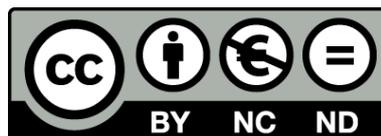




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Efecto antibacteriano de colutorios de uso común: un estudio comparativo

Miguel Noguer Castellvi



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat d' Odontologia
Dept. Ciències Morfològiques
i Odontoestomatologia



Institut Universitari de Salut Pública
de Catalunya
Unitat de Microbiologia. Campus de
Bellvitge

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE COLUTORIOS DE USO COMUN: UN ESTUDIO COMPARATIVO

Miguel Noguera Castellví

1998

TD 76

0700155860

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700155860

6



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Àrea de Salut Pública
Unitat de Microbiologia
Campus de Bellvitge

Títol de la tesi: *Efecto antibacteriano de los colutorios de uso común: Un estudio comparativo*

Data de la lectura: **23 de març de 1999**

Director/s: **Dr. Antonio Nadal Valldaura**

Departament: **Unitat departamental d'Odontostomatologia**

Programa: **Tècniques clíniques en Odontostomatologia**

Bienni: **1991-93**



Miguel Noguer Castellví

Tesis Doctoral

Memoria presentada por **Miguel Noguera Castellví** para optar al
Título de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de
Barcelona.

Mayo de 1998.

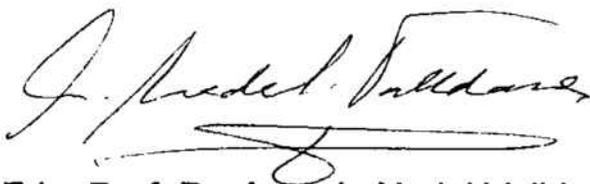
Antonio Nadal Valldaura, Catedrático Jubilado de Estomatología de
la Universidad de Barcelona

informa:

Que la Tesis Doctoral presentada por el Licenciado en Medicina y
Cirugía D. **Miguel Noguera Castellví**, ha sido realizada bajo mi
dirección .

Que el mencionado trabajo cumple los requisitos formales y
conceptuales para que pueda ser defendida ante la Comisión
correspondiente.

Y para que conste, firma el presente en Barcelona a 15 de Mayo de
1998

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Nadal Valldaura', with a stylized flourish underneath.

Fdo. Prof. Dr. Antonio Nadal Valldaura

Índice.

0.- Agradecimientos	15
1.- Introducción	21
1.1. La cavidad oral como hábitat microbiano	22
1.2 . Flora microbiana de la cavidad oral	23
1.3 . Las sustancias naturales antibacterianas de la cavidad bucal	26
1.4. La placa bacteriana.....	26
1.5 . Microorganismos que forman la placa bacteriana.....	29
1.5.1. Cocos Gram positivos de metabolismo facultativo	29
* <i>Streptococcus mutans</i>	31
* <i>Streptococcus sanguis</i>	31
* <i>Streptococcus salivarius</i>	31
* <i>Streptococcus mitis</i>	31
* <i>Enterococcus</i>	32
1.5.2. Cocos Gram positivos de metabolismo estrictamente anaerobio.....	32
* <i>Peptococcus</i>	32
* <i>Peptostreptococcus</i>	33
1.5.3. Cocos Gram negativos de metabolismo	

aeróbico 33

* *Neisseria* 33

1.5.4. Cocos Gram negativos de metabolismo anaerobio..34

* *Veillonella* 34

1.5.5. Bacilos Gram positivos de metabolismo facultativo 35

* *Nocardia* 35

* *Corynebacterium* 35

* *Lactobacillus* 36

* *Rothia* 36

1.5.6. Bacilos Gram positivos de metabolismo anaerobio..37

* *Actinomyces* 37

* *Propionibacterium*..... 37

1.5.7. Bacilos Gram negativos de metabolismo facultativo.38

* Enterobacterias..... 38

1.5.8. Bacilos Gram negativos de metabolismo anaerobio.38

* *Fusobacterium* 38

* *Bacteroides*..... 39

* *Porphyromonas* 40

* *Prevotella*..... 40

* <i>Leptotrichia</i>	41
1.5.9. Espiroquetas	41
* <i>Treponema denticola</i>	42
* <i>Treponema sockranskii ssp. buccale</i>	42
1.6 . Efectos beneficiosos de la placa	
bacteriana	43
1.7. Efectos perjudiciales de la placa bacteriana	44
1.7.1. Microbiología de la caries dental.....	45
Factores del huésped.....	52
1.7.2. Microbiología de la gingivitis y de la enfermedad periodontal	
.....	55
Factores del huésped.....	58
Factores inmunológicos	59
Microorganismos de la placa subgingival.....	60
1.7.3. Microbiología de la enfermedad endodóntica	67
1.8. Factores que influyen en la placa bacteriana.....	69
1.8.1. La sacarosa.....	69
1.8.2. La Higiene bucal.....	75
1.8.2.1. Cepillado	75
1.8.2.2. Dentífricos	76

1.8.2.3. Colutorios	76
Clorhexidina	78
Triclosán.....	79
Flúor	80
Alcohólicos.....	80
Detergentes.....	81
Peróxidos	82
1.8.3 . Antibióticos.....	82
1.9. Bacterias y oxígeno.....	84
1.9.1. Las relaciones de las bacterias con el oxígeno	84
1.9.2. Las formas reactivas (tóxicas) del oxígeno	88
1.9.3. Enzimas que actúan sobre las formas reactivas del oxígeno	88
2.- Hipótesis y Objetivos.....	91
3.- Material y Métodos.....	95
3.1. Cepas bacterianas	96
3.1.1. Cepas de colección.....	96
3.1.2. Cepas obtenidas de muestras clínicas	98
3.2. Mantenimiento.....	99

3.3 . Medios de cultivo 100

Solución de Vitamina K-Hemina..... 100

Solución de sales 100

TSB 101

Mueller-Hinton 102

MRS 103

Agar Sangre 104

Carne Picada 105

Peptona-extracto de levadura-Glucosa 106

BHI 107

3.4. Cultivo en anaerobiosis 108

3.5 . Colutorios utilizados en el trabajo experimental 110

3.6. Determinación del efecto antimicrobiano 113

3.6.1. Determinación de concentraciones mínimas
inhibitorias frente a bacterias aeróbicas
y facultativas 113

3.6.2. Determinación de concentraciones mínimas
inhibitorias frente a bacterias anaeróbicas
estrictas 115

3.6.3. Determinación del tiempo de actuación

de las soluciones colutorias	116
3.6.4. Experimentos “in vivo” en voluntarios	117
4.- Resultados.....	121
4.1. Aislamiento de bacterias patógenas bucales a partir de enfermos	122
4.2. Concentraciones mínimas inhibitorias	125
4.2.1. Bacterias Gram negativas facultativamente anaeróbicas	126
4.2.2. Bacterias Gram negativas aeróbicas estrictas.....	132
4.2.3. Bacterias Gram positivas aeróbicas formadoras de spora	133
4.2.4. Cocos Gram positivos.....	133
4.3. Bacterias aisladas de pacientes.....	138
4.4. Experimentos “in vivo” en voluntarios	142
4.5. Tiempo de supervivencia bacteriana	153
5.- Discusión.....	155
6.- Resumen y Conclusiones	165
7.- Referencias bibliográficas	169

0.- Agradecimientos.

En primer lugar debo agradecer la dedicación, apoyo y sugerencias del director de este trabajo, el Profesor D. Antonio Nadal Valldaura, catedrático jubilado de la Universidad Central de Barcelona.

Asimismo quiero agradecer a los Profesores Esteve Brau Aguadé y Carles Canalda Sahlí, catedráticos de Patología y Terapéutica Dental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Barcelona, por haberme demostrado su confianza a lo largo de estos años. Las enseñanzas de ellos recibidas en la unidad, han constituido un fundamento importante para la realización de este trabajo de doctorado.

Al Profesor Josep Duran von Arx, anterior jefe de la Unidad Departamental debo agradecerle el haberme facilitado todas las cuestiones relativas a la inscripción de la tesis, concesión de prórrogas, y todas aquellas cosas que por su naturaleza requieren siempre el criterio benévolo del responsable.

Llegado a este punto quisiera hacer una consideración. El hecho de realizar este trabajo me ha enriquecido doblemente; a la previsible mejora de mi formación, he de añadir la oportunidad de conocer a personas sobresalientes por sus cualidades humanas y científicas.

Todo mi agradecimiento pues a la licenciada en farmacia por la Universidad de Montpellier Geneviève Gautier, con quien he compartido muchas horas durante el trabajo experimental, y la preparación de los datos, y la evaluación de los resultados.

Este agradecimiento lo hago extensivo al grupo de investigación de microbiología del Campus de Bellvitge que dirige el Profesor Miquel Viñas; Las Dras. Sánchez , Puig, Leranoz y todo el personal del laboratorio de Microbiología del Institut Universitari de Salut Pública de Catalunya, por el apoyo científico y material, en el desarrollo experimental y la interpretación de los resultados de este trabajo.

Mi amiga Bassi siempre ha tenido palabras de ánimo cuando yo tenía la sensación de que esta tesis sería eterna, y por si fuera poco me ha ayudado mucho en su presentación y correcciones tipográficas.

Todo mi agradecimiento para los voluntarios que colaboraron en la obtención de muestras "in vivo", la mayoría de ellos ya salen en este apartado, pero sus familiares que también realizaron los enjuagues no. Hay que reconocer que los enjuagues con suero fisiológico tienen un gusto desagradable.

El Prof. Jaume Canela tuvo la enorme amabilidad de ayudarme en los estudios estadísticos de los experimentos realizados con voluntarios, quisiera poner aquí de manifiesto mi más sincero agradecimiento. Un agradecimiento muy especial al Doctor Miquel Viñas i Ciordia, pues sin su ayuda este trabajo jamás se hubiera llevado a cabo. Miquel Viñas además de haberme transmitido su pasión por la microbiología, me ha obsequiado con su calidad humana y su amistad.

Debo agradecer a mi padre y a mi abuelo, los Dres. José María Noguera Llerandi y José Noguera Molins, el haber sabido transmitirme su vocación estomatológica, lo que me ha permitido tener una profesión que me apasiona, y ahora poder presentar este trabajo. Por cierto que aunque no tuve la oportunidad de conocerle, mi bisabuelo el Dr. Honorato Noguera Casanovas también fue médico, de la Guardia Civil, si bien no se dedicó a la estomatología.

Para finalizar muchas gracias a mi mujer, que por si cinco preparaciones olímpicas y cuatro Juegos Olímpicos fueran poco, ahora ha tolerado las horas que le he tenido que robar para la elaboración de esta tesis.

Muchas gracias a todos.

1.- Introducción.

1.1. La cavidad oral como hábitat microbiano.

Desde el punto de vista microbiológico, la cavidad oral es uno de los hábitats más complejos que existen, posiblemente sólo superado por el rumen y el intestino. En el cuerpo humano es muy posible que el sistema microbiano que constituye la microbiota (flora bacteriana) oral sea el más complejo de cuantos existen. Los microorganismos pueden encontrarse en los hábitats naturales de dos maneras, en estado planctónico, es decir en suspensión en fluidos, o en estado adherido sobre superficies sólidas. La cavidad oral ofrece medios para la vida en ambas formas, por una parte las bacterias pueden encontrarse en la cavidad oral adheridas a las superficies sólidas: dientes, lengua y paredes de la cavidad y por otra la saliva ofrece un medio líquido de suspensión. (1), (2).

Los dientes pueden considerarse esencialmente como una superficie de adhesión de saliva, restos de alimentos y , obviamente, bacterias. La población bacteriana de mayor importancia médica, la constituyen aquellas bacterias que se han adherido y pueden

mantenerse de esta forma sobre la superficie de las piezas dentales y sobre la superficie gingival.

1.2. Flora microbiana de la cavidad oral

El origen de la microbiología bucal deriva de los descubrimientos de Antonie van Leeuwenhoek en el año 1683, estando especialmente relacionados con los estudios sobre la caries dental. En 1890 las teorías de Miller sobre la etiopatogenia de la caries ya hacen referencia a causas químico-parasitarias, basando sus conceptos de la desmineralización dental tanto en la teoría química como en la parasitaria. Las investigaciones de Miller, llevadas a cabo en el laboratorio de Koch, sentaron las bases actuales de los conceptos del papel bacteriano, el empaquetado alimenticio y sus productos ácidos sobre el proceso de la caries dental. Según esta teoría, los microorganismos acidogénicos bucales actuaban sobre los carbohidratos procedentes de los alimentos contenidos en la cavidad oral, y producían ácidos que descalcificaban el esmalte y la dentina. Miller creyó que la matriz de dentina descalcificada era destruida por la acción "peptonizante" de los microorganismos

bucales proteolíticos. Investigaciones posteriores llevadas a cabo en este campo se centraron en detectar qué microorganismos específicos eran los responsables de los ácidos descalcificantes (microorganismos acidogénicos). Estos trabajos culminaron en 1922 con el aislamiento de *Lactobacillus* en una lesión de caries. A partir de entonces, y hasta la década de los 40 se consideró a dichos microorganismos como principales agentes etiológicos de la caries dental. En 1960 se determinó el papel de los estreptococos como principales responsables de la formación de la placa dentaria, estadio inicial en la génesis de la caries.

Las enfermedades periodontales se relacionaron mucho menos con el desarrollo de la microbiología de la cavidad oral, aunque algunos trabajos iniciales hacen referencia al intento de relacionar los bacilos fusiformes y las espiroquetas con las formas agudas de la enfermedad .(3).

Actualmente se conoce que la mucosa oral suele ser estéril en el recién nacido, colonizándose a partir de las 4-12 horas de vida con estreptococos alfa-hemolíticos, los cuales van a formar parte de la flora comensal de la boca. Durante los primeros meses de vida se añaden estafilococos aerobios y anaerobios, diplococos Gram

negativos (*Neisseria*), difteroides y lactobacilos. Al inicio de la dentición, asientan también a este nivel, espiroquetas anaerobias, bacteroides, bacilos fusiformes, y algunos vibriones anaerobios. En los adultos pueden encontrarse además actinomicetos, especialmente en amígdalas, encías y lengua. Por tanto, la población bacteriana presente en el medio oral puede dividirse en: microorganismos que colonizan los epitelios y mucosas, bacterias que crecen sobre la superficie de los dientes y que forman la placa bacteriana dental, bacterias presentes en la zona subgingival y en las bolsas periodontales, y aquellas bacterias presentes en la saliva que pueden provenir de cualquiera de las anteriores zonas bucales o del exterior. Cada grupo de bacterias requerirá unas condiciones específicas de adaptación al medio que les permita sobrevivir y desarrollarse. Esta especificidad es especialmente importante entre las bacterias presentes en la placa dental para determinar el nivel de cariogenicidad de las mismas. (4).

La formación de la placa y su composición en términos de población bacteriana depende , en gran medida, de factores del huésped. Además de los que ya se han comentado, la edad es un factor importante así como el grado de salivación. (5), (6).

1.3. Las sustancias naturales antibacterianas de la cavidad bucal.

La saliva es un medio de cultivo relativamente malo para la mayoría de las bacterias. Aunque contiene diversos materiales en disolución y suspensión, que al menos teóricamente pueden servir de nutrientes para los microorganismos, también contiene algunos enzimas cuya actividad es netamente antibacteriana. Entre estos enzimas cabe destacar la **lisozima** , un enzima que hidroliza la pared de las bacterias por rotura del enlace β :1-4 de las subunidades sacarídicas del peptidoglicano. Por otra parte la saliva humana contiene también **lactoperoxidasa**, enzima que actúa sobre las bacterias al provocar el desprendimiento de oxígeno. Como veremos más adelante la presencia de oxígeno molecular y de distintas formas reactivas del oxígeno condiciona en gran medida la viabilidad y supervivencia de las bacterias. (5), (7).

1.4. La Placa Bacteriana.

La placa bacteriana, denominada también placa dental es en realidad un conjunto de poblaciones bacterianas que pueden

considerarse mixtas, es decir constituidas por diversas especies bacterianas que se encuentran incluidas en una matriz adherida consistentemente al diente. Las células bacterianas "sensu stricto" pueden llegar a representar más del 50 % del tamaño total de la placa. La matriz incluye polímeros de tipo polisacárido producidos por las propias bacterias además de restos de células epiteliales y de glóbulos blancos. El material que forma principalmente la superficie del diente (hidroxiapatita) tiene unas características físico-químicas que lo hacen idóneo para la adhesión de la placa dental.

Todos los ecosistemas bacterianos, al igual que el resto de los ecosistemas, tienen una vida extraordinariamente dinámica. En el caso de la placa dental podemos describir como su composición varía notablemente a lo largo de su existencia. En una primera etapa predominan los microorganismos de metabolismo facultativo, capaces de consumir oxígeno en los procesos respiratorios y de subsistir fermentando (es decir sin consumo de oxígeno) cuando escasea el aire. Estos microorganismos facultativos originan unas zonas en las que la tensión de oxígeno es extraordinariamente baja.

Es en estas circunstancias cuando aparecerán de modo importante las bacterias anaeróbicas estrictas, que sólo pueden desarrollarse a concentraciones muy bajas de oxígeno. Esta necesidad de la preparación del terreno por parte de otras bacterias no se refiere únicamente a la concentración de oxígeno, sino que en muchas ocasiones encontraremos bacterias que requieren algún componente de nutrición cuya producción está restringida a otras bacterias, tal es el caso de ciertos *Bacteroides* que presentan requerimiento nutricional de vitamina K, que es sintetizada por otros microorganismos o de *Treponema* que necesitan ácido isobutírico y algunas poliaminas cuya síntesis es realizada también por otros microorganismos. Estos ejemplos pueden ilustrar el grado de complicación y el fuerte nivel de interacción existente entre los distintos microorganismos que forman parte de la flora bucal.

Si entendemos la placa bucal como un sistema dinámico, fuertemente modulado por los factores ambientales ya sean bióticos o abióticos, es fácil comprender que en el desarrollo de la placa se deberán producir diferencias notables en el modo de vida de las bacterias, así al crecer la placa, aquellas bacterias que quedan atrapadas en la matriz en una posición profunda tendrán dificultades

para acceder a los nutrientes, ello comporta que sus tasas de crecimiento desciendan notablemente y que sus morfologías celulares sean en ocasiones atípicas. Por otra parte la situación de privación de oxígeno en las capas profundas, favorece el metabolismo anaeróbico, cuyos principales productos son de carácter dañino, lo cual contribuye a la aparición de ciertas enfermedades dentales como comentaremos más adelante. (1), (8), (9), (10).

1.5 . Microorganismos que forman la placa bacteriana

La microbiota oral es extraordinariamente variada en cuanto a los microorganismos que la forman. Algunas especies son claramente predominantes, la flora bucal aparece formada por una serie de bacterias de características bioquímicas netamente diferenciadas .(4). En los apartados siguientes se procede a una descripción breve de los microorganismos más importantes . (11).

1.5.1. Cocos Gram positivos de metabolismo facultativo.

*** *Streptococcus***

Los *Streptococcus* son un género bacteriano caracterizado por ser de forma ovoide o esférica. Se trata de organismos de carácter Gram positivo de un diámetro comprendido entre 0.5 y 2 μm . En general se presentan en forma de pares (diplococos) o de cadenas (estreptococos). Son bacterias inmóviles, de metabolismo fermentativo, que producen ácido láctico como producto principal de su metabolismo de los azúcares. (12). Algunas especies producen una gran cantidad de material capsular especialmente cuando crecen a expensas de sacarosa. La temperatura óptima de crecimiento de estas bacterias es de 37°C. Son parásitos de los vertebrados, y por lo tanto del hombre, donde habitan diversos hábitats especialmente la cavidad oral y el tracto respiratorio.

La clasificación de los Estreptococos se basa en distintos criterios, como su capacidad de hemólisis, su estructura antigénica (serogrupos de Lancefield ligados al polisacárido parietal C), características fisiológicas, características nutricionales, y características genéticas y químicas estructurales.

Las dos especies de mayor incidencia en la placa dental así como en el origen de enfermedades dentales, particularmente caries

dental son *Str. mutans* y *Str. sanguis*, aunque también veremos brevemente *Str. salivarius* y *Str. mitis*.

* *Streptococcus mutans*

El grupo mutans esta constituido por varias especies. Desde el punto de vista estructural no difieren del modelo general descrito anteriormente, excepto en que no tienen ni cápsula, ni polisacárido C, ni complejos fibrilares. En lugar de polisacárido C tienen otros polisacáridos que según sus diferentes especificidades antigénicas permiten distinguir diferentes serotipos.

* *Streptococcus sanguis*

Se trata de una especie bacteriana muy similar a la anterior perteneciente al grupo H de Lancefield. Difiere de *Str. mutans* en algunas pruebas bioquímicas.

* *Streptococcus salivarius*

Pertenece al grupo K de Lancefield. Desde el punto de vista bacteriológico es muy similar a los dos anteriores.

* *Streptococcus mitis*

No se agrupa en ninguno de los grupos de Lancefield. Difiere de *Str. mutans* en su incapacidad de utilizar y producir ácido a expensas de Manitol.

* ***Enterococcus***

El género *Enterococcus* no es propiamente un microorganismo de la flora bucal, sin embargo se aísla con cierta frecuencia y , dado que por su similitud puede confundirse con *Streptococcus* debe citarse aquí. Se trata de células ovoides u esféricas que se presentan en parejas o en cadenas cortas, son también claramente Gram positivos y sus requerimientos nutritivos son complejos, son característicos de las heces, pero en algunas ocasiones originan procesos piogénicos.

1.5.2. Cocos Gram positivos de metabolismo estrictamente anaerobio.

* ***Peptococcus***

Células esféricas de 0,3 a 1,2 μm de diámetro, cuya disposición es variable presentándose en ocasiones en parejas,

tétradas o agrupaciones informes, incluso en cadenas cortas. Son claramente Gram positivas inmóviles y nunca forman esporas. Tienen metabolismo anaerobio, y requieren medios nutricionalmente ricos para desarrollarse. No utilizan los hidratos de Carbono y cuando crecen a partir de peptona forman Hidrógeno.

* *Peptostreptococcus*

Células esféricas mayores que las anteriores cuya disposición es muy variable: tétradas, parejas o cadenas. Son, al igual que las citadas en el apartado anterior, anaeróbicas y requieren medios muy ricos. Son éstos unos microorganismos parásitos obligados cuyos hábitats preferidos son la cavidad oral, las membranas mucosas y el tracto intestinal de mamíferos, pueden formar parte de la flora productora de enfermedades purulentas.

1.5.3. Cocos Gram negativos de metabolismo aeróbico.

* *Neisseria*

Las bacterias pertenecientes al género *Neisseria* comprenden una serie de especies que comparten la característica de ser cocos

Gram negativos. Se encuentran frecuentemente en disposición de parejas, son inmóviles y aeróbicas estrictas, quiere ello decir que su crecimiento requiere concentraciones importantes de oxígeno. Son habitantes normales de las mucosas de los mamíferos. Entre ellas destacan dos especies altamente patógenas para el hombre como son *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Aunque el papel de *Neisseria* no se ha descrito en relación con infecciones dentales o gingivales, es importante señalar que la presencia de numerosas *Neisseria* comensales en la cavidad oral y la nasofaringe parece ser un mecanismo de reserva de genes de resistencia a los antibióticos. (13).

1.5.4. Cocos Gram negativos de metabolismo anaerobio.

* *Veillonella*

Se trata de un género de cocos de 0,4 μm de diámetro que se presentan en parejas o en masas y que poseen un metabolismo fermentativo, pero no fermentan los hidratos de carbono, sino que actúan sobre ácidos como el pirúvico, láctico, málico, fumárico, y oxalacético, los productos finales del metabolismo son ácido acético, otros ácidos orgánicos, CO_2 y H_2 . Son bacterias parásitas que

habitan la boca y los tractos intestinal y respiratorio de los humanos y algunas otras especies de mamíferos.

1.5.5. Bacilos Gram positivos de metabolismo facultativo.

* ***Nocardia***

Se trata de un género bacteriano que frecuentemente produce hifas muy rudimentarias o formas celulares alargadas y más o menos aberrantes, su forma puede ir desde la forma filamentosa a la bacilar o incluso en algunos casos forma cocos, es Gram positiva, aunque a veces la tinción de Gram es equívoca y en ocasiones es parcialmente ácido-resistente, es un microorganismo aeróbico. Este género bacteriano es abundante en la naturaleza y muy particularmente en suelos. En algunas ocasiones origina infecciones en humanos como micetomas y nocardiosis, que muy raramente afectan la cavidad oral.

* ***Corynebacterium***

Son bacterias similares a las anteriores con formas particulares (forma de maza, o de v). Se trata de microorganismos facultativos, inmóviles y con un metabolismo fermentativo. Son parásitos

obligados de las mucosas humanas y animales y en ocasiones patógenas, aunque sin relación aparente con la enfermedad dental o gingival, se citan aquí por formar parte de la flora bucal.

*** *Lactobacillus***

Se trata de un amplio género bacteriano, conocido por sus actividades sobre determinados alimentos en la elaboración de los cuales juega un papel fundamental. Es un microorganismo bacilar de metabolismo estrictamente fermentativo que produce ácido láctico como producto único o en ocasiones mayoritario de su metabolismo. En el cuerpo humano la flora de *Lactobacillus* juega un papel fundamental en la vagina, manteniendo un pH claramente ácido que limita la ocurrencia de infecciones. La diferenciación entre especies del género *Lactobacillus* requiere gran experiencia en microbiología por lo débil de sus reacciones y por la enorme cantidad de especies descritas.

*** *Rothia***

Se trata de bacilos regulares, Gram positivos y facultativamente anaerobios. Poseen un metabolismo estrictamente

fermentativo principalmente productor de ácido láctico . Normalmente habita la cavidad oral y la garganta humana, en ocasiones se comporta como un patógeno oportunista. La especie tipo es *Rothia dentocariosa*.

1.5.6. Bacilos Gram positivos de metabolismo anaerobio.

*** *Actinomyces***

Se trata de bacterias bacilares rectas o curvadas e incluso filamentosas con ramificaciones. Son Gram positivos y su metabolismo es facultativamente anaeróbico. Utilizan los hidratos de carbono con formación de ácidos acético, láctico y succínico. Es un habitante de la cavidad oral y de las membranas mucosas de los animales de sangre caliente, es muy frecuente que cause infecciones piogénicas en asociación con otras bacterias. (14), (15).

*** *Propionibacterium***

Se trata de bacilos pleomórficos redondeados o en ocasiones con aspecto bífido o ramificado sin embargo no forman filamentos, son bacterias Gram positivas inmóviles aunque son anaeróbicos desde el punto de vista metabólico toleran la presencia de oxígeno,

su metabolismo produce grandes cantidades de ácido propiónico y ácido láctico. Son bacterias típicas del queso que en ocasiones pueden encontrarse en lugares sorprendentes entre los que se encuentra la cavidad oral.

1.5.7. Bacilos Gram negativos de metabolismo facultativo.

*** Enterobacterias**

Las enterobacterias son, en principio, organismos ubicuos, aunque entre sus hábitats más frecuentes se cuenta el tracto digestivo (particularmente el intestino) y ciertos ambientes naturales (contaminados exogenamente, o no). Sin embargo ocasionalmente las enterobacterias forman parte de la flora contaminante de ciertos alimentos, por lo que ocasionalmente pueden aislarse entre la flora bucal. Desde el punto de vista médico esta presencia no es significativa si no se hace constante o los niveles de población ascienden a valores excesivos.

