal y progresivo incremento en el número de investigaciones científicas, publicadas o no, hace muy difícil que los profesionales sanitarios, que trabajan en situaciones clínicas complejas, puedan reunir la información adecuada para la toma de decisiones clínicas que se puedan aplicar de manera individualizada y racional a cada paciente, disminuyendo la probabilidad de reacciones adversas graves y efectos secundarios no deseables.

Sobre la falta de fundamento de las decisiones clínicas, Cochrane, en 1972 llevó a cabo los primeros trabajos (Elstein 2004). Las revisiones sistemáticas de la literatura científica han facilitado la integración de la mejor evidencia disponible en la toma de decisiones clínicas y, por tanto, han contribuido a la extensión de la llamada “medicina basada en la evidencia”. Se debe evitar identificar este término como si de un compendio de soluciones clínicas se tratara, considerando que lo que se pretende es el equilibrio entre el juicio clínico o profesional procedente de la experiencia y el conocimiento basado en las pruebas procedentes de la investigación y relativas a la cada vez más numerosas opciones disponibles para las intervenciones en las ciencias de la salud (Sackett y cols. 1996).

El diseño que se utilice para una determinada investigación va a permitir establecer el valor de cada publicación científica dentro de la Odontología Basada en la Evidencia. La validez interna de estos diseños indica el grado en el que las distintas explicaciones pudieran ser responsables de los resultados que se encuentren. Sobre la base de esta validez interna, los diseños de investigación pueden situarse en una escala de “evidencia”. Dicha validez también viene determinada por la calidad metodológica del estudio. Los estudios experimentales clínicos (ensayos clínicos aleatorizados, diseños cruzados y de boca partida), en los cuales el investigador introduce cambios o interviene, y mantiene los otros factores constantes, presentan el mayor nivel de validez interna. Los estudios observacionales (estudios de cohortes, estudios de casos y controles, transversales, estudios de casos y series de pacientes), en los cuales los grupos se

describen y comparan en su hábitat natural, se pueden introducir preferencias y sesgos, llevando a un menor nivel de evidencia (Aartman y van 2007).

Las cuestiones relacionadas con el diagnóstico, pronóstico y causalidad se estudian a menudo con diseños de investigación observacionales, más que experimentales (Sutherland 2001).

Pero siempre que sea posible, debería utilizarse el diseño de estudio más potente. De esta forma, en la literatura odontológica este diseño es el ensayo clínico aleatorizado, especialmente para cuestiones relacionadas con intervenciones preventivas y terapéuticas (Sutherland 2001). Existen revisiones sistemáticas (Gunsolley 2006), con o sin meta-análisis, metodológicamente rigurosas que, a pesar de la extensa y altamente compleja literatura en este campo, pueden traducirse en valiosas guías de la práctica clínica (García 2008).

Tal y como se detalló en el apartado “evaluación de los productos químicos de higiene oral” de la introducción, los diseños *in vitro* cuentan con un grado de evidencia científica reducido por las razones que se explicaron; de esta forma, los modelos basados en recuentos salivales *in vivo* se encuentran en una posición más elevada en la escala de evidencia. Por último, los modelos de placa experimental y ensayos clínicos son los que presentan un mayor grado de evidencia científica. Con este enfoque y de manera creciente en escala de evidencia, es necesario evaluar punto por punto la calidad de los métodos experimentales aportados en esta tesis con el fin de comprobar que los sesgos están limitados, contar con una idea precisa de las comparaciones que pueden establecerse y conseguir una interpretación correcta de los resultados que se han obtenido.

Respecto al primer artículo publicado, el test de contacto *in vitro* aplicado en el modelo experimental 1.1. es útil para analizar los recuentos bacterianos de las distintas cepas procedentes de la comparación entre los productos evaluados. La sensibilidad y especificidad del test de contacto breve justifica su aplicación como herramienta de comparación de actividad antimicrobiana entre distintas formulaciones. De sus resultados se deriva que la presencia del mismo agente

antimicrobiano (clorhexidina), a la misma concentración (0.12%), dentro de distintos colutorios comercializados, no garantiza una eficacia antimicrobiana similar. Así mismo, las formulaciones sin alcohol, excepto la que añadió cloruro de cetilpiridinio, demostraron ser menos efectivas, tanto *in vitro* como *in vivo*. La introducción del cloruro de cetilpiridinio como agente activo adicional en la formulación, consiguió mantener una alta actividad antimicrobiana como contrapartida a la ausencia de alcohol. Dicha formulación, además, demostró eficacia *in vitro* contra todas las cepas evaluadas, sin aparecer resistencia alguna a las mismas.

Un segundo modelo experimental basado en recuentos salivales se incluye en este primer artículo, de manera que de las cuatro formulaciones con clorhexidina al 0.12% comparadas en este modelo experimental 1.2., la formulación que combina clorhexidina al 0.12% y cloruro de cetilpiridinio al 0.05% demostró ser igual de eficaz *in vivo* para mantener la disminución de bacterias en saliva durante un período de 5 horas que la que combina clorhexidina al 0.12% con alcohol y más eficaz que las otras dos, la que contiene clorhexidina 0.12% sin antimicrobiano añadido y la que combina clorhexidina al 0.12% con fluoruro sódico. El diseño del modelo de estudio cruzado permitió demostrar la eficacia comparativa de las formulaciones a prueba, así como la seguridad de todas ellas respecto a la tolerancia de los efectos secundarios.

El segundo artículo publicado utiliza un diseño más potente desde el punto de vista de la evidencia científica, un ensayo clínico aleatorizado paralelo que permite comprobar la eficacia antimicrobiana de la formulación que combina clorhexidina (0.05%) y cloruro de cetilpiridinio (0.05%), así como su seguridad y efectos secundarios dentro de la población a la que iría destinado su uso, como son los pacientes con periodontitis tratada y en fase de mantenimiento. En este modelo experimental 2, el colutorio formulado con una baja concentración de clorhexidina (0.05%) y cloruro de cetilpiridinio (0.05%) demostró una actividad inhibitoria de placa en un período de dos semanas en pacientes bajo cuidados periodontales de soporte. Dicha formulación mostró una reducción en la microflora anaeróbica subgingival total. Sin embargo, la reducción (respecto a los modelos

experimentales del artículo previo) en la concentración del agente activo (de 0.12% a 0.05%) no demostró una reducción significativa de la incidencia y severidad de los efectos adversos del uso del producto evaluado, ya que a pesar de que la apreciación subjetiva de los pacientes fue satisfactoria para el uso del colutorio, la evaluación objetiva de las tinciones dentarias observadas confirman que la hipótesis planteada a este respecto debe ser rechazada.

Por último, el ensayo clínico aleatorizado cruzado que se llevó a cabo en el tercero y último de los artículos publicados en esta serie, permite la comparación de la eficacia antimicrobiana de formulaciones que contienen cloruro de cetilpiridinio (0.05%) como único agente activo con otra que añade bencidamina, un agente con propiedades antimicrobianas. De igual forma, este modelo experimental 3, permite evaluar los efectos secundarios de dichas formulaciones, constatando su seguridad. El producto que combina bencidamina (0.15%) y cloruro de cetilpiridinio (0.05%) demostró una actividad inhibitoria de la placa superior comparada con una formulación comercial con cloruro de cetilpiridinio (0.05%), mostrando además un menor incremento de diferentes patógenos bacterianos específicos asociados con gingivitis. Aún perteneciendo al grupo de los medicamentos antiinflamatorios, la bencidamina no pudo demostrar un efecto antiinflamatorio directo y significativo en los tejidos gingivales.

Como ya se ha subrayado, es el ensayo clínico aleatorizado el diseño experimental considerado como paradigma del mejor diseño posible para evaluar la eficacia de una intervención sanitaria, ya que es el que proporciona la evidencia de mayor calidad acerca de la existencia de una relación causa-efecto entre dicha intervención y la respuesta observada. Tanto es así que los ensayos clínicos suponen la principal fuente de las revisiones sistemáticas de la literatura científica, siendo éstas un tipo de investigación en sí mismas, principalmente de forma retrospectiva, cuya calidad depende, en parte, de la metodología de los estudios revisados. En este sentido, la Colaboración Cochrane ha desempeñado un liderazgo claro estableciendo un registro mundial de ensayos clínicos. Así mismo, en la última década del siglo pasado, se desarrolló a nivel internacional un instrumento llamado CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*, por sus siglas en

inglés [Normas Consolidadas para las Publicaciones de Ensayos Clínicos]) que también ayuda a los investigadores a mejorar la calidad de los ensayos clínicos aleatorizados paralelos (Moher y cols. 2001). De igual forma, en esa década se publicaron las recomendaciones QUORUM (*Quality of Reporting of Meta-Analyses*) con la finalidad de evaluar la mecánica de la realización de un meta-análisis (Moher y cols. 1999, Martín 2004).

El diseño de todos y cada uno de los cuatro modelos experimentales presentados y publicados por nuestro equipo se ha realizado siguiendo punto por punto las directrices de obligado cumplimiento, lo cual se analiza con detalle en el desarrollo de este trabajo. En cada uno de los cuatro modelos se han obtenido resultados estadísticamente significativos, por tanto, los cuatro muestran validez interna (es decir, su diseño y realización han conseguido evitar los errores sistemáticos o sesgos).

## **Diseño**

En cuanto al diseño de los estudios, revisiones sistemáticas recientes sobre distintas formulaciones para higiene oral (Berchier y cols. 2010, Van Strydonck y cols. 2008, Drisko 2013) han tomado en consideración tanto diseños paralelos como cruzados.

La ventaja de un diseño cruzado (Harper y cols. 1995, Pizzo y cols. 2006, Quirynen y cols. 2001, Smith y cols. 1995), respecto a uno paralelo (Keijser y cols. 2003) es que las comparaciones de los tratamientos no están influenciadas por la variabilidad entre los sujetos, ya que la comparación se lleva a cabo dentro del propio individuo.

Según la hipótesis que se maneja en cada estudio y el modo de utilización que se pretenda para el agente antimicrobiano a evaluar, debe determinarse de antemano el diseño del estudio (Chilton y Fleiss 1986). Así, tanto en el modelo experimental 1.2 como en el modelo experimental 3 los diseños fueron cruzados.

El modelo experimental 1.2 pretendía despejar la duda de si la presencia de 0.12% de clorhexidina en colutorios comercializados garantiza una eficacia antimicrobiana similar, por tanto, el hecho de que los mismos sujetos sean sus propios controles minimiza el riesgo de error debido a la variabilidad entre sujetos distintos que tendría lugar en un diseño paralelo. Del mismo modo, para el modelo experimental 3, que tuvo por objetivo evaluar la prevención en la formación de nueva placa de dos formulaciones diferentes con bencidamina y/o cloruro de cetilpiridinio, se optó por un diseño cruzado. En este caso, además, el efecto sobre los tejidos gingivales, que fue una variable analizada en todos los artículos, tuvo mayor interés desde el punto de vista clínico, ya que se trata de un antiinflamatorio, la bencidamina y por tanto, es fundamental tener en cuenta en este tipo de diseño la variabilidad en la respuesta individual.

La posible desventaja de un efecto remanente o acumulativo de los tratamientos previos de un diseño cruzado parece ser manejada adecuadamente llevando a cabo un período de aclaramiento suficiente (Berchier y cols. 2010). Tras cada período experimental, el sujeto entra en un período de tiempo suficiente como para que los efectos remanentes de un tratamiento no tengan implicación hasta el siguiente. El período de aclaramiento resulta muy variable en la literatura científica (Moran y cols. 1994, Jenkins y cols. 1994a, Harper y cols. 1995). Este tiempo de aclaramiento puede ser, según las distintas publicaciones, de 7 días (García y cols. 2011), de 14 días (Cousido y cols. 2010) o incluso de 23 días (Quirynen y cols. 2001). En el modelo experimental 1.2 fue una semana y, en el modelo experimental 3, de 10 días, mayor en este último, ya que se trata de un estudio de formación de nueva placa, sin cepillado durante cuatro días, lo cual obliga a espaciar el uso de los distintos tratamientos lo suficiente como para que los tejidos gingivales inflamados y bajo los efectos del tratamiento anterior, retornasen a su situación inicial de salud. Esto último se facilitaba además, practicándose una profilaxis profesional al final de cada período de tratamiento.

En el modelo experimental 2, al ser un ensayo a corto plazo en pacientes con patología bajo tratamiento periodontal de soporte, se prefirió un diseño en paralelo, ya que según los resultados de eficacia de la nueva formulación a prueba,

se pretendía realizar, como así fue (Costa y cols. 2013) otro estudio de similares características pero a largo plazo, para lo cual es el diseño más acertado, puesto que se espera encontrar un efecto de tratamiento duradero en el tiempo.

A pesar de varias décadas de esfuerzos educativos, las publicaciones de ensayos clínicos aleatorizados necesitan mejorarse (Dickinson y cols. 2000). Con este fin, a mediados de la década de los años 1990-2000 y, como se señaló anteriormente, dos iniciativas independientes e internacionales formadas por investigadores, estadísticos, epidemiólogos y editores biomédicos desarrollaron una herramienta para ayudar a los autores a mejorar la calidad de los ensayos, que fue conocida como CONSORT (Begg y cols. 1996, Moher y cols. 2001, Moher y cols. 2003, Moher y cols. 2012). Es un instrumento en constante evolución que está destinado principalmente a la redacción o evaluación de artículos sobre ensayos clínicos aleatorizados paralelos (CONSORT 2015). Puede ser también utilizado por los revisores y editores para identificar artículos con una descripción inadecuada de los ensayos y resultados potencialmente sesgados (Moher y cols. 1998). Tiene relevancia incluso porque el enfoque basado en la evidencia utilizada para desarrollar CONSORT también se ha utilizado para desarrollar normas para meta-análisis de ensayos aleatorizados (Moher y cols. 1999).

### **Muestra poblacional**

Para evitar un sesgo de selección es importante que la población de estudio represente los usuarios típicos del producto. De esta forma, en el modelo experimental 2 se seleccionaron pacientes en fase de cuidado periodontal de soporte, puesto que se trata de un colutorio cuya finalidad es controlar la placa y la gingivitis con el menor grado posible de efectos secundarios en pacientes con patología crónica. Los otros dos ensayos (modelo experimental 1.2 y modelo experimental 3) se realizaron con voluntarios sanos, lo cual no es infrecuente en estos casos en los que se van a comparar distintas formulaciones que se suministran en el mercado sin receta a la población general.

