

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA MADRE Y MAESTRA

Vicerrectoría de Postgrado

Facultad de Ciencias de la Salud



**Trabajo de Investigación Final para optar por el título de
Maestría en Periodoncia e Implantología Oral**

**Sensibilidad bacteriana de microorganismos periodontales frente a antisépticos con
clorhexidina y clorhexidina combinada con peróxido de hidrógeno y *Caesalpinia
coriaria*, de uso habitual en la República Dominicana: Estudio *in-vitro*.**

Sustentante:

Dr. Johannes Olsen Cruz

2013-6183

Asesor de contenido:

Dra. Aimée Cuesta

Asesor metodológico:

Dra. María G. Silva

Santo Domingo

Noviembre, 2015.

“Declaro, en mi calidad de autor de esta obra que cedo de manera formal, gratuita, permanente y absoluta a la PUCMM todos los derechos patrimoniales, de forma no exclusiva, que ostento sobre mi creación, pudiendo expresamente la PUCMM explotarla a su mejor conveniencia, recibiendo si así fuere el caso, regalías por usos onerosos; que como autor exonero a la PUCMM de cualquier responsabilidad por reclamos en contra de lo creado y que autorizo a que la misma sea protegida mediante las vías que a tales fines establece la ley, indicando siempre mi calidad de autor”

Johannes Olsen Cruz, 2013-6183.

Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra

**Vicerrectoría de Postgrado y
Centro de Desarrollo Profesional**

Maestría en Periodoncia e Implantología Oral

Sensibilidad bacteriana de microorganismos periodontales frente a antisépticos con clorhexidina y clorhexidina combinada con peróxido de hidrógeno y *Caesalpinia coriaria*, de uso habitual en la República Dominicana: Estudio *in-vitro*.

Yo, Johannes Olsen Cruz, a través del presente documento, autorizo a la Biblioteca de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra a reproducir total o parcialmente mi tesis, tanto en soporte físico como digital, y a ponerla a disposición del público, mediante cualquier medio conocido (físico, en línea) o por conocer. Cualquier reproducción de este documento no debe ser para uso comercial o de lucro.

Fecha: _____ Firma del autor: _____

Dedicatoria

A Yahuah, mi Padre Celestial. El conocimiento humano palidece ante el Suyo.

A mis padres Harold Olsen Bogaert y Raysa Cruz Erickson quienes han sido soporte y apoyo vital durante todo este camino.

Agradecimientos

A mi Dios por el apoyo y sabiduría para poder entender una ínfima parte de su creación.

A mis padres por el constante apoyo y guía. Después de Dios, les debo a ustedes quien soy.

Mi hermana Margarita quien se involucró directamente con muchos de los proyectos de esta maestría.

Este trabajo ha sido un esfuerzo de muchas personas quienes se han involucrado sin pensar en horas, fines de semana o planes previos. Un agradecimiento muy especial por el apoyo dado a la Dra. Aimée Cuesta, asesora temática y docente durante estos casi tres años de maestría. Del mismo modo agradecer a la Dra. Guadalupe Silva por su asesoramiento metodológico, el ser consistente rinde sus frutos.

A la Dra. Patricia Palma Fluxá, Jefa del Área de Microbiología Oral del Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, quien fungió como asesora metodológica desde la perspectiva de microbiología y quien junto a las técnicas microbiólogas Daniela Salinas y Darna Venegas y la Prof. Leyla Gómez me hicieron sentir como en casa en mi estadía en Chile. No tengo como pagarles.

Al Dr. James Collins coordinador del programa de Magíster en Periodoncia e Implantología Oral, por involucrarse en este proyecto y en nuestra formación como futuros periodoncistas.

Al Departamento de Estomatología de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra por permitirme desarrollar como profesional y crecer en nuevas áreas de conocimiento, especialmente a la Dra. Lamia Sued.

A mis compañeros de maestría y a mis compañeros del Magíster de Prótesis e Implantología Oral.

A toda mi familia y amigos por sus oraciones y acompañamiento.

Índice

Resumen (<i>abstract</i>).....	1
Introducción	3
1.1 Antecedentes	4
1.2 Descripción del Problema	9
1.3 Preguntas de Investigación	10
1.4 Objetivos	11
1.4.1 Objetivo General	11
1.4.2 Objetivos Específicos.....	11
1.5 Hipótesis.....	11
1.6 Justificación de la Investigación	12
1.7 Limitaciones y Delimitaciones de la Investigación	13
1.7.1 Limitaciones.....	13
1.7.2 Delimitaciones	13
1.8 Operacionalización de las Variables	14
1.9 Glosario.....	15
2.0 Marco Teórico.....	19
2.1 Enfermedad Periodontal.....	19
2.2 Clasificación de la Enfermedad Periodontal.....	19
2.3 Criterios de Salud Periodontal	20
2.4 Biopelícula	25
2.5 Clasificación de Socransky	27
2.6 Respiración Bacteriana	30
2.7 Factor de Virulencia.....	31
2.8 Patógenos Periodontales	32
2.8.1 Patógenos periodontales en la República Dominicana	32
2.8.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	33
2.8.2.1 Condiciones de cultivo e identificación:.....	33
2.8.2.2 Factores de Virulencia de la <i>Porphyromonas gingivalis</i>	33
Fimbrias	33
Prevalencia de genotipos de fimbrias en pacientes con periodontitis.....	34

Gingipainas	35
Lipopolisacáridos de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	36
Cápsulas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	36
Variaciones de los antígenos K de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	37
Hemaglutinación y agregación plaquetaria por <i>Porphyromonas gingivalis</i>	37
2.8.3 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	38
2.8.3.1 Condiciones de cultivo e identificación.....	40
2.8.3.2 Factores de Virulencia de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	40
2.8.4 <i>Eikenella Corrodens</i>	40
2.8.4.1 Condiciones de cultivo e identificación	40
2.8.4.2 Factores de virulencia de <i>Eikenella Corrodens</i>	41
Lipopolisacáridos de <i>Eikenella corrodens</i>	41
Limo	41
Proteínas de la membrana externa	41
Pili.....	42
2.8.5 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	42
2.8.5.1 Condiciones de cultivo e identificación	42
2.8.5.2 Factores de virulencia de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	43
2.8.5.3 Relación entre <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i>	43
2.9 Agentes Químicos Antimicrobianos	44
2.10 Antisépticos Orales como coadyuvantes en el control de la biopelícula durante la terapia de tratamiento fase I o etiológica	45
2.10.1 Antisépticos Orales	46
2.10.2 Clorhexidina.....	47
2.10.2.1 Colutorios de Clorhexidina combinados con otros principios activos.....	49
2.10.3 Cloruro de Cetilpiridinio.....	50
2.10.4 Peróxido de Hidrógeno	51
2.10.4.1 Seguridad del uso del peróxido de hidrógeno.....	52
2.10.4.2 Combinaciones de peróxido de hidrógeno con clorhexidina.....	52
2.10.5 Aceites Esenciales.....	53
2.10.6 Triclosán	54
2.10.7 Xilitol	55
2.10.8 Fluoruros	56
2.10.8.1 Fluoruro de Sodio	56

2.10.8.2 Fluoruro de Potasio	57
2.10.9 Acetato de Zinc	57
2.10.10 <i>Caesalpinia coriaria</i> y usos medicinales.	58
2.11 Pruebas de laboratorio.....	59
2.12 Medios de Cultivo.....	59
2.12.1 Medios de Cultivos Corrientes	60
2.12.2 Medios de Cultivos Especiales	60
2.12.2.1 Medios de Cultivos Mejorados	60
2.12.2.2 Medios de Cultivos Selectivos.....	62
2.12.2.3 Medios de Cultivos Indicadores.....	63
2.12.2.4 Medios Mixtos	63
2.13 Cultivo de Bacterias Anaerobias.....	64
2.14 Recuento Bacteriano	65
2.14.1 Recuento de Bacterias Viables.....	65
2.14.2 Turbidimetría	66
2.15 Ensayos para la determinación de sensibilidad bacteriana a antimicrobianos.....	66
2.16 Métodos de Difusión.....	67
Método de antibiograma disco-placa o Kirby-Bauer.....	67
2.19 Métodos de Dilución.....	70
Método de dilución en agar.....	70
2.20 Curva de letalidad o muerte	70
3.1 Enfoque y Alcance de la Investigación.....	73
3.2 Población y Muestra	73
3.3 Instrumentos de Recolección de Datos, Análisis y Medición de Datos	73
3.6 Materiales y Métodos.....	77
3.6.1 Especies bacterianas y medios de cultivo	77
3.6.2 Ensayos realizados y productos utilizados.....	78
3.6.3 Ensayo de Dilución en Agar	79
3.6.4 Ensayo de Difusión en Agar o <i>Agar Spot Growth Inhibition Test</i>	80
3.6.5 Ensayo de contacto o <i>Short Interval Kill Test</i>	80
4.1 Resultados	83
4.2 Discusión.....	93
5.1 Conclusión	96

Bibliografía	98
Anexos	108

Resumen (*abstract*)

El objetivo del presente estudio es evaluar la sensibilidad de microorganismos periodontales (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *E. corrodens*) frente a clorhexidinas (CHX) de uso habitual en República Dominicana al 0.06%, 0.12% y una combinación de clorhexidina al 0.15% más peróxido de hidrógeno y extracto de *Caesalpinia coriaria* (CHX0.15%+H₂O₂+Cc). Se llevaron a cabo ensayos de dilución en placa, difusión en agar y *Short Interval Kill Test* a tres tiempos (1, 3 y 5 minutos) y con tres volúmenes de suspensión bacteriana. Pruebas estadísticas de ANOVA, HSD-Tukey, T-Student y de Friedman fueron aplicadas. Los resultados mostraron diferencias significativas en cuanto a sensibilidad entre las bacterias evaluadas y los enjuagues evaluados. La CHX 0.06%, CHX 0.15%+H₂O₂+Cc y una de las CHX 0.12% mostraron menor inhibición bacteriana al ser comparadas con las demás CHX 0.12%. La prueba de Friedman determinó que hay diferencias significativas en la viabilidad bacteriana dependiendo de volumen de suspensión de bacteria, más no así en tiempo de contacto.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Introducción

En la odontología se trabaja en función de dos objetivos: la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o patología. La cavidad oral tiene más de 700 microorganismos de los cuales se conoce y se ha comprobado que entre 10-14 son patógenos y causan enfermedad periodontal.¹ Para combatir la enfermedad periodontal, enfermedad que daña los tejidos de soporte del diente, existen múltiples abordajes. La razón principal de la enfermedad periodontal está relacionada con la biopelícula, estructura organizada de microorganismos que se encuentran en una matriz de glicocálix que le brindan mayor protección a los mismos frente a los métodos de remoción para su eliminación.² Además del uso del cepillo y el hilo dental, en la rama de la Periodoncia se utilizan antisépticos como coadyuvantes al tratamiento para acceder a lugares que de otra forma sería imposible. Entre los antisépticos más conocidos está la clorhexidina, que viene en distintas concentraciones y es preferida por su alta sustentividad, su acción frente a los microorganismos (provocando ruptura de la membrana celular llevando al desalojo del contenido citoplasmático y posterior muerte de la célula) y porque se adhiere tanto a tejidos duros como a tejidos blandos. Del mismo modo existen distintos tipos de antisépticos orales como el peróxido de hidrógeno y otros de fuentes más naturales como el extracto de fluido de *Caesalpinia coriaria*, la cual viene siendo usada desde los grupos aborígenes como enjuague para afecciones de la garganta y para evitar el sangrado de las encías por su alto poder astringente.

Teniendo tantas opciones de antisépticos de clorhexidina presentes en el mercado dominicano, tanto de fabricación local como extranjera, se pretende conocer si una combinación de un antiséptico que tiene clorhexidina, peróxido de hidrógeno y extracto de fluido de *Caesalpinia coriaria* tendría resultados similares o mejores a los de las clorhexidinas de uso común en la República Dominicana.

1.1 Antecedentes

Múltiples estudios han sido realizados con el fin de comprobar la efectividad de la clorhexidina en sus distintas concentraciones sobre diversos microorganismos, específicamente bacterias. Estos estudios microbiológicos han sido realizados tanto de manera *in-vitro* como de manera clínica y por lo general se comparan las clorhexidinas con otros tipos de antisépticos o desinfectantes. Diversos métodos de estudios microbiológicos pueden llevarse a cabo tales como la difusión en agar, dilución en agar, *Short Interval Kill Test*, así como muchos otros con el fin de evaluar y comprobar la efectividad, sensibilidad o resistencia de un antimicrobiano.

Sassone *et al.*³, en el 2003 realizaron un estudio donde se proponían evaluar la actividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio en concentraciones de 1% y 5% y clorhexidina al 0.12%, 0.5%, y 1%, para así comprender cual tendría mejor efecto sobre algunas cepas de bacterias específicas que se encuentran en los canales radiculares. Se tomaron cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (29121), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) y *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25568), y se realizó un ensayo *contact test*. Este ensayo tiene como método juntar un antimicrobiano líquido con una suspensión de caldo bacteriano, y dejarlo por un período de tiempo; luego de transcurrido el tiempo se toma la combinación de ambos y se siembra en un medio de cultivo sólido con el fin de evaluar si hay crecimiento bacteriano luego del contacto de la bacteria con el antimicrobiano.^{4,5} Sassone *et al.*³ evaluaron los efectos del antimicrobiano sobre las bacterias luego de transcurridos 5 minutos, 10 minutos y 30 minutos. Ellos repitieron este ensayo 10 veces. Los resultados mostraron que la clorhexidina al 0.12% no eliminó la *E. faecalis* en ninguno de los intervalos de tiempo, mientras que la clorhexidina al 0.5% y al 1%, así como el hipoclorito de sodio al 1% y al 5% si lo lograron. Sin embargo la clorhexidina al 0.12% fue efectiva sobre *S. aureus*, *E. coli*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en todos los tiempos.

En el 2003 Herrera *et al.*⁶ evaluaron la actividad antimicrobiana de cuatro enjuagues de clorhexidina al 0.12% (CHX 0.12% + Cloruro de Cetilpiridinio 0.05%, CHX 0.12 + NaF, CHX 0.12% sin alcohol y CHX 0.12% + Alcohol 5%) en estudios *in-vivo* e *in-vitro*. El estudio *in-vitro* consistió en un ensayo de contacto modificado, en el cual se evaluaron 20 especies bacterianas al ponerse en contacto durante 1 minuto con cada producto. Entre estas especies se encontraban: *E. corrodens* (ATCC 23834), *P. gingivalis* (ATCC 33277), así como *F. nucleatum* (ATCC 10953). Luego de realizado el contacto, el inóculo fue cultivado y los resultados fueron expresados en términos de sobrevivencia/resistencia y el porcentaje de sobrevivencia comparado con el control salino. El estudio *in-vivo* consistió en un estudio de recuento bacteriano, cruzado, doble ciego, aleatorizado, en donde 10 voluntarios se enjuagaron durante 1 minuto con cada uno de los productos estudiados. Muestras de saliva fueron obtenidas luego de realizados los enjuagues, y luego a los 5 minutos, 1, 3, 5 y 7 horas. Estas muestras fueron cultivadas tanto de manera aeróbica como anaeróbica. Los enjuagues evaluados se clasificaron según sus composiciones en: Clorhexidina 0.12% + Alcohol al 5% (CHX+ALC), Clorhexidina 0.12% + 0.05 Cloruro de Cetilpiridinio (CHX+CCP) (sin alcohol), Clorhexidina 0.12% + NaF (CHX+NaF) (sin alcohol) y Clorhexidina 0.12% (CHX), además del control salino. En el estudio de contacto *in-vitro* ninguna de las especies mostró supervivencia al evaluarse con el enjuague de CHX+CCP, mientras que tres especies (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis* and *Peptostreptococcus micros*) mostraron ser resistentes frente a los otros tres enjuagues. En este mismo sentido los productos de CHX y CHX+NaF mostraron una resistencia a especies adicionales (tres y cuatro especies respectivamente), entre estas el producto CHX+NaF mostró resistencia a *E. corrodens* (ATCC 23834). En cuanto al estudio *in-vivo* de recuento bacteriano, este mostró mayores reducciones de bacterias aerobias y anaerobias al evaluarse con los enjuagues CHX+CCP y CHX+ALC, con una duración de 5 horas. Diferencias significativas fueron detectadas en múltiples puntos en el tiempo, donde estos dos productos fueron comparados con el control y otros productos probados. En conclusión determinaron que existían diferencias significativas entre los enjuagues de clorhexidina al 0.12%, tanto en los estudios *in-vivo* como *in-vitro*.