1.5.8. Bacilos Gram negativos de metabolismo anaerobio

*** *Fusobacterium***

Son bacterias bacilares con los bordes afilados (forma de huso) inmóviles y de metabolismo estrictamente anaeróbico en producto mayoritario de su metabolismo es el ácido butírico aunque producen también láctico y acético. Se encuentran principalmente en el surco gingival y en los tractos genital e intestinal. Es un grupo considerablemente heterogéneo desde el punto de vista microbiológico que está fuertemente implicado en las enfermedades odontológicas. Desde el punto de vista microbiológico se asemejan bastante al género *Bacteroides*.

*** Bacteroides**

- *B. oralis* / *B. melaninogenicus*

Se trata de microorganismos anaeróbicos estrictos característicos de la flora bucal. Forman , en muchos casos, colonias negras. La infección con estas especies deriva frecuentemente de la flora bucal dentro de ellas se cuentan infecciones dentales, sinusales, pulmonares y abscesos. Frecuentemente revisten gravedad y debe desbridarse y tratarse con antibióticos.

*** Porphyromonas**

Son bacilos cortos inmóviles que forman colonias negras o pardas cuando crecen sobre agar sangre debido a la producción de grupos protohemo (de ahí su nombre). Fermentan las proteínas con producción de ácidos butírico y acético además de otros ácidos que producen en mucha menor cantidad. Se aíslan con frecuencia de infecciones orales. *Porphyromonas gingivalis* es la especie tipo del género *Porphyromonas*. De hecho en la última edición del Manual de Bergey esta bacteria consta todavía con el nombre de *Bacteroides gingivalis*.

*** Prevotella.**

El género *Prevotella* se creó en 1990 a partir de ciertas especies del género *Bacteroides*. Se trata de bacilos con morfología variable, inmóviles e incapaces de producir esporas. El crecimiento de estas bacterias se inhibe por efecto de la bilis. Se trata de una especie bacteriana especialmente comprometida como agente etiológico de diversas afecciones orales, particularmente de las periodontitis y las periimplantitis.

* *Leptotrichia*

La especie tipo del género *Leptotrichia* es la *Leptotrichia buccalis*. Se trata de bacilos curvados que generalmente se tiñen como Gram negativos aunque los cultivos muy jóvenes a veces dan la falsa impresión de Gram positivos como consecuencia de una pared celular Gram negativa atípica. No forman esporas y son inmóviles. El principal producto de su metabolismo de los hidratos de carbono es el ácido láctico. Es claramente una bacteria que forma parte de la placa dental. La forma celular es fusiforme, requiere complejos medios de cultivo para crecer en el laboratorio. Aunque la bacteria recuerda *Fusobacterium*, su fuerte carácter sacarolítico y la producción de ácido láctico la separan claramente.

1.5.9. Espiroquetas.

Las espiroquetas han ganado en los últimos años un gran protagonismo al describirse como agentes etiológicos, en colaboración con otras bacterias, de diversas enfermedades relacionadas con la boca, especialmente enfermedades periodontales. Las espiroquetas son microorganismos de carácter



Gram negativo, con una morfología especial por cuanto tienen forma de espirilo y una movilidad por flagelos de disposición intracelular (axostilo) que producen tensiones y relajaciones en el espirilo, lo que les permite moverse. Las particularidades estructurales de las espiroquetas, así como sus particularidades evolutivas las han hecho uno de los grupos bacterianos que centra en la actualidad la atención de muchos microbiólogos. También en Infectología las espiroquetas han superado el papel que las restringió durante muchos años al caso de la sífilis.

** Treponema denticola*

Esta especie y otras relacionadas se caracterizan por requerir suero para crecer en condiciones de laboratorio. Son bacterias abundantes en la cavidad oral. Se ha relacionado frecuentemente a estas bacterias con la aparición de enfermedad periodontal.

** Treponema sockranskii ssp. Buccale*

Esta bacteria y algunas otras relacionadas, se caracterizan por requerir ácidos grasos de cadena corta en el medio de cultivo.

La identificación de estas bacterias reviste unas considerables dificultades.

1.6 Efectos beneficiosos de la placa bacteriana.

En general se considera que la microbiota oral tiene efectos negativos sobre la salud buco-dental humana e incluso sobre la salud en general. Sin embargo las bacterias que forman parte de la microbiota oral han sido descritas , desde un punto de vista particularmente teórico, como aportadoras de ciertos efectos beneficiosos.

Entre los efectos beneficiosos descritos o sugeridos se incluye la actividad sintetizadora de ciertas vitaminas, o co-factores. Por otra parte algunas bacterias de la flora bucal, producen proteasas que pueden coadyuvar a la digestión en los primeros estadios. Finalmente, como ocurre en todos los habitats del cuerpo humano colonizado por bacterias, la población autóctona impide el establecimiento de poblaciones invasoras, que en muchos casos, podrían tener efectos mucho más negativos. Si bien el ejemplo característico de la actividad protectora de la flora autóctona no es la

boca, puede asumirse que la microbiota oral deberá actuar de forma similar a la flora autóctona de otras partes del organismo. Los mecanismos que operarían a este nivel, incluirían competencia por los nutrientes, producción de sustancias antagónicas, inducción de anticuerpos, etc. (16), (2).

1.7 Efectos perjudiciales de la placa bacteriana.

Los efectos perjudiciales de la placa bacteriana, son las enfermedades producidas directa o indirectamente por los microorganismos que la forman.

Tal y como hemos descrito las principales especies bacterianas que forman parte de la flora bucal, corresponde ahora introducir los conceptos fundamentales de la enfermedad infecciosa buco-dental. Las superficies de la boca son únicas en el sentido de que no están sujetas a los estímulos metabólicos, una vez formada, la boca es prácticamente indestructible y escasamente variable, de ahí su importancia en la datación de registros fósiles. A nivel individual la estabilidad de la boca se ve amenazada por la agresión microbiana. En realidad la infección buco-dental representa una de las formas

más comunes de enfermedad y su coste en términos económicos ha sido evaluada en los Estados Unidos de América en tercer lugar tras las enfermedades cardio-respiratorias y el cáncer. De este modo, aunque las infecciones buco-dentales prácticamente nunca ponen en peligro la vida del enfermo, han adquirido en las sociedades avanzadas una enorme importancia. Los objetivos actuales para la prevención de las enfermedades infecciosas buco-dentales comprenden la eliminación más o menos selectiva de ciertos microorganismos que presuntivamente pueden ser patógenos. (17), (5).

Las infecciones buco-dentales más frecuentes comprenden principalmente caries dental y enfermedad periodontal, aunque también veremos brevemente las bases microbiológicas de la enfermedad endodóntica. A ellas nos referiremos en los apartados siguientes.

1.7.1. Microbiología de la caries dental.

La caries es debida a la disolución del material mineral que forma las piezas dentales (hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) por efecto de

sustancias ácidas producidas como consecuencia del metabolismo fermentativo de algunas de las especies bacterianas que hemos citado anteriormente. La fermentación utiliza como sustrato fermentable básicamente sacarosa y algunos otros hidratos de carbono. Estas bacterias viven, como hemos señalado, formando comunidades, que conocemos con el nombre de placa bacteriana. Durante muchos años se creyó que prácticamente cualquier tipo de bacteria presente en la superficie podía ser la causa de la caries dental, el tratamiento preventivo se basaba casi exclusivamente en la limpieza por medios mecánicos de las superficies por medio de cepillado con aplicación de sustancias o mezclas moderadamente abrasivas. La prevalencia de caries dental fue de enorme magnitud entre los jóvenes, la incidencia de esta enfermedad en la primera y segunda guerra mundial y en la guerra de Corea, fueron posiblemente las causas de la aparición de una especialidad médica profesionalmente separada de la medicina (dentista) . (4).

La situación actual es mucho mejor en los países avanzados. Los tratamientos a base de flúor de las aguas de bebida se han mostrado como una de las iniciativas preventivas más interesantes de cuantas se han aplicado en medicina, y han conducido a un

decremento espectacular de la incidencia de caries. Los dentífricos fluorados han resultado enormemente eficaces y finalmente la investigación científica acerca de las causas, evolución y tratamiento de las caries dentales ha arrojado luz sobre algunos de los aspectos más importantes de esta enfermedad. Así es en la actualidad de sobras conocido el papel de la sacarosa en la dieta. En realidad puede afirmarse que el desarrollo de *Streptococcus mutans* dependiente de sacarosa es la causa más común de la caries dental. (18), (2), (19). Sin embargo para algunos autores la dieta es más importante que la composición de la flora bacteriana en la determinación de procesos de caries.

Los individuos pertenecientes a grupos de riesgo pueden diagnosticarse y tratarse por intervenciones mecánicas frecuentes, por aplicación intensiva de tratamientos a base de flúor o por otros antimicrobianos como el peróxido de carbamida o la clorhexidina, y por restricciones en la ingesta de sacarosa fuera de las comidas regulares. El resultado de estas medidas, en términos de salud pública ha sido la reducción drástica de las caries, en la actualidad más del 50 % de los niños están libres de caries, y el número de

personas sometidas a extracciones dentarias ha descendido también espectacularmente (del 50% al 20%).

Posiblemente la caries dental ha sido un problema de salud para la humanidad desde tiempos prehistóricos, pero en términos de población no constituyó un problema importante hasta que la sacarosa comenzó a ser un componente normal en la dieta humana. Cuando se consume sacarosa frecuentemente *Streptococcus mutans* se hace el microorganismo predominante en la flora bucal, y es precisamente este microorganismo, o mejor su capacidad metabólica de producir ácidos a expensas de los hidratos de carbono, el responsable máximo de las caries dentales. Aunque el microorganismo fue aislado de caries dentales en los años 20, no fue hasta la década de los 60 en que se inició su estudio en profundidad como presunto agente etiológico de las caries dentales. Los postulados de Koch se demostraron de manera crítica en modelos animales, concretamente en roedores. En los animales de experimentación resulta fácil establecer los principios, dado que *Streptococcus mutans* no es un habitante normal de la cavidad oral de la rata, mientras que si lo es en el hombre. Estudios posteriores demostraron que la aparición de una caries dental, viene siempre

precedida o acompañada de un incremento en las poblaciones de *Streptococcus mutans*.

La caries dental viene determinada por la aparición de lesiones en la superficie del diente. Estas lesiones en forma de cavidad son en realidad un estadio tardío, puesto que vienen precedidas por una lesión superficial e incluso antes por una desmineralización que puede, en principio, ser detectada microscópicamente.

Desde el punto de vista microbiológico la aparición de la caries puede describirse como el resultado de una sucesión. La palabra sucesión, en Biología, es un término que se aplica (por los especialistas en ecología) para describir lo que acontece en el proceso de formación de un ecosistema. Si en un lugar determinado se crean unas condiciones hábiles para la vida, aparecerán una serie de organismos que gradualmente serán desplazados por otros, esta evolución de las comunidades que forman el ecosistema recibe el nombre de sucesión. En teoría cualquier ecosistema que fuera estable llegaría a una situación en la que las especies mejor adaptadas a él constituirían unas poblaciones que ya no serían

desplazadas por otras, en estas condiciones el sistema tendería a estabilizarse definitivamente, a esta situación, en ecología, se la denomina clímax. Sin embargo, si el sistema sufre cambios más o menos importantes, la posibilidad de que se llegue al clímax es nula. Es evidente que en la evolución de los ecosistemas (sucesiones) los organismos cambian, pero también su acción modifica las condiciones, de modo que las especies que aparecerán dependen también de las que había anteriormente. En realidad este proceso de aparición de las caries es el resultado de una sencilla sucesión en este ecosistema que denominamos flora bacteriana bucal. En realidad la caries, propiamente dicha, es la consecuencia de esta capacidad de modificación del medio que poseen los organismos que habitan el sistema. Durante el desarrollo de la caries se detecta en primer lugar un incremento muy considerable de *Streptococcus mutans* que tiene una responsabilidad directa en el inicio de la caries. Posteriormente se puede observar un incremento muy notable de bacterias del género *Lactobacillus* que tienen responsabilidad directa en la progresión de las lesiones.

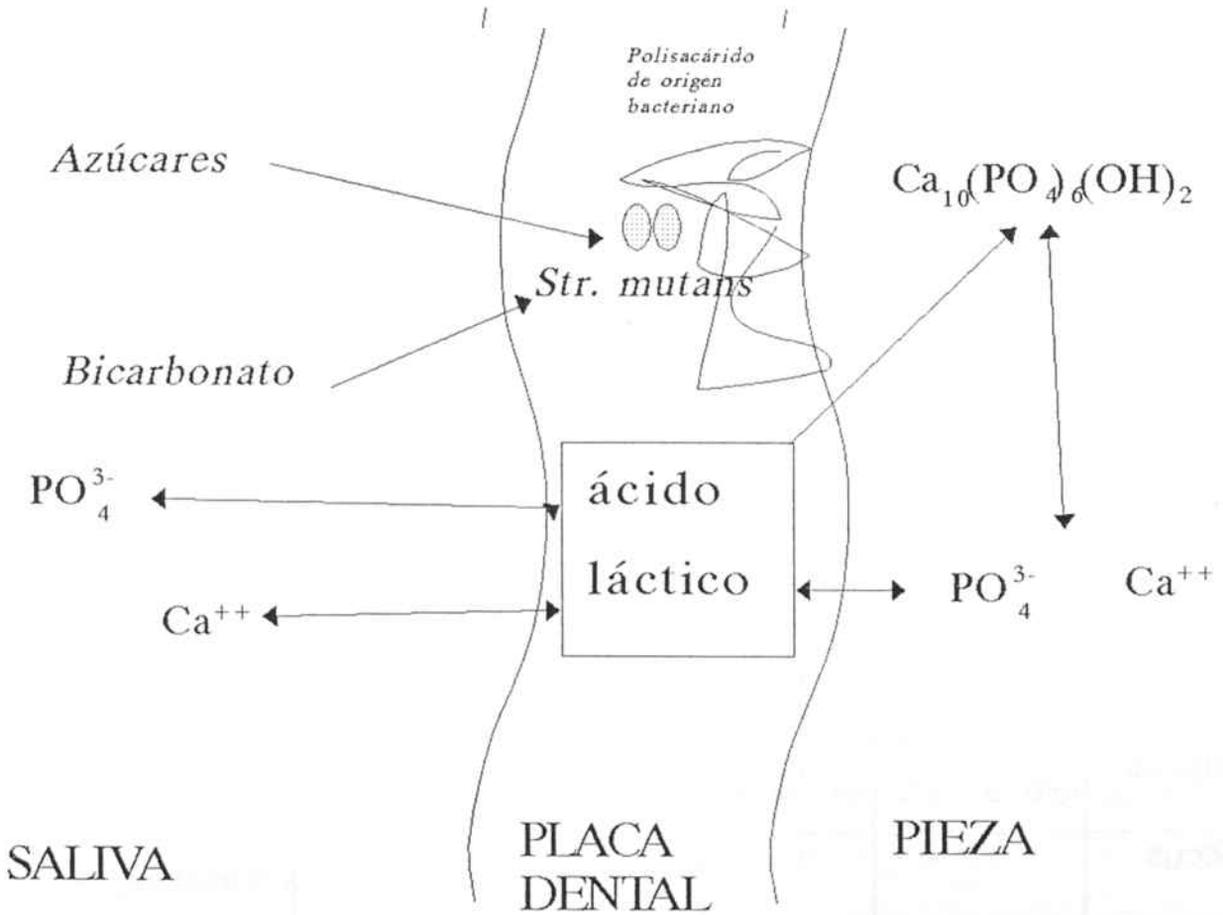
Las lesiones incipientes, denominadas mancha blanca, se producen cuando una actividad acidogénica de *Streptococcus mutans* provoca una movilización de materia mineral para tamponar el pH ácido. Si en este estadio realizamos una toma de muestras e identificamos las bacterias, observaremos como prácticamente toda la población de la placa está formada por *Str. mutans*. Cuando la lesión progresa y aparece la cavitación aparecen otros microorganismos, todos ellos resistentes a los pH ácidos, entre ellos sobresalen las bacterias del género *Lactobacillus*. Si la lesión avanza mucho, se crean unas condiciones en que *Streptococcus mutans* no puede sobrevivir, entonces es frecuente encontrar únicamente el cariogénico secundario (*Lactobacillus*). Este modelo de patogenidad contempla la existencia de una auténtica sucesión bacteriana, de modo que la flora de la lesión avanzada no tiene relación con la flora de la lesión incipiente. Cuando no se pueden aislar *Lactobacillus* de las lesiones a lo largo de su historia, estaremos delante de una lesión no progresiva, en otras palabras el cariógeno secundario es preciso para que la lesión, iniciada siempre por *Str. mutans*, progrese.

Factores del huésped.

La estructura del esmalte y la composición de la saliva son los dos principales factores dependientes del huésped relacionados con la cariogénesis.

El esmalte está constituido en su mayor parte por sustancia mineral y la aparición de caries se asocia a la disolución que el ácido produce sobre esta estructura mineral. La solubilidad del esmalte estará por tanto muy condicionada a la capacidad de los microorganismos de la placa bacteriana de producir ácido.

La saliva juega un importante papel en mantener la salud del diente, tanto por su efecto mecánico en la eliminación de los restos de alimentos y de los microorganismos no adheridos a la mucosa oral, como por su efecto buffer al neutralizar el ácido producido por la placa bacteriana. El posible papel de otros factores antibacterianos de la saliva como la lisozima, el sistema lactoperoxidasa y las inmunoglobulinas no está aún suficientemente establecido.



Gráfica que muestra las interacciones bacteria-diente que conducen al establecimiento de un proceso de caries dental.

Tabla 1. Potencial cariogéno de diferentes bacterias en función de las localizaciones.

	Superficies lisas	Fosas y surcos	Superficies radiculares	Dentina
Lactobacillus	-	++	-	++
Streptococcus				
S. mutans	+++	+++	++	+
S. sanguis	-	+	+	-
S. salivarius	-	+	+	-
S. mitis	-	+	-	-
S. anginosus	-	+	-	-
Enterococcus	-	+	-	-
Actinomyces	-	+	+	++

1.7.2. Microbiología de la gingivitis y de la enfermedad periodontal.

Bajo el término de enfermedades periodontales, o periodontopatías, se agrupan una serie de cuadros clínicos caracterizados por la afección de los tejidos que, agrupados bajo el nombre de periodonto, constituyen las estructuras que protegen y soportan a las piezas dentarias: encías, cemento radicular, hueso alveolar y ligamento periodontal. (20), (21).

La gran frecuencia de estas enfermedades queda confirmada por el hecho de que entre el 97 y el 100% de la población las padece alrededor de los 45 años de edad. La enfermedad periodontal inflamatoria es la causa principal de la pérdida de dientes en la población adulta.

Aunque el periodonto puede verse alterado por enfermedades de tipo inflamatorio, traumático, degenerativo y tumoral, se acepta clásicamente que los términos "enfermedad periodontal" o "enfermedades periodontales" se refieren a las enfermedades del periodonto de origen inflamatorio, específicamente producidas por bacterias que forman la denominada placa bacteriana periodontopática. (22) .

Las lesiones inflamatorias pueden ser agudas o crónicas y su presentación clínica varía según la zona afectada, lo que permite reconocer varias entidades clínicas (tabla 2). (23). Estas enfermedades tienen importancia capital en enfermos afectados de enfermedades de base (enfermedades sistémicas). (24).

Los colutorios se utilizan con gran frecuencia para prevenir e incluso para tratar las enfermedades del periodonto. (25), (26). El tratamiento incluye en todos los casos intervención y tratamiento antimicrobiano. De forma experimental se ha propuesto distintas metodologías coadyuvantes al tratamiento. (27).

Tabla 2. Clasificación de las enfermedades periodontales de etiología infecciosa

Asociadas a la placa

Gingivitis

- aguda: ulcerosa
abscesos
- crónica

Periodontitis

- aguda: abscesos
- crónica: del adulto
prepuberal
juvenil
rápidamente progresiva

No asociadas a la placa

Estomatitis herpética
aguda

Las dos formas de enfermedad periodontal más comunes son la gingivitis crónica y la periodontitis crónica del adulto.

La gingivitis es una inflamación reversible de las encías que se manifiesta habitualmente por sangrados ocasionales en el momento del cepillado dental.

La periodontitis se manifiesta por la destrucción irreversible de los tejidos de soporte del diente: el hueso alveolar y el ligamento periodontal; el proceso inflamatorio produce una reabsorción ósea, entonces la inserción epitelial de la encía sobre el diente migra en dirección apical y el surco gingivodental se transforma en una bolsa que es la manifestación de la pérdida de inserción. (28), (29), (30), (31), (32).

Los principales factores que intervienen en la enfermedad periodontal son: 1. tejidos del huésped, 2. factores inmunológicos, 3. microorganismos de la placa subgingival.

Factores del huésped.

La unión dentogingival es una zona de potencial debilidad. Mientras exista una adecuada higiene oral, las defensas del huésped son capaces de mantener una correcta estabilidad, pero si se produce la formación de la placa en el margen gingival, éstas van a verse

alteradas. No se conoce el mecanismo por el que algunos individuos son más susceptibles a la enfermedad periodontal que otros.

Factores inmunológicos.

La respuesta inmune del huésped, tanto la específica como la inespecífica, parece que desempeña un papel primordial en el desarrollo, progresión y recuperación de las enfermedades periodontales. Uno de los componentes más importantes en este sentido es el líquido crevicular gingival, el cual contiene tanto factores específicos (linfocitos T y B, inmunoglobulinas) como inespecíficos (polimorfonucleares, complemento, lisozima).

El contenido de polimorfonucleares en encías sanas es pequeño, produciéndose un incremento marcado de los mismos durante todo el proceso de gingivitis-periodontitis. Dichos polimorfonucleares al ponerse en contacto con las bacterias de la placa, ponen en marcha el proceso de fagocitosis, el cual se ve favorecido por la presencia de inmunoglobulinas y complemento. Este proceso puede conllevar tanto la destrucción de los microorganismos como la de leucocitos; si se produce la autólisis de los neutrófilos se liberan enzimas lisosomales (hialuronidasa, colagenasa, condroitín-sulfatasa,

elastasa...) que pueden dañar los tejidos periodontales. Por tanto, los polimorfonucleares tienen tanto un efecto protector como tóxico sobre los tejidos del huésped.

Diversos estudios han mostrado también la presencia en el líquido crevicular de anticuerpos específicos de tipo IgM, IgG e IgA frente a los microorganismos que componen la placa subgingival. La presencia de tales anticuerpos y de complemento en los tejidos periodontales sugiere que las reacciones de hipersensibilidad que puedan producirse conlleven lesión tisular, la cual contribuye al desarrollo de enfermedad periodontal.

Microorganismos de la placa subgingival.

No hay duda de que la placa es un componente esencial en la etiología de las formas más frecuentes de gingivitis crónica y periodontitis. El surco gingival sano contiene flora poco abundante, constituida especialmente por bacterias aerobias Gram positivas, y en algunas ocasiones espiroquetas, en un porcentaje inferior al 5%. Análisis bacteriológicos de la flora de la gingivitis crónica revelan que aunque estos microorganismos siguen siendo mayoritarios, su número disminuye a expensas de un aumento de bacterias Gram

negativas y de anaerobios. Las bacterias Gram positivas predominantes son: *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* y *Peptostreptococcus micros*. Entre las Gram negativas destacan: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga*, *Wolinella* y *Haemophilus*. (33).

La secuencia estado sano-gingivitis-periodontitis crónica se acompaña del paso progresivo a una flora más rica en bacterias anaerobias y en bacterias Gram negativas. La flora de las bolsas periodontales es tres veces más densa que la de la gingivitis, y se caracteriza por gran proporción de anaerobios (90%) y de bacterias Gram negativas (75%), pero su composición varía mucho entre una localización y otra y entre pacientes. Entre estas bacterias destacan: *Bacteroides forsythus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Wolinella recta* y *P. micros*. *Actinomyces actinomycetemcomitans* se encuentra en un tercio de los individuos que sufren periodontitis adulta grave, y en la mayoría de casos de periodontitis juvenil, en que *A. actinomycetemcomitans* produce una leucotoxina activa frente a los neutrófilos, lo que le confiere un importante papel patógeno en esta enfermedad. (34).

En todas las patologías periodontales se observan espiroquetas, cuyo número aumenta en función del grado de inflamación. Se cree que su presencia es secundaria a la enfermedad y su crecimiento está facilitado por los elementos nutritivos aportados por el suero, cuya cantidad crece con las lesiones. El potencial patológico de *T. denticola*, sin embargo, no permite excluir esta bacteria de los agentes etiológicos probables.

Una de las especies con mayor potencial patógeno en la periodontitis crónica son los Bacteroides que producen colonias de pigmentación negra, especialmente *B. gingivalis*. Su aislamiento en las lesiones activas es muy frecuente, detectándose además niveles elevados de IgG específica frente a esta bacteria en los individuos con esta enfermedad.

En los casos de periodontitis refractaria al tratamiento, se cree que los microorganismos protegidos en los tejidos gingivales o en el cemento, son inaccesibles para la instrumentación mecánica, o que las defensas locales están especialmente disminuidas. En estos casos la flora bacteriana se caracteriza por los siguientes microorganismos: *B. gingivalis*, *B. forsythus*, *F. nucleatum*, *W. recta*, *S. intermedius* y *P. micros*.

En la tabla 3 se muestran los principales microorganismos asociados a varias formas de enfermedad periodontal.

Por último merece la pena comentar que en los casos de periodontitis en individuos inmunodeprimidos o con patologías de base severas, se detectan microorganismos altamente patógenos en el surco gingival o en la bolsa periodontal, como *Acinetobacter*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 3. Microorganismos asociados a varias formas de enfermedad periodontal

Enfermedad	Microorganismos más frecuentes
Dientes sanos	<p><i>S. sanguis</i></p> <p><i>S. oralis</i></p> <p><i>A. naeslundii</i></p> <p><i>A. viscosus</i></p> <p><i>Veillonella sp.</i></p>
Gingivitis crónica	<p><i>S.sanguis</i></p> <p><i>S. milleri</i></p> <p><i>A. israelii</i></p> <p><i>A. naeslundii</i></p> <p><i>B. intermedius</i></p> <p><i>Capnocytophaga sp.</i></p> <p><i>F. nucleatum</i></p> <p><i>Veillonella sp.</i></p>

Periodontitis juvenil

A. actinomycetemcomitans

Capnocytophaga sp.

Eikenella corrodens

Periodontitis

A. actinomycetemcomitans

rápidamente

B. gingivalis

progresiva

B. intermedius

Espiroquetas

Periodontitis crónica

B. gingivalis

del adulto

B. intermedius

F. nucleatum

S. milleri

Eubacterium sp.