Establecer el tamaño muestral apropiado para una investigación es frecuentemente complicado y representa solo una aproximación a la realidad, sin embargo es muy necesario.

Dentro de las diferentes cuestiones que podrán ser investigadas en un estudio, es posible definir la principal. Con ello, entonces, se establecerá qué clase de datos deben ser obtenidos y la forma como serán analizados. Esto tiene mucha importancia, puesto que el tamaño de la muestra depende del método de análisis a emplear. En el modelo experimental 3 se especifica el modo de calcular el tamaño muestral para la investigación en concreto, que fue de 24 individuos. En estudios previos (Moran y cols. 2000), la comparación del índice de placa entre el cloruro de cetilpiridinio y el placebo ha mostrado una media de diferencia de 0.66 con una desviación estándar de 0.53. Fijando el umbral de 0.33 (50% del efecto con respecto al placebo), un tamaño muestral de 24 sujetos proporcionaría un poder del 90% ( $\alpha=0.05$ , test de una cola) en demostrar la superioridad de la asociación bencidamina más cloruro de cetilpiridinio con respecto al placebo.

De igual forma, para los modelos experimentales 1.2 y 2 (10 y 23 sujetos, respectivamente) se revisó qué valor de diferencia media para la comparación de las diversas variables entre los distintos productos se había utilizado en la literatura previa para estas comparaciones, así como la desviación estándar hallada, estableciendo un poder de elevado porcentaje en demostrar la superioridad de unas formulaciones respecto a otras con el número de individuos que se seleccionaron como muestra poblacional.

Para conocer el tamaño muestral en los ensayos clínicos es necesario aplicar una fórmula que depende del diseño estadístico utilizado, el tipo de respuesta medida, la distribución estadística de la respuesta y la hipótesis a comprobar, entre otras cuestiones. La determinación del tamaño de la muestra es un problema estadístico serio, difícil y a veces imposible de resolver de un modo estricto si el modelo es excesivamente complicado o si no hay información previa disponible (Martín 2004).

## **Estratificación**

En los modelos experimentales incluidos en este trabajo se han tenido en cuenta las características de los sujetos que participan en los estudios respecto a su edad, sexo, niveles de placa y gingivitis, entre otros aspectos, para que la información que resulta sobre la eficacia de los antimicrobianos a prueba tenga mayor validez.

## **Aleatorización**

La asignación aleatoria implica que todos los participantes en el experimento tienen la misma probabilidad de entrar en cualquiera de los grupos del estudio. La aleatorización es un procedimiento sistemático y reproducible por el que los sujetos participantes en un ensayo clínico son distribuidos al azar en los distintos grupos de tratamiento.

La importancia de la asignación aleatoria radica en que el diseño de investigación que se elige es el que más se aproxima a la creación de grupos de pacientes similares. No solo respecto de los factores que se sabe que pueden condicionar el resultado, tales como la gravedad de la enfermedad, sino también respecto de otros factores cuya influencia sea desconocida.

Una cuestión adicional es si se ocultó a los investigadores la asignación aleatoria. La ocultación o cegamiento de la aleatorización no debe confundirse con el cegamiento del tratamiento (diseño abierto, simple, doble o triple ciego) que se comenta más adelante. La ocultación o cegamiento de la aleatorización consiste en que el investigador desconoce la secuencia de aleatorización, en otras palabras desconoce a qué grupo será asignado el próximo paciente que incluya en el ensayo clínico. Esto resulta especialmente importante en los estudios abiertos o simple ciego, en los que el investigador conoce cuál es el tratamiento que corresponde a cada grupo. Ya que de forma consciente o inconsciente puede influir en la inclusión o exclusión del paciente en el ensayo en función del tratamiento que debería de

recibir. Para ello el investigador debe conocer el grupo al que es asignado el paciente solo cuando éste ya ha aceptado su participación y firmado el consentimiento informado.

Una inadecuada asignación al azar se ha asociado con el sesgo en la estimación de la efectividad de las intervenciones (Moher y cols. 1998).

En todos y cada uno de los artículos que se aportan en esta tesis, la aleatorización se realizó mediante un listado generado por ordenador, manteniendo la asignación aleatoria oculta a los investigadores a lo largo de todo el proceso a través de la utilización de contenedores numerados de modo secuencial. La secuencia de asignación aleatoria fue realizada por personal ajeno a la investigación clínica y de laboratorio.

### **Régimen de uso**

Puesto que la clorhexidina es uno de los antimicrobianos en enjuague más ampliamente probado y ya que además forma parte de los artículos aportados en este trabajo, debemos resaltar en este apartado que no existen ensayos clínicos que determinen el modo óptimo de administración de dicho agente. A este respecto, uno de los primeros estudios, muy citado (Löe y cols. 1976) sugiere utilizar 20mg de clorhexidina dos veces al día como dosis óptima.

En Europa, el desarrollo de la solución de clorhexidina al 0.2% se convirtió en la concentración internacional estándar (Hase y cols. 1998). Otras publicaciones consideran también dosis óptima alrededor de 20mg dos veces al día (Cumming y Löe 1973, Agerbaek y cols. 1975, Jenkins y cols. 1994b), que equilibra eficacia del agente con efectos secundarios locales y aceptabilidad de usuario (Flotra y cols. 1971).

La inhibición de placa es dosis dependiente. Se consiguen niveles de inhibición de placa similares con mayores volúmenes de soluciones a más baja

concentración (Bonesvoll y Gjermo 1978). Las concentraciones de 0.12% han demostrado ser igualmente eficaces que 0.2% si el volumen del enjuague se aumenta de 10 a 15 ml, administrando una dosis de 18 mg en cada ocasión (Keijser y cols. 2003). Los efectos secundarios son también dosis dependientes, siendo mayores por encima de 0.1% (Smith y cols. 1995). La FDA sugiere el uso de clorhexidina (al 0.2% o 0.12%) como enjuague oral aplicando 10-15ml de producto durante 30 segundos dos veces al día durante un período limitado de tiempo -2 semanas o un mes- (FDA 2011).

La revisión de la literatura en individuos sanos en el transcurso de estas últimas décadas muestra que existen pequeñas diferencias, estadísticamente significativas, entre enjuagues de clorhexidina al 0.2% y 0.12% respecto a inhibición de placa a favor de la concentración 0.2%. Muy pocos estudios aportan datos suficientes de inflamación gingival como para concluir que existan diferencias estadísticamente significativas respecto a este parámetro (Berchier y cols. 2010).

Sin embargo, determinadas formulaciones al 0.12% han mostrado el mismo efecto antibacteriano que otras con 0.2%, pero con un 30% menos de clorhexidina en términos cuantitativos (Quirynen y cols. 2001). Esta observación está en contraste con el hecho de que la actividad antibacteriana de la clorhexidina se considere dependiente de la dosis *in vivo* (Harper y cols. 1995) y pudiera indicar saturación. Es decir, varios estudios han subrayado que el efecto inhibidor de la placa de una solución de clorhexidina es dependiente de la dosis con un efecto de meseta alrededor de aproximadamente 30 a 40mg por día (Jenkins y cols. 1994b, Quirynen y cols. 2001). Los efectos secundarios son, sin embargo, dependientes de la concentración sin valores de meseta (Flotra y cols. 1971, Quirynen y cols. 2001).

Las concentraciones al 0.05%, 0.12% y 0.2% son las que se han comparado en la literatura científica de las últimas décadas (Quirynen y cols. 2001, Sekino y cols. 2004, Quirynen y cols. 2005, Cousido y cols. 2010, Escribano y cols. 2010), tal y como venía siendo habitual anteriormente y se muestra en los modelos experimentales presentados.

Por otro lado, el cloruro de cetilpiridinio se ha utilizado en un rango de concentraciones entre 0.045% y 0.1% (Gunsolley 2006), pero existe una gran variedad de resultados dependiendo de las distintas formulaciones, lo cual pudiera tener relación con esta variabilidad en las concentraciones (García y cols. 2011). En nuestras tres publicaciones aportadas se empleó una concentración de 0.05% de cloruro de cetilpiridinio, siendo ésta la más habitualmente utilizada en los ensayos clínicos sobre antimicrobianos (Quirynen y cols. 2001, Quirynen y cols. 2005, Escribano y cols. 2010, García y cols. 2011).

De igual forma, la utilización de una concentración de hidrocloreto de benzidamina al 0.15% tres veces al día es la más repetida en formulaciones para enjuague de este antiinflamatorio no esteroideo (Matthews y cols. 1987, Edres y cols. 1997, Sardella y cols. 1999, Passali y cols. 2001), ya que ha demostrado con esta dosis su efecto en el control de la inflamación y el dolor local.

## **Duración**

La duración de un ensayo clínico depende, por un lado, del tiempo requerido hasta observar la respuesta al tratamiento y, por otro, del número de individuos que han de intervenir en el ensayo. Una vez determinado qué es lo que se va a medir, el número de individuos del ensayo y la celeridad con la que el centro o centros pueden proporcionarlos, la duración total del ensayo queda fijada (Martín 2004).

La evaluación del recuento de bacterias salivales tras un solo uso del producto a prueba se ha realizado (Elworthy y cols. 1996, Addy y Moran 1997b) con diseños cruzados en los que el período de aclaramiento puede ser desde una semana, como en modelo experimental 1.2, hasta incluso 15 días (Cousido y cols. 2010), con un período de evaluación de 7 horas para el registro de las variables, ya que se trata de diseños que tratan de evaluar la sustentividad de antimicrobianos.

El diseño del estudio de crecimiento de placa a corto plazo tiene un rango de 16 horas a varios días (Addy y cols. 1983, Harrap 1974, Jenkins y cols. 1994a, Harper y cols. 1995, Moran y cols. 2000). El período de 4 días es el más comúnmente utilizado en la literatura para este tipo de diseños experimentales y, por tanto, es el que se empleó en el modelo experimental 3. Es necesario en este tipo de diseños que se den especificaciones sobre la duración del período de aclaramiento debido al potencial efecto remanente de algunos agentes (Newcombe y cols. 1995).

En nuestra segunda publicación (modelo experimental 2), se pretendía seleccionar una nueva formulación para uso como coadyuvante en pacientes de mantenimiento periodontal. Es sabido que los resultados para este nuevo producto deben validarse en estudios a largo plazo. Sin embargo, para esta evaluación preliminar, se consideró adecuado un diseño del ensayo clínico a corto plazo, con una duración de 2 semanas, el cual es válido para investigar los efectos sobre placa y gingivitis (Gunsolley 2006).

Posteriormente, nuestro equipo llevó a cabo un ensayo de similares características de 6 meses de duración (Costa y cols. 2013), período de tiempo que se considera largo plazo en diseños en paralelo y es habitual en ensayos de uso en casa para colutorios de control del biofilm oral (Stookey y cols. 2005, Charles y cols. 2004, Hoffmann y cols. 2001, Lucas y Lucas 1999, Hase y cols. 1998, Lang y cols. 1998, Chaves y cols. 1994, Jenkins y cols. 1993, Overholser y cols. 1990, Grossman y cols. 1989), ya que además es la duración recomendada por la Asociación Dental Americana para establecer la eficacia a largo plazo de las fórmulas de enjuague bucal de uso domiciliario (Council on Dental Therapeutics 1986). De hecho, en una de las últimas revisiones sistemáticas sobre productos para el control químico de placa, solo se incluyeron ensayos clínicos aleatorizados de, al menos, 6 meses de duración (Serrano y cols. 2014).

## Controles

Dentro de los antimicrobianos utilizados para el control de placa, la clorhexidina se ha considerado como control positivo o control de referencia con el que poder comparar otros productos, válido solo en la forma farmacéutica de colutorio (Addy 1986, Garcia y cols. 2011, Bozkurt y cols. 2005).

Los grupos de control positivo reducen la posibilidad de falsos negativos, es decir, se espera que el grupo de control brinde un resultado positivo y permita al investigador demostrar que el agente a prueba ha sido capaz de producir también resultados positivos.

El control negativo es el proceso que consiste en utilizar el grupo de control para asegurarse de que ninguna variable de confusión haya afectado los resultados o eliminar las posibles fuentes de sesgo, ya que no se espera que arroje resultados positivos.

Los controles aseguran que los efectos de la formulación son necesariamente debidos a la formulación a prueba. El hecho ideal de que los controles tengan características similares a la formulación a prueba, incluyendo color, gusto y consistencia, posibilita el doble ciego -sujeto y examinador- (Addy 1995) durante el estudio.

En dos de los tres artículos (modelo experimental 1.2 y 3), se utilizaron controles positivos y placebo. En el primero, se utilizó como control positivo una formulación con clorhexidina al 0.12% y 5% de alcohol, y suero salino estéril como placebo. El ensayo 2 se llevó a cabo con un placebo y el ensayo 3 con un control positivo -cloruro de cetilpiridinio- y un control negativo cuya composición química incluía un 8,1% de alcohol. En este último caso, utilizar un placebo proporciona información sobre el efecto químico máximo de formulaciones, puesto que se trata de un estudio sin cepillado, mientras que en el ensayo 2 puede ser útil para evaluar la magnitud del efecto Hawthorne, puesto que en este estudio se realizó el tratamiento como coadyuvante al cepillado.

## Ciego

El sesgo de realización de los ensayos clínicos presentados se controló a través de los diseños a simple (modelo experimental 3) o doble (modelo experimental 1.2 y 2) ciego.

El enmascaramiento o cegamiento del tratamiento consiste en una serie de medidas o precauciones que se toman con el fin de que a lo largo del estudio, el paciente, el investigador o ambos, incluso el analista estadístico, desconozcan el tratamiento que se está aplicando.

Los tipos de enmascaramiento pueden ser:

- Simple ciego: son aquellos ensayos en los que el sujeto desconoce el grupo de tratamiento al que pertenece, aunque en ocasiones puede ser el investigador el que desconoce la asignación de tratamientos.
- Doble ciego: son aquellos ensayos en los que tanto el sujeto como el investigador desconocen la asignación a los grupos de tratamiento.
- Tripe ciego: son aquellos ensayos en los que, además del sujeto y el investigador, el estadístico que trabaja con los datos registrados también desconoce la asignación a los grupos de tratamiento.