La formulación con alcohol fue más activa que los que no contenían alcohol a excepción de la CHX+CCP, en el cual la reformulación y adición de CCP no solo compensa, más aún aumenta la actividad antimicrobiana.

Sassone *et al.*⁷ nuevamente el en 2008 realizaron pruebas de difusión y ensayos de contacto (*contact test*) en dos tipos de antimicrobianos: hipoclorito de sodio al 1% y 5% y clorhexidina al 0.12%, 0.5% y 1%. Las pruebas fueron realizadas con *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Los tiempos evaluados fueron: inmediatamente hubo contacto, a los 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos. La clorhexidina al 0.12% mostró efectividad en *P. gingivalis* y *E. coli* a partir de los 15 minutos. En el caso de *F. nucleatum* y *S. aureus* mostró efectividad en todos los tiempos. Sin embargo no hubo efectividad frente a *E. faecalis* en ninguno de los tiempos.

Solmaz y Korachi⁸ en el 2013, hicieron una prueba de las propiedades de inhibición y disrupción del gluconato de clorhexidina en especies únicas y multiespecies provenientes de la biopelícula oral. El propósito del estudio fue evaluar la eficacia de clorhexidina por sus propiedades de inhibición y disrupción de la biopelícula usando un ensayo de cristal del violeta. Para esto realizaron distintos estudios y utilizaron cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (FDC Y4) y *Streptococcus mutans*. Las cepas se hicieron crecer en un caldo cerebro-corazón (*Brain-Heart Broth*); éstas fueron evaluadas tanto por separado (especies únicas) como juntas (multiespecies). Luego de crecer en caldo fueron cultivadas en un medio de agar-sangre y se realizó un ensayo de difusión por discos embebidos en clorhexidina. La clorhexidina fue diluida hasta lograr una concentración de 24mg/L. Los investigadores tomaron papel filtro de 6mm de diámetro y lo impregnaron con 15µl de clorhexidina. Del mismo modo los investigadores intentaron conocer la concentración mínima inhibitoria de los microorganismos estudiados a una concentración de 1.0 McFarland. Los resultados arrojaron que en *Streptococcus mutans* y *Fusobacterium nucleatum*, así como multiespecies formadoras de biopelícula, fueron inhibidos en más de un 90% de los casos en concentraciones de 3-12mg/L.

Del mismo modo la clorhexidina mostró un fuerte actividad disruptiva de más de un 65% en biopelícula de un día de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Igualmente la clorhexidina mostró propiedades disruptivas en colonizadores tardíos en especies únicas de biopelícula, más no así en colonizadores tempranos y biopelículas formadas por distintas especies bacterianas.

Raangs *et al.*⁹ en el 2013 realizaron un estudio *in-vitro* en donde compararon dos enjuagues, el primero era una combinación de clorhexidina al 0.05% y cloruro de cetilpiridinio al 0.05% (el cual, entre otros compuestos, tenía lactato de zinc al 0.14%) y el segundo enjuague era con una base de fluoruro de estaño. Se tomaron muestras por raspado de las lenguas de 10 individuos con halitosis y sin halitosis. Se inocularon placas de agar sangre con las muestras tomadas. Uno de los ensayos realizados fue de difusión en agar inoculado con *F. nucleatum* y con las muestras tomadas de las lenguas; también se realizó el *Short Interval Killing Test* o *contact test* en un tiempo de 2 minutos con distintas concentraciones de ambos enjuagues que iban en un 10%, 20%, 40% y 60%, sobre cuatro bacterias periodontopatógenas: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*. Como control negativo se usó solución salina. Los resultados mostraron una actividad *in-vitro* altamente significativa con el enjuague a base de clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio en el estudio de difusión. En cuanto al estudio del *Short Interval Killing Test* el enjuague de clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio mostró mayor efectividad *in-vitro* que el enjuague a base de fluoruro de estaño.

Se ha reportado el uso de los frutos del árbol *Caesalpinia coriaria* para diferentes afecciones de la cavidad oral. En la República Dominicana, Cruz-Minier¹⁰ en el 2007, realizó una investigación en la cual se propuso a realizar pruebas de sensibilidad y resistencia bacteriana con diferentes concentraciones de *Caesalpinia coriaria* en las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*. En este estudio el extracto fue conseguido directamente del fruto del *Caesalpinia coriaria*. Se realizaron ensayos por dilución en caldo y ensayos por difusión.

A pesar de que no se especifica la cantidad de gramos exactos utilizados al sacar el extracto sino más bien la cantidad de frutos usados, los resultados en el ensayo de difusión dieron halos de 5-7mm. La autora concluye que el poder demostrado en la difusión variará de acuerdo a la concentración usada.

1.2 Descripción del Problema

En ramas de la odontología como la Periodoncia, el éxito de un trabajo por lo general se divide entre la experticia clínica y los conocimientos teóricos del profesional, así como en el cumplimiento y compromiso por parte del paciente. El clínico tiene a su mano una amplia gama de herramientas y medicamentos que le permiten conseguir un resultado clínico ideal a la vez que al paciente se le facilitan herramientas y técnicas para que mantenga el objetivo terapéutico logrado.

A los pacientes de terapia periodontal de fase I o etiológica, en la cual se realiza la remoción de cálculo dental supragingival o subgingival inicial, se les recomienda el uso de antisépticos orales para combatir los microorganismos patógenos, pues hay zonas en donde que ni el cepillo o el hilo dental son efectivos. En el caso de los pacientes que son sometidos a cualquier procedimiento quirúrgico oral, el poder higienizar la zona tratada por lo general se dificulta, llevando muchas veces al descuido y al cúmulo de biopelícula, lo que conlleva a su vez a mayor inflamación, mayor duración para la cicatrización e inclusive en algunos casos infección de la zona. La clorhexidina se ha planteado como el *gold standard* entre los antisépticos dado a su sustantividad, su amplio espectro bactericida y bacteriostático. Se ha visto también que el peróxido de hidrógeno solo o combinado con clorhexidina tiene funciones bactericidas como antiséptico oral. La *Caesalpinia coriaria* (guatapaná o guatapanal), es una planta de uso medicinal desde civilizaciones antiguas y entre sus usos y beneficios están poder astringente y antiséptico.

En la República Dominicana hay aproximadamente siete enjuagues de clorhexidina al 0.12% de distintas compañías, algunas de fabricación local y otras importadas. Los rangos de precios varían ampliamente del mismo modo. En este sentido se comercializa también clorhexidina en una concentración del 0.06% la cual está indicada para la fase de mantenimiento periodontal. Esta fase es la que sigue luego de la remoción de cálculo dental (supragingival y subgingival), donde el paciente y el profesional trabajan para mantener el objetivo terapéutico logrado y donde la carga bacteriana ha sido disminuida de manera mecánica.

Surge la interrogante de si en un estudio *in-vitro* podemos notar alguna diferencia significativa en la efectividad de una u otra clorhexidina en patógenos periodontales específicos tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* y *Fusobacterium nucleatum* y a su vez compararla con una clorhexidina al 0.15% combinada con peróxido de hidrógeno y *Caesalpinia coriaria*. Esto para poder darles más opciones al odontólogo y al paciente basados en evidencia científica.

1.3 Preguntas de Investigación

Por lo antes expuesto se plantean las siguientes interrogantes:

¿Cuál es la reacción de sensibilidad de cultivos de periodontopatógenos estudiados frente a las clorhexidinas en distintas concentraciones con o sin agregados?

¿Existe variación en la resistencia de los periodontopatógenos estudiados frente a las distintas clorhexidinas al 0.06%, 0.12% y clorhexidina al 0.15% combinada con peróxido de hidrógeno y de extracto de fluido de *Caesalpinia coriaria*?

¿Existe viabilidad bacteriana luego de poner las bacterias en contacto con las distintas clorhexidinas con y sin agregados?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

1.4.1.1 Determinar sensibilidad bacteriana de microorganismos periodontales frente a antisépticos con clorhexidina y clorhexidina combinada con peróxido de hidrógeno y *Caesalpinia coriaria*, de uso habitual en la República Dominicana.

1.4.2 Objetivos Específicos

1.4.2.1 Identificar la reacción de sensibilidad de cultivos de periodontopatógenos estudiados frente a las clorhexidinas en distintas concentraciones con o sin agregados.

1.4.2.2 Evaluar la resistencia de los periodontopatógenos estudiados frente a las distintas clorhexidinas al 0.06%, 0.12% y clorhexidina al 0.15% combinada con peróxido de hidrógeno y de extracto de fluido de *Caesalpinia coriaria*.

1.4.2.3 Determinar viabilidad bacteriana frente a las distintas clorhexidinas con y sin agregados.

1.5 Hipótesis:

Dado a que el enjuague con clorhexidina al 0.15% tiene una concentración ligeramente mayor a las comercializadas al 0.12%, y sumado a que tiene peróxido de hidrógeno y extracto de *Caesalpinia coriaria*, dos principios activos descritos por la literatura por tener leves efectos antimicrobianos, suponemos que el efecto antimicrobiano de este antiséptico será igual o mayor a los de las clorhexidinas al 0.12%.

1.6 Justificación de la Investigación

Los tratamientos periodontales conllevan una actitud muy colaboradora de parte del paciente y en la mayor parte de los casos es necesario el uso en casa de algún antimicrobiano, sea luego de un tratamiento periodontal etiológico o fase I, o después de una cirugía oral con el fin de evitar la formación de biopelícula oral. La clorhexidina se conoce como el antimicrobiano *gold standard* debido a su eficacia bactericida y alta sustentividad.^{6,11,12} Actualmente hay al menos siete laboratorios que comercializan clorhexidinas al 0.06%, al 0.12% y una combinación de clorhexidina al 0.15% con peróxido de hidrógeno y extracto de *Caesalpinia coriaria*. Con los resultados del estudio *in-vitro*, el clínico podrá indicar la clorhexidina que considere apoyándose en un estudio científico sabiendo de manera previa cuáles efectos tiene sobre ciertos periodontopatógenos la clorhexidina elegida.

De igual modo la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra podrá tener una idea de cuáles clorhexidinas son igual de eficaces que las que actualmente se utilizan en las Clínicas Estomatológicas tanto de Grado como Post-grado, y así saber el abanico de opciones con las que se cuenta apoyado en un estudio *in-vitro*.

1.7 Limitaciones y Delimitaciones de la Investigación

1.7.1 Limitaciones

Entre las posibles limitaciones para la investigación del tema está que, a pesar de que hay laboratorios que pueden realizar las pruebas de sensibilidad, en el país no se cultivan ciertas cepas de periodontopatógenos. Una posible solución a esta limitante es mandar a comprar las cepas de periodontopatógenos fuera del país a través de laboratorios farmacéuticos para así poder realizar el estudio de sensibilidad. Otra posible solución es enviar las muestras de clorhexidina a un laboratorio fuera del país que sí tengas las cepas, para realizar de este modo el estudio. Una colaboración con la Universidad de Chile permitiría lograr lo antes expuesto con el uso de su Laboratorio de Microbiología Oral.

Otra limitante puede ser el alto costo de los estudios a realizar. Como una alternativa está que, al establecer un convenio de colaboración en este estudio con la Universidad de Chile los costos disminuirían por el uso de su laboratorio.

1.7.2 Delimitaciones

Se utilizarán en el estudio todas las clorhexidinas con concentración al 0.12% en forma de colutorio disponibles en el mercado dominicano. De igual modo se incluirán los enjuagues que tengan clorhexidina 0.06% y enjuagues con la combinación de clorhexidina, peróxido de hidrógeno y extracto de fluido de *Caesalpinia coriaria* o Gutapaná.

1.8 Operacionalización de las Variables

Objetivo	Variable	Definición	Indicador	Dimensión
<p>Identificar la reacción de sensibilidad de cultivos de periodontopatógenos estudiados frente a las clorhexidinas en distintas concentraciones, con o sin agregados.</p> <p>Evaluar la resistencia de los periodontopatógenos estudiados frente a las distintas clorhexidinas al 0.06%, 0.12% y clorhexidina al 0.15% combinada con peróxido de hidrógeno y de extracto de fluido de <i>Caesalpinia coriaria</i> (Cc).</p>	<p>Efectividad al 0.06%, 0.12% y 0.15% + H₂O₂ y Cc</p>	<p>Capacidad de lograr la eliminación de la bacteria</p>	<p>Crecimiento bacteriano en ensayo de dilución.</p> <p>Formación de zona de inhibición bacteriana en ensayo de difusión.</p>	<p>Crecimiento bacteriano: Contable / Incontable.</p> <p>Medida en mm: Sensible: ≥9mm Intermedio: 5-8.99mm Resistente: 0-4.99mm</p> <p>Crecimiento dentro de zona de inhibición: (-) = 0 Crecimiento. (+) = 1-10 colonias. (++) = 11-100 colonias. (+++)= > 100 colonias.</p> <p>Delimitación de la zona de inhibición: Definido / Indefinido.</p>
<p>Determinar viabilidad bacteriana frente a las distintas clorhexidinas, con y sin agregados.</p>	<p>Efectividad al 0.06%, 0.12% y 0.15% + H₂O₂ y Cc</p>	<p>Capacidad de lograr la eliminación de la bacteria</p>	<p>Crecimiento bacteriano en Ensayo de Contacto o Short Interval Kill Test</p>	<p>Crecimiento bacteriano: (-) = Negativo. (+) = Positivo.</p>

1.9 Glosario

- ❖ **Anión:** ion con carga negativa.¹³
- ❖ **Apoptosis:** es un proceso genéticamente dirigido de autodestrucción que está marcado por la fragmentación de ADN nuclear, este proceso es activado tanto por la presencia de un estímulo como por la remoción de un agente supresor o estímulo. Es un proceso fisiológico normal de eliminación de células con ADN dañado, células superfluas y células indeseadas.¹⁴
- ❖ **Bactericida:** el efecto bactericida es aquel que provoca muerte de la bacteria.¹⁵
- ❖ **Bacteriostático:** es la inhibición del crecimiento bacteriano pero no la muerte del mismo.¹⁶
- ❖ **Cápsula:** Es la estructura más externa en las células que cuentan con información genética necesaria para poseerla. Está situada por fuera de la pared celular. En general está compuesta por polisacáridos aunque puede ser de constitución péptida. Por el tipo de cultivo que origina puede suponerse si una bacteria es capsulada o no, debido a que las capsuladas producen colonias llamadas lisas o mucoides.¹⁷
- ❖ **Catión:** ion con carga positiva.¹⁸
- ❖ **Endotoxinas:** es una sustancia lipopolisacárida presente en la membrana externa de las bacterias gram-negativo que se libera luego de la lisis.¹⁹
- ❖ **Fenotipo:** son las propiedades observables de un organismo que son producidos por la interacción del genotipo y el medioambiente. Los rasgos fenotípicos no solo abarcan los rasgos físicos, sino también los conductuales.²⁰
- ❖ **Fimbrias:** Son prolongaciones delicadas o vellosidades semejantes a pelos que presentan diversas bacterias, incluidos los cocos. Son más comunes en las gram-negativo que en las gram-positivo, son además cortas, rígidas y muy numerosas y más delgadas que los flagelos. Están dispuestas tanto en los polos de los bacilos como en el resto de su contorno. Solo se visualizan a través del microscopio electrónico. Una célula flagelada también puede poseer fimbrias. Antes se le conocían como pili comunes.¹⁷