Eikenella corrodens

Wolinella recta

Espiroquetas

Los factores de virulencia de muchas bacterias con potencial periodontopático pueden agruparse en tres categorías: 1. factores de adherencia que facilitan la colonización del espacio periodontal, 2. factores que intervienen en el proceso de destrucción tisular, y 3. factores que participan en la neutralización de las defensas inmunitarias del huésped. La capacidad de una bacteria para colonizar una superficie oral depende de su capacidad de fijación, siendo primordial en este sentido el papel de estructuras como las fimbrias, la cápsula o las adhesinas. La persistencia de bacterias en dicha localización depende de la disponibilidad de nutrientes, como por ejemplo las proteasas en el caso de algunas bacterias proteolíticas. Con respecto a los factores bacterianos de destrucción tisular debe distinguirse entre el efecto directo de los propios microorganismos y las enzimas por ellos segregados. Son enzimas líticas mayores la colagenasa, seudotripsina, peptidasas y aminopeptidasa. Además, en el caso de bacterias Gram negativas, la liberación de endotoxinas puede inducir *in vitro* reabsorción ósea. Otras sustancias citotóxicas para los fibroblastos producidas por algunas bacterias son el amoníaco, el indol, las aminas, los ácidos grasos y compuestos sulfurosos volátiles.

Por todo lo expuesto puede decirse que no existe ninguna evidencia a favor de que sea un sólo microorganismo el responsable de la enfermedad periodontal, aunque algunas entidades clínicas muy precisas se asocien con la presencia específica de algunas bacterias con un potencial patógeno mayor.

La prevención de las enfermedades periodontales es por tanto una tarea compleja, dada la dificultad existente en poder controlar adecuadamente todos y cada uno de los factores anteriormente expuestos. Sin embargo, conviene no perder de vista el hecho incontrovertible de que, sin bacterias, las enfermedades periodontales simplemente no existen, y que, por tanto, el control de las bacterias supone en definitiva el control de la enfermedad.

1.7.3. Microbiología de la enfermedad endodóntica.

Brevemente, pues el interés de la acción de los antimicrobianos sobre la flora bacteriana que ya ha invadido la pulpa se limitaría a las irrigaciones peroperatorias endodónticas y al efecto de los productos de obturación canal, veremos el tercer gran grupo de enfermedades orales infecciosas junto a la caries y a las enfermedades periodontales.

La invasión microbiana de la pulpa puede tener lugar por tres vías:

En primer lugar a través de los túbulos dentinarios o por contacto directo con la pulpa, nos referimos a los casos provocados por caries, abrasiones, grietas o roturas.

En segundo lugar a través de una bolsa gingival profunda, ya sea porque alcance un canal lateral accesorio o incluso el foramen apical, o por propagación de una infección periapical de un diente adyacente.

En tercer lugar la invasión microbiana de la pulpa puede ser por vía hematógica, a través de la circulación sanguínea (anacoresis).

De todos modos la inmensa mayoría de casos de infección pulpar están provocados por las caries.

Los principales microbios que partiendo de una lesión cariosa avanzan hacia la pulpa suelen ser Gram positivos principalmente lactobacilos, aunque también se han encontrado estreptococos, propionibacterias, actinomicetes spp., y Gram negativos anaeróbicos estrictos no esporulados. A medida que aumenta la profundidad de la necrosis del tejido pulpar se establecen más especies de bacterias anaeróbicas estrictas, en particular cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos. Su desarrollo está propiciado por el crecimiento

simultáneo de bacterias anaeróbicas facultativas que bajan la tensión de oxígeno. La mayor parte de estas bacterias no son móviles, por lo que el avance de las bacterias por los túbulos es lento. Por el contrario los metabolitos tóxicos producidos por las bacterias difunden mas rápidamente y son los primeros causantes de la destrucción pulpar. (35), (36), (37), (38), (39), (40), (41).

1.8. Factores que influyen en la placa bacteriana

1.8.1 La sacarosa

A partir de observaciones epidemiológicas se ha determinado la relación existente entre la ingesta de sacarosa, las poblaciones de microbios cariógenos y la eventual aparición de caries. Estas observaciones de carácter epidemiológico han sido posteriormente corroboradas en experimentos con animales de experimentación. La flora bacteriana supragingival se nutre a partir de varias fuentes de nutrientes como la saliva, las células epiteliales descamadas, las bacterias muertas, el exudado gingival, etc. Todas estas fuentes proveen escasas cantidades de nutrientes, es decir que aunque el medio es adecuado para el desarrollo bacteriano la disponibilidad de

nutrientes es muy limitada, sin embargo la situación cambiaría radicalmente cuando consideráramos los componentes de la dieta. Los alimentos de la dieta suministrarían a los microorganismos que habitan la boca una cantidad, en teoría, ilimitada de nutrientes para su desarrollo. Pero en realidad no ocurre así, dado que la mayoría de los alimentos que se ingieren son polímeros de gran tamaño (proteínas, almidón, etc.) y permanecen en la boca períodos de tiempo cortos de modo que, a efectos prácticos, no pueden ser utilizados por los microorganismos de la placa. (2).

La sacarosa, sin embargo, no tiene estas limitaciones. Los organismos de la placa bacteriana, capaces de degradar la sacarosa pueden hacerlo muy rápidamente. Los microorganismos que fermentan la sacarosa tienen pues la ventaja selectiva de poder fermentarla y proliferar y de este modo hacerse predominantes en la placa bacteriana. La fermentación de la sacarosa produce un cambio drástico del pH hasta niveles de 5 o incluso inferiores. Cuando la sacarosa se consume durante las comidas regulares, la salivación puede fácilmente neutralizar este pH de modo que sus efectos son prácticamente despreciables, sin embargo, la ingesta de sacarosa entre las comidas permite una fermentación muy activa de modo que

estos pH bajos se pueden mantener durante largos períodos de tiempo. En resumen la ingesta frecuente de sacarosa no es cariogénica en si misma, pero sí en razón de los cambios en el comportamiento de las bacterias que su asequibilidad en el ecosistema boca produce. Sin embargo la bajada de pH no es la única causa de la aparición de la caries. Ello es fácilmente comprensible si se tiene en cuenta que diversas bacterias de la boca pueden fermentar la sacarosa produciendo un descenso de pH hasta niveles próximos a 5, pero sólo *Str. mutans* produce caries. Debía haber por lo tanto algún otro factor de patogenicidad que hiciera de *Str. mutans* el cariogénico principal. En la utilización de la sacarosa esta bacteria utiliza un enzima la invertasa, que hidroliza la sacarosa en sus dos componentes: glucosa y fructosa. Estos azúcares son convertidos en ácido láctico siguiendo las vías metabólicas representadas en las figuras 1.8.1 y 1.8.2. Además de por los enzimas de estas vías metabólicas, los componentes de la sacarosa son empleados para la biosíntesis de la cápsula bacteriana. Los enzimas glucosiltransferásicos transfieren glucosas a polímeros extracelulares denominados glucanos o dextrano. En el caso de *Str. mutans* se sintetizan algunos glucanos de estructura química

diferente, con ramificaciones, etc. Uno de ellos (denominado mutano) es exclusivo de *Str. mutans*, además producen también fructanos en los que la unidad fundamental esta constituida por residuos de fructosa en lugar de glucosa. Muchas otras bacterias de la placa bacteriana son capaces de producir uno o más polímeros pero sólo *Str. mutans* produce mutano. Los experimentos in vitro demostraron que los polímeros sirven a *Str. mutans* para adherirse con gran eficiencia a las superficies. Los subsiguientes experimentos realizados con roedores a los que se indujo caries mediante cepas distintas de *Str. mutans* demostraron que si se utilizaban mutantes deficientes en la síntesis de mutano, esta deficiencia incapacitaba a la bacteria para comportarse como cariogénico.

FIGURA 1.8.1. VIA DE PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO POR BACTERIAS HETEROFERMENTATIVAS.

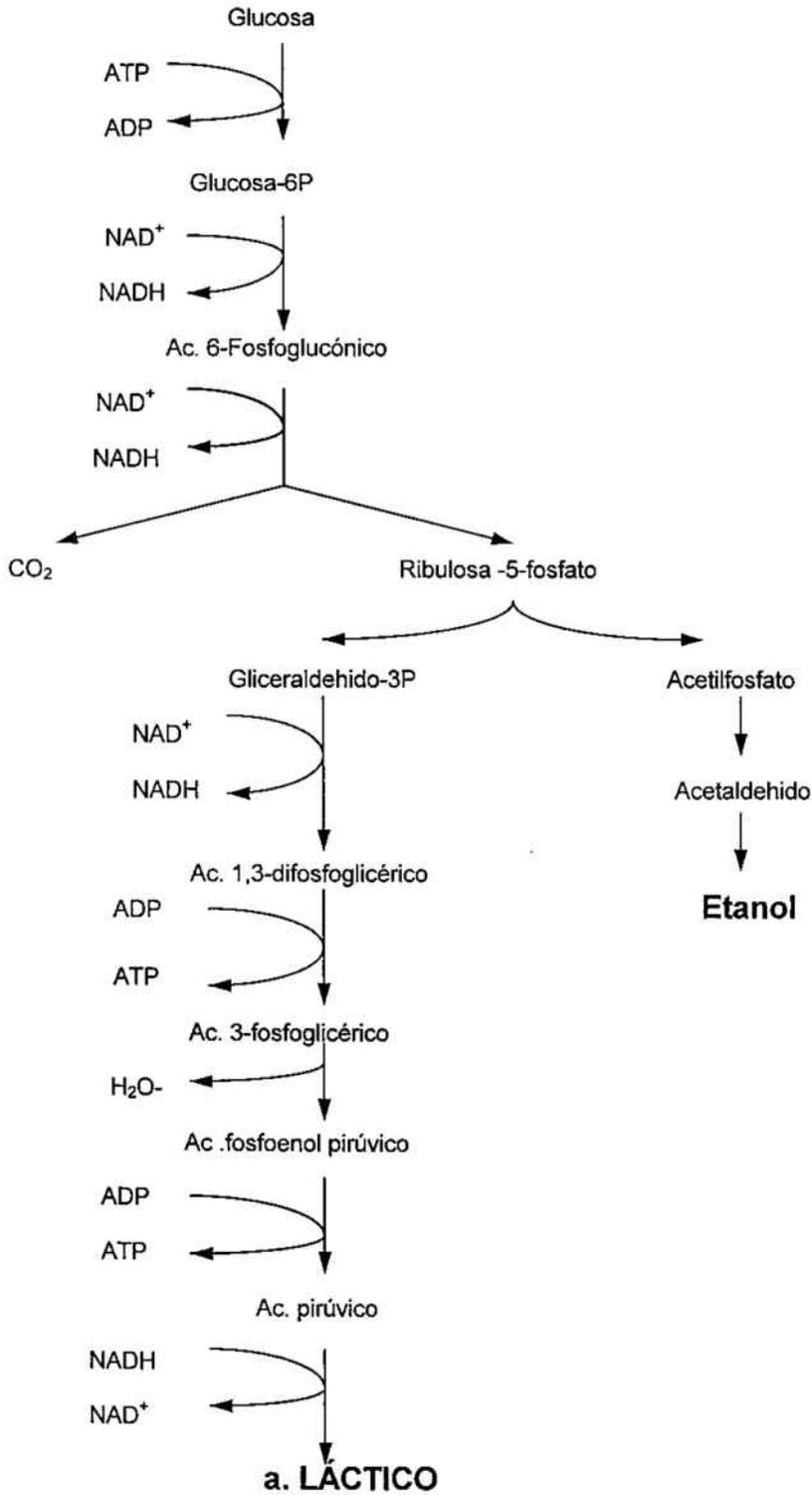
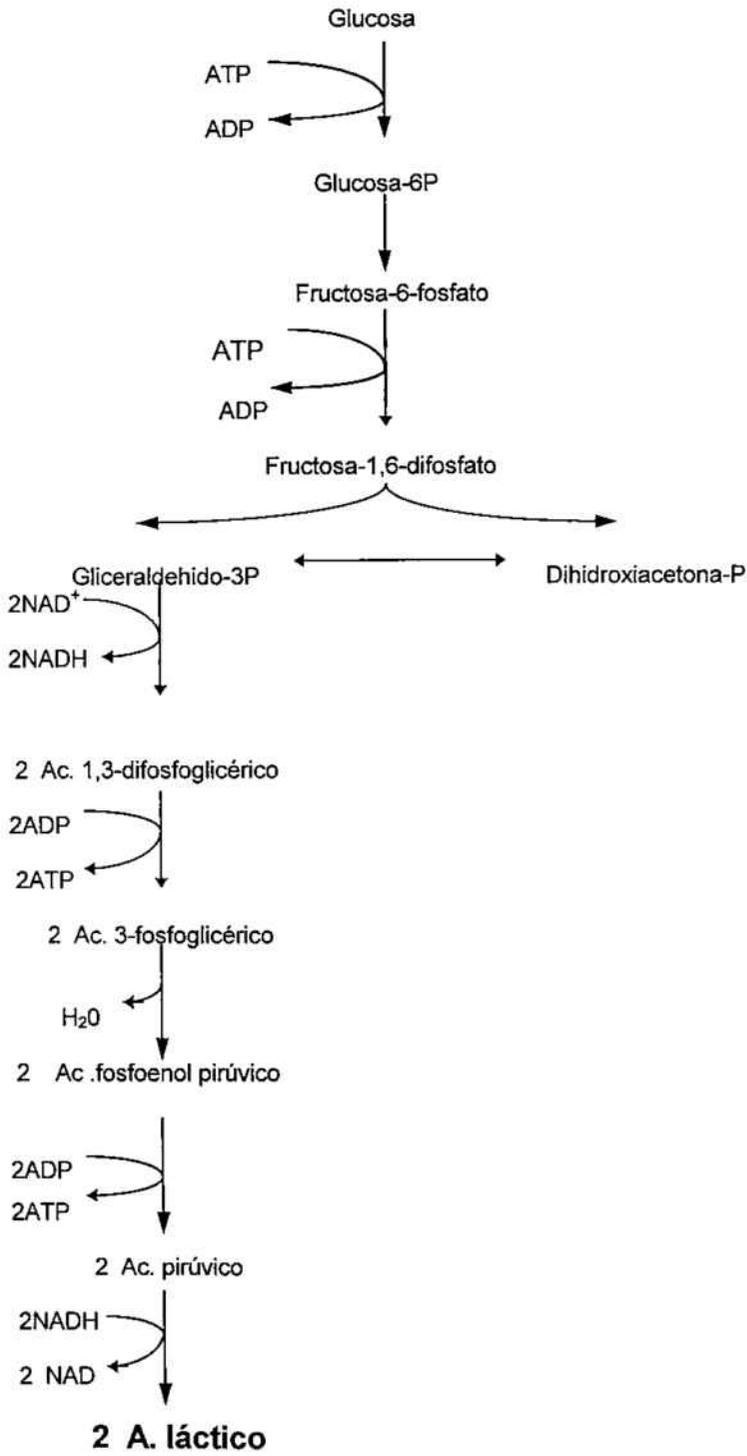


FIGURA 1.8.2. VIA DE PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO POR BACTERIAS HOMOFERMENTATIVAS



1.8.2. La Higiene bucal

La higiene bucal constituye una de las mejores armas para combatir las enfermedades de los dientes (tanto caries como enfermedad periodontal). Existen diversos métodos para llevar a cabo la higiene bucal. Entre ellos sobresalen el cepillado, el uso de dentífricos y el uso de colutorios. (42).

1.8.2.1. Cepillado

La base de acción del cepillado en el mantenimiento de la higiene bucal estriba en el efecto mecánico desarrollado por la acción del cepillo sobre la placa bacteriana. Con ello se contribuye a la destrucción de la red de material capsular que constituye la matriz en la que se encuentran embebidas las bacterias. Existen diversas técnicas de cepillado y diversos materiales de fabricación de cepillos que , en algunos casos pueden optimizar la acción del cepillado. (43). El uso de otros métodos de higiene dental basados en el efecto mecánico es aún poco frecuente en España, si bien la seda dental, ampliamente utilizada en Estados Unidos, comienza a ser frecuente aquí.

1.8.2.2. Dentífricos

El uso de dentífricos añade al cepillado un efecto químico. Generalmente este efecto se basa en la inclusión en las formulaciones de detergentes, de entre los cuales el más utilizado es el Lauril-sulfato sódico. Asimismo la mayoría de los dentífricos incorporan en su composición materiales con actividad abrasiva, lo cual contribuye al efecto mecánico del cepillado. (44), (45), (46), (47), (48), (49), (50).

1.8.2.3. Colutorios

La utilización de colutorios es un excelente sistema complementario de la higiene dental mecánica lo que conlleva múltiples aplicaciones en la práctica odontoestomatológica, como son la profilaxis de la endocarditis bacteriana, la disminución de aerosoles cargados de bacterias en la consulta, los tratamientos post quirúrgicos, el mantenimiento de implantes, y otros. (51), (52). La secuencia lógica del proceso de eliminación de la placa dental pasaría por las tres etapas siguientes: cepillado, utilización del hilo de seda dental, y enjuagado mediante un colutorio. (53). Aunque algunos autores

como López M J, demuestran que la eliminación de la placa bacteriana es superior en el caso de utilizar únicamente el cepillo, que cuando se utiliza una pasta de dientes enzimática o una placebo, atribuyendo este hecho a la mejor visualización de la zona a limpiar, a la “relajación” que produce el buen sabor y la sensación de limpieza que las pastas dentales producen de inmediato, y la mayor sensación de náuseas provocada por la presencia del dentífrico; la eficacia antimicrobiana de los antisépticos orales está muy estudiada, como veremos a continuación. (54).

Existe una amplia lista de productos utilizados como antimicrobianos orales: (55), (56).

Alexidina.

Antibióticos .

Hipocloruro de Benzidamina.

Clorhexidina.

Enzimas.

Hexetidina.

Iodina.

Hipocloruro de octenidina.

Agentes oxidantes.

Agentes fenólicos.

Amonios cuaternarios.

Cloruro de Zinc.

Fluoruro estañoso.

Sanguinarina.

Detergentes

Ahora veremos brevemente los antisépticos mas utilizados en la actualidad, pero está también demostrada la eficacia de otros como la miel (57), sanguinarina (58), (59), delmopinol (60), bicarbonato (61), cloruro de benzalconio (62), (63) , y exetidina (64).

* Clorhexidina.

Los procedimientos mecánicos de higiene oral son imprescindibles para prevenir las enfermedades infecciosas. Entre las sustancias inhibidoras que complementan esta acción destaca de modo importante la clorhexidina. La clorhexidina se caracteriza por su gran sustentividad (capacidad para ser retenida por ciertos tejidos bucales). (65). Hasta un 30 % de cada aplicación queda sobre la hidroxiapatita del esmalte y las proteínas salivares. (66). Se ha

descrito que la clorhexidina tiene un efecto antiplaca por cuatro mecanismos distintos:

1º Impide la formación de la película adquirida por bloqueo de las mucinas.

2º Inhibe la adhesión de los microorganismos.

3º destruye la placa ya formada.

4º tiene un efecto antibacteriano (germicida).

Estos cuatro mecanismos ejercen un efecto sinérgico. (67), (68), (69), (70), (71), (72), (73), (74), (75), (76), (77). La clorhexidina tiene además un marcado efecto sobre la adhesión de ciertas especies microbianas. En concreto, se ha estudiado la inhibición de la adhesión de *Porphyromonas gingivalis* por efecto de la clorhexidina. (78).

* Triclosán.

Recientemente se utiliza con frecuencia el triclosán como antibacteriano en las formulaciones colutorias. El triclosán (éter 2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenilo) es un agente antibacteriano con propiedades analgésicas y antiinflamatorias. Es soluble en lípidos. Estudios clínicos sobre pacientes afectados de aftas recurrentes han

demostrado que los pacientes experimentan un acusado descenso en la aparición de úlceras tras tratamiento con triclosán. (79), (80), (81), (82), (83).

*Flúor.

En un estudio realizado con voluntarios de 15 años de edad con los que se realizó un estudio doble-ciego con un lavado diario de boca con fluoruro sódico al 0.05 %, mientras que en el control se realizó el mismo lavado exento de flúor, pudo determinarse una diferencia significativa entre los grupos (37% de reducción) en la aparición de caries. La duración del estudio fue de tres años. Por otra parte en este mismo estudio los autores reportaron una inocuidad total de las cantidades de flúor ensayadas. (84), (85), (86).

* Alcohólicos

Axelsson y Lindhe realizaron un estudio clínico para determinar el efecto de soluciones de lavado bucal utilizadas como suplemento de la higiene regular buco-dental. El estudio contempló la prevención de tales soluciones en la aparición de caries y de gingivitis. El estudio abarcó los resultados obtenidos en 96 voluntarios. Los resultados

demonstraron que el grupo tratado con Listerine (una solución alcohólica muy similar a la utilizada en el presente estudio y denominada colutorio C1, producía un decremento del 50 % de la placa bacteriana en relación al grupo control. De una comparación entre el grupo Listerine y dos grupos de clorexidina incluida en enjuagues, tenía una actividad similar a listerine en la reducción de la placa bacteriana. Sin embargo si se consideraba el papel del colutorio en la resolución de casos de gingivitis, listerine mostraba una mayor efectividad .

Se han realizado múltiples trabajos experimentales intentando comparar la eficacia antiséptica de los principales principios activos y sus posibles efectos secundarios en especial de la clorhexidina y el listerine. (87), (88), (89), (90).

* Detergentes.

Diversos detergentes (tensioactivos) han sido incorporados por los distintos laboratorios farmacéuticos a productos para la higiene bucal. El mas frecuentemente utilizado es el Lauril sulfato (Dodecil-sulfato sódico). Los estudios para poner de manifiesto la capacidad antimicrobiana de estos componentes han demostrado que su efecto

requiere concentraciones mucho mas elevadas que los componentes o agentes activos citados anteriormente. (entre 10 y 50 veces). (91).

* Peróxidos.

Los peróxidos , en general, y el peróxido de hidrógeno y el de Carbamida en particular se usan en ciertas prácticas como blanqueadores dentales. (92). Sin embargo ha sido descrito repetidamente su efecto antibacteriano. En textos de Microbiología se demuestra que el efecto del oxígeno y de sus formas reactivas tienen una gran efectividad en la destrucción de las poblaciones microbianas. Stambaugh y Blasi (1987) describen el efecto antibacteriano de los peróxidos en una revisión que trata los distintos preparados usados en la higiene buco-dental.

1.8.3. Antibióticos

Los antibióticos no se utilizan con fines preventivos en la higiene buco-dental excepto en pacientes con determinadas

patologías asociadas. (93). En este sentido las prácticas médicas odontológicas superan en cierto modo a las de ciertas especialidades. (94), (95), (96). España es el país que acumula una mayor incidencia de resistencias a los antibióticos. Aunque no conocemos, por falta de trabajos de investigación, cuales con los marcadores de resistencia más frecuentes en la flora dental, parece lógico pensar que los niveles de resistencia deben ser similares en las bacterias que originan patologías buco-dentales a las encontradas en bacterias causantes de otras patologías extra-bucuales. Sin duda los antibióticos usados con mayor frecuencia en España son la tetraciclina, el ácido clavulánico en combinación con la amoxicilina y el metronidazol asimismo se utiliza frecuentemente la espiramicina (97), (98). La información sobre los tratamientos antibacterianos con antibióticos es en muchos casos errónea o al menos carente del apoyo experimental suficiente. En España la utilización abusiva de antibióticos sin el correspondiente control facultativo, puede, en teoría, ser causa de resistencias a los antibióticos en los patógenos buco-dentales. (99). Esta aseveración, aunque no ha sido experimentalmente descrita con profusión

suficiente de datos, se encuentra actualmente en fase de estudio en la Facultad de Odontología de la Universidad de Barcelona.

1.9. Bacterias y oxígeno.

1.9.1. Las relaciones de las bacterias con el oxígeno

Las bacterias, a diferencia del resto de los organismos vivos presentan un amplio abanico de posibilidades por lo que se refiere a sus relaciones con el oxígeno. Podemos considerar esta interacción oxígeno-bacterias desde distintos puntos de vista: metabólico, de toxicidad, etc.

Atendiendo al metabolismo, algunas bacterias utilizan el oxígeno como aceptor final de los electrones en la cadena respiratoria, se trata pues de un mecanismo metabólico igual al de la respiración del hombre y de los animales y también de las plantas, en la que se extraen electrones de la materia orgánica (el sustrato de la respiración) y estos se transfieren a través de una cadena complicada de enzimas que incluyen pigmentos de naturaleza porfirínica para finalmente transferirlos al oxígeno para formar agua. Las bacterias capaces de realizar este proceso requerirán pues la

presencia de oxígeno molecular para su desarrollo, por ello se las denomina bacterias **aeróbicas**. Sin embargo algunas bacterias, aunque pueden realizar la respiración tal y como acabamos de describir (**respiración aeróbica**), tienen también la posibilidad de obtener energía por otros métodos que no requieren el oxígeno, es decir son microorganismos con una duplicidad o incluso una multiplicidad metabólica. Estos microorganismos cuando poseen oxígeno disponible obtienen su energía respirando con oxígeno, pero en la eventualidad de que el oxígeno se agote, pueden obtener energía por otros métodos como los que describiremos a continuación: se trata de las bacterias **facultativas**. Estas bacterias facultativas tienen la capacidad de obtener energía por respiración aeróbica y también por otros sistemas como son la **respiración anaeróbica** y la **fermentación**. Se entiende por respiración anaeróbica aquella que no utiliza el oxígeno para transferir los electrones al final de la cadena respiratoria. En las bacterias es frecuente encontrar otros aceptores finales de electrones como los nitratos (que se reducen a nitritos), los sulfatos (que se reducen a sulfitos) o carbonatos (que se reducen a carbonitos). Esta respiración, aunque menos rentable en términos energéticos que la

respiración aeróbica constituye una alternativa metabólica para la vida en ausencia de oxígeno. Sin embargo la mayoría de las bacterias que son capaces de crecer en ausencia de oxígeno lo hacen mediante un sistema de obtención de energía que es el que denominamos **fermentación**: Se trata de un sistema de obtención de energía en el que no intervienen las cadenas respiratorias sino que se establecen intercambios electrónicos entre dos compuestos orgánicos. La rentabilidad energética de este sistema de obtención de energía es claramente inferior a los de las respiraciones, posiblemente el sistema de obtención de energía por fermentación tenga una antigüedad, en la evolución de las bacterias, muy superior. A efectos del tema que tratamos en esta tesis doctoral, esta referencia a las relaciones de las bacterias con el oxígeno nos conducen a resumir en la tabla 1.9.1.

Tabla 1.9.1

Sistema de obtención de Energía	Tipo	Tolerancia al oxígeno
respiración aeróbica	Aeróbicos estrictos	SI
Respiración anaeróbica	Anaeróbicos: . Estrictos . Facultativos . Aerotolerantes	NO SI Si
Fermentación	Anaeróbicos: . Estrictos . Facultativos	NO SI

Por tanto en algunos casos (anaeróbicos estrictos) la presencia del oxígeno resulta letal para el microorganismo, en otros casos se dará un metabolismo u otro según la bacteria disponga de oxígeno o no. Aquellas bacterias que pueden vivir en presencia de oxígeno, poseen todas ellas formas de detoxificación de las formas reactivas del oxígeno, particularmente peróxidos y superóxidos.

1.9.2. Las formas reactivas (tóxicas) del oxígeno.

La atmósfera actual contiene aproximadamente el 20 % de Oxígeno. El oxígeno es, en principio un gas muy reactivo. La oxidación de flavoproteínas por el oxígeno produce siempre H_2O_2 como producto mayoritario. Además estas oxidaciones, y posiblemente otras reacciones en las que participa el oxígeno, producen siempre cantidades más o menos elevadas de otra forma tóxica del oxígeno (el superóxido O_2^-). (100).