La manera de conseguir mantener el enmascaramiento durante todo el desarrollo del estudio fue a través del embalaje de los productos por fuera y, en los ensayos del primero y segundo artículo (modelos experimentales 1.2 y 2), a través también de la similitud en las características de envases, color, sabor y consistencia de los líquidos empleados. En el ensayo del tercer artículo (modelo experimental 3), debido a diferentes aspectos, como el color y envase del colutorio a prueba, no fue posible un diseño doble ciego. Por esta razón, el estudio se llevó a cabo con un diseño de observador cegado.

En otros muchos casos no es posible mantener el enmascaramiento, como es el caso de tratarse de una intervención quirúrgica o de incluir algún tipo de

técnica llevada a cabo por un profesional. Este caso se conoce (Martín 2006) como estudio abierto (sujeto y médico/investigador conocen el grupo).

## **Variables**

Además de determinar en un estudio lo que se desea comprobar, es decir, la hipótesis, es también crucial decidir qué tipo de resultado va a medirse y cómo se va a hacer, para determinar la eficacia relativa de los tratamientos a comparar. La medida de la respuesta al tratamiento puede ser un evento clínico o una medida indirecta y debe tener las siguientes características deseables: ha de ser fácil de diagnosticar u observar, ha de estar libre de errores de medida, ha de poder ser observada con independencia del tratamiento, ha de tener relevancia clínica y, finalmente, ha de ser elegida antes de comenzar la recolección de los datos (Martín 2004).

La literatura médica presenta una gran cantidad de revisiones sistemáticas y de meta-análisis que proceden de ensayos clínicos aleatorizados y, por tanto, de diseños experimentales sobre la eficacia de tratamientos farmacológicos o de productos químicos. Aunque a veces se utilicen indistintamente los dos términos, la revisión sistemática no es igual al meta-análisis (Gisbert y Bonfil 2004). La primera es el proceso que conduce a obtener los estudios cuyos resultados pueden combinarse -o no- matemáticamente para poder ofrecer conclusiones. Cuando los resultados de los estudios primarios se resumen pero no se combinan con métodos estadísticos, el resultado puede denominarse revisión sistemática “cualitativa”. Así, el método matemático llamado meta-análisis, que daría como resultado una revisión sistemática “cuantitativa” es solo una parte, aunque muy importante, de la revisión sistemática. Dicho de otro modo, un meta-análisis es la combinación estadística de, al menos, dos estudios para obtener una estimación o suma única del efecto de la intervención en salud que estamos evaluando.

Para evaluar el grado de evidencia científica existen diversas escalas que puntúan la calidad de la información en función del tipo de estudio que la aporta y

en todas ellas, las revisiones sistemáticas y los meta-análisis ocupan las mejores posiciones (Martín 2006). Por tanto, las variables que se han elegido en cada uno de los ensayos seleccionados, están en consonancia con aquellas utilizadas por los distintos investigadores (Berchier y cols. 2010) de los ensayos clínicos que forman parte de las revisiones sistemáticas y meta-análisis de la literatura médica en cada campo.

La selección de la forma más adecuada para medir los resultados no parece ser fácil. Los índices más utilizados para evaluar los niveles de gingivitis, de acuerdo con la revisión del 11<sup>º</sup> *Workshop* Europeo en Periodoncia (Serrano y cols. 2015), son claramente Löe y Silness (Löe y cols. 1965) y el índice modificado por Talbott y cols. en 1977 del índice de Löe y Silness (Talbott y cols. 1977). Para la placa, el índice más utilizado es el de Turesky y cols. (Turesky y cols. 1970). Además, puede ser también recomendable un índice de sangrado dicotómico (Serrano y cols. 2015).

La importancia del sangrado gingival como un indicador de riesgo para la periodontitis se ha destacado en estudios recientes (Lang y cols. 2009, Needleman y cols. 2015). Por tanto, el resultado primario a considerar en estudios de productos para higiene oral tendría que ser la inflamación gingival, medida con índices como índice gingival, índice de sangrado del surco o de sangrado al sondaje (Löe y cols. 1965, Muhlemann y Son 1971, Cowell y cols. 1975, Talbott y cols. 1977, Lobene y cols. 1986). El índice de placa (Quigley y Hein 1962, Silness y Löe 1964, Lange y cols. 1977), así como la profundidad de sondaje y la pérdida de inserción clínica se considerarían como variables de resultado secundarias (Polak y cols. 2015).

Sin embargo, la variable de resultado principal ha sido, en dos de los tres estudios, el índice de placa, cuya descripción, para cada estudio, se detalla en el apartado de material y métodos. La razón para ello es que el modelo experimental 2 es a corto plazo y, por tanto, el impacto de la inflamación de los tejidos cuenta con muy poco recorrido en el tiempo y el modelo experimental 3 es un modelo de estudio basado en depósito de nueva placa. En el modelo experimental 1.2 la

variable respuesta principal son los recuentos bacterianos en las muestras salivales.

Las variables secundarias fueron el índice gingival, las unidades formadoras de colonias, el porcentaje de flora y la frecuencia de detección de patógenos, respecto a variables microbiológicas y el grado de tinción, así como la tolerabilidad clínica respecto a variables de seguridad.

### **Efecto del tratamiento y precisión de resultados**

La importancia clínica de un tratamiento se valora mediante la magnitud del efecto hallado y la precisión de los resultados (Guyatt y cols. 1994).

Los ensayos clínicos, al trabajar con muestras limitadas de población, obtienen estimaciones sobre el efecto de los tratamientos en esos pacientes concretos. Interesa conocer, por tanto, cuál será la estimación del efecto del tratamiento en la población general. Por ello, además de conocer la magnitud del efecto, es necesario conocer la precisión de esa estimación a través de los intervalos de confianza, que se refieren al intervalo dentro del que se encuentra la verdadera magnitud del efecto con un grado prefijado de seguridad. Cuanto más estrecho sea el intervalo de confianza, mayor es la precisión con la que se estima el efecto. La precisión de una medida, además de poderse conocer a través de los intervalos de confianza, también puede expresarse numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica o la varianza. Por ello, cuanto más estrecha sea la distribución de resultados, menor será la desviación típica de la misma y mayor la precisión de la medida. La precisión depende pues, únicamente, de la distribución de los resultados (CEM 2014).

## **Aplicabilidad**

La valoración de la aplicabilidad de los resultados de un ensayo clínico concreto a nuestra población susceptible del tratamiento debe incluir la reproducibilidad de los resultados, el análisis de todas las variables clínicamente importantes y la relación entre los beneficios y los perjuicios y costes.

Como ya se ha puesto de manifiesto, el ensayo clínico controlado aleatorizado es el mejor diseño para demostrar y comparar la eficacia de los tratamientos. Este tipo de diseño tiene una gran validez interna. Pero las características “ideales” en las que se desarrollan limitan su aplicabilidad o validez externa. Una forma de valorar la aplicabilidad de los resultados de un ensayo al paciente individual es comprobar si sus características se ajustan a las de los pacientes incluidos en el estudio. Si nuestro paciente hubiera podido formar parte del ensayo clínico. Si cumple todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión y si sus características son similares a las que se muestran en las características basales de los pacientes analizados en el ensayo clínico. Si es así, los resultados podrían ser aplicables. Si no es así, habría que preguntarse si las diferencias influirían de forma decisiva en los resultados.

La reproducibilidad de los resultados debe considerar también si la actuación terapéutica analizada es técnicamente aplicable en el medio en el que trabajamos. Esto es especialmente importante cuando se trata de nuevos tratamientos, sobre todo aquellos que requieren recursos o aprendizaje especializados. Para decidir la aplicabilidad de los resultados de un ensayo clínico debe realizarse un análisis final de los beneficios que aporta el tratamiento frente a los perjuicios y costes.

Se debe tener en cuenta que, incluso antes de cualquier consideración de criterios de inclusión o de exclusión, los individuos potencialmente seleccionados son ya poco representativos de los individuos de la comunidad local, lo que puede restar validez externa al estudio. La validez externa de un ensayo clínico aleatorizado también depende de si los resultados han sido clínicamente

relevantes (Rothwell 2005). A este respecto, se ha podido realizar un meta-análisis de 7 artículos, dentro de una revisión sistemática, que compara si existen diferencias estadísticamente significativas entre el uso de clorhexidina como antimicrobiano al 0.12% y al 0.2% en individuos sanos, dando como resultado pequeñas diferencias en la inhibición de placa a favor de 0.2% respecto a 0.12%. Sin embargo, la relevancia clínica de esta diferencia es probablemente insignificante (Berchier y cols. 2010).

De hecho, los resultados de ensayos clínicos aleatorizados y revisiones sistemáticas sugieren que la higiene oral doméstica con toda una variedad de ayudas, tanto mecánicas como químicas, puede influir positivamente en el grado de éxito que los pacientes pueden tener en el control de placa y la inflamación gingival. Sin embargo, en la mayoría de los estudios, los autores cuestionaron la importancia clínica de los pequeños cambios que se encontraron, a pesar del hecho de que fueron estadísticamente significativos. Se necesitan más estudios para confirmar clínicamente que el autocuidado diario regular y el uso de estos agentes coadyuvantes se traducirá en una menor prevalencia y severidad de la enfermedad periodontal (Drisko 2013).

### **Evaluación específica de formulaciones para el control químico de placa**

Según la Agencia para la Investigación y Calidad de Estados Unidos (*US Agency for Healthcare Research and Quality*), el más elevado posicionamiento en la escala de evidencia científica lo ocupa la revisión sistemática con meta-análisis, cuya evidencia proviene de ensayos controlados y aleatorizados bien diseñados (AHRQ 2015). El objetivo principal de cualquier ensayo clínico aleatorizado es evaluar la eficacia comparativa de diversos tratamientos, teniendo en cuenta que, metodológicamente, presenta una alta validez interna debida al control que se puede establecer sobre los distintos sesgos.

Una revisión sistemática con meta-análisis es un estudio basado en la integración estructurada y sistemática de la información obtenida en diferentes

estudios clínicos, sobre un problema de salud determinado. Consiste en identificar y revisar los estudios controlados sobre un determinado problema, con el fin de dar una estimación cuantitativa sintética de todos los estudios disponibles. Dado que incluye un número mayor de observaciones, una revisión sistemática con meta-análisis tiene un poder estadístico superior al de los ensayos clínicos que incluye.

Con este razonamiento, la metodología que se ha aplicado en todos y cada uno de los modelos experimentales efectuados se basa en las características de los estudios que previamente han sido realizados por otros autores con la finalidad de comparar productos de higiene oral en colutorio y que, posteriormente, se han incluido en revisiones sistemáticas con meta-análisis, como los realizados por Gunsolley (Gunsolley 2006) o más recientemente por Van Strydonck y cols. (Van Strydonck y cols. 2012) o por Serrano y cols. (Serrano y cols. 2015), esta última presentada en el *Workshop* europeo sobre prevención de enfermedades periodontales y periimplantarias.

En los cuatro modelos experimentales presentados, se ha podido comprobar que las formulaciones a prueba tienen actividad antimicrobiana (modelos experimentales 1.1 y 1.2) o frente a la placa (modelos experimentales 2 y 3) demostrada y estadísticamente significativa sin, además, incrementar las resistencias de las distintas cepas evaluadas. A esto se puede añadir una explicación. Los antisépticos orales afectan a un amplio espectro de microorganismos y tienen mecanismos no específicos antimicrobianos, que afectan a una gran variedad de dianas en la célula microbiana, inhibiendo así una cierta cantidad de procesos celulares. Esta es probablemente la razón principal para la falta de desarrollo de resistencias bacterianas a los antisépticos. Las mutaciones puntuales en el microorganismo pueden afectar a uno de los mecanismos de acción de un antiséptico dado, pero rara vez se traduciría en la resistencia a todos los mecanismos. De hecho, varios estudios han examinado la seguridad microbiológica a largo plazo de dentífricos y enjuagues bucales que contienen agentes antiplaca y ninguno de ellos han informado de la aparición de infecciones oportunistas, el

crecimiento excesivo de bacterias patógenas o el desarrollo de especies resistentes (Sreenivasan y Gaffar 2002).

Además de la eficacia antimicrobiana evaluada en el laboratorio, la disminución de la carga bacteriana en el biofilm oral se ha traducido en eficacia clínica, como así se demuestra a través de la significación estadística en las diferencias de los valores que miden la cuantía de los depósitos bacterianos a través de los índices de placa. Sin embargo, en los diseños llevados a cabo no se ha podido demostrar que los antimicrobianos a prueba tengan eficacia en el desarrollo de la gingivitis, ya que los resultados obtenidos a través de las variables que registraban este efecto, no lograron significación estadística.

A pesar de cumplir cada uno de los estudios con los requisitos exigibles a un ensayo clínico, los estudios que intentan determinar los efectos de los colutorios sobre la formación de placa están limitados no solo por el número de componentes en la formulación, sino también por la acción mecánica del cepillado (Addy y cols. 1983). Los métodos de estudio a corto plazo demuestran una reducción significativa en la formación de placa en ausencia de cepillado (Barnett 2006) y, por tanto, dichos modelos de nueva formación de placa como el llevado a cabo en el tercer ensayo clínico aportado (modelo experimental 3), propuestos por primera vez hace ya unas décadas (Addy y cols. 1983), son capaces de demostrar el verdadero efecto antiplaca de los productos a prueba.

Por otro lado, el uso prolongado de agentes antimicrobianos como coadyuvantes al control de placa mecánico plantea dos preocupaciones principales con respecto a la seguridad: el desarrollo de microorganismos resistentes y el riesgo de cáncer oral asociado con el contenido de alcohol de las formulaciones de enjuague bucal. En los párrafos anteriores se hace referencia a la escasa incidencia de resistencias microbianas en el uso de productos químicos de higiene oral diaria. Sin embargo, diferentes cuestiones se han evaluado respecto a la interacción del alcohol contenido en los colutorios con el organismo, como si altera o no la permeabilidad mucosa, si causa daño celular o en definitiva, aumenta el riesgo de cáncer oral.

Una revisión de los estudios que sugiere una correlación entre los enjuagues bucales que contienen alcohol y el cáncer oral, realizada por la Asociación Dental Americana (ADA) y por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) concluyó que estos estudios presentan varias deficiencias (Claffey 2003). Entre los problemas detectados en los estudios se observó la no exclusión de los sujetos bajo el consumo de bebidas alcohólicas o fumadores y la inclusión del cáncer faríngeo en el análisis, dado que la exposición oral a los enjuagues bucales no tiene por qué afectar a la faringe. Como ya se reflejó anteriormente, no existe en la actualidad apoyo en la literatura científica para afirmar que exista una asociación entre los colutorios que contienen alcohol y el cáncer orofaríngeo (Elmore y Horwitz 1995, Cole y cols. 2003).