- ❖ **Flagelos:** Son apéndices filamentosos extracelulares, largos, flexibles, ondulados y delgados que hacen que las bacterias que lo poseen gocen de movilidad. Aparecen en algunos bacilos rectos o curvos, tanto gram-positivo como gram-negativo.¹⁷
- ❖ **Genotipo:** Información genética que tiene un organismo en particular, en forma de ADN.²¹
- ❖ **Gingipaina:** Es una proteasa secretada por *Porphyromonas gingivalis* la cual tiene como función (entre muchas otras) la degradación de las citoquinas, por lo tanto regulan la respuesta del hospedero frente a la inflamación.²²
- ❖ **Glicocálix:** Es una capa externa de aspecto gelatinoso y pegajoso que está compuesta por polisacáridos, polipéptidos o ambas cosas. Es generada en el interior de la célula y luego vertida al exterior. No es tan uniforme como la cápsula y está menos adherida a la pared celular. Si el glicocálix está compuesto solo por azúcares, se le denomina como polisacárido extracelular. Éste ofrece a las bacterias facilidad para adherirse a distintas superficies y evita la deshidratación del microorganismo.¹⁷
- ❖ **Glucólisis/Glicólisis:** es la descomposición enzimática de un carbohidrato como la glucosa, por la vía de los derivados de fosfatos con la producción de ácido pirúvico o láctico.²³
- ❖ **Hemaglutinación:** Es la capacidad que tienen algunas bacterias y virus para unir entre sí los glóbulos rojos, debido a las proteínas que tienen en su capa externa.²⁴
- ❖ **Hemaglutinina:** Es una proteína que provoca aglutinación de los hematíes o glóbulos rojos. Al proceso se le conoce como hemaglutinación.²⁵
- ❖ **Leucotoxina:** Toxina que tiene la capacidad de inhibir o destruir los leucocitos.²⁶
- ❖ **Lipopolisacáridos:** Los lipopolisacáridos (LPS) conforman el antígeno O y la endotoxina de las bacterias gram-negativo. Están localizados en la membrana externa de la envoltura celular bacteriana y juegan un papel muy importante en la patogénesis de las infecciones bacterianas, así como en la interacción con el hospedero y su sistema de defensa.²⁷

- ❖ **Pili:** usualmente son únicos en la bacteria, y de manera excepcional puede haber dos. Los microorganismos lo utilizan para pasar información genética a otra bacteria. Son más largos que las fimbrias. Antes se le conocían como pili sexual.¹⁷
- ❖ **Polisacáridos:** un carbohidrato que puede ser descompuesto por hidrólisis en dos o más moléculas de monosacáridos.²⁸
- ❖ **Proteasa:** enzimas que pueden hidrolizar proteínas y que son clasificadas de acuerdo al grupo funcional más prominente en el sitio activo (como la serina o cisteína). Puede también ser llamada proteinasa.²⁹
- ❖ **Proteólisis:** hidrólisis de las proteínas o péptidos con formación de productos solubles y simples. Puede darse a través de enzimas específicas llamadas peptidasas o mediante la digestión intracelular.³⁰
- ❖ **Sacarolítico:** que provoca descomposición de los azúcares en el metabolismo con la producción de energía.³¹
- ❖ **Serotipo:** grupo de microorganismos íntimamente relacionados que se distinguen por un set de antígenos en común. O bien, set de antígenos característicos de un serotipo.³²
- ❖ **Sustantividad (en odontología):** capacidad que posee un agente de unirse a distintas estructuras de la boca para ser liberado manera activa y mantener niveles terapéuticos. También se puede definir como la propiedad de un químico de permanecer activo en la zona de aplicación.^{33,34.}
- ❖ **Viabilidad bacteriana:** es la capacidad que posee un microbio para sobrevivir en determinadas condiciones. Se relaciona además con la capacidad de replicación de una colonia.¹⁷

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.0 Marco Teórico

2.1 Enfermedad Periodontal

Las enfermedades periodontales son un grupo de enfermedades de origen infeccioso que afectan las encías y las demás estructuras de soporte del diente. Éstas están provocadas por algunas bacterias específicas de la biopelícula oral. Para que haya un inicio de la enfermedad periodontal es esencial la presencia de las bacterias, pero existen otros factores que son predisponentes de tipo microbiano y propios del hospedador los cuales influyen en la patogénesis de la enfermedad periodontal. Es por esto que para que se desarrolle la enfermedad periodontal es necesario la presencia de bacterias así como un hospedador susceptible.³⁵ Las enfermedades de origen periodontal forman parte de las patologías que con más frecuencia se presentan a nivel mundial; estas enfermedades se dividen dos grandes grupos: gingivitis, limitada a las encías, y periodontitis, extendida a tejidos de soporte más profundos. Ésta última afecta: encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular.^{35, 36.}

2.2 Clasificación de la Enfermedad Periodontal

Las enfermedades periodontales se han clasificado de distintas maneras en el transcurso de los años, tomando como guía las expresiones clínicas y apariciones de la enfermedad. La última modificación realizada a la Clasificación de las Condiciones y Enfermedades Periodontales se realizó en el año 1999, dirigido por la Academia Americana de Periodoncia. En esta clasificación se agregó el grupo de Enfermedades Gingivales ya que éste no existía en la clasificación del 1989, siendo así los dos grandes grupos de las Enfermedades Periodontales: las Enfermedades Gingivales y las Enfermedades Periodontales propiamente dichas. Las Enfermedades Gingivales agrupan una cantidad de 40 condiciones y enfermedades gingivales diferentes y las Enfermedades Periodontales propiamente dichas se subdividen en un grupo de 7 grandes categorías. (Ver Tabla 1)^{37, 38.}

2.3 Criterios de Salud Periodontal

Para poder diferenciar salud de enfermedad se debe tener un criterio definido y ampliamente (aunque no totalmente) aceptado. Cuando se habla de salud periodontal esto implica la ausencia de signos y síntomas de afección a los tejidos de soporte del diente inducidos por la presencia de placa o diversos trastornos sistémicos. La encía normal y sana se caracteriza por su color rosa y consistencia firme, no sangra al sondaje suave y llena el espacio bajo las áreas de contacto entre los dientes.³⁵

A menudo, la encía sana ofrece una apariencia punteada (como «cáscara de naranja»), y presenta un margen en filo de cuchillo entre el tejido blando y el diente. La gingivitis inducida por placa es una afección inflamatoria de los tejidos blandos que rodean a los dientes y es una respuesta inmunitaria directa a la biopelícula dental microbiana que se acumula en los dientes. Dentro de los hallazgos clínicos podemos encontrar: eritema, edema, sangrado, sensibilidad y agrandamiento. Factores locales como restauraciones mal adaptadas o desbordantes, apiñamiento o mal posición dentaria, entre otros pueden agravar su severidad.³⁵ En la periodontitis inducida por placa, se observa destrucción de los tejidos de soporte, así como inflamación gingival en los sitios donde hay una migración de la inserción epitelial a las superficies radiculares.^{38, 39.}

TABLA 1. CLASIFICACIÓN POR LA ACADEMIA AMERICANA DE PERIODONCIA DEL 1999 EN EL TALLER INTERNACIONAL PARA LA CLASIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y CONDICIONES PERIODONTALES. ³⁷

I. ENFERMEDADES GINGIVALES

A. ENFERMEDADES GINGIVALES INDUCIDAS POR PLACA DENTAL

1. Enfermedades gingivales inducidas solamente por placa dental:

- a. Gingivitis inducida por placa sin otros factores locales contribuyentes.
- b. Gingivitis inducida por placa con otros factores locales contribuyentes.

2. Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos:

- a. Asociadas al sistema endocrino:
 - 1) Gingivitis asociada a la pubertad.
 - 2) Gingivitis asociada al ciclo menstrual.
 - 3) Asociadas al embarazo:
 - a) Gingivitis.
 - b) Granuloma piógeno.
 - 4) Gingivitis Asociada a diabetes mellitus.
- b. Asociadas a discrasias sanguíneas:
 - 1) Gingivitis asociada a leucemia.
 - 2) Otras.

3. Enfermedades gingivales modificadas por medicamentos:

- a. Enfermedades gingivales influenciadas por medicamentos:
 - 1) Hiperplasia gingival inducida por fármacos.
 - 2) Gingivitis influenciadas por medicamentos:
 - a) Gingivitis asociadas a anticonceptivos orales.
 - b) Otras.

4. Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición:

- a. Gingivitis por déficit de ácido ascórbico.
- b. Otras.

B. LESIONES GINGIVALES NO INDUCIDAS POR PLACA DENTAL

1. Enfermedades gingivales de origen bacteriano específico:

- a. Lesiones asociadas a *Neisseria gonorrhoea*.
- b. Lesiones asociadas a *Treponema pallidum*.
- c. Lesiones asociadas a estreptococos.
- d. Otras.

2. Enfermedades gingivales de origen viral:

- a. Infecciones virus herpes:
 - 1) Gingivoestomatitis herpética primaria.
 - 2) Herpes oral recurrente.
 - 3) Infecciones varicela zoster.
- b. Otras.

CONTINUACIÓN ENFERMEDADES GINGIVALES:

- 3. Enfermedades gingivales de origen fúngico:**
 - a. Infecciones de Especies Cándida:
 - 1) Candidiasis gingival generalizada.
 - b. Eritema lineal gingival.
 - c. Histoplasmosis.
 - d. Otras.
- 4. Lesiones gingivales de origen genético:**
 - a. Fibromatosis gingival hereditaria.
 - b. Otras.
- 5. Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas:**
 - a. Desórdenes mucocutáneos:
 - 1) Liquen plano.
 - 2) Penfigoide de las mucosas.
 - 3) Pénfigo vulgar.
 - 4) Eritema multiforme.
 - 5) Lupus eritematoso.
 - 6) Inducidos por fármacos.
 - 7) Otras.
 - b. Reacciones alérgicas:
 - 1) Materiales restauradores odontológicos:
 - a) Mercurio.
 - b) Níquel.
 - c) Acrílico.
 - d) Otro.
 - 2) Reacciones atribuibles a:
 - a) Pastas dentales / dentífricos.
 - b) Enjuagues / colutorios.
 - c) Aditivos a goma de mascar.
 - d) Alimentos y aditivos.
 - 3) Otros.
- 6. Lesiones traumáticas (facticio, iatrogénico, accidental):**
 - a. Lesiones físicas.
 - b. Lesiones químicas.
 - c. Lesiones térmicas.
- 7. Reacciones a cuerpos extraños.**
- 8. No específicas.**

II. PERIODONTITIS CRÓNICA

- A. LOCALIZADA.
- B. GENERALIZADA.

III. PERIODONTITIS AGRESIVA

- A. LOCALIZADA.
- B. GENERALIZADA.

IV. PERIODONTITIS COMO MANIFESTACIÓN DE ENFERMEDADES SISTÉMICAS

A. ASOCIADA A DESÓRDENES HEMATOLÓGICOS:

1. Neutropenia adquirida.
2. Leucemia.
3. Otros.

B. ASOCIADA CON DESÓRDENES GENÉTICOS:

1. Neutropenia familiar y cíclica.
2. Síndrome de Down.
3. Síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria.
4. Síndrome de Papillon-Lefèvre.
5. Síndrome de Chediak-Higashi.
6. Síndrome de Histiocitosis.
7. Enfermedad de almacenamiento de glucógeno.
8. Granulomatosis genética infantil.
9. Síndrome de Cohen.
10. Síndrome Ehlers-Danlos (Tipo IV y VIII).
11. Hipofosfatasa.
12. Otros.

C. OTRA NO ESPECIFICADA.

V. ENFERMEDADES PERIODONTALES NECROZANTES

- A. GINGIVITIS ULCERONECROTIZANTE.
- B. PERIODONTITIS ULCERONECROTIZANTE.

VI. ABSCEOS DEL PERIODONTO

- A. ABSCESO GINGIVAL.
- B. ABSCESO PERIODONTAL.
- C. ABSCESO PERICORONAL.

VII. PERIODONTITIS ASOCIADAS A LESIONES ENDODÓNTICAS

- A. LESIONES ENDO-PERIODONTALES COMBINADAS.

VIII. DEFORMIDADES Y CONDICIONES DEL DESARROLLO O ADQUIRIDAS

A. FACTORES DENTARIOS QUE MODIFICAN O PREDISPONEN A ENFERMEDADES GINGIVALES O PERIODONTALES MODIFICADAS POR PLACA.

- 1. Factores anatómicos dentales.**
- 2. Restauraciones o aparatología dental.**
- 3. Fracturas radiculares.**
- 4. Reabsorción radicular cervical y perlas del cemento.**

B. DEFORMIDADES Y CONDICIONES MUCOGINGIVALES ALREDEDOR DE LOS DIENTES.

- 1. Recesiones de tejido blando/gingival:**
 - a) Superficies vestibular y lingual.
 - b) Interproximal (papilar).
- 2. Falta de encía queratinizada.**
- 3. Reducción de profundidad del vestíbulo.**
- 4. Frenillos e inserciones musculares aberrantes.**
- 5. Agrandamientos gingivales:**
 - a. Pseudobolsa.
 - b. Margen gingival inconsistente.
 - c. Exceso en la exposición gingival.
 - d. Agrandamiento gingival (ver I.A.3 y I.B.4).
- 6. Coloración Anormal.**

C. DEFORMIDADES Y CONDICIONES MUCOGINGIVALES EN REBORDES EDÉNTULOS

- 1. Deficiencia vertical y/u horizontal del reborde.**
- 2. Falta de encía queratinizada.**
- 3. Agrandamiento de tejido blando/gingival.**
- 4. Frenillos e inserciones musculares aberrantes.**
- 5. Reducción de profundidad del vestíbulo.**
- 6. Coloración Anormal.**

D. TRAUMA OCLUSAL

- 1. Trauma oclusal primario.**
- 2. Trauma oclusal secundario.**

2.4 Biopelícula

La biopelícula o *biofilm* se define como una estructura tridimensional similar a una comunidad de células bacterianas, donde una o más comunidades se encuentran incluidas en una matriz, polimérica autosustentable, conformada principalmente de glicocálix, y que se encuentran adheridas entre sí y/o a una superficie sólida o interfase.^{2, 40.}

La mayor parte de los microorganismos crecen sobre superficies en modo de biopelícula. El fenotipo expresado por las bacterias en su crecimiento sobre una superficie va a variar si esta crece en forma planctónica o en biopelícula. El que las bacterias crezcan en biopelícula usualmente las ayuda a desarrollar resistencia a agentes antimicrobianos. Para que la biopelícula se forme debe pasar por varios procesos. La primera fase para la formación de biopelícula inicia con la adsorción de moléculas del hospedero y bacterias a la superficie dentaria para formar lo que se conoce como película adquirida, permitiendo que los microorganismos sean transportados pasivamente hasta ella e interactúen mediante fuerzas de Van der Waal, así como fuerzas de repulsión y atracción electroestáticas, para crear así una unión débil. Esta unión es reforzada a través de fuertes interacciones mediadas por moléculas específicas en la superficie de las bacterias (adhesinas) con los receptores complementarios de las mismas en la biopelícula dental. Con el paso del tiempo, los fenómenos de coagregación de nuevos colonizadores y los de multiplicación permitirán la adhesión firme de las bacterias a la superficie dental. De acuerdo con Bascones y Figuero: “La expresión clínica de los diferentes cuadros de periodontitis dependerá de la interacción entre factores del hospedador, ambientales y del agente microbiológico. Un ambiente favorable y factores genéticos positivos determinan la diferente susceptibilidad del individuo, y no sólo eso, sino también la distinta severidad de los cuadros clínicos, la tasa de progresión, la recidiva y la aleatoria respuesta a la terapéutica.”³⁵

Cuando la biopelícula se forma sobre superficies duras, este lo hace en gruesas capas de bacterias las cuales pueden medir cientos de micrómetros de espesor si estas no son interrumpidas. En sentido opuesto, la colonización bacteriana en los tejidos gingivales blandos es en monocapa, y las células epiteliales son constantemente desprendidas y repuestas por el hospedero.⁴¹