1.9.3. Enzimas que actúan sobre las formas reactivas del oxígeno.

En los aerobios y los anaerobios aerotolerantes la acumulación letal de superóxido se evita por efecto de un enzima denominado **superóxido dismutasa** que cataliza la conversión de superóxido a oxígeno y peróxido:



Además la mayoría de los microorganismos de estos grupos poseen el enzima **catalasa** que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno:



Existen algunos aerotolerantes que no contienen catalasa, como el caso de las bacterias lácticas, presentes en grandes cantidades en la flora bucal y comprometidas en la aparición de caries, sin embargo estas bacterias poseen **peroxidases**, enzimas que también tienen actividad de eliminación de peróxidos. En definitiva pues la superóxido dismutasa, la catalasa y las peroxidases juegan un papel fundamental en la protección de los microorganismos frente a las formas reactivas del oxígeno. El primer enzima es absolutamente indispensable para la vida en contacto con el aire. (101).

2.- Hipótesis y Objetivos.

Los objetivos de este trabajo de doctorado se han centrado en establecer, de modo crítico y basado en resultados experimentales, la comparación de las eficacias de diversos preparados farmacéuticos de tipo colutorio.

Los principios activos de la mayoría de los colutorios comerciales responden a agentes químicos desinfectantes basados en la clorhexidina, los alcoholes o los generadores de oxígeno. En general los profesionales recomiendan unos u otros en función de la información que poseen. En principio podía estudiarse el efecto antibacteriano escogiendo cepas bacterianas de las que habitualmente se usan en los laboratorios de microbiología para valorar la eficiencia de los desinfectantes. Por lo tanto era imprescindible que en los experimentos estuvieran representadas las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas, que como se sabe presentan diferencias de comportamiento importantes frente a los agentes antibacterianos. Por otra parte dada la especificidad de la flora bucal y el hecho de que, aunque no completamente establecidos, los agentes etiológicos de las enfermedades bucales más comunes, han sido identificados, se hacía necesario introducir

en el estudio algunas bacterias aisladas de pacientes afectados de infección oral.

Por lo tanto los objetivos concretos de este estudio pueden resumirse en los siguientes apartados:

- 1.- Determinación del poder antimicrobiano de las soluciones colutorias mediante el método de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)
- 2.- Comparación y valoración de los valores de CMI determinados.
- 3.- Ensayo del efecto antibacteriano *in situ* de cada uno de los colutorios frente a floras bacterianas bucales de individuos sanos que no estuvieran bajo tratamiento antibiótico. (ensayos con voluntarios)
- 4.- La diferente composición de los colutorios ensayados sugiere que sus mecanismos de acción pueden ser enormemente variados. Por lo tanto, presumiblemente, la cinética de actuación sobre las

bacterias debería presentar diferencias importantes. Por lo tanto el cuarto objetivo se sitúa en la determinación de las cinéticas de muerte de las distintas especies bacterianas en contacto con los colutorios.

La hipótesis general se basa en la creencia, ampliamente documentada en la prensa profesional, de que los colutorios a base de clorhexidina son más activos en la eliminación de la placa basal. Las mismas fuentes otorgan una utilidad clara al peróxido de Carbamida como blanqueador, aunque se dispone de muy poca información sobre la acción antibacteriana de los colutorios a base de peróxido de carbamida. Finalmente, por lo que respecta a los colutorios a base de triclosán y de base alcohólica, se han incluido en el estudio para obtener una mayor representatividad en la comparación de los resultados.

3.- Material y Métodos.

3.1 Cepas bacterianas.

Para la realización de este estudio se han utilizado una serie de cepas bacterianas que podemos dividir en dos grupos. Por una parte se han utilizado 6 bacterias que generalmente se usan para medir la actividad bactericida de desinfectantes, y por otra cuatro especies bacterianas implicadas en la producción de caries y de enfermedad periodontal.

3.1.1. Cepas de colección.

En este grupo se incluyen *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* como bacterias Gram negativas, y *Bacillus subtilis* como Gram positivas. La tabla siguiente muestra el origen y principales características de estas cepas microbianas.

Cepa	Origen	Características	Referencia
microbiana			
Klebsiella pneumoniae	Dept. Microbiol & Parasitol	Cepa salvaje	Viñas et al., 1983 . (102).
Serratia marcescens	Dept. Microbiol & Parasitología	Pigmentada; cepa salvaje	Viñas et al., 1983 . (102).
Escherichia coli	Dept. Microbiol & Parasitología	Cepa de laboratorio	Leranoz et al, 1989 . (103).
Pseudomonas aeruginosa	Dept. Microbiol & Parasitología	Cepa salvaje	Manual CETC
Salmonella typhimurium	CECT	Cepa salvaje	Manual CETC
Bacillus subtilis	CECT	Cepa salvaje	Manual CETC

Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

En el grupo de cepas patógenas buco-dentales se han utilizado *Streptococcus mutans*, *Prevotella oralis*, *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromonas gingivalis*.

Estas cepas patógenas buco-dentales se aislaron, a partir de muestras clínicas, del modo que explicaremos en el apartado siguiente.

3.1.2. Cepas obtenidas de muestras clínicas.

Con el fin de incluir en el estudio algunas cepas bacterianas obtenidas directamente de enfermos afectados de infección bucodental, se ha procedido a la obtención de diversas muestras a partir de pacientes. Las muestras se obtuvieron por punción de la zona sospechosa de infección, y se recogieron mediante una tira de papel estéril. A partir de las muestras así obtenidas, se sembraron (en el mismo momento de la obtención de la muestra) para cada una dos placas de agar sangre (una de ellas incubada en aerobiosis, y la otra en jarra de Gaspack) y a la vez se inoculó un tubo de medio carne picada, que se incubó en condiciones de anaerobiosis. Tras 48 horas de incubación a 35 °C, se procedió a la identificación de los

por medios microbiológicos. En la identificación se aplicó el método API 20A, específico para la identificación de bacterias anaeróbicas, mientras que para las bacterias aeróbicas y/o facultativas la identificación fue llevada a cabo igualmente por personal del Laboratorio de Microbiología del Campus de Bellvitge de la Universidad de Barcelona mediante pruebas bioquímicas. El método de identificación se basó en la aplicación del método API para anaerobios, incubación durante 24 horas en anaerobiosis y lectura de los resultados. La identificación se llevó a cabo por aplicación de los códigos API a los resultados obtenidos. En todos los casos seleccionados (que se detallan en el apartado de resultados) la identificación fue considerada por el programa informático API como excelente o muy buena.

3.2 Mantenimiento.

Las cepas bacterianas se mantuvieron en el laboratorio en congelación a -80°C en medios de cultivo suplementados con un 10% de glicerol (como anticongelante, para que el agua no haga cristales y las bacterias se lisen)

3.3 Medios de cultivo.

Solución de Vitamina K-Hemina.

Se trata de una solución que frecuentemente se adiciona a los medios para el cultivo de bacterias anaeróbicas estrictas. Es un factor de nutrición para el mejor desarrollo de las bacterias. Se prepara de la siguiente forma:

Se añaden 100 mg de Vitamina K a 20 ml de etanol al 95%, se filtran a través de un filtro estéril de 0,20 μm de diámetro de poro (Solución A).

Se prepara una solución de hemina disolviendo 50 mg de hemina en 1 ml de NaOH 1N y se añaden a 100 ml de agua destilada y se esteriliza al autoclave a 121°C durante 15 minutos (Solución B).

Se añade 1 ml de Vitamina K estéril (solución A) a 100 ml de solución B

Solución de sales.

En ocasiones los medios para bacterias anaeróbicas se complementan con la adición de una solución salina, que asegura

ciertas sales que necesitan los anaeróbicos para desarrollarse, y que se prepara de acuerdo a las siguientes composición y normas:

Cloruro cálcico anhidro	0,2 g
SO ₄ Mg x 7 H ₂ O	0,2 g
PO ₄ H ₂ K	1 g
CO ₃ HNa	10 g
ClNa	2 g

Se mezclan el cloruro cálcico y el sulfato magnésico en 300 ml de agua y se agitan hasta disolución. Se añaden 500 ml continuando la agitación. Se añade el resto de las sales lentamente hasta que se disuelvan y una vez conseguido se añade 200 ml de agua destilada. Se conserva a 4°C.

Caldo de Trypticase y Soja. (TSB)

Se trata de un medio rico que permite el desarrollo de gran variedad de bacterias aeróbicas y facultativas. Su composición es la siguiente:

Peptona de Caseína.....17,0 g/l

Peptona de Soja.....	3,0 g/l
NaCl.....	5,0 g/l
KH ₂ PO ₄	2,5 g/l
Glucosa.....	2,5 g/l

El medio se prepara disolviendo 30 g de producto preparado en 1 l de agua destilada, ajustando el pH a 7,2 y esterilizando en el autoclave durante 20 minutos a la temperatura de 121°C.

Se ha utilizado un medio análogo al anterior (TSA) del que se omite la glucosa y al que se adicionan 14 g/l de agar-agar para su solidificación, para cultivo de las mismas bacterias en medio sólido.

TSA y TSB se han utilizado para cultivar *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Ambos medios se han empleado para el cultivo de microorganismos poco exigentes de carácter aerobio y/o facultativo.

Medio de Mueller-Hinton

Se trata de un medio muy recomendado para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos y sulfamidas. Su composición es la siguiente:

Peptona 17,5 g/l

Almidón 1,5 g/l

Sólidos de infusión de carne 4 g/l

El pH final del medio se sitúa alrededor de 7,4.

Se ha utilizado el medio de Mueller-Hinton comercializado por Adsa-Sharlau y se ha preparado siguiendo las instrucciones del fabricante.

El medio se ha empleado para la determinación de la susceptibilidad a los colutorios (Determinación de MIC) de aquellos microorganismos capaces de crecer en dicho medio.

Medio MRS (Medio de Man, Rogosa y Sharpe).

Es un medio ideal para el cultivo de bacterias del grupo del ácido láctico. En este trabajo se ha utilizado para el cultivo de *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Su composición es la siguiente:

Peptona 10 g/l

Extracto de carne 8 g/l

Extracto de levadura 4 g/l

D(+) Glucosa	20 g/l
Acetato sódico	5 g/l
Citrato amónico	2 g/l
Sulfato magnésico	0,2 g/l
Sulfato manganoso	1,05 g/l

En un frasco a parte se prepara polisorbato a 1g/l, el pH final del medio debe ser de 6,2 aproximadamente. Se ha preparado siguiendo las recomendaciones del fabricante (ADSA-Sharlau).

Agar sangre.

Es un medio nutritivo convencional suplementado con un 10% de sangre desfibrinada de animal obtenida en condiciones asépticas. En este trabajo se han utilizado placas de agar sangre obtenidas directamente de laboratorios especializados en la preparación de estos medios de cultivo (Biomerieux). El medio se ha utilizado para el cultivo de todos los géneros bacterianos que presentan requerimientos especiales para su crecimiento. Asimismo el medio se ha utilizado para preparar los inóculos con el fin de proceder a la

identificación de los microorganismos aislados de muestras clínicas odontológicas.

Medio de Carne Picada

Se compone de :

Carne picada de buey (exenta de grasa)	500 g
Agua destilada	1000 ml
Sosa 1N	25 ml

Se utiliza carne exenta de grasa para evitar la formación de película grasa en la superficies del medio lo que afectaría al desarrollo de las bacterias. Una vez preparada se mezcla con la sosa y el agua y se lleva a ebullición con agitación. Se deja enfriar a temperatura ambiente en baño María a temperatura baja. Se aspira la grasa residual en la superficie mediante una trompa de agua y se filtra el resto reteniendo la carne picada a través de varias capas de gasa. Al líquido filtrado se le añade suficiente agua destilada para alcanzar un litro y a este volumen se añade:

Tripticase	30 g
Extracto de levadura	5 g
Fosfato potásico	5 g

Solución de resazurrina 4 ml

Se lleva a ebullición, se deja enfriar y se añade 0,5 g de cisteína, se ajusta el pH a 7 y se distribuye en tubos en los que previamente se ha puesto una parte de la carne picada. Normalmente se distribuye una parte de carne picada por 4 o 5 de líquido.

Este medio se ha empleado para el cultivo de los microorganismos anaeróbicos estrictos exigentes (*Prevotella*, *Actinomyces* y *Prophyromonas*)

Peptona extracto de levadura-glucosa (PYG).

El medio se compone de:

Peptona	5 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	10 g
Solución de resazurrina	4 ml
Solución de sales	40 ml
Agua destilada estéril	1000 ml
Solución de vitamina K-Hemina	10 ml

Clorhidrato de cisteína 0,5 g

Ocasionalmente el medio se completa con la adición de glucosa (10 g/l). Este medio se ha empleado para el cultivo de anaerobios estrictos en algunos experimentos de identificación de las cepas bacterianas.

BHI

Se trata de un medio de infusión de cerebro y corazón (Brain Heart Infusion). Se ha empleado para la determinación de las MIC de los microorganismos exigentes utilizados en los experimentos referidos en esta memoria. Su composición es la siguiente

Infusión de cerebros de ternera	200 g
Infusión de corazón de vacuno	250 g
Peptona proteosa	10 g
Glucosa	2 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico	2,5 g

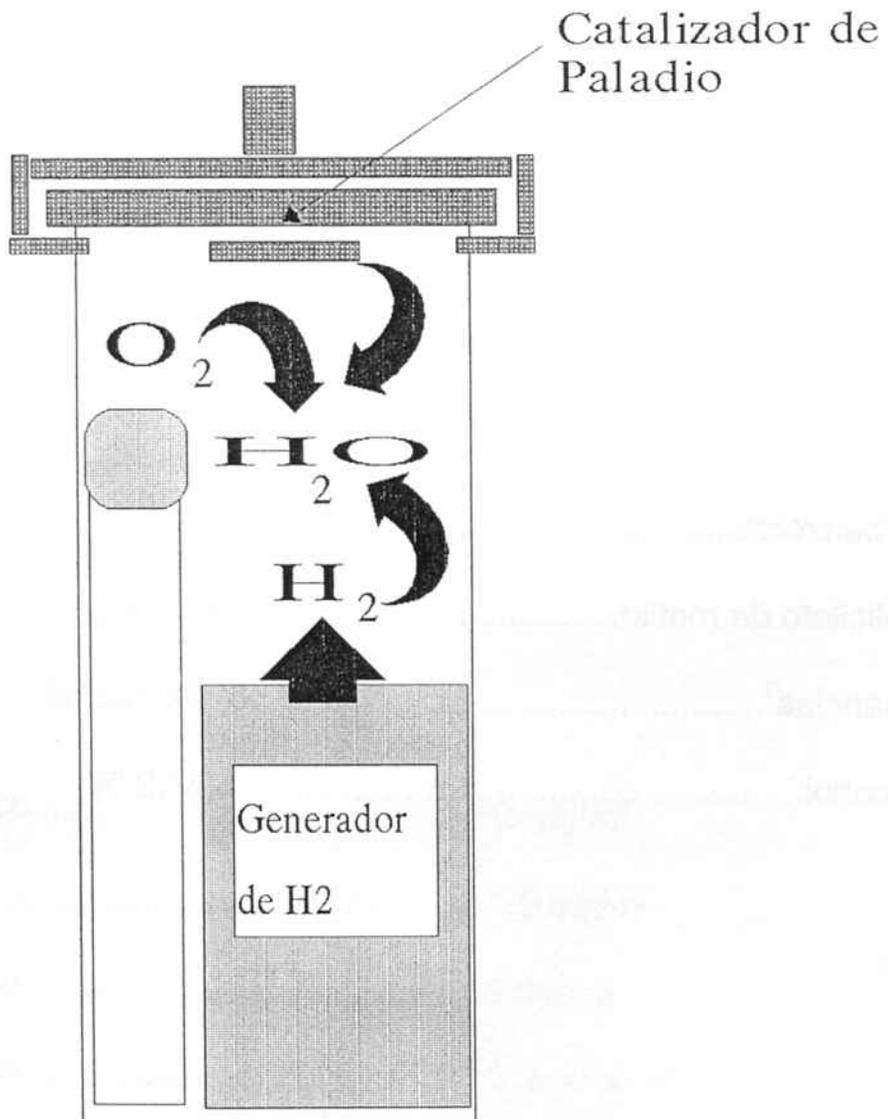
El pH final es de 7,4.

3.4 Cultivo en anaerobiosis.

Para alcanzar las condiciones de anaerobiosis necesarias para el desarrollo de las bacterias anaeróbicas utilizadas en este trabajo, se ha empleado el método denominado GASPAC. Se trata de un dispositivo de laboratorio consistente en jarras de cierre hermético dotadas de un contenedor para catalizador de paladio.

En el interior se introduce un sobre productor de hidrógeno, que en presencia del Oxígeno del aire realiza la reacción detonante que tiene como producto final el agua con ello se consiguen tensiones de oxígeno adecuadas para el desarrollo de las bacterias anaeróbicas utilizadas en los experimentos de esta memoria doctoral (Figura 3.4). En la fase final de desarrollo de los experimentos de esta memoria doctoral se incorporó un nuevo sistema de obtención de condiciones anaerobias. Se trata de un dispositivo que evita el uso de catalizadores de paladio y desprendimiento de oxígeno, y que se basa en la capacidad del ácido ascórbico para absorber el oxígeno y desprender dióxido de carbono (Anaerogen, Oxoid).

Figura 3.4 Esquema que representa una jarra de Gaspack y su funcionamiento.



3.5 Colutorios utilizados en el trabajo experimental.

El enfoque eminentemente práctico de este trabajo nos llevó a utilizar en los experimentos colutorios obtenidos del mercado (tanto farmacéutico como del comercio en general de grandes superficies). Los colutorios ensayados se han redenominado para eludir el uso de su nombre comercial. A continuación se exponen sus formulaciones:

C1.

A. benzoico.....	0,125 mg/ml
Salicilato de metilo.....	0,06 mg/ml
Esencias ¹	0,196 mg/ml
Alcohol.....	27,2 %

C2.

Digluconato de clorhexidina.....	1,20 mg/ml
Fluoruro sódico.....	0,5 mg/ml

¹ No se indica cuales

Sacarina sódica.....0,6 mg/ml

C3.

Digluconato de clorhexidina.....1,20 mg/ml

Sacarina sódica.....0,1 mg/ml

C4

Peróxido de Carbamida.....100 mg/ml

Mentol.....0,5 mg/ml

Otros excipientes².....cs

C5.

Nitrato Potásico.....10 mg/ml

Triclosán.....1,5 mg/ml

Cloruro de Zinc.....1 mg/ml

Fluoruro sódico.....2 mg/ml

Pantenol.....5 mg/ml

² No se indica cuales

Vitamina E (acetato).....0,4 mg/ml
 Xilitol.....10 mg/ml
 Excipiente "idóneo"³.....cs

C 6.

Triclosán.....1,5 mg/ml
 Cloruro de Zinc.....2 mg/ml
 Alantoína.....2 mg/ml
 sacarina sódica.....0,2 mg/ml
 Excipiente hidroalcohólico⁴.....c.s.

Se ha medido el pH de las soluciones colutorias resultando los valores siguientes:

Colutorio	pH
C1	4,1
C2	5,9
C3	5,8
C4	6,6
C5	3,3
C6	4,5

³ No se indica composición

⁴ No indica concentración alcohólica

3.6 Determinación del efecto antimicrobiano.

3.6.1 Determinación de la MIC frente a bacterias aeróbicas y facultativas.

El efecto antibacteriano de los productos ensayados se ha controlado mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. Para ello se prepararon diluciones del producto a concentraciones entre el 50% y el 0.001 % en medio de cultivo contenido en los pocillos de placas de microtitulación con un volumen total por pocillo de 200 μ l. Los pocillos se inocularon con 10 μ l de un cultivo en fase exponencial de la bacteria a ensayar. Tras la inoculación las placas de microtitulación se incubaron a la temperatura adecuada (37°C o 30°C según los casos). Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el crecimiento bacteriano mediante lectura de las placas con un aparato lector de ELISA (Behring EL311 microplate reader) a la longitud de onda de 530 nm. Paralelamente se realizó una lectura visual de crecimiento bacteriano.

Se consideró el valor de concentración mínima inhibitoria aquella dilución mayor que evita totalmente el crecimiento detectable del microorganismo. Los experimentos se realizaron por triplicado

del microorganismo. Los experimentos se realizaron por triplicado para evitar desviaciones debidas a la manipulación de medios y bacterias. Esta metodología se utilizó para todas las bacterias aeróbicas y facultativas.

Microorganismo	Medio de cultivo
<i>Serratia marcescens</i>	Muller Hinton
<i>Escherichia coli</i>	Muller Hinton
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Muller Hinton
<i>Streptococcus mutans</i>	MRS
<i>Salmonella typhimurium</i>	Muller Hinton
<i>Bacillus subtilis</i>	BHI
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	BHI
<i>Prevotella oralis</i>	BHI
<i>Actinomyces</i>	
<i>actinomycetemcomitans</i>	Muller-Hinton
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	

3.6.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria para bacterias anaeróbicas estrictas.

La determinación de los parámetros de susceptibilidad de las bacterias anaeróbicas incluidas en este estudio se realizó mediante experimentos desarrollados en tubo de ensayo con el medio apropiado. Las distintas determinaciones se desarrollaron con incubaciones realizadas en jarras de Gaspack con generador de Hidrógeno (ver 3.4).

Se prepararon diluciones de producto desde 10 % volumen/volumen, hasta 0.01 % y los tubos se inocularon con 100 μ l de un cultivo en fase exponencial de la bacteria a ensayar. La incubación a la temperatura adecuada (37°C) se prolongó 24 horas, tras las cuales se leyeron los tubos visualmente para determinar el crecimiento bacteriano. Se tomó como valor de MIC aquella dilución que evita el crecimiento visible del microorganismo.

3.6.3.- Determinación del tiempo de actuación de las soluciones colutorias.

Una vez determinados los valores de concentración mínima inhibitoria, y dadas las aparentes diferencias detectadas en el comportamiento de las distintas soluciones frente a las diversas bacterias ensayadas, pareció oportuno determinar el tiempo óptimo de actuación de los distintos agentes sobre los microorganismos. Con ello podría obviarse una posible limitación de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias. En efecto, cuando determinamos las CMI, las bacterias se encuentran en contacto con la dilución correspondiente del producto antimicrobiano durante todo el periodo de incubación, a no ser que los productos activos se debiliten (como en el caso del peróxido de carbamida, que va perdiendo actividad con el tiempo) o que se modifiquen alterando su efecto antimicrobiano. Estas alteraciones podrían producir incrementos o decrementos del poder bactericida del producto en cuestión. Si se diseñan experimentos con el fin de determinar el efecto antimicrobiano de las soluciones durante periodos cortos de tiempo, pueden obtenerse imágenes que representan mejor la

situación real en la que el colutorio permanece solo unos pocos minutos en la boca.

Con el fin de cuantificar el efecto antibacteriano de los colutorios con respecto al tiempo se diseñaron experimentos en los que se realizaron curvas de supervivencia del microbio en presencia de los distintos colutorios ensayados. Para ello se prepararon suspensiones bacterianas que se pusieron en contacto con las soluciones desinfectantes. Cada 15 segundos se obtuvo una muestra que se diluyó rápidamente 10,000 veces con el fin de anular el efecto del colutorio y se procede al recuento de bacterias supervivientes. Los resultados se representan en forma de curvas de supervivencia. La pendiente de la representación está en razón directa con el efecto antimicrobiano del colutorio.

3.6.4. Experimentos “in vivo” en voluntarios.

Con el fin de determinar la eficiencia real en cavidades orales humanas se seleccionaron un total de 30 voluntarios que se sometieron a un sencillo experimento.

A cada voluntario se le suministraron cada semana tres frascos rotulados con los números 1, 2 y 3. Los frascos 1 y 3 contenían 15

ml de suero fisiológico estéril, mientras que el frasco 2 contenía un colutorio (desconocido para el voluntario) en un volumen de 15 ml. Juntamente con los tres frascos se suministró una hoja de información sobre cómo realizar la toma de muestras.

1.- Los voluntarios se enjuagaron la boca con los 15 ml de suero fisiológico estéril del frasco 1, durante un minuto. Transcurrido este tiempo el líquido de enjuague se recogió en el mismo frasco nº 1.

2.- Inmediatamente después los voluntarios se enjuagaron la boca con el colutorio contenido en el frasco nº 2, también durante un minuto y el líquido de enjuague se recogió asimismo en el frasco nº 2.

3.- Tras 2 minutos de espera los voluntarios se enjuagaron la boca nuevamente durante un minuto, esta vez con el suero fisiológico estéril contenido en el frasco nº 3 y al igual que en los casos anteriores el líquido de enjuague se recogió en el correspondiente frasco nº 3.

Todos los líquidos se trasladaron rápidamente al laboratorio donde se procedió a la realización de las diluciones correspondientes y al recuento de las bacterias en suspensión en los líquidos de enjuague 1 y 3 por siembra de alícuotas en agar

columbia-sangre. Los resultados se expresaron en forma de unidades formadoras de colonia por mililitro. La supervivencia se expresó en porcentaje de bacterias supervivientes (bacterias/ml en el frasco 3 x 100 /bacterias/ml en el frasco 1).

El tiempo transcurrido entre la valoración de un colutorio y el siguiente fue como mínimo de una semana para permitir la recuperación de la flora oral.

4.- Resultados.

4.1 Aislamiento de bacterias patógenas bucales a partir de enfermos.

De acuerdo a las metodologías descritas en el apartado de material y métodos se procedió a aislar diversas bacterias con presunta significación clínica de pacientes en consulta odontológica. En todos los casos se trató de enfermos afectados de periodontitis o de periimplantitis (con afectación infecciosa posterior al implante). (104), (105). Se analizaron un total de catorce muestras procedentes de 14 pacientes distintos de los que se aislaron diversas cepas bacterianas. De entre ellas se seleccionaron las cepas de referencia 1296, 1396 y 996. Tras las correspondientes pruebas bioquímicas realizadas por el sistema API 20A se obtuvieron los resultados expresados en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas clínicas utilizadas

Test	1296	1396	996
Indol	-	-	-
Ureasa	-	-	-
Glucosa	+	+	+
Manitol	-	-	-
Lactosa	+	-	+
Sacarosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Salicinal	+	+	-
Xilosa	-	-	+
Arabinosa	-	-	+
Hidrólisis de gelatina	-	+	-
Hidrólisis de la esculina	+	-	+
Glicerol	-	+	-
Celobiosa	+	-	-
Manosa	+	-	+
Melezitosa	-	-	-

Rafinosa	+	-	+
Sorbitol	-	-	-
Ramnosa	-	-	+
Trealosa	-	-	+
Catalasa	-	-	-
Formación de esporas	-	-	-
Coloración de Gram	-	+	-
Forma	Bacilo	Bacilo	Bacilo

De acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas así como de la observación al microscopio lumínico tras las correspondientes tinciones de Gram, la cepa 1296 puede ser clasificada como *Prevotella oralis* se le dió el número de colección CCO⁵ 005601. Por su parte la cepa 1396 responde al perfil bioquímico y morfológico de *Actinomyces odontolyticus* (CCO 005608), finalmente la cepa 996 fué identificada como *Porphyromonas gingivalis* (CCO 005605). Si bien las cepas identificadas y seleccionadas no cubren todo el espectro de patógenos bucales, pueden considerarse suficientemente

⁵ CCO (Colección de Cultivos de la Fac. de Odontología de la UB)

significativas como para tener una buena estima del poder antimicrobiano de los colutorios usados y estudiados en este trabajo.