El riesgo carcinogénico es dependiente del nivel de exposición al producto en términos de la cantidad a la que el sujeto es expuesto y la duración de la exposición. El etanol se metaboliza por el organismo produciéndose acetaldehído (NIAAA 2015), siendo éste identificado como carcinógeno. Este compuesto aparece de forma natural en muchas comidas, de manera que la cantidad diaria de acetaldehído ingerida a través de la comida, bebidas y otras fuentes es mucho mayor que con los colutorios según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA 2010).

Incluso cuando los colutorios se usan dos veces al día, la exposición total al acetaldehído es despreciable en comparación con la exposición derivada del consumo de comidas y bebidas alcohólicas. A diferencia de lo que ocurre con la ingesta de bebidas alcohólicas, con el uso de colutorios orales se ingiere una cantidad mínima de etanol, de modo que muy poca cantidad de acetaldehído retorna a la saliva desde el hígado, lo que ayuda a explicar la gran diferencia significativa en términos de exposición al acetaldehído y, por tanto, en el riesgo carcinogénico (Homann y cols. 1997, Salaspuro y cols. 2002, Polesel y cols. 2005, Lachenmeier y cols. 2009).

Se han realizado estudios *in vitro* sobre un modelo de mucosa oral utilizado durante años para investigar su patología, examinando el transporte de químicos a

través del tejido oral. De ellos se deriva la observación de que el pretratamiento de este modelo de mucosa oral con 26.9% de etanol en condiciones que simulan un enjuague no tiene efecto sobre la permeabilidad de la mucosa (Koschier y cols. 2011). Estos tratamientos no tuvieron efectos adversos sobre la viabilidad celular y la histología tisular, es decir, no producen daño citotóxico significativo (Moharamzadeh y cols. 2009).

El análisis cuantitativo de 18 estudios epidemiológicos publicados sobre el uso de colutorios y malignidad oral (Gandini y cols. 2012) permite concluir que no se detectó asociación estadísticamente significativa entre el uso de colutorio con alcohol y riesgo de cáncer oral, incluyendo una tendencia no significativa de riesgo con el aumento del uso diario. Estas conclusiones están en concordancia con otras revisiones de la literatura previas (Cole y cols. 2003, La 2009) en las que se afirma que la evidencia epidemiológica disponible descarta un vínculo entre el uso de colutorios con alcohol y cáncer oral.

A pesar de todo ello, en el modelo experimental 1.1 y 1.2, la introducción de un agente activo adicional, como es el cloruro de cetilpiridinio, ha demostrado que se consigue mantener una alta actividad antimicrobiana, ya que la presencia o no de alcohol resultó ser un factor importante para la actividad de estos productos, de forma que dicha posibilidad ya se reflejaba en nuestra hipótesis de trabajo para el primer artículo. Es decir, de las cinco formulaciones comparadas, las que no contenían alcohol fueron menos efectivas, excepto la que combinaba clorhexidina al 0.12% y cloruro de cetilpiridinio al 0.05%, que demostró mayor eficacia tanto *in vitro* como *in vivo*. El hecho de elegir como sustituto del alcohol un antimicrobiano como el cloruro de cetilpiridinio (además de otras modificaciones necesarias en la formulación), está basado en que se trata de un miembro monocatiónico de la familia de amonios cuaternarios que se adsorbe fácilmente sobre las superficies orales. Sin embargo, tiene una sustantividad limitada (Roberts y Addy 1981). Es un agente catiónico de superficie activa con un amplio espectro antimicrobiano capaz de destruir patógenos gram-positivos y hongos en particular. Se sugiere que la interacción con la bacteria ocurre mediante la alteración de la función de la membrana, fuga de material citoplasmático y, en última instancia, el colapso del

equilibrio intracelular (Pitten y Kramer 2001). Este agente antimicrobiano ha demostrado una mejora estadísticamente significativa en los índices de placa y gingivitis (Haps y cols. 2008). No solo ha demostrado eficacia, sino también seguridad como agente inhibitorio de la placa en un rango de concentraciones entre 0.045 y 0.1%, pero existe una gran variedad de resultados dependiendo de las distintas formulaciones (Gunsolley 2006). La evidencia existente sugiere que los enjuagues bucales a base de cloruro de cetilpiridinio, cuando se utiliza como complemento a la higiene bucal, ya sea con o sin supervisión, proporcionan un beneficio pequeño pero significativo adicional en la reducción de la acumulación de placa y la inflamación gingival (Haps y cols. 2008).

La estrategia de disminuir la concentración de antimicrobianos como la clorhexidina para minimizar los efectos secundarios que la evidencia científica le atribuye, no tuvo éxito en cuanto a los resultados del segundo modelo experimental, ya que las diferencias fueron estadísticamente significativas en cuanto a grado de tinción de superficies para el colutorio a prueba.

Otros estudios posteriores están en concordancia con nuestros resultados (Quiryneen y cols. 2005, Escribano y cols. 2010, Garcia y cols. 2011), en cuanto a que la sustitución de alcohol en una formulación por el cloruro de cetilpiridinio no disminuyó la actividad antibacteriana, a pesar de que la concentración de clorhexidina (0.05%) fue reducida por debajo del umbral de 0.10%, nivel mínimo sugerido para una óptima actividad antibacteriana (Jenkins y cols. 1994b, Smith y cols. 1995, Ernst y cols. 1998).

La información extraída de alguno de los ensayos clínicos (Quiryneen y cols. 2005) que prueban clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio a bajas concentraciones (0.05%) se considera muy relevante en cuanto a efectividad y seguridad se refiere, puesto que su duración es de 6 meses, lo que se considera imprescindible para considerar como eficaz y seguro un producto de higiene oral, según las directrices de instituciones de referencia tan importantes como la ADA (Council on Dental Therapeutics 1986).

Por último, respecto a la aplicación de los resultados en la población clínica específica, cabe destacar que dicha población - a la que va dirigida la prescripción de los antimicrobianos a prueba- estará formada, en gran medida, por individuos sanos en los que se pretende un papel preventivo en la patología derivada del depósito de biofilms bacterianos. De esta forma, tanto el modelo experimental 1.2 como el 3 incluyen individuos sin problemas periodontales. En el modelo experimental 2, sin embargo, se seleccionaron pacientes en fase de cuidados periodontales de soporte, ya que la muestra precisaba ser representativa de la población a la que va dirigida la nueva formulación a prueba, es decir, pacientes con patología periodontal que necesitan un control etiológico de su enfermedad, minimizando los efectos secundarios que los productos químicos coadyuvantes les pudieran ocasionar.

Como se ha señalado anteriormente en el análisis de la aplicabilidad de los estudios aportados, el grado en que cada diseño permite la generalización se refiere a los aspectos relativos a la validez externa.

Desde un punto de vista metodológico, el mejor diseño experimental es aquel que excluye las explicaciones alternativas de los resultados. Idealmente, los resultados de un experimento tendrán sólo una interpretación. Cualquier factor o fuente que no sea la variable independiente y que pudiera explicar los resultados es una amenaza para la validez interna. Ya que los resultados que se extraen de cada uno de los modelos experimentales aportados pueden ser atribuidos inequívocamente a las variables independientes descritas, se puede afirmar que los estudios son internamente válidos.

CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. De manera general, se puede concluir que el tipo de modelo de investigación aplicado en los estudios incluidos (actividad antibacteriana *in vitro*, actividad antibacteriana *in vivo* en saliva, ensayo clínico aleatorizado, modelo de formación de nueva placa), no resta validez a los resultados que se derivan de los mismos. Por tanto, se puede afirmar que si el modelo experimental está bien diseñado, la validez de los resultados que aporta es inequívoca.
2. Tanto el modelo *in vitro* mediante el test de contacto breve como el modelo *in vivo* de recuentos salivales han demostrado su validez para comparar la actividad microbiana de enjuagues comerciales que incluyen clorhexidina al 0.12% en su formulación. Las formulaciones sin alcohol fueron menos efectivas, tanto *in vitro* como *in vivo*, con la excepción del producto reformulado con cloruro de cetilpiridinio.
3. El colutorio que combina clorhexidina al 0.12% y cloruro de cetilpiridinio al 0.05% fue el único que demostró eficacia *in vitro* contra todas las cepas evaluadas -periodonto patógenos específicos y especies cariogénicas-.
4. De las cuatro formulaciones con clorhexidina al 0.12% comparadas, la formulación en la que se combinaba con cloruro de cetilpiridinio, mostró la mayor eficacia *in vivo* para mantener la disminución de bacterias en saliva.
5. Un diseño de ensayo clínico aleatorizado, con dos semanas de seguimiento, en pacientes bajo cuidados periodontales de soporte, permitió concluir que un colutorio con una baja concentración de clorhexidina (0.05%) y cloruro de cetilpiridinio, tenía actividad inhibitoria de placa, así como efecto sobre la microflora anaeróbica subgingival total.
6. Un diseño de modelo cruzado, evaluando la formación de nueva placa, permitió concluir que el producto que combinaba bencidamina y cloruro de cetilpiridinio demostró una actividad inhibitoria de la placa superior

comparado con una formulación con cloruro de cetilpiridinio solo, y mostró un menor incremento de diferentes patógenos bacterianos específicos asociados con gingivitis. Sin embargo, no se pudo demostrar un efecto antiinflamatorio directo y significativo.

## BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- AAP (2015) *American Academy of Periodontology*. URL <http://www.perio.org> [acceso 31 Agosto 2015].
- Aartman, I.H. y van, L.C. (2007) [Research designs and levels of evidence]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 114, 161-165.
- ADA (2007) *American Dental Association*. URL <http://www.ada.org> [acceso 14 Enero 2015].
- Addy M., M.J.y.W.W. (1994) Chemical plaque control in the prevention of gingivitis and periodontitis. ed. Lang NP, K.T., pp. 244-257. London: Quintessence Publishing.
- Addy, M. (1986) Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *J Clin Periodontol* 13, 957-964.
- Addy, M. (1995) Evaluation of clinical trials of agents and procedures to prevent caries and periodontal disease: choosing products and recommending procedures. *Int Dent J* 45, 185-196.
- Addy, M., Moran, J. y Newcombe, R.G. (2007) Meta-analyses of studies of 0.2% delmopinol mouth rinse as an adjunct to gingival health and plaque control measures. *J Clin Periodontol* 34, 58-65.
- Addy, M. y Moran, J.M. (1997a) Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontol 2000* 15, 52-54.
- Addy, M. y Moran, J.M. (1997b) Evaluation of oral hygiene products: science is true; don't be misled by the facts. *Periodontol 2000* 15, 40-51.
- Addy, M., Sharif, N. y Moran, J. (2005) A non-staining chlorhexidine mouthwash? Probably not: a study in vitro. *Int J Dent Hyg* 3, 59-63.
- Addy, M., Willis, L. y Moran, J. (1983) Effect of toothpaste rinses compared with chlorhexidine on plaque formation during a 4-day period. *J Clin Periodontol* 10, 89-99.
- Addy, M. y Wright, R. (1978) Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of providone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 5, 198-205.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2015) *Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS* . URL

- <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm>  
[acceso 14 Enero 2015].
- Agerbaek, N., Melsen, B. y Rolla, G. (1975) Application of chlorhexidine by oral irrigation systems. *Scand J Dent Res* 83, 284-287.
- AHRQ (2015) *Agency for Healthcare Research and Quality's* . URL <http://www.ahrq.gov> [acceso 14 Enero 2015].
- Ainamo, J., Barmes, D., Beagrie, G., Cutress, T., Martin, J. y Sardo-Infirri, J. (1982) Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). *Int Dent J* 32, 281-291.
- Albandar, J.M., Brunelle, J.A. y Kingman, A. (1999) Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 70, 13-29.
- Albandar, J.M., Buischi, Y.A., Oliveira, L.B. y Axelsson, P. (1995) Lack of effect of oral hygiene training on periodontal disease progression over 3 years in adolescents. *J Periodontol* 66, 255-260.
- Albandar, J.M. y Kingman, A. (1999) Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 70, 30-43.
- Albandar, J.M. y Rams, T.E. (2002) Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol 2000* 29, 7-10.
- Albandar, J.M. y Tinoco, E.M. (2002) Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000* 29, 153-176.
- Arakawa, H., Karasawa, K., Igarashi, T., Suzuki, S., Goto, N. y Maeda, M. (2004) Detection of cariogenic bacteria genes by a combination of allele-specific polymerase chain reactions and a novel bioluminescent pyrophosphate assay. *Anal Biochem* 333, 296-302.
- Artnik, B., Premik, M. y Zaletel-Kragelj, L. (2008) Population groups at high risk for poor oral self care: the basis for oral health promotion. *Int J Public Health* 53, 195-203.
- Arweiler, N.B., Auschill, T.M., Baguley, N., Netuschil, L. y Sculean, A. (2003) Efficacy of an amine fluoride-triclosan mouthrinse as compared to the individual active ingredients. *J Clin Periodontol* 30, 192-196.

- Auschill, T.M., Arweiler, N.B., Netuschil, L., Brex, M., Reich, E. y Sculean, A. (2001) Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 46, 471-476.
- Axelsson, P., Albandar, J.M. y Rams, T.E. (2002) Prevention and control of periodontal diseases in developing and industrialized nations. *Periodontol* 2000 29, 235-246.
- Axelsson, P. y Lindhe, J. (1978) Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 5, 133-151.
- Axelsson, P. y Lindhe, J. (1987) Efficacy of mouthrinses in inhibiting dental plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol* 14, 205-212.
- Bakdash, B. (1995) Current patterns of oral hygiene product use and practices. *Periodontol* 2000 8, 11-14.
- Balbuena, L., Stambaugh, K.I., Ramirez, S.G. y Yeager, C. (1998) Effects of topical oral antiseptic rinses on bacterial counts of saliva in healthy human subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118, 625-629.
- Barnett, M.L. (2006) The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc* 137 Suppl, 16S-21S.
- Beals, D., Ngo, T., Feng, Y., Cook, D., Grau, D.G. y Weber, D.A. (2000) Development and laboratory evaluation of a new toothbrush with a novel brush head design. *Am J Dent* 13, 5A-14A.
- Beck, J.D. (1994) Methods of assessing risk for periodontitis and developing multifactorial models. *J Periodontol* 65, 468-478.
- Beck, J.D., Koch, G.G. y Offenbacher, S. (1995) Incidence of attachment loss over 3 years in older adults-new and progressing lesions. *Community Dent Oral Epidemiol* 23, 291-296.
- Beck, J.D., Koch, G.G., Rozier, R.G. y Tudor, G.E. (1990) Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *J Periodontol* 61, 521-528.
- Begg, C., Cho, M., Eastwood, S., Horton, R., Moher, D., Olkin, I., Pitkin, R., Rennie, D., Schulz, K.F., Simel, D. y Stroup, D.F. (1996) Improving the quality of reporting of randomized controlled trials. The CONSORT statement. *JAMA* 276, 637-639.