A esto se suma la evidencia de que las células gingivales epiteliales son invadidas por algunas bacterias orales, y que existe una clara diferencia entre las comunidades formadas en tejidos duros y tejidos blandos.⁴¹

Se ha reportado que en la cavidad oral hay más de 700 especies de microorganismos.¹

Y se han elaborado dos hipótesis acerca de su función en la enfermedad periodontal. La primera hipótesis planteaba la no especificidad de la placa bacteriana, dónde se consideraba a la biopelícula dental como una masa de microorganismos nativos no específicos, que debido a la falta de higiene oral se acumulaban en grandes proporciones, tales que sobrepasaban el umbral de la resistencia del hospedero y afectaban la estructura dental y los tejidos de soporte. En esta hipótesis no se evaluaba la composición de la placa bacteriana per se, si no que se veía la relación de grandes cúmulos de placa y sus consecuencias patológicas.^{1, 40.}

La segunda hipótesis fue denominada: hipótesis de la placa dental específica. Esta postula que las patologías periodontales son causadas por ciertos microorganismos específicos y se formuló basada en las observaciones clínicas dónde la gingivitis estaba asociada a la permanente acumulación de placa que progresa hacia una periodontitis. Estudios en los que se trabajaban con esta hipótesis encontraron un mayor número de patógenos específicos en sitios con enfermedad periodontal y menos números de los mismos en sitios sanos.^{1, 40.}

Si bien la placa bacteriana no es el único factor para la progresión de la enfermedad periodontal, se ha demostrado que se precisa de ciertos microorganismos periodontopatógenos para que ésta se establezca. Aproximadamente unos 10-15 microorganismos han sido confirmados en cuanto a su acción en la enfermedad periodontal.^{42.}

2.5 Clasificación de Socransky

Junto con la hipótesis de la especificidad de la biopelícula se fueron haciendo estudios que relacionaron ciertos tipos de patógenos periodontales con ciertos tipos de enfermedades periodontales. Para considerar a un microorganismo como patógeno periodontal éste debe primero cumplir con ciertos criterios. Inicialmente se planteaban los postulados de Koch que señalan las condiciones que se deben exigir a cualquier microorganismo para considerarlo como agente causal de una infección determinada:

1. El microorganismo debe encontrarse en todos los casos de la enfermedad.⁴³
2. Debe aislarse y obtenerse en cultivo puro, a partir de las lesiones.⁴³
3. Debe reproducir la enfermedad cuando se inocula, a partir de un cultivo puro, en un animal de experimentación susceptible.⁴³
4. Debe aislarse el mismo microorganismo en cultivo puro, a partir de las lesiones producidas en el animal.⁴³

Hoy en día sabemos que algunos de estos criterios no aplican a los patógenos periodontales por lo que Socransky *et al.*⁴³ desarrollaron una nueva especie de criterios para determinar si un microorganismo es periodontopatógeno o no:

1. **Criterio de asociación:** La especie causante de la enfermedad debe hallarse en mayor frecuencia y en mayores cantidades en los individuos enfermos, respecto de los individuos sanos o con otras enfermedades.⁴³
2. **Criterio de eliminación:** La eliminación de la especie debe asociarse a la remisión de la enfermedad. La evaluación de este criterio presenta una serie de dificultades, puesto que la terapia normalmente no es suficientemente selectiva como para eliminar una sola especie.⁴³
3. **Criterio de la respuesta del huésped:** Cuando una especie es capaz de producir daños en el organismo parece plausible que el huésped deba producir, bien anticuerpos específicos contra aquella, o bien una respuesta celular inmune dirigida contra el agente dañino.⁴³

4. **Criterio de los factores de virulencia:** La especie en cuestión debe manifestar mecanismos adecuados para colonizar el huésped, evadir sus defensas y producir daño tisular, bien directamente o bien mediante la producción de metabolitos dañinos.⁴³
5. **Criterio de estudios en animales:** La implantación de la especie en modelos animales debe reproducir la enfermedad.⁴³
6. **Criterio de análisis de riesgo:** Los estudios prospectivos deben demostrar el riesgo que supone para la progresión de la enfermedad la presencia de la especie.⁴³

Socransky *et al.*⁴⁴ hicieron estudios de placa bacteriana subgingival con sondas de ADN y la hibridación ADN-ADN *checkerboard* para la relación de esas comunidades de placa bacteriana con la enfermedad periodontal. A partir de la información encontrada se formaron seis grupos, en los cuales se juntaban las bacterias que tenían más de un 60% de similitud. Se pudo dividir en grupos un total de 29 bacterias de las 32 encontradas.

Los grupos se dividieron en colores: rojo, naranja, verde amarillo, azul y púrpura; hubo microorganismos que no quedaron dentro de estos grupos debido a que no pudieron ser relacionados. (Ver Figura 1)⁴⁴

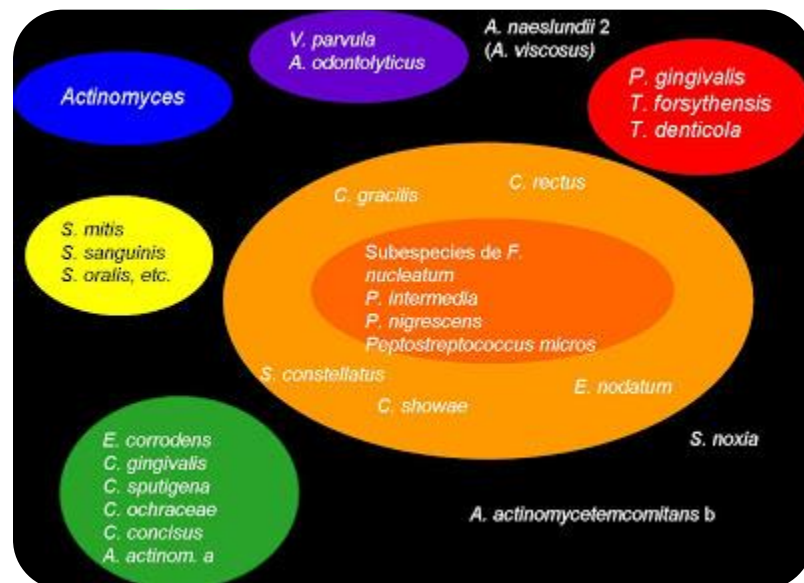


Figura 1.- Esquema de grupos de microorganismos orales sugeridos por Socransky *et al.*⁴⁴

El grupo rojo está compuesto por:

- *Porphyromonas gingivalis*.
- *Tannerella forsythensis* (antes conocida como *Bacteroides forsythus*).
- *Treponema denticola*.⁴⁴

El grupo naranja:

- *Subspecies de Fusobacterium nucleatum*.
- *Prevotella intermedia*.
- *Prevotella nigrescens*.
- *Peptostreptococcus micros*.
- *Campylobacter rectus*.
- *Campylobacter showae*.
- *Campylobacter gracilis*.
- *Eubacterium nodatum*.
- *Streptococcus constellatus*.⁴⁴

Grupo verde:

- *Eikenella corrodens*
- *Campylobacter concisus*.
- *Capnocytophaga gingivalis*.
- *Capnocytophaga sputigena*.
- *Capnocytophaga ochracea*
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo *a* (antes conocida como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*).⁴⁴

Grupo amarillo:

- *Streptococcus mitis*.
- *Streptococcus sanguinis* (antes conocida como *Streptococcus sanguis*).
- *Streptococcus oralis*, etc.⁴⁴

Grupo púrpura:

- *Actinomyces odontolyticus*.
- *Veillonella párvula*.⁴⁴

Grupo azul:

- Todas las especies de *Actinomyces*, excepto *Actinomyces viscosus*.⁴⁴

Las especies: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotipo b*, *Actinomyces viscosus* y *Selenomonas noxia* no pudieron ser coagregadas a un grupo en específico.⁴⁴

Luego de que los grupos fueron formados, se evaluó la relación de presencia de ciertos microorganismos en zonas donde había mayor profundidad al sondaje. Los resultados mostraron que había una fuerte relación de los microorganismos del grupo rojo en relación a la profundidad al sondaje. Los que más mostraron aumento en la prevalencia y en la cantidad, a la vez que aumentaba la profundidad al sondaje, fueron *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *T. denticola*. Lo mismo ocurrió con todas las especies del grupo naranja específicamente con la *P. intermedia* y las subespecies de *F. nucleatum*.⁴⁴

Del mismo modo se observó que donde se encontraban especies como *Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces viscosus* había menor relación a la profundidad al sondaje. En cuanto al grupo rojo se observó también que donde estos no se encontraban, la profundidad al sondaje era mínima; y donde se encontraban los tres microorganismos, se relacionaba con la mayor profundidad al sondaje así como sangrado al sondaje.⁴⁴

2.6 Respiración Bacteriana

Las bacterias se pueden clasificar de acuerdo a su facilidad para desarrollarse en medios con distintas tensiones de oxígeno o frente a la ausencia del mismo. Se clasifican en:

- **Aerobias:** Solo pueden vivir o multiplicarse en presencia de oxígeno.⁴⁵
- **Anaerobias:** Solo crecen en un ambiente con ausencia total de oxígeno.⁴⁵
- **Aerobias Facultativas:** Este corresponde a las bacterias que se desarrollan en aerobiosis pero que pueden sobrevivir en un ambiente anaeróbico o con una baja tensión de oxígeno.⁴⁵

- **Areobias Microaeroflicas:** Bacterias que pueden sobrevivir con muy bajas tensiones de oxígeno.⁴⁵
- **Anaerobias Aerotolerantes:** Bacterias que se desarrollan en anaerobiosis pero que pueden sobrevivir por un lapso de tiempo en un ambiente aerobio.⁴⁵

2.7 Factor de Virulencia

El factor de virulencia, según los estudios clásicos de las interacciones entre parásito y hospedero, puede considerarse como una molécula que ejerce un efecto perjudicial, léase toxina, en la célula del hospedero. Sin embargo observaciones más recientes han revelado que los factores de virulencia se pueden describir mejor como moléculas que resultan en el mantenimiento de una especie asociado con o dentro de los confines del hospedero. Así que, de los factores de virulencia se cree que pueden dañar al hospedero; así como pueden funcionar en el establecimiento de una relación simbiótica o parasitaria entre las especies bacterianas y el hospedero. Para que un potencial factor de virulencia ejerza sus efectos sobre el hospedero, la bacteria debe primero encontrar un nicho ecológico apropiado dentro del hospedero (o sitio de actividad), establecerse y eventualmente crecer y multiplicarse. Este establecimiento en el lugar adecuado es esencial para la sobrevivencia de la bacteria y para la máxima producción de actividad biológica en el medioambiente del hospedero.⁴⁶

Otra definición que podemos darle a factor de virulencia es: "...la capacidad de un microorganismo para producir una enfermedad o interferir con los procesos metabólicos o fisiológicos del hospedero." Así que: "Un microorganismo virulento se caracteriza por expresar y producir metabolitos, toxinas, enzimas y componentes de la superficie o pared celular que le permiten evadir las barreras defensivas e invadir y sobrevivir en los tejidos y células del hospedero." De acuerdo a sus funciones los factores de virulencia se ha agrupado en factores de adhesión, invasión, crecimiento y evasión de la respuesta inmune.⁴⁷

2.8 Patógenos Periodontales

2.8.1 Patógenos periodontales en la República Dominicana

Poca información existe acerca de la prevalencia de los patógenos periodontales más comunes en la República Dominicana. Hasta ahora solo se han realizado dos estudios: uno de ellos fue desarrollado en el 1991 por Slots *et al.*⁴⁸ donde tomaron muestras con conos de papel de 24 pacientes con periodontitis y realizaron cultivos. Las bacterias fueron básicamente distinguidas mediante el estudio de su morfología y reveló que el 85% de las poblaciones bacterianas correspondían a cocos y bacterias no motiles. A partir de esto se tomaron muestras de los microorganismos anaeróbicos y se aplicaron distintos ensayos enzimáticos. Los resultados mostraron que en 20 de los 24 pacientes las colonias presuntivamente identificadas fueron *P. intermedia*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. El segundo estudio fue publicado recientemente, a mediados del 2015 por Collins *et al.*⁴⁹ donde evaluaron a 77 pacientes los cuales fueron diagnosticados con salud periodontal, gingivitis, Periodontitis Crónica y Periodontitis Agresiva. Uno de los objetivos fue comparar la prevalencia de periodontopatógenos en los pacientes con las diferentes condiciones periodontales. Para las pruebas de laboratorio se usó PCR. Sus resultados mostraron que tanto *T. forsythia* como *E. corrodens* aparecieron en el 100% de los pacientes con gingivitis. Las bacterias del complejo rojo (dentro de estas *P. gingivalis*), *D. pneumosintes* y *E. corrodens* se encontraron de manera significativa en pacientes con Periodontitis Crónica al ser comparados con pacientes sanos. Tanto *F. nucleatum* como *T. denticola* fueron encontradas con más frecuencia en la Periodontitis Agresiva. Finalmente la *A. actinomycetemcomitans* fue la que menos se encontró en todos los grupos evaluados.

2.8.2 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis es un bacilo asacarolítico gram negativo que forma colonias pigmentadas negro-verdosas en placas de agar sangre suplementado con hemina y menadiona. Se distingue de los demás bacilos pigmentados gram negativos (como las especies del género *Prevotella*) por su actividad hemaglutinante y falta de autofluorescencia bajo luz ultravioleta. Se diferencia y caracteriza aún más de otras especies de *Porphyromonas* debido a su producción de ácido fenólico.⁵⁰

2.8.2.1 Condiciones de cultivo e identificación:

Crece anaeróbicamente, con pigmentación oscura que puede ser: café, verde oscuro o negro en agar sangre debido al producto metabólico final de la sangre (hemina). Tiene una fuerte actividad proteolítica, léase degradación de proteínas.⁵¹

2.8.2.2 Factores de Virulencia de la *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis expresa una serie de factores de virulencia, tales como fimbrias, enzimas proteolíticas, hemaglutininas, lipopolisacáridos (LPS), hemolisinas, fibrinolisin, hialuronidasa, fosfatasa ácida y alcalina y cápsula, y exhibe una diversidad genotípica y serotípica que permite una variabilidad intra-especie con la potencialidad de inducir inflamación y destrucción periodontal.^{47, 52.}

Fimbrias

Las fimbrias son apéndices delgados, filamentosos de superficie proteica que salen de la superficie de un número de especies bacterianas y son especialmente prominentes en bacterias gram-negativo, en las cuales éstas se fijan en la membrana externa de las mismas.⁵³

Una de las funciones de las fimbrias es la adherencia (adhesina), la cual es la habilidad de permanecer unida a distintos tipos de células, como las de la mucosa, para luego invadir tejidos más profundos.¹⁷

En *P. gingivalis* se expresan dos tipos de fimbrias distintas en su superficie celular: una que comprende un subunidad de proteína (llamada FimA) codificado por el gen *fimA* (denominado fimbria larga o mayor), y la otra que consiste en una subunidad de proteína Mfa codificada por el gen *mfa1* (denominado como fimbria corta o menor o fimbria Mfa). Se entiende que ambas fimbrias están relacionadas con el desarrollo de la periodontitis.⁵³ Las fimbrias largas son un factor crítico para la colonización de *P. gingivalis* en regiones subgingivales, pues promueven la adhesión bacteriana e invasión de un sitio determinado. Las proteínas de las FimA varían de tamaño de la proteína deducida desde 40.5 hasta 49 Uma (unidades de masa atómica unificada) dependiendo de la cepa, y éstas han sido previamente clasificadas en cuatro tipos (Tipos I-IV) basado en sus terminales amino y secuencias de ADN. Algunas cepas con FimA tipo IV tales como la W50 y W83, tienen pocas fimbrias a diferencia de las cepas tipo I tales como la 381 y la ATCC 33277 y HG565 las cuales tienen muchas fimbrias y poseen una marcada habilidad para la adhesión a los tejidos del hospedero y los componentes salivares. A partir de ahí los genes *fimA* de *P. gingivalis* fueron clasificados aún más en seis tipos de variantes (Tipo I-V y Ib) basados en su secuencia de nucleótidos. En contraste, las variaciones genómicas de las fimbrias cortas permanecen desconocidas, a pesar de que las variaciones clonales del gen *mfa1* han sido investigadas usando una variedad de cepas de laboratorio.⁵³