4.2 Concentraciones mínimas inhibitorias.

En este apartado vamos a considerar los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en función de la especie bacteriana tratada y del colutorio con el que se han obtenido los valores. Como se ha comentado anteriormente, todos los valores que se expresan en este apartado representan el valor resultante de, como mínimo, tres experimentos independientes. En ningún caso se expresan las desviaciones, dado que los valores de las desviaciones son en la mayor parte de los casos de 0 y , caso de existir, en ningún caso superaron el valor de una dilución. Por lo tanto las determinaciones pueden considerarse de valor suficiente.

4.2.1. Bacterias Gram negativas facultativamente anaeróbicas.

Serratia marcescens.

Las MIC para esta especie bacteriana oscilan entre 12,5 % (v/v) y 0,39% (v/v). La figura 4.2.1 muestra una gráfica que resume los resultados para esta especie bacteriana.

Salmonella typhimurium

Al igual que en el caso anterior , los resultados de los valores de MIC en esta especie oscilan entre 12,5 y 0,39 %(v/v). En este caso sin embargo el peróxido de carbamida alcanza los mismos valores de efectividad que la clorhexidina. La similitud de los resultados es coherente con la similitud estructural entre ambas especies bacterianas

(se trata en los dos casos de bacterias pertenecientes a la familia enterobacterias). (Figura 4.2.2)

Figura 4.2.1
Serratia marcescens

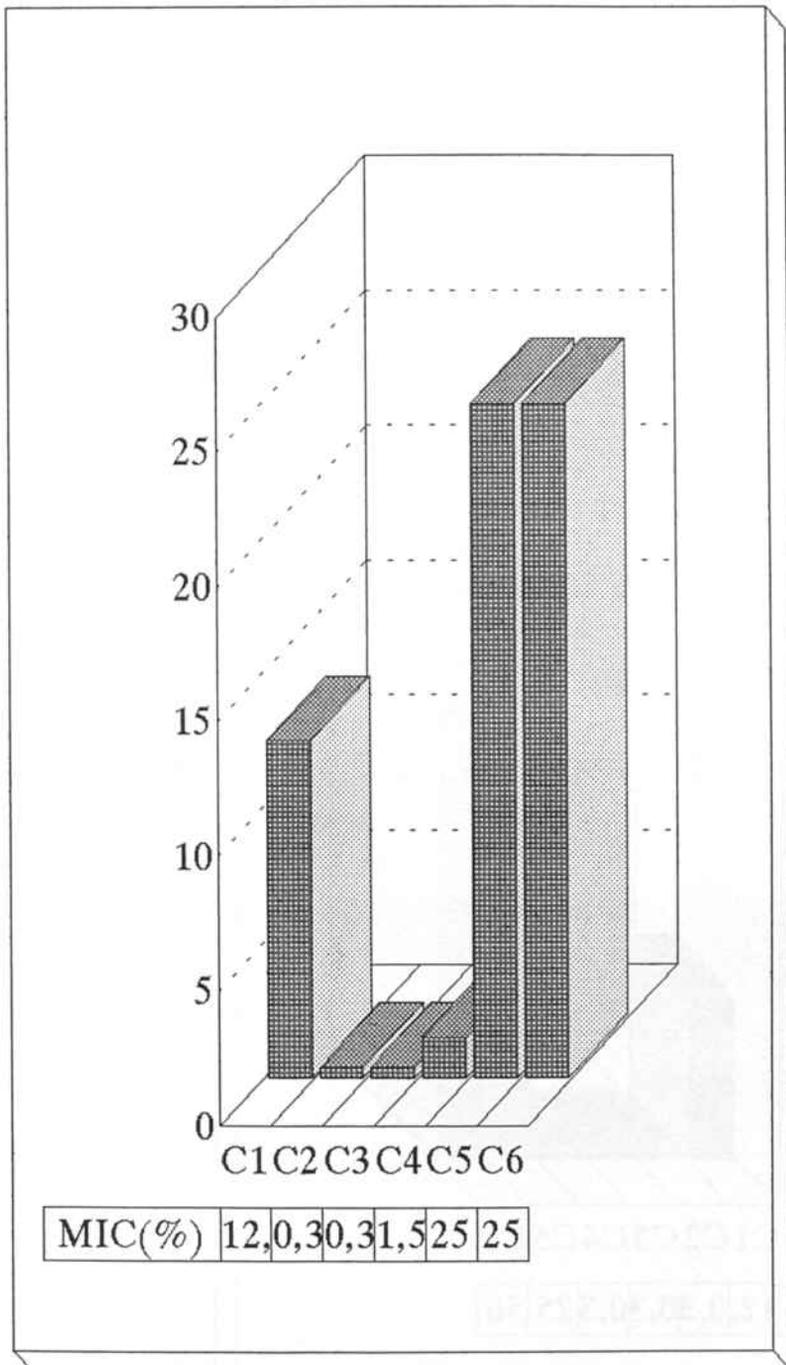
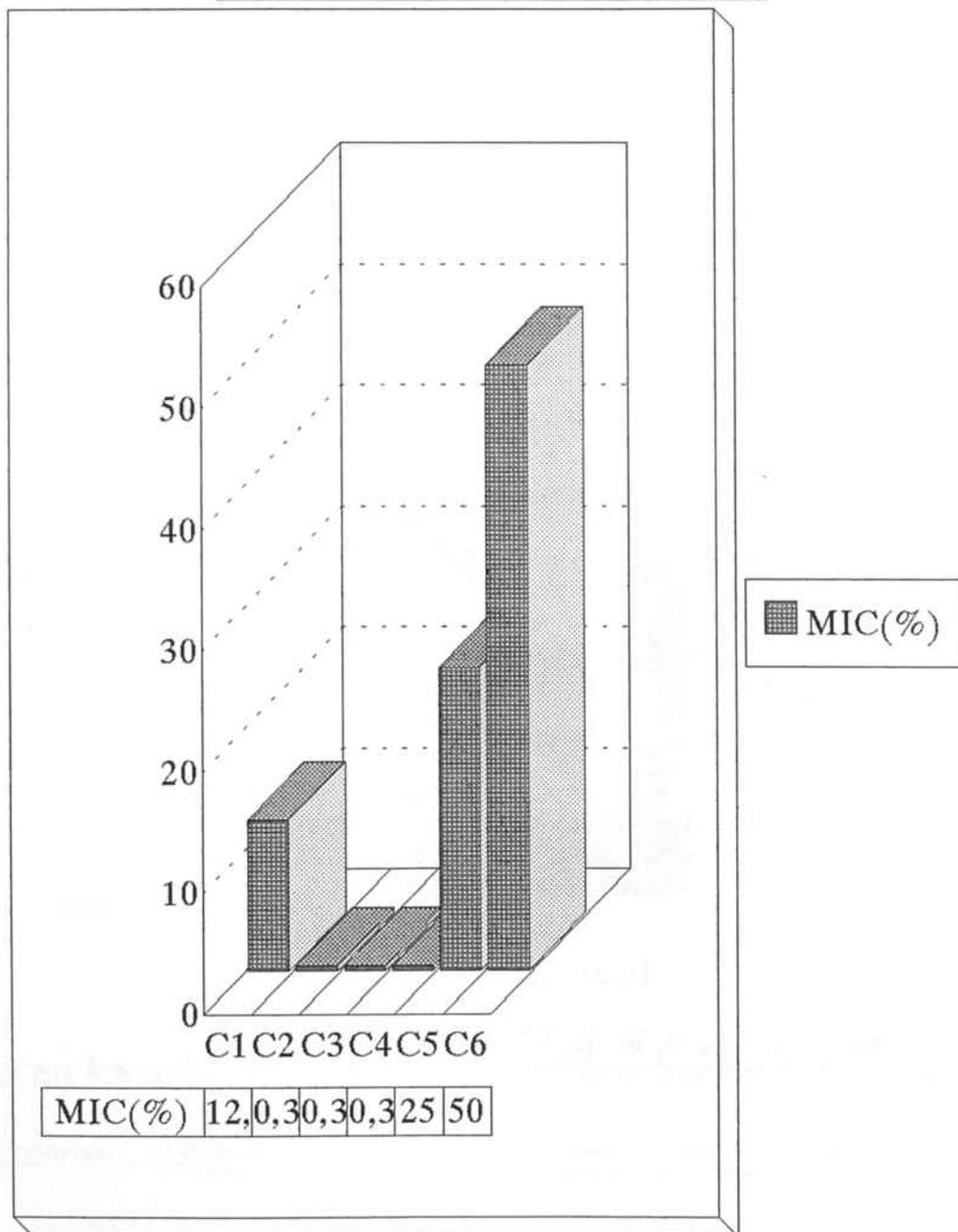


figura 4.2.2
Salmonella typhimurium



Escherichia coli

Esta especie bacteriana, asimismo estrechamente relacionada con las anteriores y perteneciente a la misma familia, muestra, sin embargo, niveles de sensibilidad algo mayores (especialmente a la clorhexidina). Aquí los valores hallados se sitúan entre 12,5 y 0,09%(v/v). (Figura 4.2.3)

Klebsiella pneumoniae

Los resultados en esta especie son, una vez más del mismo orden que los encontrados en el resto de las enterobacterias , oscilando entre 25 y 0,05%(v/v). (Figura 4.2.4)

figura 4.2.3.
Escherichia coli

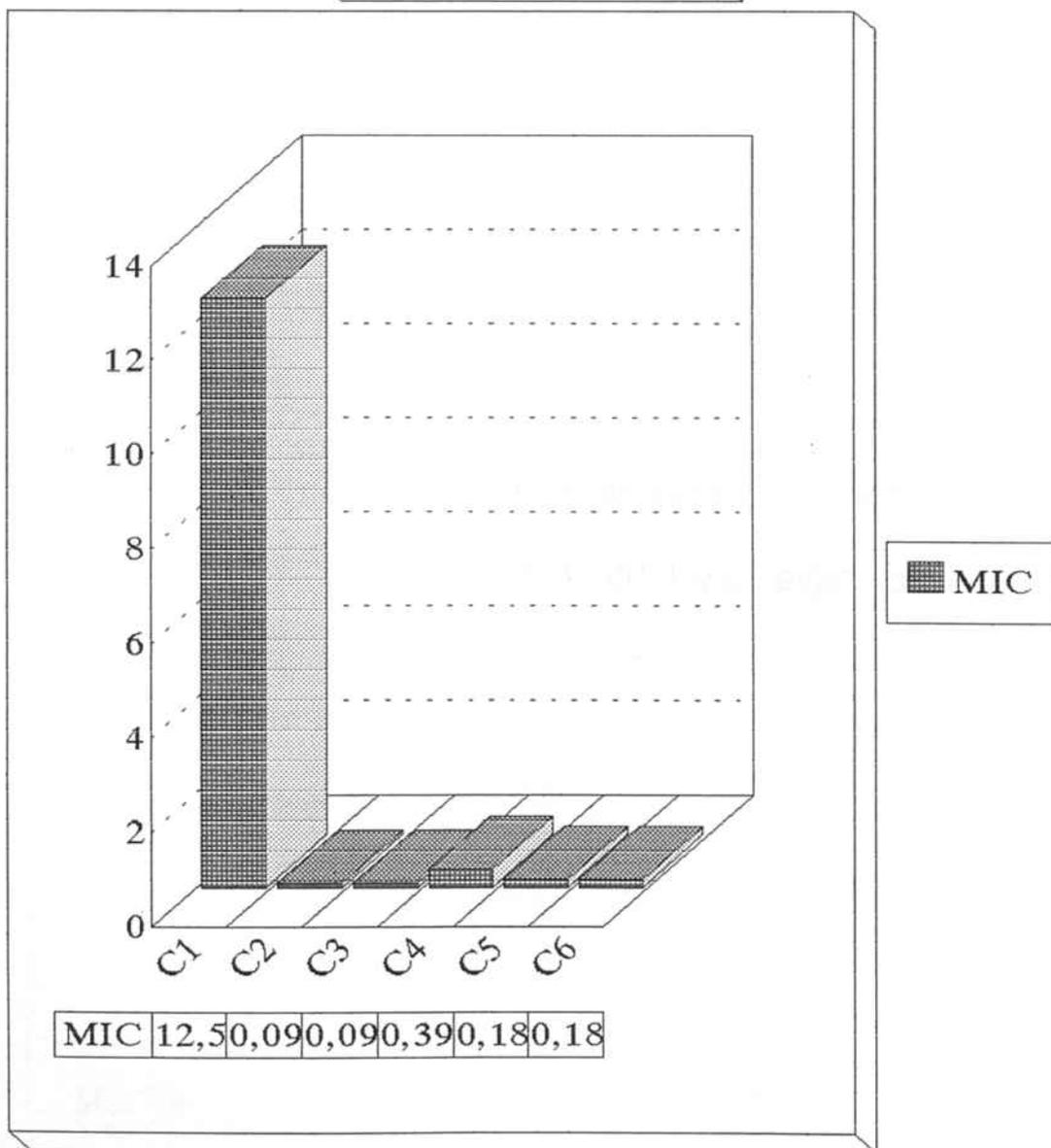
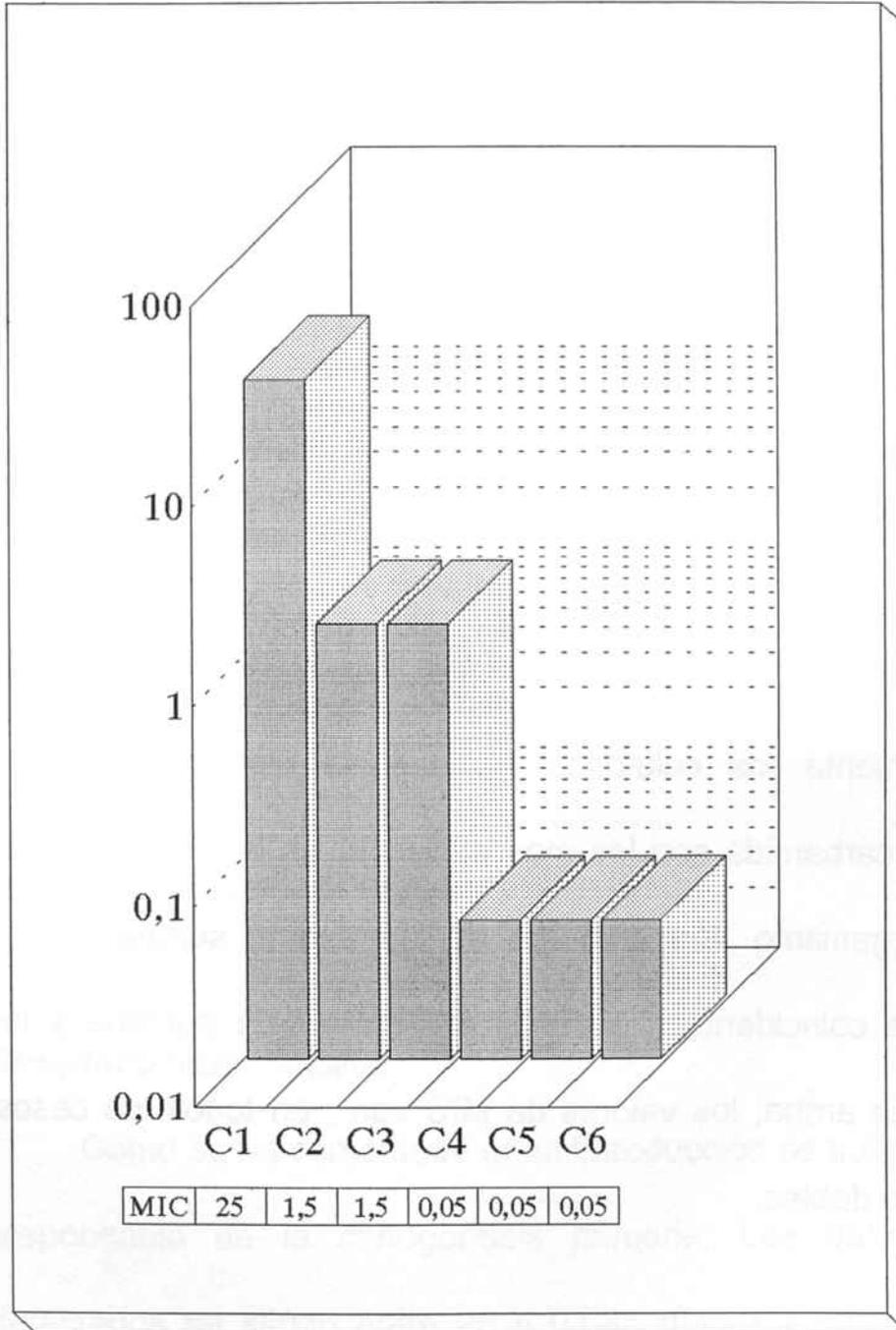


Figura 4.2.4
Klebsiella pneumoniae



4.2.2. Bacterias Gram negativas aeróbicas estrictas.

Pseudomonas aeruginosa

Esta bacteria se incluyó en el estudio dado que en muchos casos se ha considerado una de las bacterias más resistentes a los desinfectantes. De hecho muchas de las metodologías aceptadas por la legislación de diversos países avanzados consideran a esta especie bacteriana como una de las de elección para estudiar el efecto antibacteriano de desinfectantes y otros productos. Sin embargo los valores detectados (figura 4.2.5) muestran una resistencia a los distintos colutorios muy similar a la detectada en las enterobacterias. Los valores oscilan entre 50 y 0,3%.

Nuevamente los colutorios a base de clorhexidina y de peróxido de carbamida son los más eficientes en la eliminación de este microorganismo. Sin embargo es interesante señalar que a pesar de las coincidencias estructurales entre esta bacteria y las descritas más arriba, los valores de MIC son , en todos los casos, como mínimo dobles.

4.2.3. Bacterias Gram positivas aeróbicas y formadoras de espora.

Bacillus subtilis

En este apartado se ha considerado únicamente una bacteria esporógena aeróbica (*Bacillus subtilis*). Los valores de MIC obtenidos se sitúan entre 12,5 y 0,048 (figura 4.2.6). En este caso nuevamente los colutorios a base de clorhexidina muestran los mejores comportamientos mientras que el colutorio a base de peróxido de carbamida se sitúa en valores algo superiores como ocurría en el caso de *Serratia marcescens* y *Salmonella typhimurium*.

4.2.4. Cocos Gram positivos.

***Streptococcus mutans*.**

Como se ha comentado en la introducción se trata del principal responsable de la cariogénesis primaria. Los valores de MIC detectados se sitúan entre 25 y 0,048 (figura 4.2.7). Es digno de mención que , en comparación con las especies bacterianas citadas

anteriormente, esta es la bacteria más sensible a todos los colutorios exceptuando el colutorio C1.

Figura 4.2.5
Pseudomonas aeruginosa

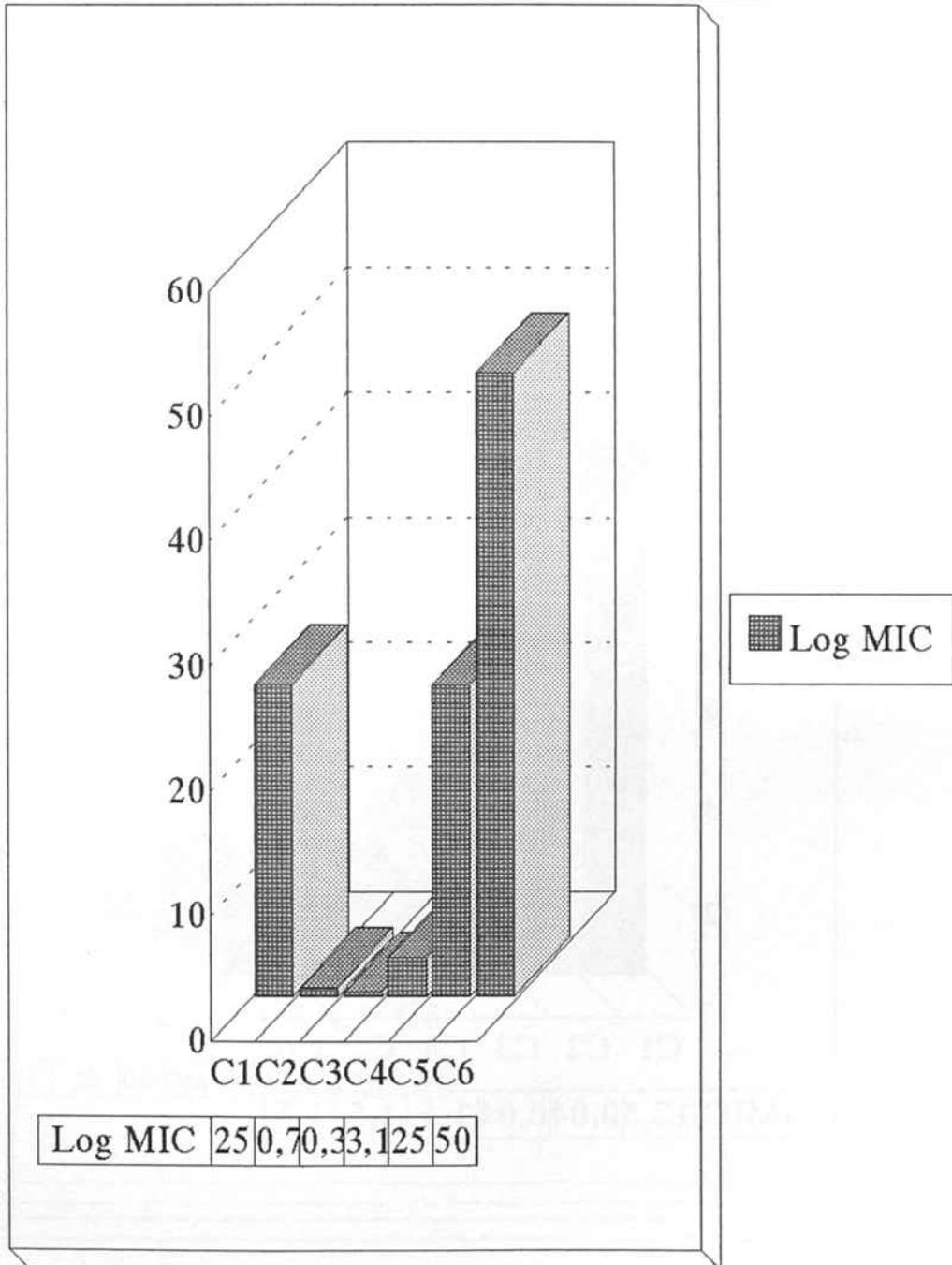


FIGURA 4.2.6
Bacillus subtilis

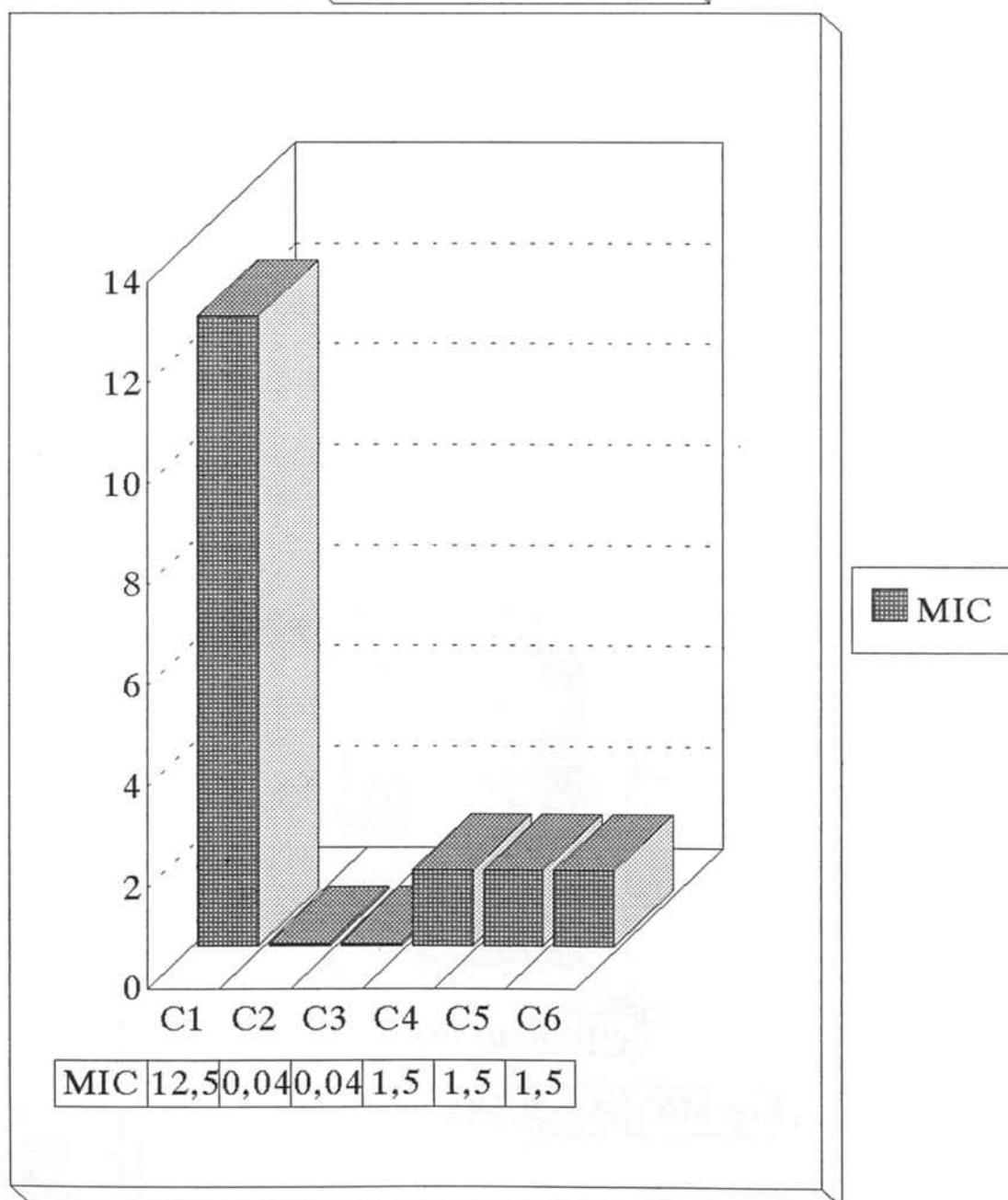
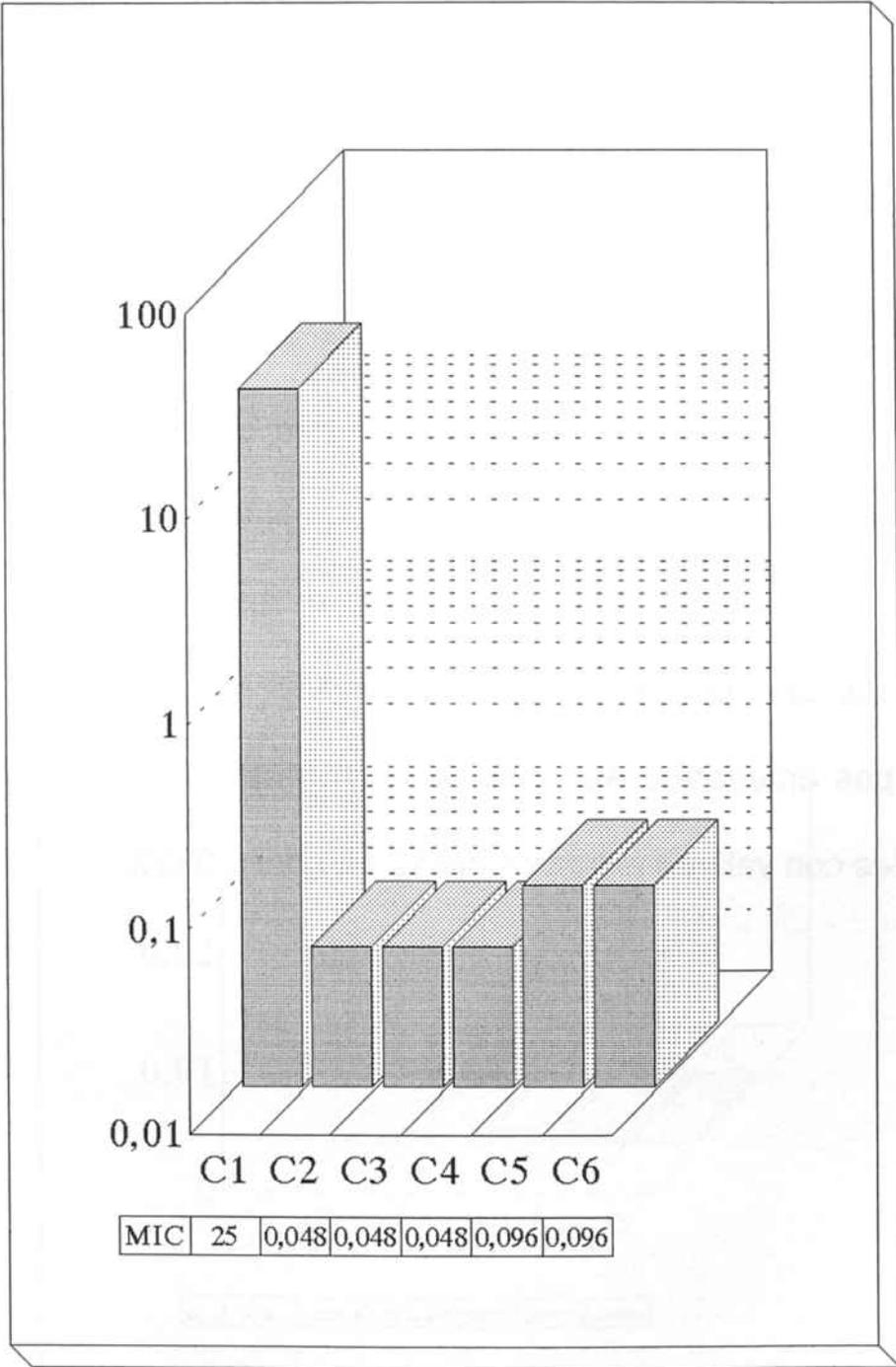


Figura 4.2.7
Streptococcus mutans



4.3. Bacterias aisladas de pacientes

En este apartado se han tratado tres especies bacterianas distintas : *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella oralis* y *Actinomyces odontolyticus*.