- Berchier, C.E., Slot, D.E. y Van der Weijden, G.A. (2010) The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol* 37, 829-839.
- Bernardi, F., Pincelli, M.R., Carloni, S., Gatto, M.R. y Montebugnoli, L. (2004) Chlorhexidine with an Anti Discoloration System. A comparative study. *Int J Dent Hyg* 2, 122-126.
- Bizarra, F. y Ribeiro, S. (2009) Improving toothbrushing behaviour in an institution for the disabled in Lisbon, Portugal. *Int J Dent Hyg* 7, 182-187.
- Blanc, V., Isabal, S., Sanchez, M.C., Llama-Palacios, A., Herrera, D., Sanz, M. y Leon, R. (2014) Characterization and application of a flow system for in vitro multispecies oral biofilm formation. *J Periodontal Res* 49, 323-332.
- Boles, B.R., Thoendel, M. y Singh, P.K. (2004) Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 101, 16630-16635.
- Bonesvoll, P. y Gjermo, P. (1978) A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol* 23, 289-294.
- Bonesvoll, P., Lokken, P., Rolla, G. y Paus, P.N. (1974) Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol* 19, 209-212.
- Borgnakke, W.S., Ylostalo, P.V., Taylor, G.W. y Genco, R.J. (2013) Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S135-S152.
- Boutaga, K., Savelkoul, P.H., Winkel, E.G. y van Winkelhoff, A.J. (2007) Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 78, 79-86.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M. y Savelkoul, P.H. (2006) The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 33, 427-433.
- Bozkurt, F.Y., Ozturk, M. y Yetkin, Z. (2005) The effects of three oral sprays on plaque and gingival inflammation. *J Periodonto* 76, 1654-1660.

- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L. y Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13, 20-26.
- Bravo-Pérez M., C.-P.E.C.-M.F.J.L.-C.J.C.Á.-A.I.y.H.-S.P. (2005) Encuesta de Salud Oral en España. *RCOE* 11, 409-456.
- Brecx, M. (1997) Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontol 2000* 15, 100-108.
- Brecx, M.C., Frohlicher, I., Gehr, P. y Lang, N.P. (1988) Stereological observations on long-term experimental gingivitis in man. *J Clin Periodontol* 15, 621-627.
- Breeuwer, P. y Abee, T. (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* 55, 193-200.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. y Dubois-Brissonnet, F. (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 27, 1017-1032.
- Brown, L.J. y Löe, H. (1993) Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000* 2, 57-71.
- Caldwell, D.E., Atuku, E., Wilkie, D.C., Wivcharuk, K.P., Karthikeyan, S., Korber, D.R., Schmid, D.F. y Wolfaardt, G.M. (1997) Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. *Adv Dent Res* 11, 4-13.
- Cancro, L.P. y Fischman, S.L. (1995) The expected effect on oral health of dental plaque control through mechanical removal. *Periodontol 2000* 8, 60-74.
- Caso, A., Hung, L.K. y Beirne, O.R. (2005) Prevention of alveolar osteitis with chlorhexidine: a meta-analytic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99, 155-159.
- CEM (2014) *e-medida Revista Española de Metrología. Centro Español de Metrología; Ministerio de Industria, Energía y Turismo*. URL <http://www.e-medida.es> [acceso 11 Mayo 2015].
- Chapple, I.L. y Genco, R. (2013) Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S106-S112.
- Chapple, I.L., Van der Weijden, F., Doerfer, C., Herrera, D., Shapira, L., Polak, D., Madianos, P., Louropoulou, A., Machtei, E., Donos, N., Greenwell, H., van Winkelhoff, A.J., Eren, K.B., Arweiler, N., Teughels, W., Aimetti, M., Molina, A.,

- Montero, E. y Graziani, F. (2015) Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S71-S76.
- Charles, C.H., Mostler, K.M., Bartels, L.L. y Mankodi, S.M. (2004) Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol* 31, 878-884.
- Chaves, E.S., Kornman, K.S., Manwell, M.A., Jones, A.A., Newbold, D.A. y Wood, R.C. (1994) Mechanism of irrigation effects on gingivitis. *J Periodontol* 65, 1016-1021.
- Chen, F. y Cushion, M.T. (1994) Use of an ATP bioluminescent assay to evaluate viability of *Pneumocystis carinii* from rats. *J Clin Microbiol* 32, 2791-2800.
- Chen, X., Wolff, L., Aeppli, D., Guo, Z., Luan, W., Baelum, V. y Fejeskov, O. (2001) Cigarette smoking, salivary/gingival crevicular fluid cotinine and periodontal status. A 10-year longitudinal study. *J Clin Periodontol* 28, 331-339.
- Chilton, N.W. y Fleiss, J.L. (1986) Design and analysis of plaque and gingivitis clinical trials. *J Clin Periodontol* 13, 400-410.
- Chlebicki, M.P. y Safdar, N. (2007) Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *Crit Care Med* 35, 595-602.
- Ciancio, S.G. (1995) Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. *Periodontol 2000* 8, 75-86.
- Claffey, N. (2003) Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *J Clin Periodontol* 30 Suppl 5, 22-24.
- Claydon, N.C. (2008) Current concepts in toothbrushing and interdental cleaning. *Periodontol 2000* 48, 10-22.
- Clerehugh, V., Worthington, H., Clarkson, J. y Davies, T.G. (1989) The effectiveness of two test dentifrices on dental plaque formation: a 1-week clinical study. *Am J Dent* 2 Spec No, 221-224.
- Cole, P., Rodu, B. y Mathisen, A. (2003) Alcohol-containing mouthwash and oropharyngeal cancer: a review of the epidemiology. *J Am Dent Assoc* 134, 1079-1087.

- Collaert, B., Attstrom, R., De, B.H. y Mover, R. (1992) The effect of delmopinol rinsing on dental plaque formation and gingivitis healing. *J Clin Periodontol* 19, 274-280.
- CONSORT (2015) *Consolidado Normas of Reporting Trials*. URL <https://www.consort-statement.org> [acceso 14 Enero 2015].
- Cooke, B.E. y Armitage, P. (1960) Recurrent Mikulicz's aphthae treated with topical hydrocortisone hemisuccinate sodium. Double-blind controlled clinical trial. *Br Med J* 1, 764-766.
- Corbin, A., Pitts, B., Parker, A. y Stewart, P.S. (2011) Antimicrobial penetration and efficacy in an in vitro oral biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 3338-3344.
- Cortellini, P., Labriola, A., Zambelli, R., Prato, G.P., Nieri, M. y Tonetti, M.S. (2008) Chlorhexidine with an anti discoloration system after periodontal flap surgery: a cross-over, randomized, triple-blind clinical trial. *J Clin Periodontol* 35, 614-620.
- Costa, X., Laguna, E., Herrera, D., Serrano, J., Alonso, B. y Sanz, M. (2013) Efficacy of a new mouth rinse formulation based on 0.07% cetylpyridinium chloride in the control of plaque and gingivitis: a 6-month randomized clinical trial. *J Clin Periodonto* 40, 1007-1015.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. y Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711-745
- Council on Dental Therapeutics (1986) Guidelines for acceptance of chemotherapeutic products for the control of supragingival dental plaque and gingivitis. pp. 529-532.
- Cousido, M.C., Tomas, C., I, Garcia-Caballero, L., Limeres, J., Alvarez, M. y Diz, P. (2010) In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig* 14, 397-402.
- Cowell, C.R., Saxton, C.A., Sheiham, A. y Wagg, B.J. (1975) Testing therapeutic measures for controlling chronic gingivitis in man: a suggested protocol. *J Clin Periodontol* 2, 231-240.
- Cumming, B.R. y Loe, H. (1973) Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. *J Periodontal Res* 8, 57-62.

- Cummins, D. (1997) Vehicles: how to deliver the goods. *Periodontol 2000* 15, 84-99.
- Cummins, D. y Creeth, J.E. (1992) Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels, and mouthwashes. *J Dent Res* 71, 1439-1449.
- D'Aiuto, F., Orlandi, M. y Gunsolley, J.C. (2013) Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and CVD outcomes. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S85-105.
- D'Arcangelo, C. y Varvara, G. (1998) [A comparative in-vitro study of the bactericidal efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate plus cetrimide on root canal anaerobic bacterial flora]. *Minerva Stomatol* 47, 381-386.
- Davey, M.E. y O'toole, G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847-867.
- Davies, D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2, 114-122.
- Dawes C, J.G.y.T.CH. (1963) The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. *Br Dent J* 16, 65-68.
- De Assis, D.F., Prado, M. y Simao, R.A. (2011) Evaluation of the interaction between endodontic sealers and dentin treated with different irrigant solutions. *J Endod* 37, 1550-1552.
- DePaola, L.G., Overholser, C.D., Meiller, T.F., Minah, G.E. y Niehaus, C. (1989) Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol* 16, 311-315.
- Dickinson, K., Bunn, F., Wentz, R., Edwards, P. y Roberts, I. (2000) Size and quality of randomised controlled trials in head injury: review of published studies. *BMJ* 320, 1308-1311.
- Dietrich, T., Sharma, P., Walter, C., Weston, P. y Beck, J. (2013) The epidemiological evidence behind the association between periodontitis and incident atherosclerotic cardiovascular disease. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S70-S84.
- Donlan, R.M. y Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193.

- Drescher, K., Dunkel, J., Cisneros, L.H., Ganguly, S. y Goldstein, R.E. (2011) Fluid dynamics and noise in bacterial cell-cell and cell-surface scattering. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 108, 10940-10945.
- Drisko, C.L. (2013) Periodontal self-care: evidence-based support. *Periodontol 2000* 62, 243-255.
- Ebo, D.G., Stevens, W.J., Bridts, C.H. y Matthieu, L. (1998) Contact allergic dermatitis and life-threatening anaphylaxis to chlorhexidine. *J Allergy Clin Immunol* 101, 128-129.
- Edres, M.A., Scully, C. y Gelbier, M. (1997) Use of proprietary agents to relieve recurrent aphthous stomatitis. *Br Dent J* 182, 144-146.
- EFSA (2010) European Food Safety Authority. Committee for Cosmetics: Protocol Meeting 5<sup>th</sup>.
- Eick, S., Goltz, S., Nietzsche, S., Jentsch, H. y Pfister, W. (2011) Efficacy of chlorhexidine digluconate-containing formulations and other mouthrinses against periodontopathogenic microorganisms. *Quintessence Int* 42, 687-700.
- Ellepola, A.N. y Samaranayake, L.P. (2001) Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis* 7, 11-17.
- Elmore, J.G. y Horwitz, R.I. (1995) Oral cancer and mouthwash use: evaluation of the epidemiologic evidence. *Otolaryngol Head Neck Surg* 113, 253-261.
- Elstein, A.S. (2004) On the origins and development of evidence-based medicine and medical decision making. *Inflamm Res* 53 Suppl 2, S184-S189.
- Elter, J.R., Beck, J.D., Slade, G.D. y Offenbacher, S. (1999) Etiologic models for incident periodontal attachment loss in older adults. *J Clin Periodontol* 26, 113-123.
- Elworthy, A., Greenman, J., Doherty, F.M., Newcombe, R.G. y Addy, M. (1996) The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol* 67, 572-576.
- Engbretson, S. y Kocher, T. (2013) Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S153-S163.

- Ernst, C.P., Prockl, K. y Willershausen, B. (1998) The effectiveness and side effects of 0.1% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses: a clinical study. *Quintessence Int* 29, 443-448.
- Escribano, M., Herrera, D., Morante, S., Teughels, W., Quirynen, M. y Sanz, M. (2010) Efficacy of a low-concentration chlorhexidine mouth rinse in non-compliant periodontitis patients attending a supportive periodontal care programme: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 37, 266-275.
- Fauli, C. (1993) *Tratado de Farmacia Galénica*. Madrid.
- FDA (2011) *Food and Drug Administration Official Information, side effect and Uses 2011*. URL <http://www.drugs.com/pro/Chlorhexidine.html> [acceso 14 Enero 2015].
- FDI Commission. (1999) Guidance on the assessment of the efficacy of toothpastes. Work Project (8-95). *Int Dent J* 49, 311-316.
- Fedorowicz, Z., Aljufairi, H., Nasser, M., Outhouse, T.L. y Pedrazzi, V. (2008) Mouthrinses for the treatment of halitosis. *Cochrane Database Syst Rev* CD006701.
- Ferguson, D.B., Marley, J.T. y Hartwell, G.R. (2003) The effect of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: long-term results. *J Endod* 29, 91-94.
- Filoche, S., Wong, L. y Sissons, C.H. (2010) Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 89, 8-18.
- Fine, D.H. (1995) Chemical agents to prevent and regulate plaque development. *Periodontol 2000* 8, 87-107.
- Fine, D.H., Furgang, D. y Barnett, M.L. (2001) Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 28, 697-700.
- Fischman, S.L. (1997) The history of oral hygiene products: how far have we come in 6000 years? *Periodontol 2000* 15, 7-14.
- Flotra, L., Gjermo, P., Rolla, G. y Waerhaug, J. (1971) Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scand J Dent Res* 79, 119-125.
- Forward, G.C., James, A.H., Barnett, P. y Jackson, R.J. (1997) Gum health product formulations: what is in them and why? *Periodontol 2000* 15, 32-39.