Prevalencia de genotipos de fimbrias en pacientes con periodontitis

Con el uso de pruebas de tipo PCR convencional usando un *primer* tipo-específico de *fimA* para diferenciar los genotipos *fimA* de los organismos presentes en las muestras de saliva y placa dental, varios investigadores han notado la prevalencia y distribución de los genotipos *fimA* en sujetos con distintas condiciones periodontales en varias locaciones geográficas incluyendo Japón, China, Alemania, Noruega, Países Bajos, Suiza, Brasil y México. A partir de esos estudios clínicos y epidemiológicos puede ser deducido que la *fimA* tipo II es la más prevalente en pacientes con periodontitis, mientras que la segunda *fimA* más prevalente está entre el tipo IV o el Ib, dependiendo de la población étnica que se estudie.⁵³

De manera contraria, las *fimA* tipo I y III son más prevalentes en pacientes que no padecen de periodontitis. En cuanto a su importancia clínica, los clones tipo II fueron asociados con más frecuencia con periodontitis crónica avanzada con profundidad marcada al sondaje, así como se ha relacionado a formas severas de periodontitis agresiva, siendo seguido por las *fimA* tipo IV. A esto podemos sumarle que los clones tipo II aparentan estar relacionados con la periodontitis marginal en pacientes que padecen síndrome de Down y en poblaciones de pacientes con discapacidades mentales.⁵³

La hiperplasia gingival es uno de los efectos adversos más frecuentes asociados al uso de medicamentos anticonvulsivos, de los bloqueadores de canales de calcio e inmunosupresores. Se ha visto una relación significativa en el desarrollo de la hiperplasia y el deterioro que esta causa con la *fimA* tipo II de *P. gingivalis*. Del mismo modo existe relación entre las enfermedades cardiovasculares y *P. gingivalis*; así como también entre *P. gingivalis* y la diabetes mellitus. Los clones tipo II y IV han sido encontrados de manera más frecuente en placas de ateromas de pacientes que se han sometido a operaciones cardiovasculares. Los niveles glicémicos de la diabetes pueden verse afectados por la persistencia de *P. gingivalis*, especialmente los clones tipo II, en bolsas periodontales luego de ser tratadas por un profesional.⁵³

En un estudio realizado en la República Dominicana por Collins et al.⁴⁹, donde se estudiaron grupos de pacientes con diversos estados periodontales, se comprobó que el tipo de fimbria más frecuente en pacientes con periodontitis es la *fimA* genotipo II.

Gingipainas

Los factores de virulencia más potentes de *P. gingivalis* son las gingipainas, las cuales consisten en tres proteasas de cisteína que se unen y adhieren a una alta gama de proteínas del hospedero. Estas proteasas son responsables de al menos el 85% del total de la actividad proteolítica ejercida por varias cepas de este patógeno. Las gingipainas se encuentran relacionadas en diversas fases como la adherencia y colonización bacteriana, presente igual en la adquisición de nutrientes, neutralización de las defensas del hospedero, manipulación de la respuesta inflamatoria, destrucción de tejidos, invasión y diseminación a sitios sistémicos.⁵⁴

Lipopolisacáridos de *Porphyromonas gingivalis*

Los lipopolisacáridos son un componente importante de la membrana externa de las bacterias gram-negativo, los cuales contribuyen a la integridad bacteriana y protegen la membrana. Estos están conformados por tres componentes: polisacáridos (exterior), oligosacáridos (centro) y lípido A (interior). Los lipopolisacáridos de bacterias entéricas tales como *Escherichia coli* son endotoxinas prototípicas que inducen a una fuerte respuesta del sistema inmune y se une a los receptores tipo Toll los cuales promueven la secreción de citoquinas proinflamatorias en muchos tipos de células. A pesar de que los lipopolisacáridos de *P. gingivalis* provocan una respuesta débil del sistema inmunitario, se ha propuesto que juega un papel importante en la perturbación de la homeostasis inmune oral requerida para el mantenimiento de la salud oral.^{47, 54.}

Cápsulas de *Porphyromonas gingivalis*

Las cápsulas le confieren a los microorganismos que la poseen una mayor capacidad de agresión o virulencia. Ayuda a proteger a las bacterias del mecanismo de la fagocitosis que ejecutan las células de defensa del organismo. También favorecen a las bacterias a resistir la acción de los antibacterianos. Es una fuente de reserva de nutrientes y es muy antigénica. El antígeno capsular se denomina K, de *Kapsel* (en alemán) o Vi de virulencia. Las cápsulas pueden servir en algunas bacterias como pruebas de identificación.¹⁷

La diversidad de virulencia entre las cepas clínicas aisladas y las cepas de laboratorio de *P. gingivalis* han sido examinadas por diversos investigadores usando modelos roedores donde se minimizan los factores de susceptibilidad del hospedero. En estudios recientes se utilizaron ampliamente modelos de abscesos en roedores. Luego de la infección subcutánea de los roedores con *P. gingivalis* se evaluó la patogenicidad y virulencia en relación al tamaño de los abscesos y/o lesiones erosivas de la piel que se desarrollaron en conjunto con caquexia y muerte de los roedores. En estos estudios las variaciones clonales de patogenicidad y virulencia fueron claramente demostrados y muchas cepas de *P. gingivalis* fueron clasificadas como virulentas/invasivas o no virulentas/ no invasivas.⁵³

Las bacterias gram-negativo pueden producir polisacáridos cargados negativamente, no invasivos, hidrofílicos, extracelulares los cuales se presentan como cápsulas bacterianas. Los polisacáridos capsulares resisten la fagocitosis y son factores de virulencia importantes para la bacteria, donde se ha encontrado que una alta tasa de clones virulentos / invasivos se encuentran encapsulados.⁵³

Por lo tanto, la presencia de una cápsula aparenta ser uno de los factores de virulencia determinantes, a pesar de que otros factores que regulan la expresión de virulencia en *P. gingivalis* no han sido claramente dilucidados. Del mismo modo es importante resaltar que existen cepas de *P. gingivalis* las cuales no poseen dicha cápsula.⁵³

Variaciones de los antígenos K de *Porphyromonas gingivalis*

Los polisacáridos capsulares bacterianos que funcionan como antígenos son denominados antígenos-K, y son un factor de virulencia importante para la bacteria. Los antígenos-K de *P. gingivalis*, los cuales han sido clasificados en siete serotipos (K1-K7), son considerados porque contribuyen significativamente en la virulencia bacteriana. Se encontró que distintas cepas con estos siete serotipos eran todas encapsuladas y altamente virulentas en los modelos de abscesos en roedores, comparados con las cepas no encapsuladas. A esto se añade que se ha examinado la prevalencia de los clones con serotipo K en 185 pacientes con periodontitis en las siguientes proporciones: K1, 3.8%; K2, 2.2%; K3, 1.1%; K4, 3.2%; K5, 12.0%; K6, 23.2%. Sin embargo, el vínculo de los serotipos K con la virulencia en la periodontitis no está completamente entendida.^{53, 55.}

Hemaglutinación y agregación plaquetaria por *Porphyromonas gingivalis*

Las hemaglutininas son un tipo de proteína que se agregan a los hematíes o glóbulos rojos provocando la aglutinación de los mismos. Varios organismos microbianos poseen hemaglutininas, y al proceso de aglutinación de los hematíes se le conoce como hemaglutinación. La hemaglutinación provocada por *P. gingivalis* media la adherencia bacteriana a las células del hospedero así como la adquisición bacteriana de hemina de los eritrocitos (la cual es esencial para la multiplicación).⁵⁴

La bacteria también puede agregar plaquetas. Las plaquetas sanguíneas son rápidamente activadas para la agregación cuando son expuestas a un estímulo apropiado asociado a la disrupción del revestimiento de células endoteliales de los vasos sanguíneos; estas plaquetas forman un tapón plaquetario efectivo para la homeostasis en el sitio del daño o injuria. La agregación plaquetaria provocada por *P. gingivalis* puede conllevar a consecuencias patológicas serias si el organismo encuentra una vía de acceso al torrente sanguíneo.⁵⁴

Es sabido que la trombosis en la arteria coronal es iniciada por la formación de placas de ateromas y la agregación plaquetaria puede contribuir a esa constricción. La agregación plaquetaria bacteriana podría explicar el vínculo emergente entre la periodontitis y las enfermedades cardiovasculares.⁵⁴

2.8.3 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es un coco-bacilo facultativo anaeróbico, gram-negativo inmóvil asociado con la periodontitis agresiva. Éste está agrupado en seis serotipos (a-f) basados en los antígenos de polisacáridos presentes en la superficie de la célula, del mismo modo están agrupados en distintos genotipos. *A. actinomycetemcomitans* posee dos exotoxinas: la leucotoxina y toxina citoletal de distensión (Cdt por sus siglas en inglés). Existe una diversidad considerable intraespecies de *A. actinomycetemcomitans* y su relación con la enfermedad es básicamente moderada. Según Höglund et al.⁵⁶ un clon específico de *A. actinomycetemcomitans*, la JP2 está fuertemente asociada con periodontitis agresiva en individuos de ascendencia africana. Ellos establecen que el clon JP2 se diferencia de los demás clones de *A. actinomycetemcomitans* por diversas peculiaridades genéticas así como un incrementado potencial de virulencia. Los genes Cdt *a*, *b* y *c* están presentes en el 80% de las cepas *A. actinomycetemcomitans*, su asociación con la enfermedad queda aún pendiente para determinar.^{56, 57.}

En cuanto a la distribución de los serotipos de acuerdo a su ubicación geográfica, Brígido et al.⁵⁷ realizaron una revisión de literatura de artículos que documentaban la relación entre la distribución de serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, estatus étnico, poblaciones geográficas y las condiciones periodontales. Ellos se enfocaron en la relación de los distintos serotipos bacterianos y el estado periodontal. La búsqueda se basó en artículos que reportaran la presencia de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* mediante ensayos con PCR, del mismo modo las muestras debían ser de pacientes con periodontitis y periodontalmente sanos, puesto que la bacteria puede encontrarse en estado de salud periodontal, periodontitis e infecciones no orales. Entre los resultados encontrados notaron que en general los serotipos a-c se encontraban con mucho más frecuencia en las muestras orales que los serotipos d-f.

En estudiantes afroamericanos se encontró que los serotipos de *A. actinomycetemcomitans*: a, b y c estaban distribuidos de manera equitativa; en cambio en estudiantes hispanos el serotipo de más prevalente fue el c. Entre las cepas de *A. actinomycetemcomitans* estudiadas en Grecia, se encontró que los serotipos a, b y c conformaban el 95% de los serotipos presentes. De igual modo un 98% de los serotipos presentes en pacientes brasileños estaba distribuido entre los tipos a, b y c, siendo c la más prevalente. Los serotipos d, e y f se encontraban con poca frecuencia. En cuanto a sujetos de los Estados Unidos, los estudios revisados por Brígido et al.⁵⁷ mostraban que el serotipo c es dominante, seguido luego por el a y b. En poblaciones asiáticas tales como japoneses, tailandeses y coreanos usualmente estaban infectadas con serotipo c, siendo este predominante pero no único. A pesar de que el serotipo e es raro de encontrar, se observó que en pacientes indonesios este era el más prevalente.

2.8.3.1 Condiciones de cultivo e identificación

Crece como una colonia blanca, transparente, suave y no hemolítica en agar sangre, aunque puede hacerse crecer en *Tryptic Soy Agar*. Para su crecimiento *A. actinomycetemcomitans* se identifica de preferencia en un medio específico de crecimiento (con vancomicina y bacitracina como antibióticos para suprimir otras especies) y suero como nutriente, bajo 5 a 10% de dióxido de carbono, donde aparece como una colonia blanca y transparente con una estructura interna en forma de estrella.⁵¹

2.8.3.2 Factores de Virulencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans produce una variedad de factores de virulencia tales como los lipopolisacáridos, colagenasa, proteasa, leucotoxinas y toxina citoletal de distensión. La leucotoxina tiene la habilidad de formar poros en los granulocitos, monocitos y en algunos linfocitos neutrófilos, que mueren después debido a la presión osmótica. La colagenasa provoca destrucción del tejido conectivo y la proteasa tiene la capacidad de adherirse a la inmunoglobulina G.^{51, 57.}

2.8.4 Eikenella Corrodens

Eikenella Corrodens es un coco-bacilo gram-negativo anaeróbico el cual era previamente conocido como *Bacteroides corrodens*. Se le reconoce como un patógeno oportunista que se puede encontrar presentes en tanto infecciones orales como en otras áreas del cuerpo; sola o acompañada por otras bacterias. Esta bacteria usualmente se encuentra en la cavidad oral, el aparato respiratorio superior y en la superficie de las mucosas de los sistemas intestinal y genital.^{58, 59} Ha sido relacionada junto con las demás bacterias del grupo “HACEK” (*Haemophilus, Actinobacillus, Cardiobacterium, Eikenella, Kingella*) por ser parte de las bacterias presentes con más frecuencia en endocarditis bacteriana.⁵⁹

2.8.4.1 Condiciones de cultivo e identificación

Crece lentamente en condiciones aeróbicas en agar sangre o agar chocolate, así mismo, la presencia de 5% de CO₂ favorece su crecimiento.⁶⁰

Son colonias rugosas, convexas, de bordes circulares o irregulares, grisáceas, translúcidas, no hemolíticas y presentan olor a humedad o a cloro. Después de varios días de incubación adquieren una pigmentación amarillenta. Dentro del mismo cultivo se puede observar macroscópicamente que algunas colonias corroen o producen pequeños surcos en el agar. También se pueden observar colonias rodeadas por un halo verdoso. Cuando se examinan estas colonias con lupa, se observa que la depresión, halo o surcos en el agar son en realidad colonias muy pequeñas.⁶⁰

2.8.4.2 Factores de virulencia de *Eikenella Corrodens*

Entre los factores de virulencia presentes en *Eikenella corrodens* tenemos los lipopolisacáridos, los exopolisacáridos, las proteínas de membrana externa, limo, adhesinas y pilis.⁵⁸

Lipopolisacáridos de *Eikenella corrodens*

Sus lipopolisacáridos están formados básicamente por un 34.5% p/p de carbohidratos, 25% p/p de lípido A y una pequeña cantidad de ácido 2-ceto-3-deoxioctonoico (KDO), heptosa y una fuerte actividad endotóxica clásica.⁵⁸

Se han diferenciado 16 fenotipos diferentes de lipopolisacáridos entre 27 cepas conocidas de *Eikenella corrodens*. Del mismo modo esta bacteria presenta un factor de hemoaglutinación estable al calor para eritrocitos de humanos, ovejas y ratones.⁵⁸

Limo

Con estudios de microscopía se ha visto que *Eikenella corrodens* posee una capa de limo fibroso asociado con la superficie externa de la membrana externa, la cual está constituida por exopolisacáridos. El limo de *Eikenella corrodens* parece tener una respuesta inmunosupresora importante.⁵⁸

Proteínas de la membrana externa

La membrana externa de *Eikenella corrodens* presenta de una a tres bandas de proteína, una de ellas muestra actividad antigénica y del mismo modo función de porina.⁵⁸

Pili

Se conoce como pili a apéndices de superficie proteínica que trabajan como factores de virulencia, pues se entiende que la modulación de la piliación puede ser un mecanismo para evadir la respuesta inmune por parte del hospedero.⁵⁸

Estos también transmiten información genética por lo que usualmente se les relaciona con los casos de resistencia a los antimicrobianos. Es una estructura antigénica.¹⁷

2.8.5 *Fusobacterium nucleatum*

El género *Fusobacterium* actualmente incluye unas 13 especies; de las cuales *Fusobacterium nucleatum* es la que con más frecuencia se encuentra en especies humanas y tiene a su vez 5 subespecies.⁶¹

El *Fusobacterium nucleatum*, es un bacilo fusiforme anaeróbico, gram-negativo. Es frecuentemente encontrado tanto en la placa supragingival como en la subgingival. Estudios revelan que *Fusobacterium nucleatum* no sólo induce péptidos antimicrobianos e IL-8, una quimioquina para los neutrófilos desde las células epiteliales gingivales, sino que además son altamente susceptibles a ser eliminadas mediante péptidos antimicrobianos y neutrófilos. Estas características indican que *Fusobacterium nucleatum* puede que sea un miembro no dañino o inclusive beneficioso de la microbiota oral.^{60, 61} Sin embargo, Socransky *et al.*⁴⁴ mostraron la alta prevalencia y altos niveles de *Fusobacterium nucleatum* asociados con profundidad al sondaje aumentado.