Porphyromonas gingivalis al igual que *Prevotella oralis* presentan una gran susceptibilidad a todos los colutorios ensayados, con susceptibilidades en todos los casos de diluciones superiores a 100. A pesar de ello, en este caso el colutorio C1 presenta una menor actividad aún dentro de valores de efectividad muy elevados. *Actinomyces odontolyticus* presenta sensibilidades algo menores que las dos cepas anteriores. Aún en esta especie las eficiencias son considerables con valores extremos del 12 % y del 0.025%.

Figura 4.3.1
Porphyromonas gingivalis

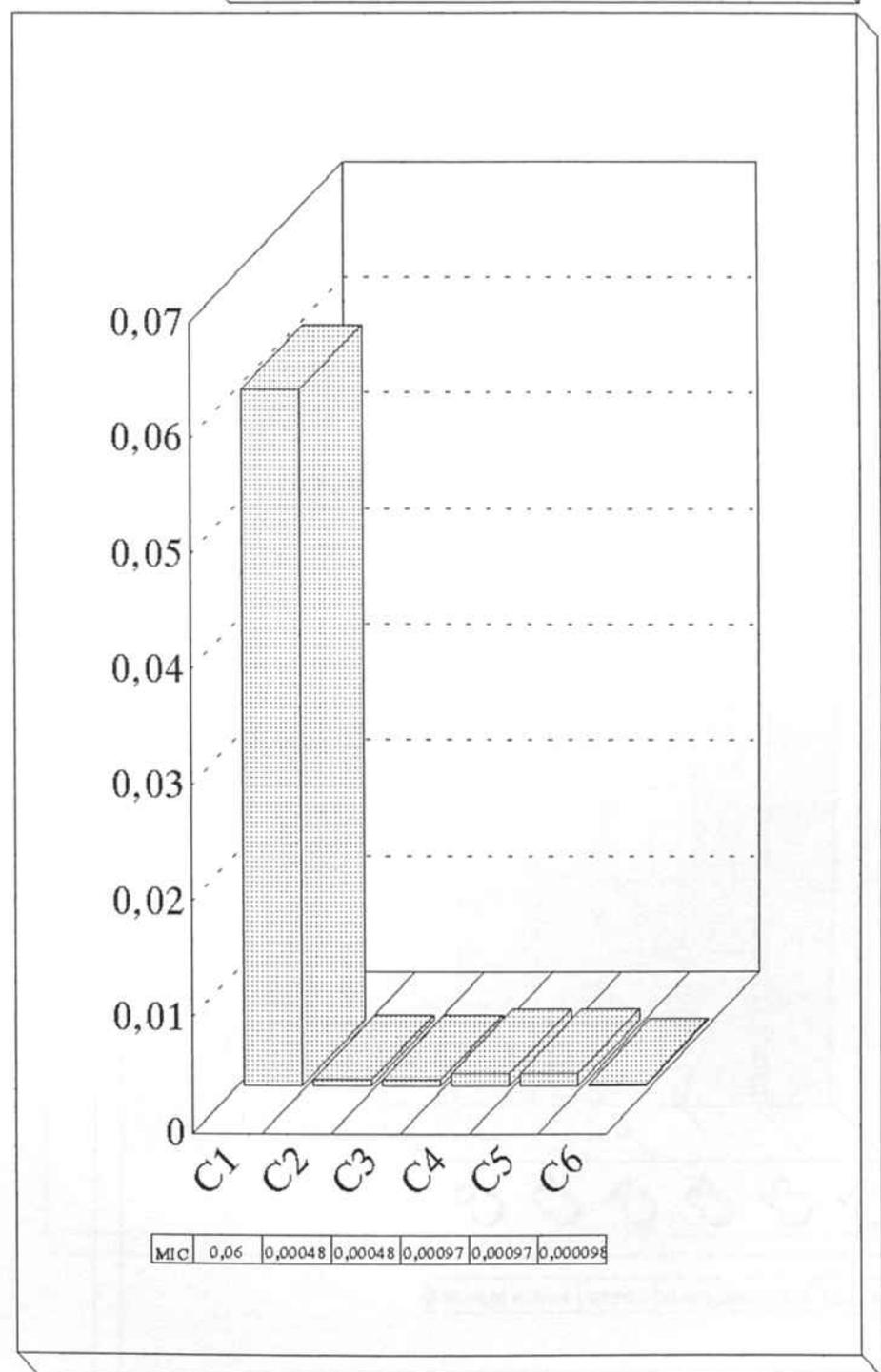
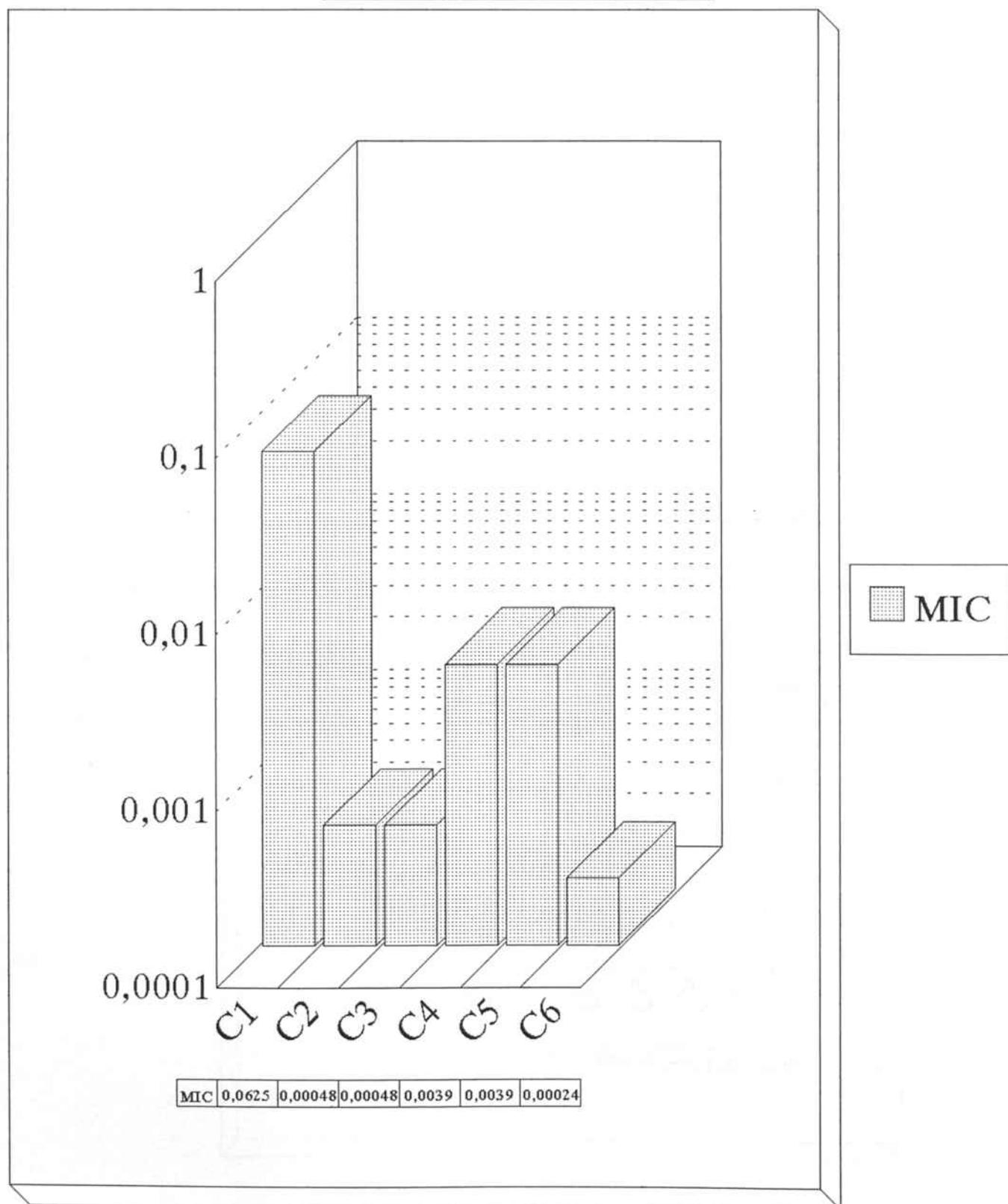
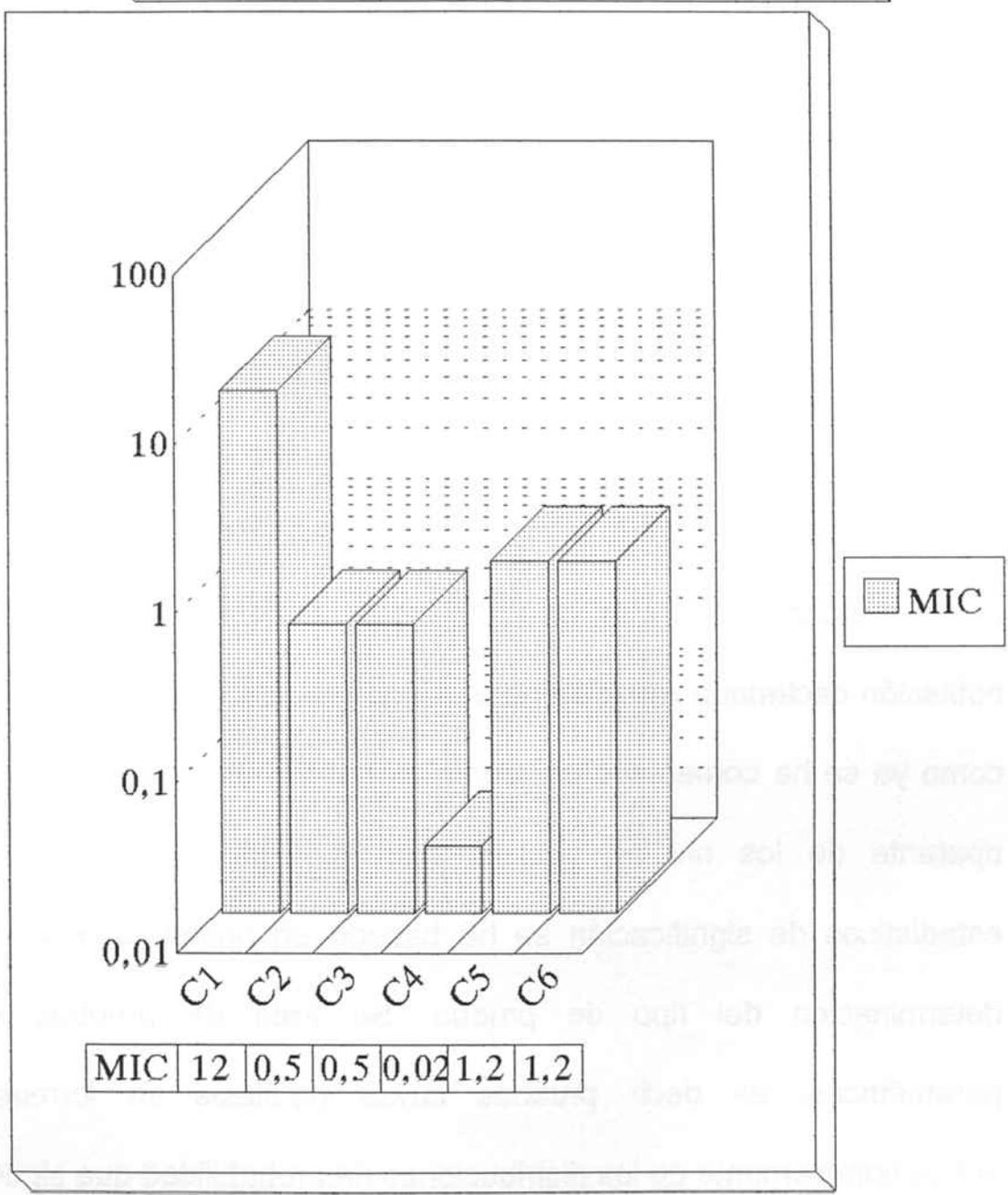


Figura 4.3.2
Prevotella oralis



Se utiliza escala logarítmica debido a los bajos valores

Figura 4.3.3.
Actinomyces odontolyticus



Se utiliza escala logarítmica debido a los bajos valores

4.4. Experimentos “in vivo” en voluntarios.

Los gráficos 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4, 4.4.5, y 4.4.6, muestran las distintas supervivencias bacterianas en voluntarios tras el enjuague de la cavidad oral con 20 ml de los distintos colutorios. Todos los resultados se han obtenido a partir de los datos recogidos de 30 voluntarios. En todos los casos se aprecia un descenso significativo del número de bacterias recogidas en el enjuague, este descenso puede atribuirse específicamente al uso de colutorios, dado que en el caso de que en el frasco 2 se incorpore simplemente suero fisiológico estéril (sin ningún agente de los que característicamente forman parte de los colutorios) el descenso de población bacteriana recogida no es significativo. En cualquier caso, como ya se ha comentado en todos los casos hubo una reducción aparente de los niveles poblacionales. La aplicación de tests estadísticos de significación se ha basado en primer lugar en la determinación del tipo de prueba. Se trata de pruebas no paramétricas, es decir pruebas cuyas hipótesis se formulan independientemente de las distribuciones de probabilidad que siguen las variables. Es decir que las variables no siguen las condiciones de aplicación de las pruebas paramétricas clásicas. (106).

Se ha aplicado la prueba de T-de Wilcoxon, que compara la tendencia central en dos muestras de datos apareados.

Las siguientes tablas muestran los datos obtenidos empleando dos métodos: el primero asume que se trata de datos con una distribución normal, el segundo que se trata de una distribución no ajustada a la normalidad.

La aplicación de un test para verificar la normalidad de los datos obtenidos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov demostraron que en todos los casos los resultados se ajustaban a una distribución normal:

Colutorio	K-S Z	Distribución normal
C1(Antes tratamiento)	0,8753	+
C1(después trat.)	0,5536	+
C2 (A)	1,0752	+
C2(D)	0,5379	+
C3(A)	0,6188	+
C3(D)	0,5055	+
C4(A)	0,4949	+
C4(D)	0,5113	+
C5(A)	0,7380	+
C5(D)	0,6840	+
C6(A)	0,5931	+
C6(D)	0,5741	+

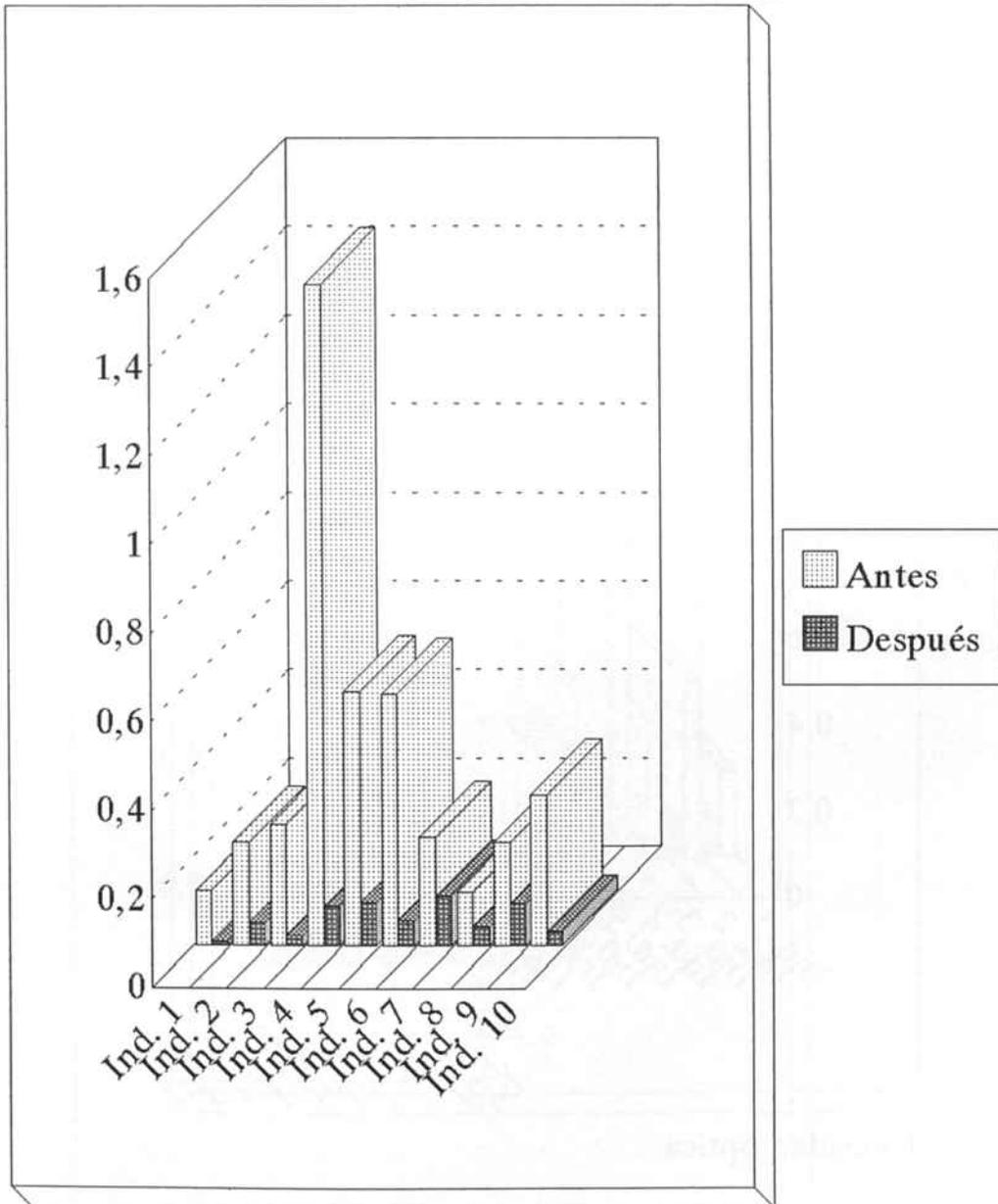
Asumiendo una distribución normal para los valores obtenidos, tal y como demuestra el test de Kolmogorov-Smirnov podría aplicarse la T de Student como test de significación. En este caso los resultados serian como sigue:

Colutorio	T-student	P	Diferencias significativas
C1	2,85	0,19	Si
C2	2,71	0,024	Si
C3	4,16	0,003	Si
C4	4,26	0,003	Si
C5	3,65	0,006	Si
C6	3,85	0,004	Si

Si consideráramos que los datos obtenidos no siguen una distribución normal (lo cual discrepa de los resultados mencionados hasta aquí), el test de significación a aplicar sería el de T-de Wilcoxon, en este caso los resultados obtenidos serían como sigue:

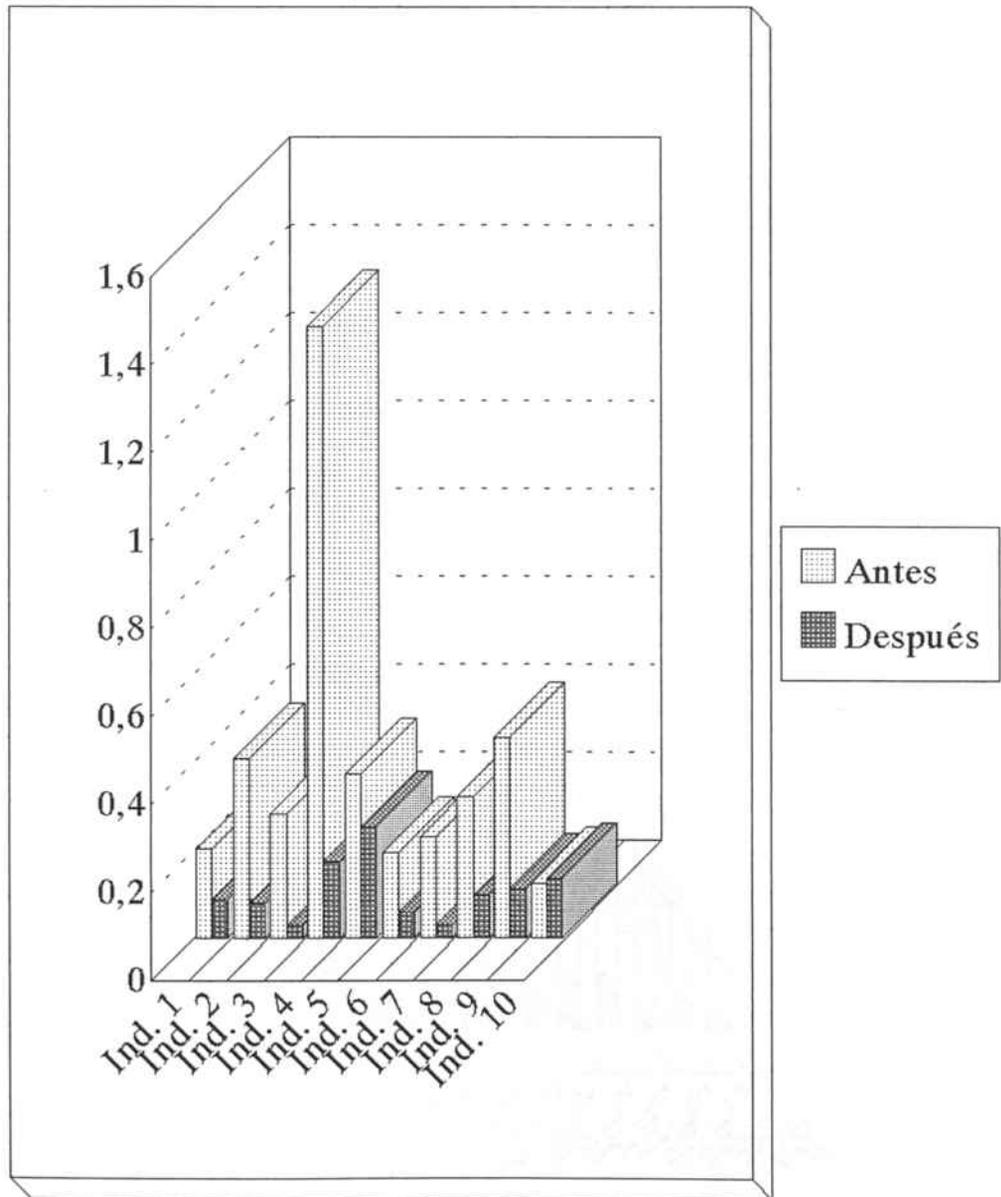
Colutorio	T-Wilcoxon (Z)	P	Diferencias significativas
C1	-2,8031	0,0051	+
C2	-2,7011	0,0069	+
C3	-2,6656	0,0077	+
C4	-2,6656	0,0077	+
C5	-2,6656	0,0077	+
C6	-2,5992	0,0093	+

Figura 4.4.1
Colutorio C1(10 casos)