- Foster, J.S. y Kolenbrander, P.E. (2004) Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol* 70, 4340-4348.
- Gandini, S., Negri, E., Boffetta, P., La, V.C. y Boyle, P. (2012) Mouthwash and oral cancer risk quantitative meta-analysis of epidemiologic studies. *Ann Agric Environ Med* 19, 173-180.
- Garcia, R.I. (2008) Mouthrinses and dentifrices are effective antigingivitis and antiplaque agents. *J Evid Based Dent Pract* 8, 13-14.
- Garcia, V., Rioboo, M., Serrano, J., O'Connor, A., Herrera, D. y Sanz, M. (2011) Plaque inhibitory effect of a 0.05% cetyl-pyridinium chloride mouth-rinse in a 4-day non-brushing model. *Int J Dent Hyg* 9, 266-273.
- Giertsen, E., Svaton, B. y Saxton, A. (1987) Plaque inhibition by hexetidine and zinc. *Scand J Dent Res* 95, 49-54.
- Gisbert, J.P. y Bonfil, X. (2004) [Systematic reviews and meta-analyses: how should they be performed, evaluated and used?]. *Gastroenterol Hepatol* 27, 129-149.
- Giuliana, G., Pizzo, G., Milici, M.E. y Giangreco, R. (1999) In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 87, 44-49.
- Gjerme, P., Baastad, K.L. y Rolla, G. (1970) The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *J Periodontal Res* 5, 102-109.
- Gjerme, P., Bonesvoll, P. y Rolla, G. (1974) Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 19, 1031-1034.
- Gjerme, P., Rolla, G. y Arskaug, L. (1973) Effect on dental plaque formation and some in vitro properties of 12 bis-biguanides. *J Periodontal Res Suppl* 12, 81-92.
- Goldenheim, P.D. (1993) In vitro efficacy of povidone-iodine solution and cream against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Postgrad Med J* 69 Suppl 3, S62-S65.
- Goodson, J.M. (1994) Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5, 142-168.

- Greenstein, G. (2002) Full-mouth therapy versus individual quadrant root planning: a critical commentary. *J Periodontol* 73, 797-812.
- Greenstein, G. (2004) Efficacy of full-mouth disinfection vs quadrant root planing. *Compend Contin Educ Dent* 25, 380-6, 388.
- Grossman, E., Meckel, A.H., Isaacs, R.L., Ferretti, G.A., Sturzenberger, O.P., Bollmer, B.W., Moore, D.J., Lijana, R.C. y Manhart, M.D. (1989) A clinical comparison of antibacterial mouthrinses: effects of chlorhexidine, phenolics, and sanguinarine on dental plaque and gingivitis. *J Periodontol* 60, 435-440.
- Guggenheim, B., Giertsen, E., Schupbach, P. y Shapiro, S. (2001) Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 80, 363-370.
- Gunsolley, J.C. (2006) A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc* 137, 1649-1657.
- Gunsolley, J.C. (2010) Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent* 38 Suppl 1, S6-10.
- Guyatt, G.H., Sackett, D.L. y Cook, D.J. (1994) Users' guides to the medical literature. II. How to use an article about therapy or prevention. B. What were the results and will they help me in caring for my patients? Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* 271, 59-63.
- Haapasalo, M. (2011) Can I use chlorhexidine as the only irrigating solution in my endodontic treatments? *Today's FDA* 23, 58-9, 61.
- Haffajee, A.D., Arguello, E.I., Ximenez-Fyvie, L.A. y Socransky, S.S. (2003) Controlling the plaque biofilm. *Int Dent J* 53 Suppl 3, 191-199.
- Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R.L., Jr. y Socransky, S.S. (1997) The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 24, 324-334.
- Haffajee, A.D. y Socransky, S.S. (2006) Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol* 2000 42, 7-12.
- Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Patel, M.R. y Song, X. (2008) Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 23, 196-205.
- Haisman-Welsh, R.J. y Thomson, W.M. (2012) Changes in periodontitis prevalence over two decades in New Zealand: evidence from the 1988 and 2009 national surveys. *N Z Dent J* 108, 134-138.

- Haps, S., Slot, D.E., Berchier, C.E. y Van der Weijden, G.A. (2008) The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 6, 290-303.
- Harper, P.R., Milsom, S., Wade, W., Addy, M., Moran, J. y Newcombe, R.G. (1995) An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products (II). Inhibition of salivary bacteria and plaque in vivo. *J Clin Periodontol* 22, 723-727.
- Harrap, G.J. (1974) Assessment of the effect of dentifrices on the growth of dental plaque. *J Clin Periodontol* 1, 166-174.
- Hase, J.C., Ainamo, J., Etemadzadeh, H. y Astrom, M. (1995) Plaque formation and gingivitis after mouthrinsing with 0.2% delmopinol hydrochloride, 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo for 4 weeks, following an initial professional tooth cleaning. *J Clin Periodontol* 22, 533-539.
- Hase, J.C., Edwardsson, S., Rundegren, J., Attstrom, R. y Kelty, E. (1998) 6-month use of 0.2% delmopinol hydrochloride in comparison with 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo (II). Effect on plaque and salivary microflora. *J Clin Periodontol* 25, 841-849.
- Helmerhorst, E.J., Hodgson, R., van 't, H.W., Veerman, E.C., Allison, C. y Nieuw Amerongen, A.V. (1999) The effects of histatin-derived basic antimicrobial peptides on oral biofilms. *J Dent Res* 78, 1245-1250.
- Helms, J.A., Della-Fera, M.A., Mott, A.E. y Frank, M.E. (1995) Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Arch Oral Biol* 40, 913-920.
- Herrera, D., Roldan, S., Santacruz, I., Santos, S., Masdevall, M. y Sanz, M. (2003) Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol* 30, 307-314.
- Hirschfeld, L. y Wasserman, B. (1978) A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol* 49, 225-237.
- Hjeljord, L.G., Rolla, G. y Bonesvoll, P. (1973) Chlorhexidine-protein interactions. *J Periodontal Res Suppl* 12, 11-16.
- Hoffmann, T., Bruhn, G., Richter, S., Netuschil, L. y Brex, M. (2001) Clinical controlled study on plaque and gingivitis reduction under long-term use of

- low-dose chlorhexidine solutions in a population exhibiting good oral hygiene. *Clin Oral Investig* 5, 89-95.
- Homann, N., Jousimies-Somer, H., Jokelainen, K., Heine, R. y Salaspuro, M. (1997) High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis* 18, 1739-1743.
- Hope, C.K. y Wilson, M. (2004) Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1461-1468.
- Hope, C.K. y Wilson, M. (2006) Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods* 66, 390-398.
- Hugoson, A. y Jordan, T. (1982) Frequency distribution of individuals aged 20-70 years according to severity of periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 10, 187-192.
- Hunt, R.J. (1987) The efficiency of half-mouth examinations in estimating the prevalence of periodontal disease. *J Dent Res* 66, 1044-1048.
- Hunt, R.J. y Fann, S.J. (1991) Effect of examining half the teeth in a partial periodontal recording of older adults. *J Dent Res* 70, 1380-1385.
- ISCIII (2013) *Instituto de Salud Carlos III. Declaración de Helsinki 2013*. URL <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-investigacion/fd-evaluacion/fd-evaluacion-etica-investigacion/Declaracion-Helsinki-2013-Esp.pdf> [acceso 14 Enero 2015].
- Jenkins, S., Addy, M. y Newcombe, R. (1993) Evaluation of a mouthrinse containing chlorhexidine and fluoride as an adjunct to oral hygiene. *J Clin Periodontol* 20, 20-25.
- Jenkins, S., Addy, M. y Newcombe, R.G. (1994a) A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 21, 441-444.
- Jenkins, S., Addy, M. y Newcombe, R.G. (1994b) Dose response of chlorhexidine against plaque and comparison with triclosan. *J Clin Periodontol* 21, 250-255.

- Jenkins, S., Addy, M., Wade, W. y Newcombe, R.G. (1994c) The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 21, 397-401.
- Jepsen, S., Berglundh, T., Genco, R., Aass, A.M., Demirel, K., Derks, J., Figuero, E., Giovannoli, J.L., Goldstein, M., Lambert, F., Ortiz-Vigon, A., Polyzois, I., Salvi, G.E., Schwarz, F., Serino, G., Tomasi, C. y Zitzmann, N.U. (2015) Primary prevention of peri-implantitis: Managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S152-S157.
- Johansen, J.R., Gjermo, P. y Eriksen, H.M. (1975) Effect of 2-years' use of chlorhexidine-containing dentifrices on plaque, gingivitis, and caries. *Scand J Dent Res* 83, 288-292.
- Josephson, K.L., Gerba, C.P. y Pepper, I.L. (1993) Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 59, 3513-3515.
- Kassebaum, N.J., Bernabe, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C.J. y Marcenes, W. (2014) Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res* 93, 1045-1053.
- Keijser, J.A., Verkade, H., Timmerman, M.F. y Van der Weijden, F.A. (2003) Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Periodontol* 74, 214-218.
- Kinane, D.F. (2001) Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 25, 8-20.
- Kinane, D.F. y Attstrom, R. (2005) Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6, 130-131.
- Kingman, A. y Albandar, J.M. (2002) Methodological aspects of epidemiological studies of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 29, 11-30.
- Kingman, A., Morrison, E., Löe, H. y Smith, J. (1988) Systematic errors in estimating prevalence and severity of periodontal disease. *J Periodontol* 59, 707-713.
- Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Jr., Rickard, A.H., Jakubovics, N.S., Chalmers, N.I. y Diaz, P.I. (2006) Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000* 42, 47-79.

- Koljalg, S., Naaber, P. y Mikelsaar, M. (2002) Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *J Hosp Infect* 51, 106-113.
- Koschier, F., Kostrubsky, V., Toole, C. y Gallo, M.A. (2011) In vitro effects of ethanol and mouthrinse on permeability in an oral buccal mucosal tissue construct. *Food Chem Toxicol* 49, 2524-2529.
- Krall, E.A., wson-Hughes, B., Garvey, A.J. y Garcia, R.I. (1997) Smoking, smoking cessation, and tooth loss. *J Dent Res* 76, 1653-1659.
- Krall, E.A., wson-Hughes, B., Papas, A. y Garcia, R.I. (1994) Tooth loss and skeletal bone density in healthy postmenopausal women. *Osteoporos Int* 4, 104-109.
- Krauthaim, A.B., Jermann, T.H. y Bircher, A.J. (2004) Chlorhexidine anaphylaxis: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis* 50, 113-116.
- Kurtoglu, S., Caksen, H. y Poyrazoglu, M.H. (2000) Neonatal poisonings in middle Anatolia of Turkey: an analysis of 72 cases. *J Toxicol Sci* 25, 115-119.
- La, V.C. (2009) Mouthwash and oral cancer risk: an update. *Oral Oncol* 45, 198-200.
- Lachenmeier, D.W., Gumbel-Mako, S., Sohnius, E.M., Keck-Wilhelm, A., Kratz, E. y Mildau, G. (2009) Salivary acetaldehyde increase due to alcohol-containing mouthwash use: a risk factor for oral cancer. *Int J Cancer* 125, 730-735.
- Lang NP, K.T.L.J. (1997) ed. Quintessence, p. 428. Chicago.
- Lang, N.P., Cumming, B.R. y L oe, H. (1973) Toothbrushing frequency as it relates to plaque development and gingival health. *J Periodontol* 44, 396-405.
- Lang, N.P., Hase, J.C., Grassi, M., Hammerle, C.H., Weigel, C., Kelty, E. y Frutig, F. (1998) Plaque formation and gingivitis after supervised mouthrinsing with 0.2% delmopinol hydrochloride, 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo for 6 months. *Oral Dis* 4, 105-113.
- Lang, N.P., Lindhe, J. y van, d., V (2005) Advances in the prevention of periodontitis. Group D consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6, 291-293.
- Lang, N.P., Schatzle, M.A. y L oe, H. (2009) Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 36 Suppl 10, 3-8.
- Lang, W.P., Ronis, D.L. y Farghaly, M.M. (1995) Preventive behaviors as correlates of periodontal health status. *J Public Health Dent* 55, 10-17.

- Lange, D.E., Plagmann, H.C., Eenboom, A. y Promesberger, A. (1977) [Clinical methods for the objective evaluation of oral hygiene]. *Dtsch Zahnarztl Z* 32, 44-47.
- Lavstedt, S., Modeer, T. y Welander, E. (1982) Plaque and gingivitis in a group of Swedish schoolchildren with special reference to toothbrushing habits. *Acta Odontol Scand* 40, 307-311.
- Lindhe J, L.N.y.K.T. (2008) *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 5th edition.
- Litonjua, L.A., Cabanilla, L.L. y Abbott, L.J. (2011) Plaque formation and marginal gingivitis associated with restorative materials. *Compend Contin Educ Dent* 32, e69-e72.
- Llodrá-Calvo J.C. (2012) Encuesta de Salud Oral en España. *RCOE* 17, 13-41.
- Lobene, R.R., Kashket, S., Soparkar, P.M., Shloss, J. y Sabine, Z.M. (1979) The effect of cetylpridinium chloride on human plaque bacteria and gingivitis. *Pharmacol Ther Dent* 4, 332-47.
- Lobene, R.R., Weatherford, T., Ross, N.M., Lamm, R.A. y Menaker, L. (1986) A modified gingival index for use in clinical trials. *Clin Prev Dent* 8, 3-6.
- Locker, D. y Leake, J.L. (1993) Risk indicators and risk markers for periodontal disease experience in older adults living independently in Ontario, Canada. *J Dent Res* 72, 9-17.
- Löe, H. (1979) Mechanical and chemical control of dental plaque. *J Clin Periodontol* 6, 32-36.
- Löe, H. y Schiott, C.R. (1970) The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 5, 79-83.
- Löe, H., Schiott, C.R., Karring, G. y Karring, T. (1976) Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects. *J Periodontal Res* 11, 135-144.
- Löe, H., Theilade, E. y Jensen, S.B. (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 36, 177-187.
- Lucas, G.Q. y Lucas, O.N. (1999) Preventive action of short-term and long-term chlorhexidine rinses. *Acta Odontol Latinoam* 12, 45-58.