También se ha reconocido que *Fusobacterium nucleatum* actúa como puente de coagregación entre aerobios y anaerobios no agregativos, dado a que se ha visto su relación con todas las especies bacterianas orales estudiadas hasta el momento.⁶²

2.8.5.1 Condiciones de cultivo e identificación

Crece de manera anaeróbica en agar-sangre y puede identificarse fácilmente en un medio específico.⁵¹

2.8.5.2 Factores de virulencia de *Fusobacterium nucleatum*

Las propiedades adhesivas de *Fusobacterium nucleatum* han sido evaluadas por distintos investigadores los cuales han demostrado que diversas cepas tienen como característica la habilidad de hemaglutinar eritrocitos. También se ha visto adhesión a células epiteliales, componentes salivares, fibroblastos gingivales, células blancas y superficies de algunas bacterias.⁶³

Del mismo modo, este organismo tiene la capacidad de inducir la muerte celular apóptica de células tanto mononucleares y polimorfonucleares, y por lo tanto puede conllevar a la activación de la liberación de citosinas, elastasa y radicales de oxígeno a partir de los leucocitos. Su características de poder co-agregarse con casi todos los microorganismos les hace parecer como puentes entre los colonizadores primarios y los colonizadores secundarios del biopelícula.⁵¹

2.8.5.3 Relación entre *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*

Distintos estudios han demostrado que las co-infecciones con diferentes patógenos modulan la respuesta inmune y afectan el resultado clínico de la infección en diversas enfermedades. En el caso de la cavidad oral, usualmente *Porphyromonas gingivalis* coexiste con otras bacterias periodonto-patógenas tales como *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*.⁶⁴ Polak *et al.* mostraron en un modelo murino que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* potencian los resultados de las periodontitis experimentales al compararse con mono-infecciones ya fuese con una u otra bacteria.⁶⁵ De manera similar el uso de modelos murinos en abscesos inducidos por una combinación de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* tuvieron un efecto sinérgico en la destrucción de tejidos blandos.⁶⁴

P. gingivalis ha sido relacionada con algunas enfermedades cardiovasculares, especialmente en el proceso de formación de ateromas. Se ha comprobado la existencia de *P. gingivalis* en placas ateroscleróticas mediante técnicas de PCR.

En un estudio realizado por Saito *et al.*⁶⁶ en el cual se evaluó la habilidad de *P. gingivalis* de invadir células humanas gingivales epiteliales y células endoteliales aórticas humanas en co-infección con cepas de *F. nucleatum* tanto clínicas como con cepas de laboratorio, se observó que las habilidades invasivas de *P. gingivalis* fueron mucho más potentes cuando eran incubadas con las cepas clínicas de *F. nucleatum* en lugar de las de laboratorio. La coagregación entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* está mediada por una unión específica de carbohidrato-proteína. Entre sus funciones *F. nucleatum* protege a especies que son ácido-sensibles como *P. gingivalis* en contra de los ataques ácidos. Del mismo modo *F. nucleatum* contribuye a la generación de un microambiente reducido y capnofílico el cual es necesario para el crecimiento de *P. gingivalis*. Podríamos con esto concluir que la combinación de estas dos bacterias provee propiedades únicas que potencian la virulencia de la infección y puede que ocurra debido a una interacción específica entre los agentes infecciosos.⁶⁴

2.9 Agentes Químicos Antimicrobianos

Los agentes químicos antimicrobianos no están compuestos por un solo tipo de agente, sino que estos se clasifican según su selectividad.³⁴ Los podemos agrupar de la siguiente manera:

1. Agentes no selectivos

- **Antisépticos:** los cuales pueden ser usados en tejidos vivos. Tienen como función prevenir o impedir el crecimiento o acción de los microorganismos mediante la inhibición de su actividad o la destrucción de los mismos.³⁴
- **Desinfectantes:** estos solo se emplean sobre objetos inanimados o medios inertes. Algunos tienen la capacidad de destruir tejidos vivos. La FDA (*Food and Drug Administration*) explica que estos pueden destruir en 10 o 15 minutos los gérmenes que son depositados sobre un material inerte; refieren además que estos deben destruir “todas las formas vegetativas de las bacterias, además de los hongos y los virus”.³⁴
- **Esterilizantes:** los esterilizantes químicos son desinfectantes que poseen nivel esporicida.³⁴

- **Preservadores o conservadores:** estos agentes tienen como función prevenir el deterioro de alimentos, líquidos anestésicos, medicamentos, entre otros, que son provocados por microorganismos.³⁴

2. Selectivos:

- **Quimioterápicos:** son agentes que poseen una acción selectiva, los cuales pueden inhibir o destruir microorganismos. Estos se pueden utilizar en seres vivos tanto de manera sistémica como local.³⁴

2.10 Antisépticos Orales como coadyuvantes en el control de la biopelícula durante la terapia de tratamiento fase I o etiológica

Las enfermedades periodontales usualmente se relacionan a una infección polibacteriana sobretodo en sus subdivisiones principales, como la periodontitis crónica, la cual se caracteriza por destrucción progresiva del ligamento periodontal y hueso alveolar en conjunto con la formación de bolsas periodontales, recesiones o la combinación de ambas, y la periodontitis agresiva la cual presenta una progresión más rápida debido a las respuestas inmunes del hospedero a las agresiones bacterianas.⁶⁷ De acuerdo con Matesanz-Pérez et al. “el *gold standard* para el tratamiento de la periodontitis es el desbridamiento mecánico de las bolsas mediante el raspado y alisado radicular”.^{68,69} Según van Winkelhoff y Winkel, el tratamiento periodontal básico puede incluso detener la actividad de la enfermedad en la mayoría de los casos de pacientes adultos con periodontitis crónica.⁶⁹ Sin embargo se entiende que este modo de abordaje es un procedimiento terapéutico demandante y que tiene sus limitaciones relacionadas con la dificultad para acceder a bolsas periodontales profundas y a furcaciones con el fin de eliminar ciertos patógenos.⁶⁸

Se ha corroborado que cuando las bolsas periodontales mayores a 5mm no ceden con la terapia básica, se precisa de realizar cirugías de acceso con el fin de lograr un mejor raspado y alisado radicular a campo abierto, lo que permite mejor remoción de los depósitos bacterianos. Luego de que se realiza cualquier tipo de cirugía periodontal, esta conlleva algunos días de recuperación de la zona tratada, donde la higienización se puede ver comprometida por el hecho de que se evita tocar la zona sensible. Una medida para evitar la formación de biopelícula dental es el uso de antisépticos orales. Se ha visto que los antisépticos orales interrumpen la adhesión y coagregación de la biopelícula mediante distintas vías. El uso de tratamientos quimioterapéuticos en odontología no es algo nuevo, pues ya se vienen utilizando como coadyuvantes de la terapia de mecánica para el control de la placa bacteriana, así como métodos de prevención y tratamiento de las enfermedades periodontales.

2.10.1 Antisépticos Orales

Los antisépticos son agentes químicos utilizados para eliminar microorganismos orales de diversas formas. Se conocen como antisépticos orales al gluconato de clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio, los aceites esenciales, entre otros. Cada uno de los antisépticos orales debe cumplir ciertos requisitos y pueden actuar sobre los microorganismos:

- Provocando muerte celular.¹¹
- Inhibiendo la reproducción microbiana.¹¹
- Inhibiendo el metabolismo celular.¹¹

Del mismo modo los antisépticos deben poseer sustantividad; ésta puede ser medida de dos formas: a) el tiempo necesario para que su actividad antiséptica disminuya hasta la mitad y b) porcentaje de su actividad antiséptica que se conserva pasado un tiempo dado.³⁴

La efectividad de estos agentes antisépticos varía ampliamente y depende de la formulación, la concentración del agente activo, dosis, sustantividad, cumplimiento del uso y su interacción con otros químicos presentes en la cavidad oral en el momento de su uso. Diferentes enjuagues antimicrobianos han demostrado eficacia en contra de las bacterias, hongos, virus y esporas.¹¹

2.10.2 Clorhexidina

De los antisépticos orales ya mencionados el gluconato de clorhexidina se conoce como el agente antimicrobiano que mejor cumple con estos parámetros. Éste es un bisguanida de naturaleza catiónica, y por esta razón presenta afinidad por la pared celular (cargada negativamente) de los microorganismos.¹²

La exposición a la clorhexidina causa ruptura de la membrana celular de la bacteria, lo que permite el desalojo del contenido citoplasmático resultando en la muerte de la célula. Igualmente se adhiere a las mucinas salivares, reduciendo la formación de biopelícula e inhibiendo la colonización de placa bacteriana. La clorhexidina también se adhiere a la bacteria, lo cual la inhibe su adsorción hacia el diente.^{11, 70, 71.}

La clorhexidina tiene un amplio espectro de uso, se ha descrito su uso en restauraciones dentales y su función al facilitar la unión del adhesivo en restauraciones dentales debido a la inhibición de los factores endógenos que degradan la interfase adhesiva.⁷²

Existen distintas presentaciones de clorhexidina las cuales pueden variar entre países y laboratorios farmacéuticos. La clorhexidina puede venir en presentaciones de colutorios o enjuagues con concentraciones al 0.05%, 0.12%, 0.5%, 0.20% y 2%.⁷³ Vienen también presentaciones en gel que pueden ser al 0.5%, 1% y 2% y chips liberadores de clorhexidina de 2.5mg los cuales se colocan en sitios con bolsas periodontales, luego del raspado y alisado radicular.^{74, 75.}

Del mismo modo se han hecho presentaciones en spray al 0.12% y al 0.20%⁷⁶; se ha añadido a goma de mascar y se ha utilizado en estudios para ver el control de placa en pacientes jóvenes que portan aparatología ortodóntica⁷⁷ así como se han hecho cepillos dentales que liberan clorhexidina.⁷⁸ Del mismo modo existen distintos tipos de combinaciones de clorhexidina con otros tipos de antimicrobianos.

El gluconato de clorhexidina al 0.12% es un antiséptico bactericida con eficacia probada en contra de los siguientes organismos:^{11, 70.}

- Un amplio rango de organismos gram positivo y gram negativo.^{11, 70.}
- Organismos aerobios y anaerobios muchos de los cuales se asocian a la placa bacteriana, incluyendo *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia*.^{11, 70.}
- Virus de herpes simple 1 y 2, virus de inmunodeficiencia tipo 1, citomegalovirus, influenza A, parainfluenza y hepatitis B. (La clorhexidina no está aprobada para la prevención y el tratamiento de infecciones virales).^{11, 70.}
- Ataca también al menos siete especies de *Cándida* y otras levaduras (en ocasiones con su solo uso o en combinación de otros medicamentos antifúngicos para reducir infecciones oportunistas en poblaciones de alto riesgo, tales como pacientes sometidos a tratamientos para la leucemia o trasplante de médula ósea).^{11, 70.}

El gluconato de clorhexidina se adhiere firmemente a las estructuras dentarias, la placa dental y a los tejidos orales blandos. Se libera lentamente en la cavidad oral, lo que le otorga efectos antimicrobianos que se mantienen hasta por 12 horas dado a su alto nivel de sustentividad.^{11, 70.}

La Academia Americana de Periodoncia planteó que dado a la sustentividad de la clorhexidina en enjuague en una concentración al 0.12%, esta se debe utilizar: 15ml por un minuto, dos veces al día por 15 días.⁷⁹ Es importante resaltar que no solo influye la concentración de clorhexidina que se esté utilizando (ej.: 0.12% o 0.20%), sino que la cantidad usada y el tiempo de uso va a variar dependiendo de la concentración elegida.

Aunque las indicaciones de uso varían de acuerdo al fabricante, se puede establecer que a mayor concentración se debe usar menor cantidad y por menor período de tiempo durante el enjuague, así mismo de manera inversa a menor concentración, mayor cantidad y mayor tiempo durante el enjuague.¹²

Del mismo modo se han visto efectos adversos provocados por el uso de la clorhexidina. Hay pacientes que presentan hipersensibilidad a la clorhexidina, así como se ha comprobado que la misma provoca tinción de los dientes, alteración del sabor, descamación de la mucosa y en algunos casos se ha reportado inflamación de la glándula parótida, sobre todo cuando ésta se utiliza por un tiempo más prolongado de lo indicado. Los casos de tinción se han visto agravados cuando los pacientes al momento de usar la clorhexidina consumían vino, té, café o tabaco.^{11, 80, 81.}

A pesar de los efectos adversos que presenta, sus beneficios son mayores en cuanto a la inhibición de placa bacteriana por lo cual se ha recomendado su uso luego de procedimientos quirúrgicos donde el paciente no podrá higienizarse adecuadamente en la zona tratada. Luego de una intervención quirúrgica el proceso de cicatrización se desarrolla mediante una respuesta inflamatoria y subsecuentemente la presencia de inflamación promueve la rápida formación de biopelícula. Se ha comprobado que cuando hay poca presencia de placa las incisiones periodontales cicatrizan de manera más rápida y con menores complicaciones que cuando se deja formar grandes cantidades de placa. El Taller Europeo de Periodontología estableció que el mantenimiento post-operatorio del control de placa bacteriana es un factor determinante para conseguir resultados exitosos luego de una cirugía periodontal.⁷⁹

2.10.2.1 Colutorios de Clorhexidina combinados con otros principios activos

Existen distintas formulaciones de colutorios de clorhexidina que incluyen otros principios activos antimicrobianos tales como triclosán, cloruro de cetilpiridinio, peróxido de hidrógeno, fluoruro sódico, xilitol, entre otros, los cuales usualmente se añaden para mejorar la eficacia antiséptica del colutorio.¹²

Así mismo, las concentraciones de clorhexidina pueden variar en los colutorios que traen dichas combinaciones, debido a que se desee disminuir, por ejemplo, los efectos secundarios que se dan por el uso prolongado de la clorhexidina o porque se desee agregar un efecto anticaries.¹²

2.10.3 Cloruro de Cetilpiridinio

El Cloruro de Cetilpiridinio (CCP) es un amonio cuaternario que presenta actividad bactericida, pues altera la estabilidad de la membrana celular ya que sus colas laterales se introducen en la zona hidrofóbica. Su mecanismo de acción es similar al de la clorhexidina en cuanto a que provoca ruptura de la membrana celular, conllevando así el desalojo del contenido intracelular y por lo tanto la muerte celular. De acuerdo con DePaola et al.¹¹ el CCP también altera el metabolismo de la bacteria e inhibe el crecimiento celular. En cuanto a su sustantividad el CCP se une a la estructura del diente y al biopelícula, sin embargo la unión no es tan fuerte como el que presenta la clorhexidina y por lo tanto la liberación de esa unión se da de manera más rápida. De ahí la necesidad de indicar su uso cada 8 horas. Las concentraciones disponibles varían de país en país. En Estados Unidos están presentes las concentraciones al 0.05% y al 0.07%. El primero usualmente se utiliza para fines cosméticos, léase proporcionar buen aliento; y el segundo se suele utilizar como coadyuvante terapéutico, especialmente en pacientes tratados periodontalmente y que se encuentran en fase de mantenimiento.^{11, 12.}

DePaola et al.¹¹ exponen que distintos estudios demuestran la efectividad del CCP frente a bacterias tales como: *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Streptococcus sanguis*, *Eikenella corrodens*, *Salmonella typhimurium*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ctinomycetemcomitans*, *Lactobacillus casei*, y *Prevotella intermedia*. Así como diversas especies de Cándida.