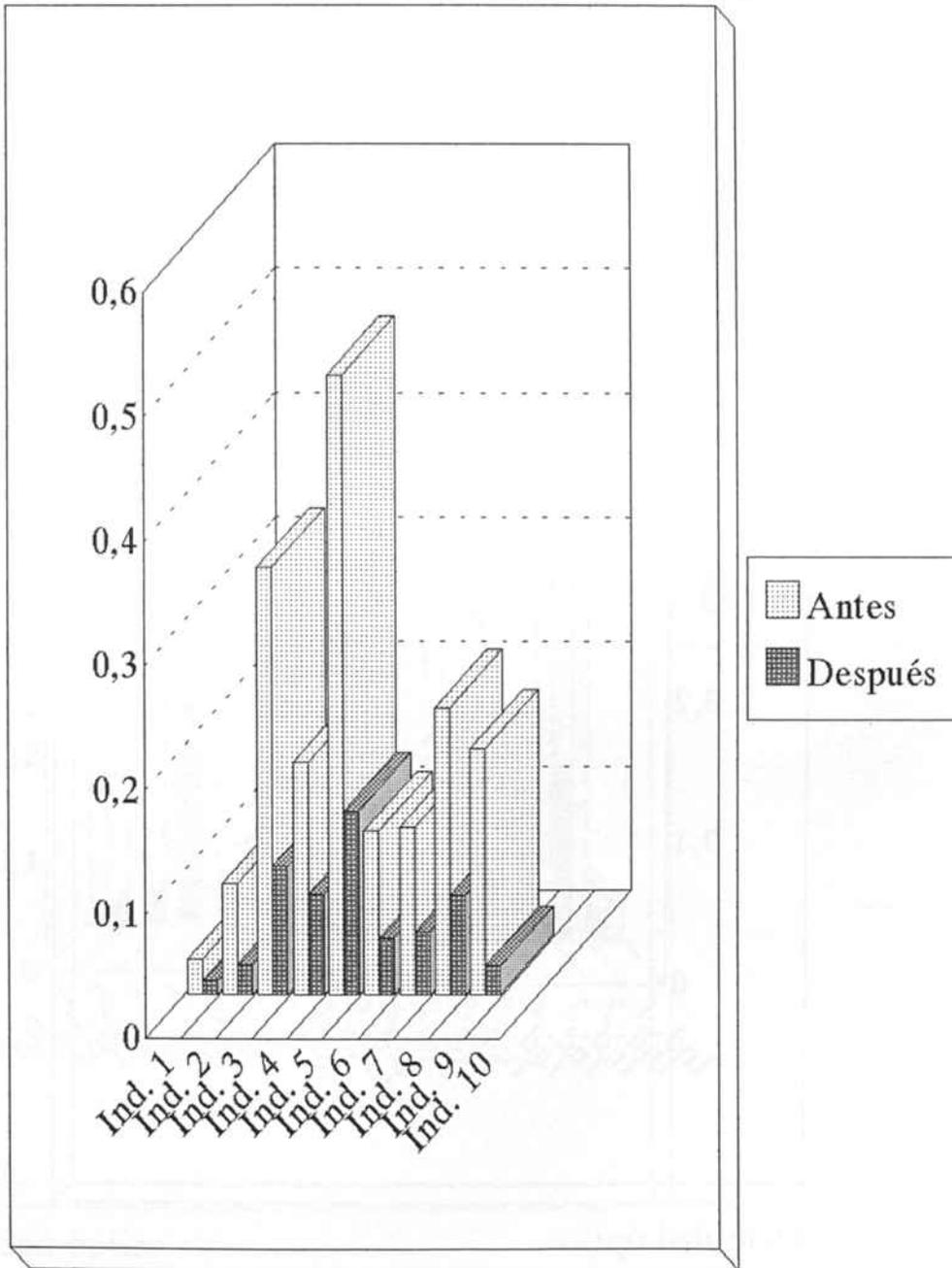
Densidad óptica

Figura 4.4.2
Colutorio C2



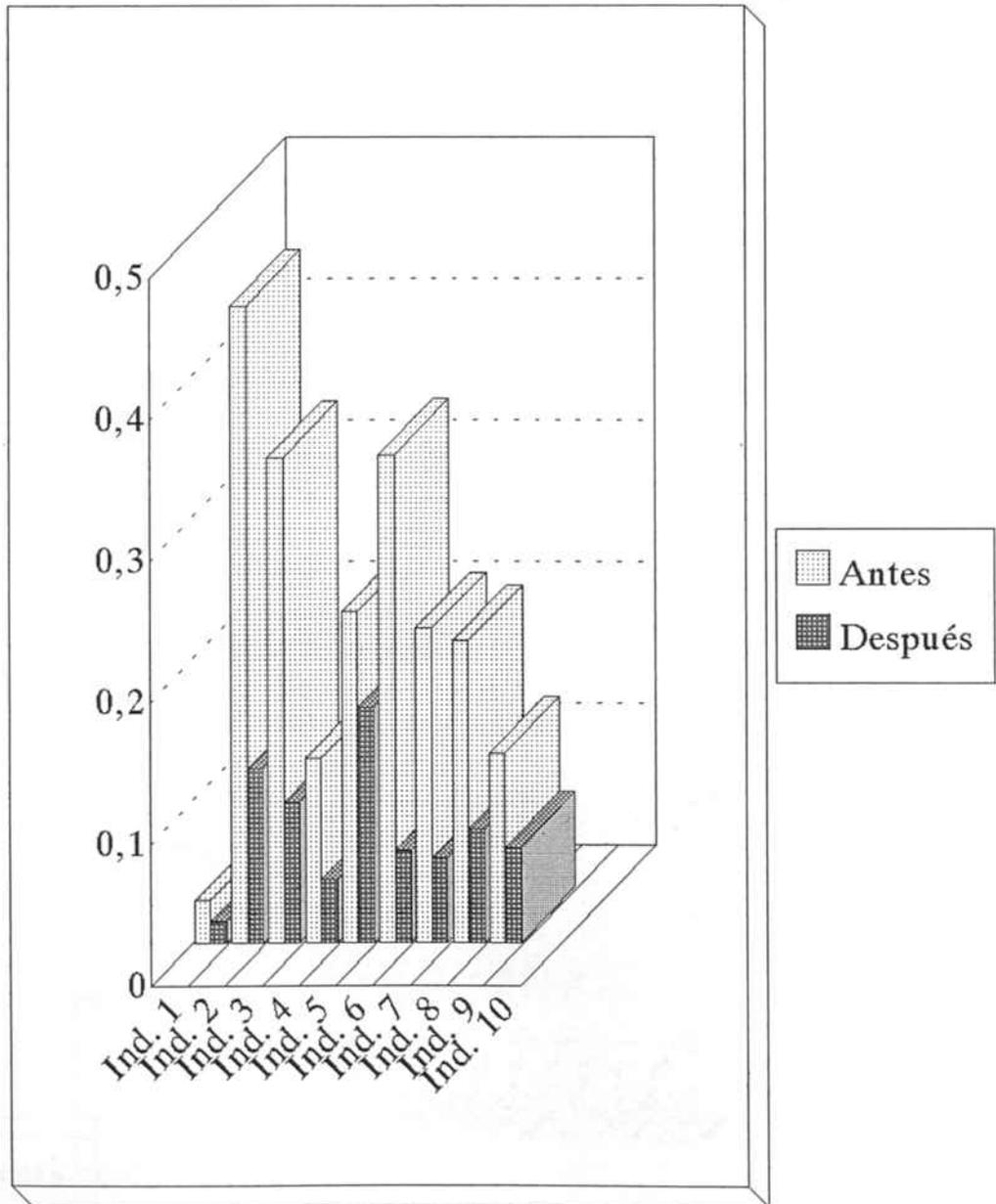
Densidad óptica

Figura 4.4.3
Colutorio C3(10 casos)



Densidad óptica

Figura 4.4.4
Colutorio C4 (10 casos)



Densidad óptica

Figura 4.4.5
Colutorio C5(10 casos)

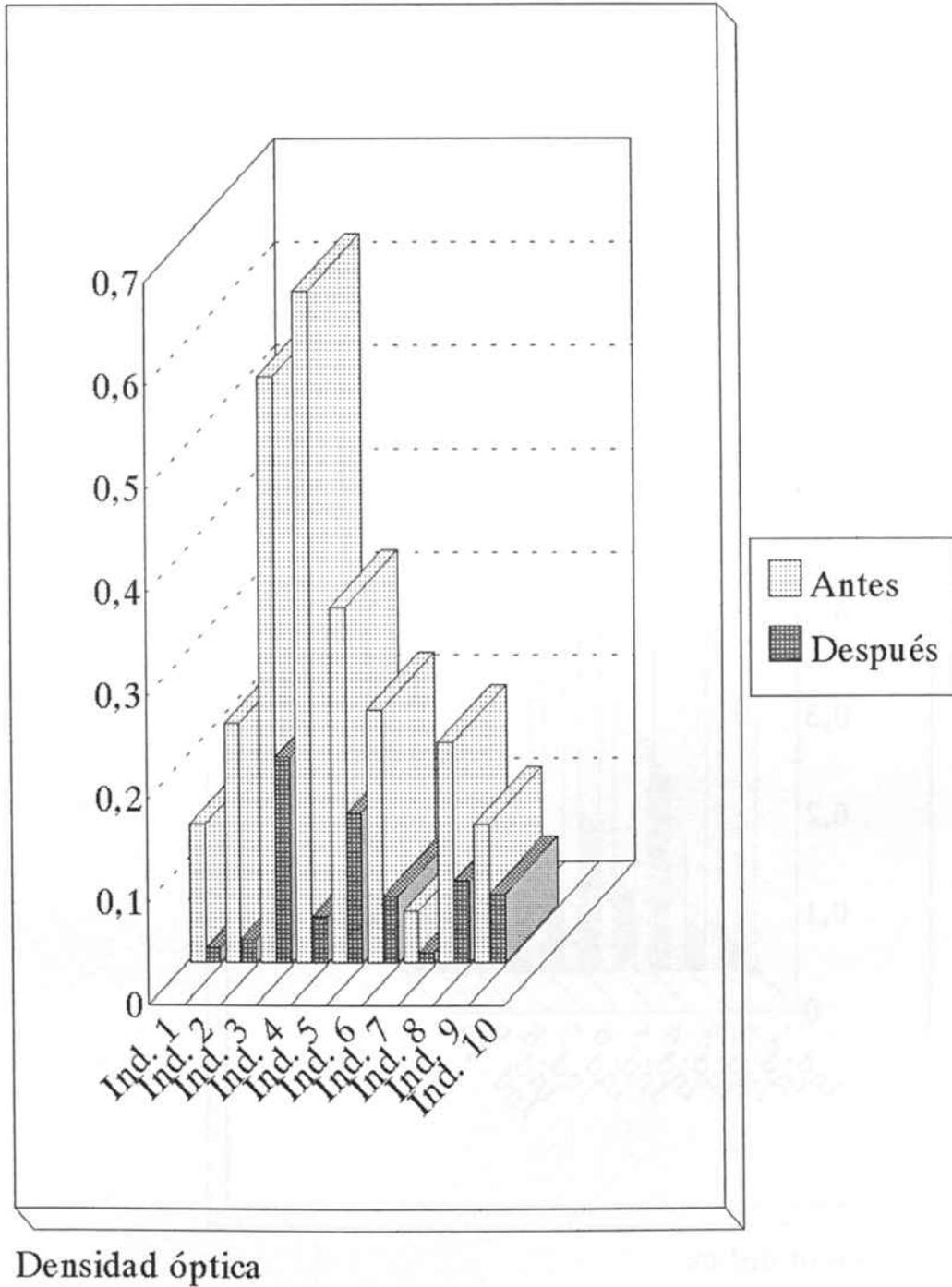
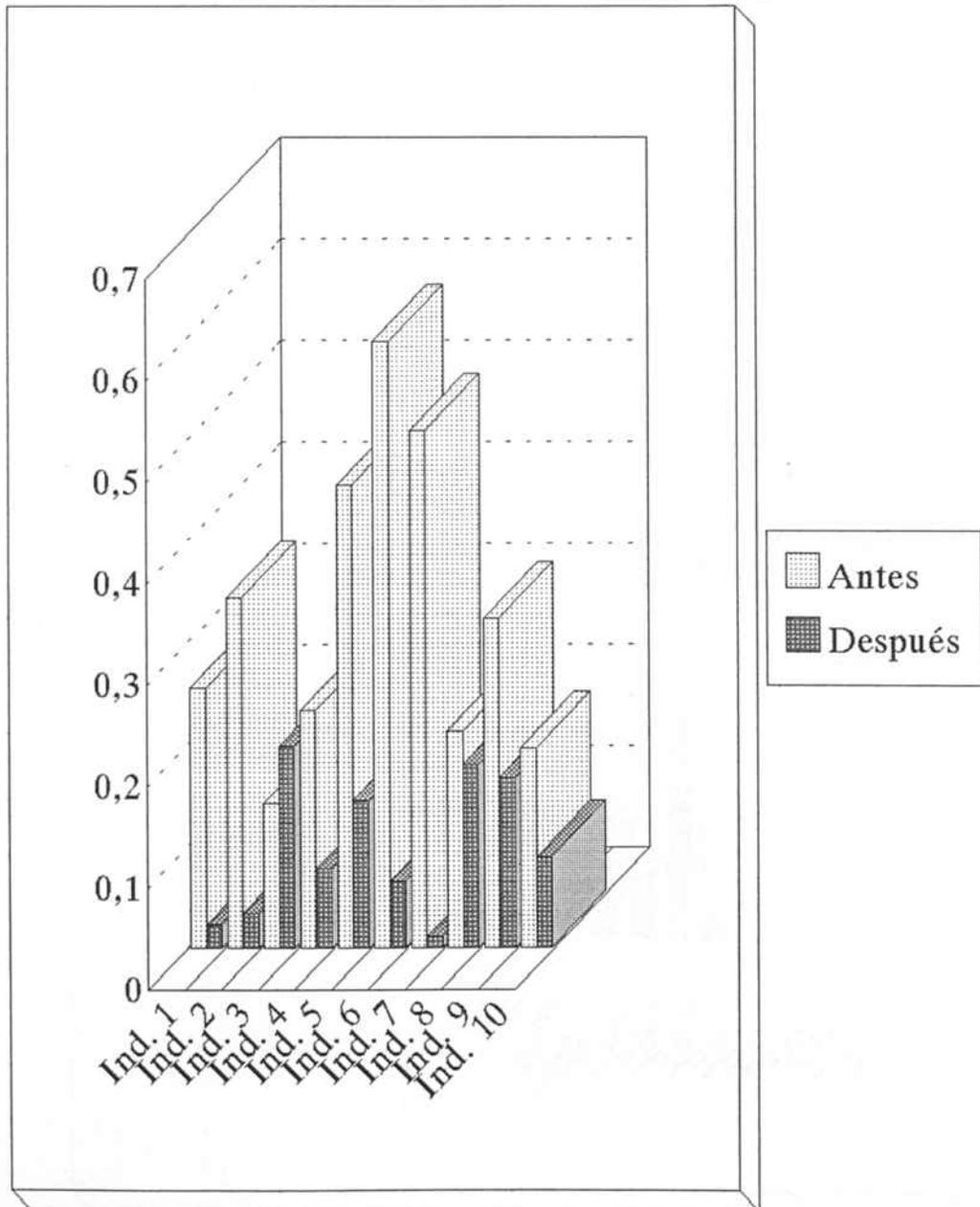


Figura 4.4.6
Colutorio C6(10 casos)

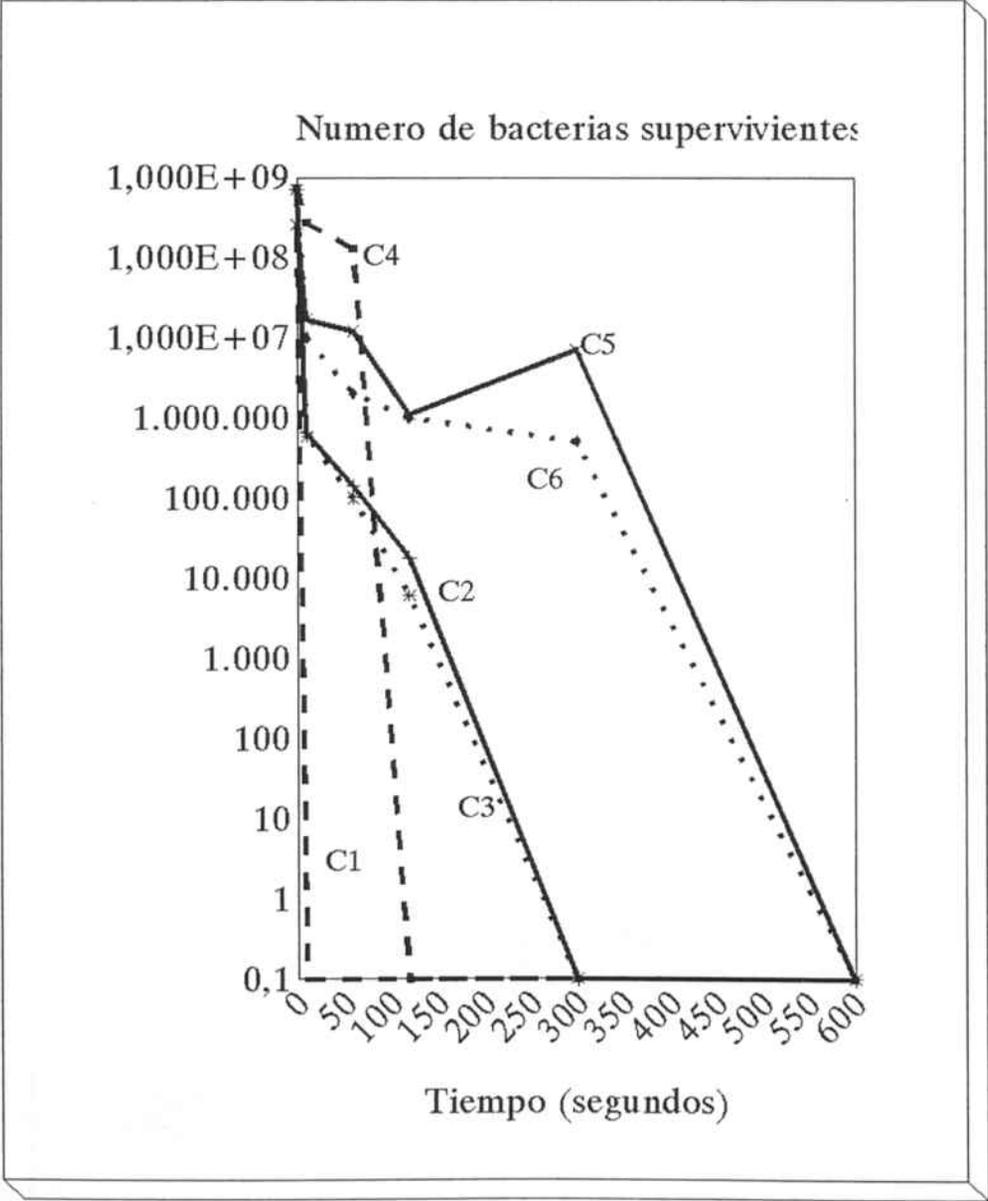


Densidad óptica

4.5. Tiempo de supervivencia bacteriana

La figura 4.5 muestra las cinéticas de muerte con respecto al tiempo en la utilización de los distintos colutorios ensayados en esta tesis doctoral. Como puede apreciarse la cinética de muerte es mucho más rápida en el caso del colutorio C1, por otra parte los colutorios a base de clorhexidina y de peróxido de carbamida muestran una buena respuesta, aunque no tan eficiente como en el caso anterior. Los peores resultados se obtienen en la utilización de los colutorios a base de triclosán.

Figura 4.5
Curvas de muerte bacteriana



5.-Discusión.

Los experimentos de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria realizados, permiten asegurar que todos los productos ensayados muestran actividad antimicrobiana frente a todas las especies ensayadas. En el caso de las bacterias anaeróbicas facultativas, los valores de CMI obtenidos se sitúan entre los mismos valores extremos para las cuatro especies ensayadas. En todos los casos C1 se mostró como el menos activo en esta serie experimental, exceptuando el caso de *Salmonella* que mostró una excepcional resistencia a triclosán. Aunque las enterobacterias, como se ha comentado en la introducción, no forman parte de la flora bucal, frecuentemente son utilizadas en los laboratorios de microbiología como indicadores de actividad antibacteriana de desinfectantes y antibióticos. Los resultados referidos a triclosán (colutorios C5 y C6) y *Salmonella* sugieren que esta especie presenta algún tipo de resistencia a este producto. Dada la frecuencia con la que los caracteres de resistencia pueden ser exportados a otros microorganismos, este resultado permite alertar acerca de la posible evolución a formas de resistencia a este producto en especies Gram negativas.

En lo que respecta a las bacterias Gram negativas de carácter aeróbico estricto la especie ensayada fue *Pseudomonas aeruginosa*. Se trata, como es sabido, de una especie bacteriana caracterizada por una elevada resistencia a los agentes antimicrobianos. Los resultados con esta especie demuestran una vez más, como ocurría en el caso de *Salmonella* una escasa actividad de los productos a base de triclosán. Si bien en este estudio no se han investigado las causas de esta resistencia, los resultados sugieren la existencia de algún mecanismo específico que permita a estas dos especies resistir concentraciones tan elevadas del antimicrobiano.

Hasta aquí hemos considerado bacterias Gram negativas, que poseen una membrana externa por encima de su pared celular y que en consecuencia, en principio deben presentar un patrón distinto de susceptibilidad que las bacterias Gram positivas, en las cuales la falta de esta membrana externa facilita enormemente el contacto de los colutorios (o de sus principios activos) sobre la superficie directa de las bacterias.

En el caso de las bacterias Gram positivas se estudiaron un coco y un bacilo. En el caso de *Bacillus subtilis* la resistencia a los antimicrobianos ensayados se situó en valores ligeramente inferiores

a los determinados para las bacterias Gram negativas. También estos resultados están de acuerdo con las diferencias estructurales entre Gram positivos y Gram negativos. La segunda especie Gram positiva ensayada presenta ya un interés adicional, pues se trata de la especie cariogénica primaria *Streptococcus mutans*. En este caso la determinación de las CMI mostró unos resultados excepcionalmente buenos en todos los casos salvo el del colutorio C1.

Finalmente, dentro de este apartado nos falta evaluar los resultados obtenidos con las tres especies bacterianas aisladas de enfermos. Los resultados obtenidos con estas tres especies muestran algunas características dignas de mención y discusión. En primer lugar el colutorio que basa su acción en el peróxido de carbamida mostró los mejores resultados frente a *Porphyromonas gingivalis* y frente a *Prevotella oralis*. Sabido es que las bacterias anaeróbicas estrictas carecen de los enzimas necesarios para detoxificar las formas tóxicas del oxígeno, lo que las hace extremadamente sensibles al aire o al oxígeno. El peróxido de carbamida en ambiente acuoso genera oxígeno (oxígeno naciente), este es sin duda el mejor “antibiótico” contra las bacterias

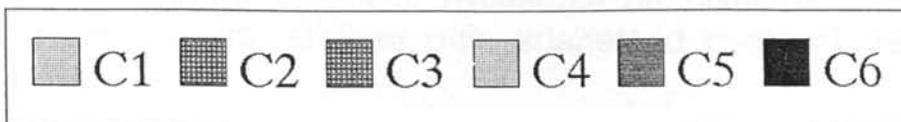
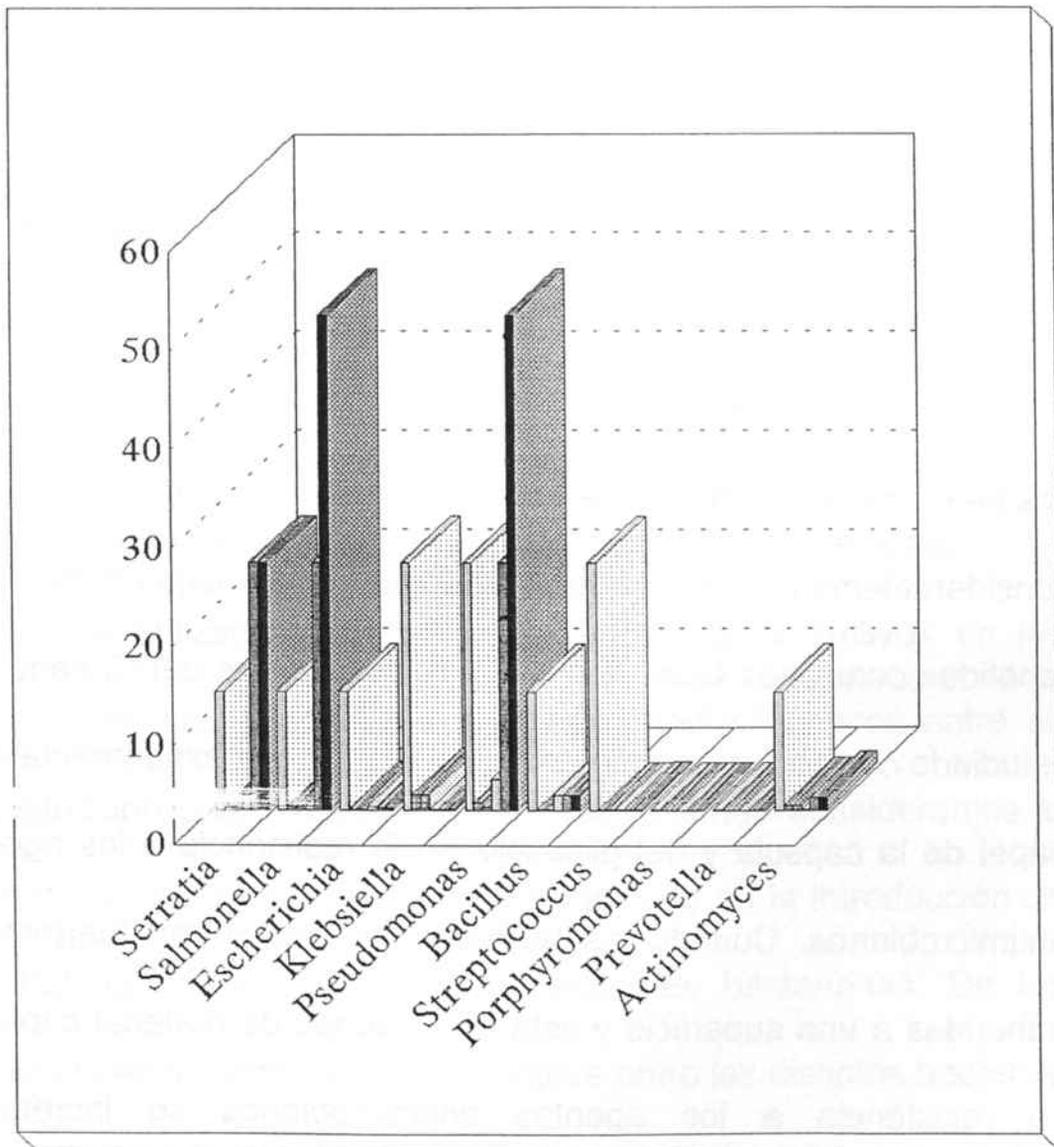
anaeróbicas estrictas. En definitiva a pesar de algunas excepciones en los resultados de determinación de las CMI, el colutorio C1 se presenta como el menos activo frente al conjunto de especies bacterianas ensayadas. Este aspecto contrasta con las tendencias del mercado actual. Los productos con esta base de acción se encuentran a la venta en nuestro país en las grandes áreas comerciales, supermercados, etc. Ello, combinado con campañas de publicidad no fundamentadas en criterios científicos, hace que el mayor consumo de colutorios haya que buscarlo en productos de estas características. Como se comentará más adelante estas consideraciones pueden modificarse a la alza o a la baja en función de los resultados de otros capítulos experimentales de esta tesis. Estas consideraciones pueden reafirmarse a la luz de una presentación de los datos como la que se ofrece en la figura 5.1 en la que se comparan los resultados para las distintas especies y para los distintos colutorios.

Los resultados obtenidos en los experimentos de enjuague de la cavidad oral de voluntarios con los distintos colutorios mostraron unos resultados que ponen de manifiesto que la eliminación de la

flora bacteriana oral como consecuencia del enjuague con soluciones colutorias se sitúa por encima del 95 % de eliminación de la población bacteriana en todos los casos. Este porcentaje de eliminación de bacterias es significativamente elevado, particularmente teniendo en cuenta los resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias detectadas en la primeras series experimentales de esta tesis. En principio podría basarse la interpretación de estos resultados bajo dos prismas distintos:

1.- La determinación de la MIC, ampliamente usada para determinar el poder antimicrobiano de antibióticos y desinfectantes, puede no ser una buena medida del real poder antimicrobiano en algunos hábitats de composición especial (como es el caso de la boca). La adición del efecto mecánico producido por el enjuague podría, en este sentido, contribuir de manera notable al efecto antibacteriano de las soluciones colutorias. Desde este punto de vista, las posibles limitaciones derivadas del uso de la MIC como medida del poder antimicrobiano se complementarían con los resultados obtenidos en los experimentos del tiempo de actuación óptimo, así como en los ensayos realizados en los enjuagues bucales.