- Macgregor, I.D., Balding, J.W. y Regis, D. (1998) Flossing behaviour in English adolescents. *J Clin Periodontol* 25, 291-296.
- Machtei, E.E., Christersson, L.A., Grossi, S.G., Dunford, R., Zambon, J.J. y Genco, R.J. (1992) Clinical criteria for the definition of "established periodontitis". *J Periodontol* 63, 206-214.
- Machtei, E.E., Hausmann, E., Dunford, R., Grossi, S., Ho, A., Davis, G., Chandler, J., Zambon, J. y Genco, R.J. (1999) Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 26, 374-380.
- Madianos, P.N., Bobetsis, Y.A. y Offenbacher, S. (2013) Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S170-S180.
- Mandel, I.D. (1988) Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 15, 488-498.
- Marsh, P.D. (2004) Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 38, 204-211.
- Marsh, P.D. (2005) Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6, 7-15.
- Martín, A.y.L.J.D. (2004) *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. 1ª edición, Madrid.
- Martín, J.L.T.A.y.S.T. (2006) *Revisiones Sistemáticas en las Ciencias de la Vida. El concepto de Salud a través de la síntesis de la Evidencia Científica*.
- Matthews, R.W., Scully, C.M., Levers, B.G. y Hislop, W.S. (1987) Clinical evaluation of benzydamine, chlorhexidine, and placebo mouthwashes in the management of recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 63, 189-191.
- McFall, W.T., Jr. (1982) Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. A long-term study. *J Periodontol* 53, 539-549.
- Mendoza (2008) Investigación clínica farmacológica para el desarrollo de nuevos medicamentos. En *Farmacología médica*, ed. Panamericana, pp. 132-135.
- Michalowicz, B.S., Gustafsson, A., Thumbigere-Math, V. y Buhlin, K. (2013) The effects of periodontal treatment on pregnancy outcomes. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S195-S208.

- Milstone, A.M., Passaretti, C.L. y Perl, T.M. (2008) Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. *Clin Infect Dis* 46, 274-281.
- Moghadam, B.K., Drisko, C.L. y Gier, R.E. (1991) Chlorhexidine mouthwash-induced fixed drug eruption. Case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 71, 431-434.
- Moharamzadeh, K., Franklin, K.L., Brook, I.M. y van, N.R. (2009) Biologic assessment of antiseptic mouthwashes using a three-dimensional human oral mucosal model. *J Periodontol* 80, 769-775.
- Moher, D., Cook, D.J., Eastwood, S., Olkin, I., Rennie, D. y Stroup, D.F. (1999) Improving the quality of reports of meta-analyses of randomised controlled trials: the QUOROM statement. Quality of Reporting of Meta-analyses. *Lancet* 354, 1896-1900.
- Moher, D., Hopewell, S., Schulz, K.F., Montori, V., Gotzsche, P.C., Devereaux, P.J., Elbourne, D., Egger, M. y Altman, D.G. (2012) CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Int J Surg* 10, 28-55.
- Moher, D., Pham, B., Jones, A., Cook, D.J., Jadad, A.R., Moher, M., Tugwell, P. y Klassen, T.P. (1998) Does quality of reports of randomised trials affect estimates of intervention efficacy reported in meta-analyses?. *Lancet* 352, 609-613.
- Moher, D., Schulz, K.F. y Altman, D.G. (2001) The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet* 357, 1191-1194.
- Moher, D., Schulz, K.F. y Altman, D.G. (2003) The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Clin Oral Investig* 7, 2-7.
- Moran, J. y Addy, M. (1984) The antibacterial properties of some commercially available toothpastes in vitro. *Br Dent J* 156, 175-178.
- Moran, J. y Addy, M. (1991) The effects of a cetylpyridinium chloride prebrushing rinse as an adjunct to oral hygiene and gingival health. *J Periodontol* 62, 562-564.

- Moran, J., Addy, M., Jackson, R. y Newcombe, R.G. (2000) Comparative effects of quaternary ammonium mouthrinses on 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 27, 37-40.
- Moran, J., Addy, M., Kohut, B., Hovliaras, C.A. y Newcombe, R.G. (1994) Efficacy of mouthrinses in inhibiting the development of supragingival plaque over a 4-day period of no oral hygiene. *J Periodontol* 65, 904-907.
- Moran, J., Addy, M. y Wade, W. (1988) Determination of minimum inhibitory concentrations of commercial toothpastes using an agar dilution method. *J Dent* 16, 27-31.
- Moran, J., Addy, M., Wade, W.G., Maynard, J.H., Roberts, S.E., Astrom, M. y Mover, R. (1992) A comparison of delmopinol and chlorhexidine on plaque regrowth over a 4-day period and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 19, 749-753.
- Moyers, T.B. y Rollnick, S. (2002) A motivational interviewing perspective on resistance in psychotherapy. *J Clin Psychol* 58, 185-193.
- Muhlemann, H.R. y Son, S. (1971) Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta* 15, 107-113.
- Mullany, L.C., Darmstadt, G.L. y Tielsch, J.M. (2006) Safety and impact of chlorhexidine antiseptic interventions for improving neonatal health in developing countries. *Pediatr Infect Dis J* 25, 665-675.
- Murray, T.W. (2014) Epidemiology of oral health conditions in older people. *Gerodontology* 31 Suppl 1, 9-16.
- Nakonechna, A., Dore, P., Dixon, T., Khan, S., Deacock, S., Holding, S. y Abuzakouk, M. (2014) Immediate hypersensitivity to chlorhexidine is increasingly recognised in the United Kingdom. *Allergol Immunopathol (Madr.)* 42, 44-49.
- Nashwan, A.J. (2011) Use of chlorhexidine mouthwash in children receiving chemotherapy: a review of literature. *J Pediatr Oncol Nurs* 28, 295-299.
- Needleman, I., Nibali, L. y Di, I.A. (2015) Professional mechanical plaque removal for prevention of periodontal diseases in adults - systematic review update. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S12-S35.

- Netuschil, L., Weiger, R., Preisler, R. y Brex, M. (1995) Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci* 103, 355-361.
- Newcombe, R.G. (1992) Crossover trials comparing several treatments. *J Clin Periodontol* 19, 785-787.
- Newcombe, R.G., Addy, M. y McKeown, S. (1995) Residual effect of chlorhexidine gluconate in 4-day plaque regrowth crossover trials, and its implications for study design. *J Periodontal Res* 30, 319-324.
- Newman, H.N. (1986) Modes of application of anti-plaque chemicals. *J Clin Periodontol* 13, 965-974.
- Newton, J.T. y Asimakopoulou, K. (2015) Managing oral hygiene as a risk factor for periodontal disease: a systematic review of psychological approaches to behaviour change for improved plaque control in periodontal management. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S36-S46.
- NIAAA (2015) *National Institute On Alcohol Abuse And Alcoholism* . URL <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh294/243-244.htm> [acceso 14 Enero 2015].
- NLM (2015) *National Library of Medicine U.S.* URL <http://toxnet.nlm.nih.gov> [acceso 14 Enero 2015].
- Nocker, A. y Camper, A.K. (2009) Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol Lett* 291, 137-142.
- Nocker, A., Cheung, C.Y. y Camper, A.K. (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 67, 310-320.
- Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D. y Camper, A.K. (2007) Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 73, 5111-5117.
- Noguerol B., L.U.J.S.A.M.H.G.D.M.A.F. (2002) Microbiología periodontal y periimplantaria. In *Microbiología oral*, ed. McGraw-Hill- Interamericana de España, S.A.U.

- OMS (1997) WHO. Oral Health Surveys: Basic Methods. Geneva: World Health Organization, 1997. Ed. nº4.
- OMS (2015) *World Health Organization*. URL <http://www.who.int/research/es/> [acceso 14 Enero 2015].
- Ong, G. (1998) Periodontal disease and tooth loss. *Int Dent J* 48, 233-238.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2012). URL [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.1\\_M%C3%A9todos\\_laboratorio.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.1_M%C3%A9todos_laboratorio.pdf) [acceso 14 Enero 2015].
- Ouhayoun, J.P. (2003) Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash. *J Clin Periodontol* 30 Suppl 5, 10-12.
- Overholser, C.D., Meiller, T.F., DePaola, L.G., Minah, G.E. y Niehaus, C. (1990) Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 17, 575-579.
- Pan, J.C., Lau, B.H., Fam, H.B. y Ng, M.M. (2004) Evaluation of biofilm formation on nylon sutures removed from clinically noninfected eyes after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 30, 1972-1976.
- Pan, P., Barnett, M.L., Coelho, J., Brogdon, C. y Finnegan, M.B. (2000) Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol* 27, 256-261.
- Pan, P.C., Harper, S., Ricci-Nittel, D., Lux, R. y Shi, W. (2010) In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent* 38 Suppl 1, S16-S20.
- Papapanou, P.N. (2012) The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told. *J Dent Res* 91, 907-908.
- Paraskevas, S. y Van der Weijden, G.A. (2006) A review of the effects of stannous fluoride on gingivitis. *J Clin Periodontol* 33, 1-13.
- Parra Juez, J.L.y.P.G.L. (1995) *Ciencia cosmética: bases fisiológicas y criterios prácticos*. Madrid.
- Passali, D., Volonte, M., Passali, G.C., Damiani, V. y Bellussi, L. (2001) Efficacy and safety of ketoprofen lysine salt mouthwash versus benzydamine hydrochloride mouthwash in acute pharyngeal inflammation: a randomized, single-blind study. *Clin Ther* 23, 1508-1518.

- Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P. y Frey, J. (2005) Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol* 43, 2291-2302.
- Persson, G.R. y Persson, R.E. (2008) Cardiovascular disease and periodontitis: an update on the associations and risk. *J Clin Periodontol* 35, 362-379.
- Petersen, P.E., Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S. y Ndiaye, C. (2005) The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ* 83, 661-669.
- Pihlstrom, B.L. (2001) Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol 2000* 25, 37-58.
- Pitten, F.A. y Kramer, A. (1999) Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 55, 95-100.
- Pitten, F.A. y Kramer, A. (2001) Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneimittelforschung* 51, 588-595.
- Pizzo, G., Guiglia, R., Imburgia, M., Pizzo, I., D'Angelo, M. y Giuliana, G. (2006) The effects of antimicrobial sprays and mouthrinses on supragingival plaque regrowth: a comparative study. *J Periodontol* 77, 248-256.
- Polak, D., Martin, C., Sanz-Sanchez, I., Beyth, N. y Shapira, L. (2015) Are anti-inflammatory agents effective in treating gingivitis as solo or adjunct therapies? A systematic review. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S139-S151.
- Polesel, J., Dal, M.L., Bagnardi, V., Zucchetto, A., Zambon, A., Levi, F., La, V.C. y Franceschi, S. (2005) Estimating dose-response relationship between ethanol and risk of cancer using regression spline models. *Int J Cancer* 114, 836-841.
- Pons, J.L., Bonnavero, N., Chevalier, J. y Cremieux, A. (1992) Evaluation of antimicrobial interactions between chlorhexidine, quaternary ammonium compounds, preservatives and excipients. *J Appl Bacteriol* 73, 395-400.
- Prochaska, J.O. y DiClemente, C.C. (1983) Stages and processes of self-change of smoking: toward an integrative model of change. *J Consult Clin Psychol* 51, 390-395.
- Puig, S.M., Montiel Company JM y Almerich Silla, J.M. (2008) Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13, E257-E260.

- Pullar, T., Kumar, S., Tindall, H. y Feely, M. (1989) Time to stop counting the tablets? *Clin Pharmacol Ther* 46, 163-168.
- Quigley, G.A. y Hein, J.W. (1962) Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J Am Dent Assoc* 65, 26-29.
- Quirynen, M., Avontroodt, P., Peeters, W., Pauwels, M., Coucke, W. y van, S.D. (2001) Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 28, 1127-1136.
- Quirynen, M., Bollen, C.M., Vandekerckhove, B.N., Dekeyser, C., Papaioannou, W. y Eyssen, H. (1995) Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J Dent Res* 74, 1459-1467.
- Quirynen, M., Marechal, M., Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., Darius, P.L. y van, S.D. (1990) The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol* 17, 138-144.
- Quirynen, M., Soers, C., Desnyder, M., Dekeyser, C., Pauwels, M. y van, S.D. (2005) A 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 32, 390-400.
- Ramberg, P., Furuichi, Y., Lindhe, J. y Gaffar, A. (1992) A model for studying the effects of mouthrinses on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 19, 509-520.
- Ramfjord SP (1953) A rational plan for periodontal therapy. *J Periodontol* 24, 75-87.
- Rams, T.E. y Slots, J. (1992) Antibiotics in periodontal therapy: an update. *Compendium* 13, 1130, 1132, 1134.
- Ramseier, C.A. (2003) Smoking prevention and cessation. *Oral Health Prev Dent* 1 Suppl 1, 427-439.
- Ramseier, C.A. (2005) Potential impact of subject-based risk factor control on periodontitis. *J Clin Periodonto* 32 Suppl 6, 283-290.
- Ramseier, C.A. y Suvan, J.E. (2015) Behaviour change counselling for tobacco use cessation and promotion of healthy lifestyles: a systematic review. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S47-S58.

- Reglamento UE (2009) *Reglamento (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos*. URL [https://www.boe.es/legislacion/enlaces/union\\_europea.php](https://www.boe.es/legislacion/enlaces/union_europea.php) [acceso 14 Enero 2015].
- Reglamento UE (2014) *Reglamento (UE) nº 536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de abril de 2014 sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano*. URL [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg\\_2014\\_536/reg\\_2014\\_536\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg_2014_536/reg_2014_536_es.pdf) [acceso 14 Enero 2015].
- Reich, E.B.M.N.L.a.P.L.G. (2002) Mouthrinses and periodontal disease. *Int Dent J* 52, 346-352.
- Reyes, L., Herrera, D., Kozarov, E., Roldan, S. y Progulske-Fox, A. (2013) Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S30-S50.
- Ritz, H.L. (1967) Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch Oral Biol* 12, 1561-1568.
- Roberts, W.R. y Addy, M. (1981) Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol* 8, 295-310.
- Robinson, P.G., Deacon, S.A., Deery, C., Heanue, M., Walmsley, A.D., Worthington, H.V., Glenny, A.M. y Shaw, W.C. (2005) Manual versus powered toothbrushing for oral health. *Cochrane Database Syst Rev* CD002281.
- Rothwell, P.M. (2005) External validity of randomised controlled trials: "to whom do the results of this trial apply?". *Lancet* 365, 82-93.
- Rugg-Gunn, A.J. y Macgregor, I.D. (1978) A survey of toothbrushing behaviour in children and young adults. *J Periodontal Res* 13, 382-389.
- Russell, A.L. (1956) A system of classification and scoring for prevalence surveys of periodontal disease. *J Dent Res* 35, 350-359.
- Sackett, D.L., Rosenberg, W.M., Gray, J.A., Haynes, R.B. y Richardson, W.S. (1996) Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *BMJ* 312, 71-72.
- Salaspuro, V., Hietala, J., Kaihovaara, P., Pihlajarinne, L., Marvola, M. y Salaspuro, M. (2002) Removal of acetaldehyde from saliva by a slow-release buccal tablet of L-cysteine. *Int J Cancer* 97, 361-364.