2.10.4 Peróxido de Hidrógeno

Dentro de los antisépticos usados en la odontología tenemos también el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual viene siendo estudiado desde hace mucho tiempo y se ha mostrado que posee poder antimicrobiano contra microorganismos orales, así como ha sido reportado que su uso tópico reduce la formación de placa, reduce la severidad de la gingivitis y limita la gingivitis ulcerativa aguda.^{82, 83.}

Miyasaki et *al.*⁸⁴ en el año 1986 hicieron pruebas *in-vitro* para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC por sus siglas en inglés) y concentraciones mínimas bactericidas (MBC por sus siglas en inglés) del H_2O_2 y el H_2O_2 combinado con bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$). Aunque en ese momento se sabía poco de los efectos o toxicidad a nivel clínico del H_2O_2 , estudios *in-vitro* revelaban que este provocaba peroxidación lípida, lisis de células eucariotas y dañaba el DNA de las bacterias causando mutaciones de las mismas.

En una revisión de la literatura realizada por Hossainian et. *al*⁸⁵ en el 2011, se recopiló información de los efectos del enjuague peróxido de hidrógeno en la prevención de placa e inflamación gingival. Entre los artículos se encontraron concentraciones que iban desde un 0.013% hasta un 1.5% presentando cero inhibición de placa bacteriana y otros si presentaban disminución de placa en niveles de leve a moderado de la gingivitis inicial. En conclusión al evaluar las diferencias entre el enjuague de H_2O_2 y tratamientos de control en los efectos a corto plazo uno de tres estudios indicó un efecto positivo del H_2O_2 comparado con la no higienización por parte del paciente.

Al compararse el H_2O_2 con agua destilada, solución salina o placebo, el H_2O_2 fue más efectivo que los ya mencionados en tres estudios. En la misma revisión también se observó que el H_2O_2 comparado con la clorhexidina era significativamente menos efectivo. En cuanto a los artículos consultados que presentaban los efectos a largo plazo del H_2O_2 en los índices gingivales y de placa, un artículo mostró una diferencia significativa en el índice gingival modificado (MGI por sus siglas en inglés) al compararse con placebo cuando este era usado como un coadyuvante en la higiene oral diaria, pero tales efectos no se vieron reflejados en los índices de sangrado.⁸⁵

2.10.4.1 Seguridad del uso del peróxido de hidrógeno

En cuanto a la seguridad del uso del peróxido de hidrógeno se ha hablado que el grado de concentración de H_2O_2 está relacionado con el grado de efectos secundarios. En solo dos de los diez estudios que se evaluaron en la revisión de literatura de Hossainian et. *al.*⁸⁵ no se indicaban la concentración de H_2O_2 utilizado. En los demás estudios las concentraciones de H_2O_2 eran menores a 1.5%. Solo un estudio, de los que no indicaron la concentración utilizada, reportó efectos secundarios como sensación de dolor a nivel oral y/o cambios erosivos de la mucosa oral. Del mismo modo ellos explican que otras literaturas han indicado casos aislados en que se presentan efectos secundarios a partir de concentraciones al 3% al utilizarlo de 1-2 minutos de 3-5 veces al día y que a menor concentración, los cambios en la mucosa oral eran menos marcados.

Hossainian et. *al.*⁸⁵ explican que a base de los estudios seleccionados se puede concluir que el uso de productos con bajas concentraciones de H_2O_2 (menos de 1.25%) de manera diaria, por un período prolongado de tiempo, no induce a efectos secundarios.

2.10.4.2 Combinaciones de peróxido de hidrógeno con clorhexidina

Se han desarrollado combinaciones de peróxido de hidrógeno con clorhexidina a distintas concentraciones para uso de enjuague oral. Algunas investigaciones se han realizado con el fin de conocer los efectos tiene el H_2O_2 en la inhibición de la formación de manchas luego de usarse la clorhexidina. Existen resultados positivos con respecto a la inhibición de biopelícula con el uso de clorhexidina con agentes oxidantes como el peroxi-monosulfato.⁸⁵

Dona et *al.*⁸⁶ hicieron una prueba con la combinación de clorhexidina y perborato sódico monohidratado (Bocasan, Oral-B®, Belmont, California). Este venía en polvo que al ser agregado a 30ml agua liberaba peróxido de hidrógeno al 1.14%. Los investigadores encontraron que esta combinación dio como resultado índices de placa significativamente más bajos al ser comparados con clorhexidina sola en un modelo de acumulación de placa de 3 días.

Gründemann et al.⁸⁷ realizaron una investigación donde también se usó perborato sódico monohidratado (Bocasan, Oral-B®, Belmont, California) en conjunto con clorhexidina al 0.12% *versus* clorhexidina al 0.12% sola, en un protocolo donde se le indicó a los participantes no utilizar ninguna medida de higiene más que los enjuagues.

Al grupo de estudio se le indicó hacer el enjuague primero con el perborato sódico disuelto en 30ml de agua por 1 minuto, escupir y luego enjuagarse con 15ml de clorhexidina por 1 minuto, dos veces al día por 14 días. El grupo control se enjuagó 2 veces al día con 15ml de clorhexidina por 1 minuto, por 14 días también. Al finalizar el estudio se observó que había mejoría en cuanto a la inhibición de placa y desarrollo de gingivitis. En cuanto a la proporción de tinción, placa y gingivitis de las superficies manchadas fue significativamente menor cuando se le agregó un agente oxidante en conjunto con la clorhexidina.⁸⁷

En el 2013 Mirhadi et al.⁸⁸ realizaron un estudio para conocer la citotoxicidad de la combinación de peróxido de hidrógeno y clorhexidina (CHX) en distintas concentraciones en fibroblastos humanos cultivados del ligamento periodontal de terceros molares extraídos. Los fibroblastos fueron sometidos a seis soluciones preparadas: a) CHX al 0.2% y b) CHX al 2% solas; así como c) CHX 0.2% + H₂O₂ 1%; d) CHX 0.2%+ H₂O₂ 3%; e) CHX 2% +H₂O₂ 1% y f) CHX 2% +H₂O₂ 3%. Todas las soluciones fueron citotóxicas sobre los fibroblastos, pero la combinación f) CHX 2% + H₂O₂ 3% fue la más citotóxica y la a) CHX al 0.2%, fue la menos. La citotoxicidad de la CHX 0.2% no aumentó a pesar de que se aumentara el H₂O₂ de un 1% a 3%. Por lo que los autores concluyeron que para lograr una buena sinergia entre los antisépticos y a la vez evitar la mayor citotoxicidad posible la combinación CHX 0.2% + H₂O₂ 3% es la ideal.

2.10.5 Aceites Esenciales

Los Aceites Esenciales son una combinación de aceites esenciales fenólicos compuestos por eucaliptol, mentol, salicilato de metilo y timol. Los cuales no tienen ningún tipo de carga, tienen baja sustantividad y alta capacidad de interacción con ciertos componentes de la placa bacteriana.^{11, 89.}

Sus efectos antimicrobianos se dan por sus compuestos fenólicos los cuales provocan:

- Desnaturalización de las proteínas.¹¹
- Alteración de la membrana celular, provocando desalojo del contenido intracelular y la posterior muerte celular.¹¹
- Alteración de la actividad enzimática.¹¹
- Presenta propiedades antiinflamatorias al inhibir una enzima involucrada en la formación de prostaglandinas (sintetasa de prostaglandina). Las prostaglandinas son parte de los mediadores primarios de inflamación.¹¹
- De los aceites esenciales el timol, principalmente, altera la función de los neutrófilos al suprimir la formación radicales libres en los mismos y también alterando la quimiotaxis de neutrófilos.¹¹

Se tiene entendido que la exposición a los aceites esenciales por un período de tiempo de 30 segundos provoca alteraciones morfológicas en la superficie celular de ciertos patógenos orales. Se cree que se altera la integridad de la membrana celular; estos cambios en la superficie celular influyen de manera adversa a la sobrevivencia de las bacterias y hongos. Un dato importante acerca de los aceites esenciales, es que estos pueden extraer las endotoxinas de las bacterias gram-negativo limitando así parte de sus factores de virulencia. Los aceites esenciales pueden lisar tanto bacterias aerobias como anaerobias relacionadas con el biopelícula como son: *A actinomycetemcomitans*, *A viscosus*, *S mutans*, *S sanguis*, *especies Bacteroides*.¹¹

2.10.6 Triclosán

Es un bisfenol aniónico y liposoluble sintético que ha demostrado eficacia contra la placa bacteriana –biopelícula- y así mismo actividad antiinflamatoria. Es frecuentemente utilizado como antiséptico con un amplio espectro y baja toxicidad y se ha usado en la cosmetología por más de 20 años, siendo añadido a enjugues, jabones, y otros cosméticos de uso humano.⁸⁹

En el caso de los enjuagues, usualmente su composición viene en concentraciones de 0.03%, a pesar que se entiende que su potencial para disminuir el metabolismo bacteriano y consecuente reducción de adherencia a las mucosas se presenta en concentraciones al 0.05%.⁸⁹

La acción de este compuesto es la disrupción de la membrana plasmática de las bacterias incrementando su permeabilidad e inhibiendo la actividad de enzimas similares a la tripsina, modificando el transporte celular y previniendo el adecuado metabolismo y reproducción de las células bacterianas; todo este proceso no presenta un desbalance en la microbiota oral. Su amplio espectro actúa contra las bacterias gram-positivo y gram-negativo y es efectivo contra el género *micobacterium*, bacterias anaeróbicas, esporas y hongos de las especies *Cándida*.⁸⁹

El triclosán es un agente con carga aniónica y por lo tanto posee baja sustantividad, especialmente cuando se incorpora a enjuagues orales. De modo que para remediar esta deficiencia usualmente se relaciona o agrega con copolímeros tales como el Gantrez, junto con el cual autores refieren que le proporciona sustantividad de 12 horas. Así que su efectividad se basa en su biodisponibilidad. Debido a su alta biodisponibilidad se puede afirmar que el triclosán puede reducir la placa en un 22% y la gingivitis en un 25% esto perdura aún más debido a la baja concentración de alcohol presente en la fórmula provocando una estabilidad en el pH de alrededor de 6.8.⁸⁹

2.10.7 Xilitol

El xilitol es un sustituto del azúcar, no nutritivo y por lo tanto no calórico, que ha sido usualmente añadido a confitería y de igual modo a algunos enjuagues orales. Este sustituto no puede ser metabolizado por las bacterias orales, y en adición el xilitol puede ayudar la inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans*.^{89, 90.}

Este tipo de poliol tiene distintas propiedades que se consideran favorables en cuanto a la prevención de las caries. Dado a su composición éste reduce la cantidad de polisacáridos extracelulares adherentes, reduce igualmente ácidos lipopoteicos lo cual se traduce en una biopelícula con poca adherencia a las superficies dentales.⁹⁰

2.10.8 Fluoruros

Algunos enjuagues antisépticos traen incorporados en su formulación fluoruros, los cuales tienen un papel importante al interferir en el proceso de las caries dentales. Autores describen su acción como carioestática, pues es un ion que interfiere con el balance ecológico de la biopelícula y suele adherirse rápidamente a la superficie del esmalte debido a los bajos pH que usualmente presentan los enjuagues antisépticos; por lo tanto reduce de este modo la acidogénesis bacteriana y la desmineralización del esmalte. Igualmente interfiere con la biosíntesis de los polisacáridos responsables por la adhesión de los microorganismos a las superficies dentales y por lo tanto contribuyen a la remineralización dental.⁸⁹

2.10.8.1 Fluoruro de Sodio

El fluoruro de Sodio en enjuagues ha mostrado ser efectivo al reducir caries e inhibir el uso de carbohidratos por parte de los microorganismos orales al bloquear las enzimas involucradas en la vía glucolítica bacteriana. En el caso específico de las células estreptocócicas, el flúor inhibe la enolasa, una de las enzimas que pertenece a la serie de enzimas glucolíticas.^{90, 91} De acuerdo con Sajadi *et al.*⁹⁰ análisis de los intermediarios glucolíticos muestran que el xilitol inhibe la parte inicial o superior de las vías glucolíticas mientras que el flúor inhibe la parte final o más baja. Esto sugiere que la combinación del flúor y el xilitol posee efectos inhibitorios sinérgicos en la producción de ácido por parte del *Streptococcus mutans* y que el xilitol tiene el potencial de mejorar los efectos inhibitorios de bajas concentraciones de flúor.⁸⁹

2.10.8.2 Fluoruro de Potasio

Las sales de potasio, tales como el fluoruro de potasio han sido ingredientes activos utilizados en enjuagues y pastas dentales con el fin de tratar la hipersensibilidad dentinaria.⁹²

2.10.9 Acetato de Zinc

Las sales de zinc han mostrado un efecto de inhibición moderado en la formación de placa bacteriana y la formación de cálculo supragingival sin mostrar efectos secundarios significativos.^{93, 94.}

La glicólisis y ureólisis son eventos metabólicos importantes en la placa dental pero con efectos opuestos en los niveles de pH de la placa. La glicólisis hace que el pH decrezca a través de la formación de ácidos orgánicos, mientras que la ureólisis aumenta el pH a través de la liberación de amonio. La aplicación de urea simultáneamente con o previo a un desafío de glucosa suprime el descenso del pH en la placa. El zinc al igual que la clorhexidina es un agente catiónico que es conocido por disminuir la producción de ácidos por parte de la placa dental luego de ser expuesto a sacarosa o glucosa.⁹⁵

En un estudio realizado por Giertsen *et al.*⁹⁵ en donde pacientes hicieron enjuagues que tenían acetato de zinc y clorhexidina, se confirmó información de estudios previos que decían que los iones de zinc inhiben la producción de ácidos en la placa dental.

Mostraron también que un enjuague con 20mmol/L de acetato de zinc suprime la producción de amonio por parte de la urea en la placa dental. Este estudio demostró que los iones de zinc inhiben tanto la producción de ácidos y el metabolismo de urea que se presenta en la placa dental formada. La retención de iones de zinc en la cavidad oral puede explicar el efecto inhibitorio que tienen los iones de zinc tanto en la ureólisis o glicólisis provocada por la placa.

Se cree que los iones de zinc inhiben las enzimas glucolíticas. En estudios *in-vitro* se ha visto que la combinación de clorhexidina e iones de zinc inhiben de manera sinérgica el crecimiento de estreptococos orales.

En otro estudio realizado por Grietsen *et al.*⁹⁶ estos refieren que al combinar iones de zinc con antimicrobianos como la clorhexidina, resulta en una reducción de los efectos adversos de este último, tales como tinción o el aumento en la formación de cálculo.

2.10.10 *Caesalpinia coriaria* y usos medicinales.

El uso de plantas con fines medicinales también tiene su parte en odontología. En el caso particular de la República Dominicana el uso de plantas como remedios viene vinculado a los distintos grupos aborígenes que habitaron la isla antes de la época colonial. El Guatapaná, *Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd, es una planta que existe en casi todos los lugares áridos de América Tropical, ubicándose desde México, las Antillas e inclusive en la parte norte de América del Sur.¹⁰

El fruto del Gutapaná o Guatapanal, como también se le conoce en la República Dominicana, es usado como remedio casero como astringente y hemostático en heridas, y en otras condiciones hemorrágicas, así como se utiliza para el tratamiento de amigdalitis mediante enjuagues y también como antidiarreico. Las raíces son antisépticas contra la gangrena. (10)

En el año 2007 Cruz-Minier se propuso a determinar la existencia de sensibilidad o resistencia de las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* frente a diferentes concentraciones del extracto de Guatapaná. Encontraron que en las pruebas se obtuvieron halos de sensibilidad que midieron entre 5 y 7 mm para todas las bacterias exceptuando *Streptococcus pyogenes*, cuyo resultado presentó resistencia.¹⁰

En una revisión de Waizel y Martínez del 2011⁹⁷, de plantas medicinales utilizadas en México para tratar enfermedades periodontales, se menciona a la *Caesalpinia coriaria* a la cual se le conoce en este país bajo el nombre de Cascalote o *nacazcolotl*. Indican que su uso es como gárgaras y han comprobado que tiene: “propiedades astringentes por su alto contenido en taninos (elagitaninos), además con ácidos hidrociánico y shikímico;

antocianinas, felandrina, heterósidos cianogénicos, mucílagos, saponinas. Mostró actividad antimicrobiana contra organismos patógenos.”