Figura 5.1
Comparación efecto bactericida de los colutorios



2.- Un segundo enfoque que permitiría discutir estos resultados se centraría en el diseño de los experimentos de enjuague. Cuando contamos la población bacteriana arrastrada por un suero fisiológico que se ha utilizado en un enjuague estamos, posiblemente, sobrestimando la población adherida pobremente o incluso la población no adherida. Sin embargo, en aquellos individuos en los que exista una placa bacteriana compacta y bien estructurada, con abundante material capsular polisacárido, presuntivamente las bacterias no se liberarían por efecto de un enjuague relativamente “suave” realizado con el suero fisiológico. Desde este punto de vista posiblemente el efecto sobre la población firmemente adherida es considerablemente menor que el detectado en los experimentos. En repetidas ocasiones Costerton y sus colaboradores del Canadá han estudiado con profusión de ejemplos y situaciones experimentales el papel de la cápsula y del glicocáliz en la resistencia a los agentes antimicrobianos. Cuando las bacterias se encuentran fuertemente adheridas a una superficie y están recubiertas de material capsular, su resistencia a los agentes antimicrobianos se incrementa espectacularmente, esta es una situación que se ha estudiado no solo en la placa bacteriana sino también en tapones bacterianos

formados en catéteres urinarios u otras prótesis. Por tanto esta es una limitación de la mayoría de los estudios realizados en el laboratorio de microbiología. Existiría una posibilidad de estimar cuantitativamente este fenómeno procediendo a una obtención de la placa bacteriana por métodos más contundentes que el simple enjuague o bien diseñando experimentos en los que mediante medios de cultivo ricos en sacarosa pudieran formarse “placas dentales” “in vitro” sobre piezas artificiales en las que podrían repetirse los experimentos descritos en esta memoria.

3.- Finalmente queda aún por considerar una tercera objeción: toda la microbiología, tal y como la conocemos en la actualidad, se basa en la utilización de cultivos puros (es decir cultivos en los cuales todos sus miembros son prácticamente idénticos entre si. Esta situación dista mucho de la realidad cuando consideramos la cavidad oral, en la que, como hemos indicado en la introducción de este trabajo coexisten multitud de especies bacterianas. De las posibles interferencias que pueden darse entre las distintas bacterias presentes en la cavidad oral se conoce relativamente poco, con lo que si bien en algunos casos la existencia de distintas bacterias

puede amplificar el efecto antimicrobiano de las soluciones, en otros puede darse la situación contraria y la presencia de un determinado organismo puede hacer disminuir la sensibilidad de otro frente a un determinado antibacteriano.

Por tanto el alcance de los experimentos descritos en esta memoria doctoral, debe situarse en el contexto en el que se han desarrollado los experimentos. La extensión de las conclusiones a un nivel superior requerirá de trabajos experimentales adicionales como los propuestos en esta discusión.

Como consideraciones finales de este capítulo de discusión queda referirnos a los experimentos en los que se ha determinado el tiempo de supervivencia de las bacterias a los colutorios. En este caso hemos utilizado una única cepa bacteriana y los resultados demuestran que C1 es el más rápido en su acción antimicrobiana, lo que está de acuerdo con los resultados de eliminación de flora bucal en voluntarios. Una vez más los resultados de una serie experimental están en desacuerdo con las posibles conclusiones que podrían obtenerse de una observación parcial de los valores de CMI determinados, puesto que el producto con una CMI más elevada (y por tanto el teóricamente menos eficiente) rinde al utilizar

otra metodología resultados muy superiores al resto de los productos. En este apartado son , por tanto, válidas todas las consideraciones hechas al referirnos a la determinación de la capacidad de eliminación de flora bucal.

6.- Resumen y Conclusiones.

1.- Se ha ensayado la capacidad antibacteriana de seis colutorios a base de clorhexidina, timol, triclosan, peróxido de carbamida (oxígeno nascente), etc, frente a once especies bacterianas de interés microbiológico y/o odontológico.

2.- La determinación de las Concentraciones Mínimas inhibitorias sugiere que los colutorios más eficientes son los que basan su efecto en la capacidad antibacteriana de la clorhexidina, triclosan y peróxido de carbamida y finalmente alcoholes. El peróxido de carbamida presenta un excelente comportamiento frente a bacterias anaeróbicas.

3.- De los valores de CMI puede inferirse que la utilización de dentífricos comerciales basados en el efecto antibacteriano de C1 estaría desaconsejada por la escasa actividad antibacteriana, al margen de otros criterios que tampoco parecen aconsejar su uso, tal es la adición de ciertas concentraciones de alcohol en su formulación. Sin embargo las series experimentales restantes sugieren conclusiones divergentes.

4.- En los experimentos de eliminación de flora bucal realizados *in vivo* se ha puesto de manifiesto el comportamiento superior de C1 frente al resto de los colutorios ensayados.

5.- La conclusión apuntada en el apartado anterior se ve reforzada con los resultados obtenidos en la determinación del tiempo de supervivencia. En dichos experimentos nuevamente C1 se comportó como el más activo, seguido de los colutorios a base de clorhexidina y de triclosán.

6.- Como conclusión metodológica puede afirmarse que la determinación de la CMI no constituye un buen parámetro para determinar la eficiencia de los colutorios puesto que en algunos casos el prolongado tiempo de contacto puede enmascarar los resultados.

7.- Los ensayos realizados con el colutorio a base de peróxido de carbamida, demuestran que además de su bien estudiado efecto blanqueador, estos preparados muestran un excelente

comportamiento como antimicrobianos. Esta afirmación es especialmente cierta en lo que se refiere a bacterias anaeróbicas estrictas.

8.- Los tiempos de supervivencia de las bacterias en contacto con los productos ensayados, muestran, una vez más, el superior comportamiento de C1 frente al resto de los colutorios ensayados.

9.- Del conjunto de resultados de este trabajo puede concluirse que, al margen de otras consideraciones de carácter farmacológico, el colutorio C1 muestra una actividad antimicrobiana óptima, seguido de C2 y C3 y el peróxido de carbamida, y que los colutorios a base de triclosán son los menos eficientes de los que se han ensayado, aunque aún en este caso existe una apreciable eliminación de flora bacteriana.

7.- Referencias bibliográficas.

(1) Nadal Valldaura Antonio. Patología Dentaria. Ediciones Rondas 1987.

(2) Liébana Ureña J. Microbiología Oral. Interamericana. Mc Graw-Hill 1995.

(3) Wallace Macfarlane T. Clinical Oral Microbiology. Editorial Wright 1989.

(4) Baron S. Medical Microbiology. (1996). University of Texas Medical Branch . Galveston. Tx.

(5) Loesche W J, Schork A, Terpenning M S, Chen Y M, Stoll J. Factors Which Influence Levels Of Selected Organisms In Saliva Of Older Individuals. Journal Of Clinical Microbiology 1995;33(10):2550-2557.

(6) Fransson C, Berglundh T, Lindhe J. The effect of Age On The Development Of Gingivitis. Clinical, Microbial and Histological Findings. J Clin Periodontol.1996;23:379-385.

(7) Ryan K.J. Sherris. Medical Microbiology. 1994. Prentice Hall .
NJ.

(8) Madinier I. Flore Bactérienne Buccale Et Potentiel Pathogene. J
Biol Bucale 1991; 19: 3-15.

(9) Moreu G, González M, Sánchez MC. Microscopía Electrónica De
Barrido De Los Morfotipos Microbianos Del Epitelio Periodontal.
Revista Europea De Odontoestomatología 1995; VII , 5: 295-300.

(10) Mouton Christian. Bacteriología Bucodental. Masson 1995.

(11) Prieto J, Guardiola L. Microbiología De La Cavidad Oral. Av
Odontoestomatol 1997; 13 (Supl. A): 9-16.

(12) Palenstein Helder van W H, Matee M I N, Hoeven van der,
Miks F H M. Cariogenicity Depends More On Diet Than The
Prevailing Mutans Streptococcal Species. J Dent Res
1996;75(1):535-542.

(13) Viñas M, Lorén JG, Regué J. Envueltas bacterianas y antibióticos. 1993. Promociones y Publicaciones Universitarias. Barcelona.

(14) Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* In Adult Periodontitis. I. Topographic Distribution Before And After Treatment. J Periodontol 1994;65:820-826.

(15) Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang N.P. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* In Adult Periodontitis. II. Characterization Of Isolated Strains And Effect Of Mechanical Periodontal Treatment. J Periodontol 1994;65:827-834.

(16) Nolte W. Microbiología Odontológica. Nueva Editorial Interamericana 1985.

(17) Nieminen A, Siren E, Wolf J, Asikainen S. Prognostic Criteria For The Efficiency Of Non- Surgical Periodontal Therapy In Advanced Periodontitis. J Clin Periodontol 1995;22:153-161.

(18) Baca Garcia P. Subespecies De Streptococci Mutans En Dos Grupos Raciales De Poblacion. Acta Estomatológica Valenciana 1990;1:3-10.

(19) Baca P, Bravo M, Baca G, Junco G, Llodra JC. Efectividad Del Barniz De Clorhexidina y Timol Cervitec En Los Recuentos Salivares De Estreptococos Del Grupo Mutans y Lactobacillus. R.O.E 1996; 1,7 : 527-530.

(20) Flemming TF. Irrigación Supragingival Como Tratamiento Complementario De La Gingivitis y La Periodontitis. Periodoncia 1994;4:109-121.

(21) Yiu CKY, Wei SHY. Eficacia De Los Dentífricos En El Control Del Cálculo, Placa y Gingivitis. Quintessence (Ed Esp) 1994;7:221-231.

(22) Fine DH, Mendieta C, Barnett ML, Furgang D, Naini A, Vincent JW. Endotoxin Levels In Periodontally Healthy And Diseased Sites: Correlation With Levels Of Gram Negative Bacteria. J Periodontol 1992;63,11:897-901.

(23) Hellström M K, Ramberg P, Krok L, Lindhe J. The Effect Of Supragingival Plaque Control On The Subgingival Microflora In Human Periodontitis. J.Clin Periodontol 1996;23:934-940.

(24) Mendieta C, Reeve CM. Periodontal Manifestations Of Systemic Disease And Management Of Patients With Systemic Disease. Curr Opin Periodontol 1993:18-27.

(25) Fine DH, Mendieta C, Barnett ML, Furgang D, Meyers R, Olshan A, Vincent J. Efficacy Of Preprocedural Rinsing With An Antiseptic In Reducing Viable Bacteria In Dental Aerosols. J Periodontol 1992;63,10:821.

- (26) Mendieta C, Vallcorba N, Binney A, Addy M. Comparison of 2 Chlorhexidine Mouthwashes On Plaque Regrowth In Vivo And Dietary Staining In Vitro. J Clin Periodontol 1994;21,4:296-300.
- (27) Mendieta C, Williams RC. Periodontal Regeneration With Bioresorbable Membranes. Curr Opin Periodontol 1994:157-167.
- (28) Nisengard R, Bascones A. Invasión Bacteriana En La Enfermedad Periodontal. Av Odontoestomatol 1987; Vol III, Num 3: 119-122.
- (29) Nisengard R, Bascones A. Invasión Bacteriana En La Enfermedad Periodontal. Avances En Odontoestomatol 1987; Número Monográfico: 124-127.
- (30) Bascones A. Microbiología De La Enfermedad Periodontal. Av. Odontoestomatol 1989; Periodoncia 2 : 105-117.

(31) Malagón J, Ramos JA. Participación Del Sistema Inmune En La Etiopatogenia De La Enfermedad Periodontal. Avances En Periodoncia. 1990;2:165-175.

(32) Mendieta C. Microbiología De La Enfermedad Periodontal. Periodoncia 1992;2:129-137.

(33) Robertson MR, Saglie FR, Carranza FA, Newman MG. Invasión Bacteriana y Actividad De La Enfermedad En La Periodontitis Humana. Av Odontoestomatol 1985; Num 4: 200-206.

(34) Adriens PA. Importancia De La Invasión Bacteriana Para El Tratamiento Parodontal . Revue Belge De Medicine Dentaire 1989;2,137-140.

(35) Farber PA, Seltzer S. Endodontic Microbiology. I. Etiology. Journal Of Endodontics 1988; 14, 7: 363-371.

(36) Zabalegui B. Biología Técnica De La Endodoncia: Situación Actual. Archivos De Odontoestomatología 1990; 6, 3: 65-78.

(37) Brook I, Frazier EH, Gher ME. Aerobic And Anaerobic Microbiology Of Periapical Abscess. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 123-125.

(38) Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Profiling of *Propionibacterium acnes* Recovered From Root Canal and Blood During And After Endodontic Treatment. *Endodental Traumatol* 1992; 8: 248-254.

(39) Sundqvist G. Associations Between Microbial Species In Dental Root Canal Infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 257-262.

(40) Sundqvist G. Ecología De La Flora Del Conducto Radicular. *Endodoncia* 1993; 11, 1: 22-27.

(41) Nagaoka S, Miyazaki Y, Jih Liu H, Iwamoto Y, Kitano M. Bacterial Invasion Into Dentinal Tubules Of Human Vital And Nonvital Teeth. *Journal Of Endodontics* 1995; 21, 2: 70-73.

(42) Bakdash Bashar. Oral Hygiene And Compliance As Risk Factors In Periodontitis. J Periodontol 1994;May(Suppl):539-544.

(43) Vander Weijden G A, Timmerman M F, Reijerse E, Snoek C M, Velden van der U. Toothbrushing Force In Relation To Plaque Removal. J Clin Periodontol 1996;23:724-729.

(44) Rivera S, Pinchería H, Mascaró V. Estudio Comparativo De Medios Mecánicos y Químicos Usados En El Control De La Placa Bacteriana En Pacientes En Tratamiento De Ortodoncia. Av Odontoestomatol 1986; Vol II, Num 4:179-133.

(45) Lopez MJ, Rios V, Bullón P. Eficacia De Los Productos Químicos Como Agentes Antiplaca. Revista Europea De Odontoestomatología 1991; Volumen3: 115-122.

(46) Harper S, Mueller L, Fine J, Gordon J, Laster L. Eficacia Clínica De Un Dentífrico y Un Colutorio Que Contienen Extracto De Sanguinaria y Cloruro De Zinc Durante 6 Meses De Uso. Journal of Clin Periodontology.1990; 61: 352-358.

(47) Walker C, Borden LC, Zambon JJ, Bonta CY, De Vizio W, Volpe AR. The Effects Of 0,3% Triclosan Containing Dentifrice On The Microbial Composition Of Supragingival Plaque. J Clin Periodontol 1994;21:334-341.

(48) Yiu C, Wei S. Eficacia Clínica De Los Dentífricos En El Control Del Cálculo, Placa y Gingivitis. Quintessence (Ed. Esp) 1994; Vol 7, Num 4:221-231.

(49) Tahmassebi J, Duggal MS, Curzon MEJ. Effect Of A Calcium Carbonate-Based Toothpaste With 0,3% Triclosan On Ph Changes In Dental Plaque In Vivo. Caries Res 1994;28:272-276.

(50) Curull C. Dentífricos, Geles y Colutorios. ¿Por Qué y Para Qué? Periodoncia 1997; 7, Num 2: 77-86.

(51) Ciancio S. Ampliación Del Uso De Los Colutorios Y Utilidad Futura. Archivos De Odontoestomatología 1995;11:2,93-97.

(52) Rubinstein L. Antimicrobial Mouthrinses Impact On Dental Hygiene. Jada 1994;125:24-28.

(53) Westfelt E. Rationale Of Mechanical Plaque Control. J Clin Periodontol 1996;23:263-267.

(54) Lopez MJ, Bullón P. Efectividad y Control Enzimológico De Un Dentífrico Sobre La Formación De La Placa Bacteriana. Archivos De Odontoestomatología 1989;5:520-526.

(55) Bascones A. Av. Odontoestomatol. 1989 Periodoncia 6: 318-324.

(56) Mandel I.D. Colutorios Antimicrobianos: Repaso y Puesta Al Día. Archivos De Odontoestomatología 1991;10:583-592.

(57) Steinberg D, Kaine G, Gedalia I. Antibacterial Effect Of Propolis And Honey On Oral Bacteria. American Journal Of Dentistry 1996; 9: 236-239.

(58) Hanna JJ, Johnson JO, Kuftneck. Evaluación Clínica A Largo Plazo De Una Pasta y Un Enjuague Bucal Con Sanguinaria En El Control De La Placa, Inflamación Gingival y Sangrado Gingival Durante El Tratamiento Ortodóntico. American Journal Of Ortodontics And Dentofacial Ortopedics St. Louis 1989; Vol 96, Num 3.

(59) Grenby TH. El Empleo De La Sanguinaria En Enjuagues y Crema Dental, Comparado Con Otros Agentes Antimicrobianos. British Dental Journal 1995; 178:254-258.

(60) Elworthy AJ, Edgar R, Moran J, Addy M, Mover R, Kelty E, Wade WG. A 6 Month Home-Usage Trial Of 0,1% And 0,2% Delmopinol Mouth Washes. (II) Effects On The Plaque Microflora. J Clin Periodontol 1995;22:527-532.

(61) Hase JC, Ainamo J, Etemadzadeh H, Aström M. Plaque Formation And Gingivitis After Mouthrinsing With 0,2% Delmopinol Hydrochloride, 0,2% Chlorexidine Digluconate And Placebo For 4 Weeks, Following A Professional Tooth Cleaning. J Clin Periodontol 1995;22:533-539.

(62) Tanzer JM, Grant L, McMahon T. Bicarbonate-Based Dental Power, Fluoride, And Saccharin Inhibition Of Dental Caries Associated With Streptococcus Mutans Infection On Rats. J Dent Rest 1988;67:969-972.

(63) Falcolini G, Cappetta S, Cozza P, Genovesse, MD. Efectos De Diferentes Colutorios En La Formación De La Placa Dental. Estudio "In Vivo" Con Observaciones En El S.E.M. Odontología & Implantoprotesi 1989;1:45-48.

(64) Wile DB, Dinsdale JRM, Joynson DHM. Hexetidina (Oraldene) , Informe Sobre Sus Propiedades Antibacterianas y Antifúngicas Sobre La Flora Oral En Sujetos Sanos. Curr Med Res Opin 1986;10:82-93.

(65) Van Rijkom H M, Truin G J, Hof van't M A. A meta-Analysis Of Clinical Studies On The Caries-Inhibiting Effect of Chlorhexidine Treatment. J Dent Res 1996;75(2):790-795.

(66) Greenstein G, Stenberg D. Progresión De La Enfermedad Periodontal. Periodontal Insights 1997; Vol 2; Num 4: 3-7.

(67) Rioboo R, Travesi MA, González I, Moreno JP. Control De La Placa Bacteriana y Clorhexidina. Revista Española De Estomatología 1985; Tomo 33, Num 2: 79-92.

(68) Ashley KC. Las Propiedades Antimicrobianas De Dos Colutorios Antisépticos De Uso Corriente: Corsodyl (Clorhexidina) y Oraldene (Hexetidina). Journal of Applied Bacteriology 1984;56:221-225.

(69) Bascones A, Manso J. Clorhexidina En Odontoestomatología: Conceptos Actuales y Revisión De La Literatura. Avances En Odontoestomatología 1994;10:685-708.

(70) Lavigne SE, Krust-Bray KS, Williams KB, Killoy WJ, Theisen F. Effects Of Subgingival Irrigation With Chlorexidine On The Periodontal Status Of Patiens With Ha-Coated Integral Dental Implants. Int J Oral Maxillofac Inplants 1994;9:156-162.

(71) Axelsson P, Lindhe J. Efficacy Of Mouthrinses In Inhibiting Dental Plaque And Gingivitis In Man. J Clin Periodontol 1987;14:205-212.

(72) Lang NP, Brex MC. Digluconato De Clorexidina, Un Agente Para El Control Químico De La Placa y La Prevención De La Inflamación Gingival. Archivos De Odontoestomatología 1987;3:157-168.

(73) Echeverría JJ, Olivé L, González P, Planas ME, Maierhofer G, Sentís J. Efecto Antiplaca De Una Solución De Clorexidina Liposomada: Estudio Preliminar. Archivos De Odontoestomatología 1993;9:205-207.

(74) Albandar JM, Gjermo P, Preus HR. Chlorhexidine Use After Two Decades Of Over-The- Counter Availability. J Periodontol 1994;65:109-112.

(75) Fine D. Evaluación De Los Colutorios Antibacterianos y Su Efectividad Bactericida. Archivos De Odontoestomatología 1994;10(Suppl II):666-675.

(76) Lopez J, Roselló X, Chimenos E. Caballero R. Estudio Clínico Abierto De Un Gel De Clorhexidina En El Control De La Inflamación Gingival (Ensayo Entre Gel Versus Colutorio En 116 Pacientes). Avances En Periodoncia 1997;9:49-61.

(77) Marcos JL, Herguedas K, Astorkia R, Juarros F. Clorhexidina Puesta Al Día Tras 25 Años De Experiencia. Periodoncia 1997;7:31-41.

(78) Grenier D. Effect Of Clorhexidine On The Adherence Properties Of Porphyromonas Gingivalis. J Clin Periodontol 1996;23:140-142.

(79) Cubells AB, Dalmau LB, Chaknis P, Volpe AR. Efecto De Un Dentífrico Compuesto Por Triclosán Copolímero y Fluoruro, Sobre La Formación De Placa y Gingivitis: Un Estudio Clínico A Seis Meses. Journal Of Clinical Dentistry 1991; 2, 3: 63-69.

(80) Calsina G, Alcubierre C, Sentis J, Echeverría JJ. Eficacia Clínica De Una Pasta Dentífrica Que Contiene Triclosan y Citrato De Zinc En El Control De La Placa Bacteriana. Archivos De Odontoestomatología 1994;10:139-144.

(81) Kjaerheim V, Mette S, Rölla G. Significance Of Choice Of Solvents For The Clinical Effect Of Triclosan Containing Mouthrinses. Scand J Dent Res 1994;102:202-205.

(82) Mette S, Rölla G, Kjaerheim V. Triclosan-Containing Mouthwashes-Does The Nature Of The Solvent Influence Their Clinical Effect? Scand J Dent Rest 1994;102:46-49.

(83) Skaare A B, Herlofson B B, Barkvoll P. Mouthrinses Containing Triclosan Reduce The Incidence Of Recurrent Aphthous Ulcers (RAU). J Clin Periodontol 1996;23:778-781.

(84) Rugg-Gunn AJ, Holloway PJ, Davies TGH. Caries Prevention By Daily Fluoride Mouthrinsing. Report Of A Three-Year Clinical Trial. Brit Dent J 1973;135:353-360.

(85) Martinez I, Manau JM, Cuenca E, Echeverria JJ. Efecto De Un Colutorio De Fluoruro Estañoso-Fluoruro De Aminas (Lemirol) Sobre El Indice De Placa En Ausencia De Cepillado. Archivos De Odontoestomatología 1993;9:454-456.

(86) Duckworth RM, Steward D. Effect Of Mouthwashes Of Variable NaF Concentration But Constant NaF Content On Oral Fluoride Retention. Caries Research 1994;28:43-47.

(87) Cappetta S, Curcio ML, Gamberale S, Tomassini E, Bossu M. Acción De Algunos Colutorios Para La Tipificación De La Placa Bacteriana: Estudio Microbiológico "In Vivo". *Odontoestomatología & Implantoprotesi* 1989;4:197-201.

(88) Jakush J. En Opinión Del Consejo No Hay Razón Para Retirar Listerine. *Ada News* 1991;6 De Mayo:1-3.

(89) Fishman S. Los Colutorios Antimicrobianos Desde La Perspectiva Del Clínico. *Archivos De Odontoestomatología* 1994;10(Suppl II):676-678.

(90) Bowsma Otis J. The Estatus, Future, And Problems Of Oral Antiseptics. *Current Opinion In Periodontology* 1996;3:78-84.

(91) Smith RN, Andersen RN, Kolenbrander PE. Inhibition Of Intergeneric Coaggregation Among Oral Bacteria By Cetylpyridinium Chloride, Chlorhexidine Digluconate And Octenidine Dihydrochloride. *J Periodontol Res* 1991;26:422-428.

(92) Lenhard M. Assessing Tooth Color Change After Repeated Bleaching In Vitro With A 10 Percent Carbamide Peroxide Gel. Jada 1996; Vol 127 : 1618-1624.

(93) Kornman KS, Newman, MG, Moore, DJ, Singer RE. The Influence Of Supragingival Plaque Control In Clinical And Microbial Outcomes Following The Use Of Antibiotics For The Treatment Of Periodontitis. J Periodontol 1994;65:848-854.

(94) Cisneros R, De La Cruz S. Control Quimioterápico De La Placa Bacteriana. Iedar (Instituto De Estudios Documentales Del Azúcar y De La Remolacha) 1995.

(95) Moreno A. Fundamentos Farmacológicos De La Terapéutica Antimicrobiana. Avances En Odontoestomatología 1994;10 (Supl. A):46-50.

(96) Santos A, Vallcorba N, Calsina, G, Estany J, Echeverria JJ. Periodoncia: Revision Bibliográfica Del Año 1992. Estomatología 1993;9:305-326.

(97) Bascones A, Manso FJ, Muñoz M. Antibióticos y Antimicrobianos En Odontoestomatología. Av Odontoestomatol 1997; 13(Supl. A): 37-52.

(98) Bascones A, Manso FJ, Vadillo JM. Infecciones Orofaciales Odontogénicas: Diagnóstico y Tratamiento. Av Odontoestomatol 1997;13(Supl A):9-16.

(99) Van Winkelhoff AJ, Winkel EJ. Infecciones y Tratamientos Periodontales. Periodoncia 1997; 6, Num 2; 116-125.

(100) Stanier RY, Adelberg EA, Ingraham JL. General Microbiology 4th Ed (1987) MacMillan Press. London.

(101) Stanier RY, Adelberg EA, Ingraham JL. General Microbiology 4th Ed (1977) MacMillan Press. London.

(102) Viñas M, Lorén JG, Guinea J. Particulate-bound pigment in *Serratia marcescens* ATCC 274. 1983. Microbios Letters 24:19-26

TD 527
0200155860

(103) Leranoz AM, Fusté MC, Viñas M, Hull RA, Williams RP. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding proline oxidase of *Serratia marcescens*.

(104) Papaianou W, Quirynen M, Nys M, Van Steenberghe D. The Effect Of Periodontal Parameters On The Subgingival Microbiota Around Implants. Clin Oral Impl Res 1995;6:197-204.

(105) Mombelli A, Maxer M, Gaberthuel T, Grunder U, Lang NP. The Microbiota Of Osseointegrated Implants In Patients With A History Of Periodontal Disease. J Periodontol 1995; 22: 124-130.

(106) Sentís J, Pardell H, Cobo E, Canela J. Bioestadística. Editorial Masson SA. Barcelona. 1995.