- Salvi, G.E., Carollo-Bittel, B. y Lang, N.P. (2008) Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol* 35, 398-409.
- Salzer, S., Slot, D.E., Van der Weijden, F.A. y Dorfer, C.E. (2015) Efficacy of interdental mechanical plaque control in managing gingivitis - a meta-review. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S92-S105.
- Sanchez, M.C., Llama-Palacios, A., Blanc, V., Leon, R., Herrera, D. y Sanz, M. (2011) Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res* 46, 252-260.
- Sanchez, M.C., Llama-Palacios, A., Marin, M.J., Figuero, E., Leon, R., Blanc, V., Herrera, D. y Sanz, M. (2013) Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an in vitro subgingival-biofilm model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18, e86-e92.
- Sanchez, M.C., Marin, M.J., Figuero, E., Llama-Palacios, A., Leon, R., Blanc, V., Herrera, D. y Sanz, M. (2014) Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontal Res* 49, 20-28.
- Sanz, M., Baumer, A., Buduneli, N., Dommisch, H., Farina, R., Kononen, E., Linden, G., Meyle, J., Preshaw, P.M., Quirynen, M., Roldan, S., Sanchez, N., Sculean, A., Slot, D.E., Trombelli, L., West, N. y Winkel, E. (2015) Effect of professional mechanical plaque removal on secondary prevention of periodontitis and the complications of gingival and periodontal preventive measures: Consensus report of group 4 of the 11(th) European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S214-S220.
- Sanz, M. y Kornman, K. (2013) Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S164-S169.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J.M. y Silva, A. (2004) Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis

- on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 31, 1034-1047.
- Sanz, M. y Quirynen, M. (2005) Advances in the aetiology of periodontitis. Group A consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6, 54-56.
- Sanz-Alonso M, H.-G.D. (2001) Asociación entre enfermedades periodontales y enfermedades sistémicas ¿existe la Medicina Periodontal?. *RCOE* 6, 659-668.
- Sardella, A., Uglietti, D., Demarosi, F., Lodi, G., Bez, C. y Carrassi, A. (1999) Benzylamine hydrochloride oral rinses in management of burning mouth syndrome. A clinical trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 88, 683-686.
- Sbordone, L. y Bortolaia, C. (2003) Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 7, 181-188.
- Scannapieco, F.A., Bush, R.B. y Paju, S. (2003) Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. *Ann Periodontol* 8, 54-69.
- Scheie, A.A. (1994) Mechanisms of dental plaque formation. *Adv.Dent.Res.* 8, 246-253.
- Schenkein, H.A. y Loos, B.G. (2013) Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S51-S69.
- Schiott, C.R., Löe, H., Jensen, S.B., Kilian, M., Davies, R.M. y Glavind, K. (1970) The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Periodontal Res* 5, 84-89.
- Sedlacek, M.J. y Walker, C. (2007) Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol* 22, 333-339.
- SEFH (2013) *Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria*. URL <http://www.sefh.es/fichadjuntos/Boletin12013.pdf> [acceso 14 Enero 2015].

- Sekino, S., Ramberg, P., Uzel, N.G., Socransky, S. y Lindhe, J. (2003) Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 30, 919-925.
- Sekino, S., Ramberg, P., Uzel, N.G., Socransky, S. y Lindhe, J. (2004) The effect of a chlorhexidine regimen on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 31, 609-614.
- Serrano, J., Escribano, M., Roldan, S., Martin, C. y Herrera, D. (2014) Efficacy of adjunctive chemical plaque control in managing gingivitis. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 15, 74-5.
- Serrano, J., Escribano, M., Roldan, S., Martin, C. y Herrera, D. (2015) Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S106-S138.
- Serrano-Granger J.y Herrera D. (2005) La placa dental como biofilm ¿Cómo eliminarla? *RCOE* 10, 431-439.
- Seymour, G.J., Ford, P.J., Cullinan, M.P., Leishman, S. y Yamazaki, K. (2007) Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 13 Suppl 4, 3-10.
- Shapiro, J.A. (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* 52, 81-104.
- Shapiro, S., Giertsen, E. y Guggenheim, B. (2002) An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res* 36, 93-100.
- Sharma, A. y Chopra, H. (2009) Chlorhexidine urticaria: a rare occurrence with a common mouthwash. *Indian J Dent Res* 20, 377-379.
- Silness, J. y Løe, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 22, 121-135.
- Simonsson, T., Hvid, E.B., Rundegren, J. y Edwardsson, S. (1991) Effect of delmopinol on in vitro dental plaque formation, bacterial acid production and the number of microorganisms in human saliva. *Oral Microbiol Immunol* 6, 305-309.
- Sliepen, I., Van, E.M., Quirynen, M. y Teughels, W. (2010) Effect of mouthrinses on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms in a hydrodynamic model. *Clin Oral Investig* 14, 241-250.

- Slots, J. (2002) The search for effective, safe and affordable periodontal therapy. *Periodontol 2000* 28, 9-11.
- Slots, J. y Jorgensen, M.G. (2002) Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet? *Periodontol 2000* 28, 298-312.
- Slots, J., Moenbo, D., Langebaek, J. y Frandsen, A. (1978) Microbiota of gingivitis in man. *Scand J Dent Res* 86, 174-181.
- Slots, J. y Rams, T.E. (1990) Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol* 17, 479-493.
- Slots, J. y Rams, T.E. (1991) New views on periodontal microbiota in special patient categories. *J Clin Periodontol* 18, 411-420.
- Smith, R.G., Moran, J., Addy, M., Doherty, F. y Newcombe, R.G. (1995) Comparative staining in vitro and plaque inhibitory properties in vivo of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol* 22, 613-617.
- Socransky, S.S. (1970) Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* 49, 203-222.
- Socransky, S.S. y Haffajee, A.D. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 63, 322-331.
- Socransky, S.S. y Haffajee, A.D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 28, 12-55.
- Socransky, S.S. y Haffajee, A.D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 38, 135-187.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. y Kent, R.L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134-144.
- Socransky, S.S., Manganiello, A.D., Propas, D., Oram, V. y van, H.J. (1977) Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontal Res* 12, 90-106.
- Socransky, S.S., Smith, C., Martin, L., Paster, B.J., Dewhirst, F.E. y Levin, A.E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17, 788-792.
- Solis, C., Santos, A., Nart, J. y Violant, D. (2011) 0.2% chlorhexidine mouthwash with an antidiscoloration system versus 0.2% chlorhexidine mouthwash: a prospective clinical comparative study. *J Periodontol* 82, 80-85.

- Sonju, T. y Rolla, G. (1973) Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res* 7, 30-38.
- Sreenivasan, P. y Gaffar, A. (2002) Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol* 29, 965-974.
- Stamm, J.W. (1986) Epidemiology of gingivitis. *J Clin Periodontol* 13, 360-370.
- Stewart, J.E., Strack, S. y Graves, P. (1997) Development of oral hygiene self-efficacy and outcome expectancy questionnaires. *Community Dent Oral Epidemiol* 25, 337-342.
- Stewart, P.S. y Costerton, J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135-138.
- Stookey, G.K., Beiswanger, B., Mau, M., Isaacs, R.L., Witt, J.J. y Gibb, R. (2005) A 6-month clinical study assessing the safety and efficacy of two cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Am J Dent* 18 Spec No, 24A-28A.
- Sutherland, S.E. (2001) Evidence-based dentistry: Part IV. Research design and levels of evidence. *J Can Dent Assoc* 67, 375-378.
- Takenaka, S., Trivedi, H.M., Corbin, A., Pitts, B. y Stewart, P.S. (2008) Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74, 1869-1875.
- Talbott, K., Mandel, I.D. y Chilton, N.W. (1977) Reduction of baseline gingivitis scores with repeated prophylaxes. *J Prev Dent* 4, 28-29.
- Tang, G., Yip, H.K., Cutress, T.W. y Samaranayake, L.P. (2003) Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent* 31, 161-171.
- Tanner, A., Kent, R., Maiden, M.F. y Taubman, M.A. (1996) Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J Periodontal Res* 31, 195-204.
- Tanner, J., Swarbrook, S. y Stuart, J. (2008) Surgical hand antisepsis to reduce surgical site infection. *Cochrane Database Syst Rev* CD004288.
- Taylor, J.J., Preshaw, P.M. y Lalla, E. (2013) A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14, S113-S134.

- Teles, R.P. y Teles, F.R. (2009) Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control?. *Braz Oral Res* 23 Suppl 1, 39-48.
- Theilade, E., Wright, W.H., Jensen, S.B. y Løe, H. (1966) Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res* 1, 1-13.
- Tomas, I., Cousido, M.C., Tomas, M., Limeres, J., Garcia-Caballero, L. y Diz, P. (2008) In vivo bactericidal effect of 0.2% chlorhexidine but not 0.12% on salivary obligate anaerobes. *Arch Oral Biol* 53, 1186-1191.
- Tonetti, M.S., Chapple, I.L., Jepsen, S. y Sanz, M. (2015a) Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11(th) European Workshop on Periodontology consensus conference. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S1-S4.
- Tonetti, M.S., Eickholz, P., Loos, B.G., Papapanou, P., van, d., V, Armitage, G., Bouchard, P., Deinzer, R., Dietrich, T., Hughes, F., Kocher, T., Lang, N.P., Lopez, R., Needleman, I., Newton, T., Nibali, L., Pretzl, B., Ramseier, C., Sanz-Sanchez, I., Schlagenhauf, U. y Suvan, J.E. (2015b) Principles in prevention of periodontal diseases: Consensus report of group 1 of the 11(th) European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S5-S11.
- Tonetti, M.S. y Van Dyke, T.E. (2013) Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol* 84, S24-S29.
- Turesky, S., Gilmore, N.D. y Glickman, I. (1970) Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *J Periodontol* 41, 41-43.
- Van der Weijden, F. y Slot, D.E. (2011) Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. *Periodontol 2000* 55, 104-123.
- Van der Weijden, F.A. y Slot, D.E. (2015) Efficacy of homecare regimens for mechanical plaque removal in managing gingivitis a meta review. *J Clin Periodontol* 42 Suppl 16, S77-S91.
- Van der Weijden, G.A. y Hioe, K.P. (2005) A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6, 214-228.

- Van Strydonck, D.A., Slot, D.E., van, d., V y Van der Weijden, F. (2012) Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol* 39, 1042-1055.
- Van Strydonck, D.A., Timmerman, M.F., van, d., V y Van der Weijden, F. (2008) Clinical efficacy of a chlorhexidine-delivering toothbrush. *J Clin Periodontol* 35, 584-590.
- Van Winkelhoff, A.J., Loos, B.G., van der Reijden, W.A. y van, d., V (2002) Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 29, 1023-1028.
- Vaughan, B.L., Jr., Smith, B.G. y Chopp, D.L. (2010) The influence of fluid flow on modeling quorum sensing in bacterial biofilms. *Bull Math Biol* 72, 1143-1165.
- Wade, W.G. y Addy, M. (1992) Antibacterial activity of some triclosan-containing toothpastes and their ingredients. *J Periodontol* 63, 280-282.
- Wade, W.G. y Slayne, M.A. (1997) Controlling plaque by disrupting the process of plaque formation. *Periodontol 2000* 15, 25-31.
- Walker, C. y Sedlacek, M.J. (2007) An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 22, 152-161.
- Watts, A. y Addy, M. (2001) Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J* 190, 309-316.
- Wei, G.X., Campagna, A.N. y Bobek, L.A. (2006) Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on Streptococcus mutans biofilm. *J Antimicrob Chemother* 57, 1100-1109.
- Weiger, R., Netuschil, L., von, O.C. y Brex, M. (1995a) Microbial vitality of supragingival dental plaque during initial stages of experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res* 30, 204-209.
- Weiger, R., Netuschil, L., von, O.C., Schlagenhaut, U. y Brex, M. (1995b) Microbial generation time during the early phases of supragingival dental plaque formation. *Oral Microbiol Immunol* 10, 93-97.
- Weiger, R., Netuschil, L., Wester-Ebbinghaus, T. y Brex, M. (1998) An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses in vivo. *Arch Oral Biol* 43, 559-565.

- Wennstrom, J. y Lindhe, J. (1986) The effect of mouthrinses on parameters characterizing human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 13, 86-93.
- Wennstrom, J.L. (1988) Mouthrinses in "experimental gingivitis" studies. *J Clin Periodontol* 15, 511-516.
- Wennstrom, J.L. (1992) Subgingival irrigation systems for the control of oral infections. *Int Dent J* 42, 281-285.
- White, D., Cox, E., Suszcynskymeister, E. y Baig, A.A. (2002) In vitro studies of the anticalculus efficacy of a sodium hexametaphosphate whitening dentifrice. *J Clin Dent* 13, 33-37.
- Wood, S.R., Kirkham, J., Marsh, P.D., Shore, R.C., Nattress, B. y Robinson, C. (2000) Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 79, 21-27.
- Worthington, H.V., Clarkson, J.E., Bryan, G. y Beirne, P.V. (2013) Routine scale and polish for periodontal health in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 11, CD004625.
- Wu, C.D. y Savitt, E.D. (2002) Evaluation of the safety and efficacy of over-the-counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. *Periodontol 2000* 28, 91-105.
- Xu, Y., Chen, M. y Zhang, S. (2000) [Multicenter evaluation of the antimicrobial activity in vitro for six broad-spectrum beta-lactams in China using the E-test method]. *Zhonghua Yi.Xue Za Zhi* 80, 362-365.
- Yaacob, M., Worthington, H.V., Deacon, S.A., Deery, C., Walmsley, A.D., Robinson, P.G. y Glenny, A.M. (2014) Powered versus manual toothbrushing for oral health. *Cochrane Database Syst Rev* 6, CD002281.
- Zanatta, F.B., Antoniazzi, R.P. y Rosing, C.K. (2010) Staining and calculus formation after 0.12% chlorhexidine rinses in plaque-free and plaque covered surfaces: a randomized trial. *J Appl Oral Sci* 18, 515-521.
- Zaura-Arite, E., van, M.J. y ten Cate, J.M. (2001) Conofocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 80, 1436-1440.
- Zee, K.Y., Samaranayake, L.P. y Attstrom, R. (1996) Predominant cultivable supragingival plaque in Chinese "rapid" and "slow" plaque formers. *J Clin Periodontol* 23, 1025-1031.