También, dependiendo de qué parte de la planta esté siendo empleada y dependiendo del método para extracción del contenido, esta puede ser usada para odontalgias, úlceras e inflamaciones dentarias.⁹⁸

2.11 Pruebas de laboratorio

Existen diversas pruebas de laboratorio que nos permiten reconocer qué tipo de bacteria se encuentra en el biopelícula oral de nuestros pacientes. Estas pueden ser microscopía, cultivo bacteriano, análisis enzimáticos, inmunoanálisis, sondas de ácido nucleico y análisis de reacción en cadena de la polimerasa. Pero solo el cultivo nos permite hacer crecer la bacteria para estudiar su sensibilidad frente a diversos medicamentos.⁴²

Aun cuando existen microorganismos que no pueden ser cultivados, la técnica si permite hacer crecer muchos periodontopatógenos con el uso de cultivos selectivos y no selectivos. Es preciso también recalcar que el estudio mediante cultivos presenta ciertas limitaciones como la incapacidad de detectar niveles bajos de microorganismos, tienen un alto costo, alta carga de trabajo y requieren un tiempo prolongado hasta que se obtienen los resultados.⁴²

2.12 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son preparados estériles que pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos los cuales contienen sustancias nutritivas necesarias y ambiente adecuado para el desarrollo bacteriano.⁵² Estos deben cumplir con ciertos requisitos:

- Contener las sustancias nutritivas necesarias para la biosíntesis bacteriana.⁵²
- Tener un pH óptimo.⁵²
- Ser estériles y estar protegidos de la contaminación exterior para evitar la contaminación con bacterias del medio ambiente.⁵²

Clasificaremos los medios de cultivo según su composición en corrientes y especiales.

2.12.1 Medios de Cultivos Corrientes

Estos pueden ser líquidos o sólidos tales como el caldo corriente y el agar corriente, respectivamente.⁵²

- **Caldo corriente:** Es un preparado en base a carne macerada, peptona, cloruro de sodio, ajustados a un pH conveniente (pH7). Para reconstituirlos como Caldo, se les agrega agua destilada y se esterilizan en autoclave.⁵²
- **Agar Corriente:** Consta de caldo corriente al cual se le agrega agar-agar que es un polvo de fibras desecadas de un alga marina llamada *Gelidium espiniforme*. Este medio de cultivo provisto por el alga no tiene ningún tipo de valor nutritivo, sino que sirve únicamente para darle consistencia al medio. Los nutrientes son proporcionados por el caldo.⁵²

Los tipos de medios de cultivo corrientes son utilizados para hacer crecer especies bacterianas que son poco exigentes desde el punto de vista nutritivo.⁵²

2.12.2 Medios de Cultivos Especiales

Estos medios de cultivo pueden ser líquidos, semisólidos y sólidos; a su vez cualquiera de estos tres puede ser un medio Mejorado, Selectivo o Indicador. Son preparados a base de los componentes de caldo o agar corriente, a los cuales además se les suma alguna sustancia nutritiva (medios mejorados) lo cual facilita el desarrollo microbiano, del mismo modo podría tener agregado alguna sustancia química la cual selecciona el desarrollo de una determinada especie bacteriana (medios selectivos) y finalmente están aquellos que contienen algún tipo de componente que pone de manifiesto alguna propiedad bioquímica específica de la bacteria (medios indicadores).⁵²

2.12.2.1 Medios de Cultivos Mejorados

Son medios bases o corrientes a los cuales se les adiciona una o más sustancias nutritivas que permiten el desarrollo de bacterias más exigentes desde el punto de vista nutritivo.⁵²

Entre ellas se encuentran:

- Agar o caldo corriente combinado con azúcares tales como: Glucosa, Lactosa, Sacarosa, Manitol, Sorbitol, entre otros.
- Agar Sangre.
- Agar Sangre + Hemina + Menadiona.⁵²

De este grupo definiremos el Agar Sangre + Hemina + Menadiona, medio el cual usamos para el crecimiento de algunas de nuestras especies bacterianas en el presente estudio

Agar Sangre + Hemina + Menadiona

A un medio base de Agar corriente o Agar enriquecido como el Agar Columbia se le agrega agua destilada (la proporción según la cantidad a preparar) y se lleva al autoclave. Luego de que éste está estéril y ha entibiado a una temperatura aproximada entre 45-50° *Celsius* (pero aún se encuentra fundido) se le agrega sangre desfibrinada (puede ser de conejo o de cordero) a una proporción de 5%, de manera aséptica. Debe mantenerse agitando para que se incorpore todo. Del mismo modo se le agrega una solución de Vitamina K (Menadiona) y Hemina mientras el agar esté fundido.⁵²

Este agar es plaqueado de manera aséptica, evitando siempre la contaminación externa. La Hemina y Menadiona sirven como factores de crecimiento para algunas especies bacterianas bucales tales como: *Porphyromonas*, *Prevotellas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Veionellas*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, entre otros microorganismos propios de la microbiota anaeróbica de la boca.⁵²

Antes y luego de sembradas las placas Petri con este preparado deben ser colocadas en condiciones anaeróbicas en Jarra Gas-Pack o algún otro tipo de sistema que produzca anaerobiosis.⁵²

En algunos casos el desarrollo de la bacteria puede conllevar a distintitos grados de hemólisis, las cuales se denominan de la siguiente manera:

- **Hemólisis alfa:** Destrucción parcial de los glóbulos rojos, transformándose la hemoglobina en metahemoglobina; se observa una coloración verdosa alrededor de la colonia.⁵²
- **Hemólisis beta:** Hay una destrucción total de los glóbulos rojos, no se metaboliza la hemoglobina y se conserva un halo transparente alrededor de la colonia.⁵²
- **Hemólisis gamma:** No hay hemólisis. Por lo tanto el medio permanece igual alrededor de la colonia.⁵²

2.12.2.2 Medios de Cultivos Selectivos

Son aquellos medios que permiten sólo el desarrollo de una o más especies bacterianas impidiendo el desarrollo de otras, de acuerdo a alguna propiedad especial de las bacterias que desarrollan en él; estos medios de cultivo son⁵²:

- Agar Chapman.
- Agar Tomate.
- Agar LBS.
- Caldo Jay.
- Agar TSBV.
- Agar CFAT.
- Agar Petragani.
- Agar *Brucella bacteroides*.⁵²

De este grupo definiremos el Agar TSBV.

Agar TSBV

Es un medio selectivo para las especies *Aggregatibacter*. Para su preparación se utiliza Agar *Trypticase*, Extracto de levadura, Suero de caballo, Bacitracina, Vancomicina (estos últimos son antibióticos inhibidores del resto de la microbiota acompañante).⁵²

Una vez preparado, este medio de cultivo se debe dejar 72 horas en la cámara de anaerobiosis con 85% de Nitrógeno, 10% de H₂, y 5% de CO₂; esto permite mantener el medio en condiciones de anaerobiosis para poder sembrarlo, ya que los microorganismos que se desarrollan en él (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), son muy exigentes con respecto a las condiciones ambientales porque son muy lábiles a la presencia de O₂.⁵²

2.12.2.3 Medios de Cultivos Indicadores

Son aquellos medios que demuestran una propiedad especial de las bacterias en relación a sus características fisiológicas.⁵² Entre ellas tenemos:

- Caldo Glucosa Campana Tornasol.
- Caldo Urea Rojo Fenol.
- Gelatina.
- Agar Sub-Acetato de Plomo.
- Agar Simmonds (Citrato).
- Agar Thioglicolato.⁵²

2.12.2.4 Medios Mixtos

Son aquellos que permiten el desarrollo de las bacterias y además, son capaces de seleccionar e indicar ciertas propiedades fisiológicas que poseen.⁵²

En este grupo tenemos:

- Agar Mac-Conkey.
- Agar *Mitis salivarius*.
- Agar TYCSB.⁵²

Antes de utilizar cualquiera de estos medios de cultivos, luego de recién preparados se recomienda dejarlos en la estufa de incubación a una temperatura de 37°C por un período de 24 horas para confirmar que el medio se mantiene estéril. Si durante este tiempo hay crecimiento de alguna colonia, el medio debe ser descartado sin utilizar.

2.13 Cultivo de Bacterias Anaerobias

Las bacterias anaerobias pueden ser cultivadas en medio sólidos, semisólidos o líquidos.⁹⁹ Para que estas bacterias puedan crecer debemos proporcionarles un ambiente de anaerobiosis dentro del medio de cultivo. Existen distintas técnicas y métodos para el cultivo de anaerobios como son:

- **Métodos Físicos:**
 - Regeneración (pérdida de oxígeno por ebullición).
 - Aspiración (al vacío).⁹⁹
- **Métodos Químicos:** Mediante sustancias reductoras como son:
 - Glucosa (Agar Veillon).
 - Thioglicolato (Agar Thioglicolato).⁹⁹
- **Métodos Físico-Químicos:**
 - Jarra Gas-Pack (Generador de CO₂).
 - Sistema Roll Tube (Mezcla de gases N y CO₂).⁹⁹
- **Métodos Biológicos:**
 - Bacteria Aerobia-Anaerobia (Placa Fôrtner).⁹⁹

Sistema Gas-Pack

Los cultivos se colocan en una jarra que cierra herméticamente y que tiene granallas de Paladio que absorben parte del O₂ que se encuentra dentro de la jarra, antes de cerrar la jarra se agrega un generador de CO₂ y H₂ que es un sobre de Boranato de sodio y ácido tártrico al cual se le adicionan 10cc de agua destilada. Esto genera una reacción química que desprende CO₂ en una proporción de un 10%, la cual es ideal para ciertas bacterias anaerobias facultativas, esta condición se conoce como Capnofilia. El H₂ generado se combina con el oxígeno para que a su vez se forme H₂O, lo cual colabora para eliminar todo el oxígeno ambiental del interior de la jarra. Existen sistemas como el OXOID™ que no precisan de que se le agregue agua, solamente los sobres generadores de anaerobiosis.⁹⁹

2.14 Recuento Bacteriano

Existen diversos procedimientos para poder determinar la cantidad de bacterias presentes en un medio de cultivo. Estas se pueden clasificar en métodos directos y métodos indirectos.¹⁰⁰

- **Métodos Directos:**
 - Método de cuantificación directo al microscopio.¹⁰⁰
 - Recuento de bacterias viables.¹⁰⁰
- **Métodos Indirectos:**
 - Turbidometría.¹⁰⁰
 - Medición de la actividad metabólica.¹⁰⁰
 - Peso seco.¹⁰⁰

En el presente estudio se utilizó el recuento de bacterias viables para valorar los resultados y la turbidometría para ajustar o estandarizar las suspensiones bacterianas utilizadas.

2.14.1 Recuento de Bacterias Viables

Mediante este método se deben realizar diluciones seriadas del cultivo que se está estudiando. A partir de cada dilución se hace una siembra en una placa agar y esto se lleva a incubar. Las colonias bacterianas luego se cuentan.¹⁰⁰

El método tiene como ventaja que podemos contar el número de células vivas (Unidades Formadoras de Colonias por unidad de volumen) UFC/ml. Como desventaja tiene el tiempo requerido para poder obtener buenos resultados y la gran cantidad de material a procesar.¹⁰⁰

2.14.2 Turbidimetría

Cuando las bacterias van aumentando en número en un medio de cultivo específico, tal como el caldo de cultivo, éste va adquiriendo una turbidez directamente proporcional al número de organismos presentes. Esta turbidez puede medirse mediante un espectrofotómetro o colorímetro.¹⁰⁰

El modo en que funciona este instrumento es mediante la emisión de una onda de luz transmitida a través de la suspensión de bacterias hacia una célula fotoeléctrica. El cambio de intensidad de la luz es registrado por el equipo y se traduce a una escala como porcentaje de transmisión, de modo que a mayor cantidad de células bacterianas, menor cantidad de luz transmitida. A pesar de ser un método rápido, tiene como desventaja que no discrimina entre células vivas o muertas.¹⁰⁰

2.15 Ensayos para la determinación de sensibilidad bacteriana a antimicrobianos

El uso de estudios de sensibilidad de microorganismos frente a distintos antimicrobianos es una de las más importantes funciones que realizan los laboratorios de microbiología clínica. Estos se desarrollan mediante pruebas de sensibilidad o antibiogramas, los cuales tienen como principal objetivo evaluar la respuesta que presenta un microorganismo al entrar en contacto con uno o varios antimicrobianos, ofreciendo una aproximación inicial de lo que podría ser un factor predictivo en la eficacia clínica.

Existen distintos organismos internacionales que según su región geográfica han planteado lineamientos ideales para el trabajo en los laboratorios de microbiología tales como el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* antes conocido como *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, de los Estados Unidos de América. Esto se ha hecho con el fin de que los resultados de los estudios puedan ser usados, comparados y comprendidos por sus homólogos a nivel mundial. Sin embargo, cada laboratorio puede establecer de acuerdo a su estructura, demanda asistencial y política de antibióticos, el esquema de técnicas y organización de trabajo que les aseguren la realización e información final de los antibiogramas o pruebas.

Para la prueba de sensibilidad tenemos distintos ensayos básicos como son:

- **Métodos de Difusión:**
 - Método de antibiograma disco-placa o Kirby-Bauer.
 - Método del Épsilon *test*.
- **Métodos de Dilución:**
 - Método de dilución en agar.
 - Método de dilución en caldo.
- **Curva de letalidad o de muerte.**

2.16 Métodos de Difusión

Método de antibiograma disco-placa o Kirby-Bauer

El método de antibiograma disco-placa se basa en los estudios de Bauer, Kirby y colaboradores. El método consiste en inocular una placa Petri con agar, con la bacteria a estudiar y luego poner en su superficie discos de papel absorbente (también llamados papel filtro o secante) impregnados con distintos antibióticos. El modo en que funciona es que inmediatamente se pone el disco embebido sobre la superficie del agar húmedo, el papel absorbe el agua y el antibiótico difunde sobre el medio de cultivo.¹⁰¹

El antibiótico es difundido de manera circular y también en el espesor del agar. Inmediatamente se colocan los discos sobre las placas Petri inoculadas, éstas se llevan a incubación por un período de 18-24 horas. Luego de que transcurre este tiempo es que se formará la zona de inhibición alrededor del disco.¹⁰¹

El espacio que se da entre el halo (por las bacterias inhibidas) y las bacterias en crecimiento se denomina concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI no se puede obtener mediante los métodos de disco placa, pero si se puede relacionar su resultado con los resultados de ensayos previos con el método de dilución, el cual sí nos puede dar el CMI.¹⁰¹

El diámetro de la zona de inhibición se mide según la cepa usada y el antibiótico usado. Estos resultados se grafican frente a la CMI, de manera que se obtenga la línea de regresión o “recta de concordancia”, la cual proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición.⁽¹⁰¹⁾ Instituciones como la CLSI se dedican a establecer categorías de acuerdo al antibiótico estudiado y lo separan en sensible (S), intermedia (I) o resistente (R).

Si aparecen colonias dentro de la zona de inhibición, puede que estemos frente a mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos, por lo que es conveniente volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana. Como un estándar general, no debemos considerar aquellas colonias diminutas que se encuentren dentro de la zona de inhibición y que solo se pueden visualizar mediante luz transmitida con el uso de una lupa.¹⁰¹

En cuanto a la disposición de los discos, estos no deben situarse a menos de 15mm del borde de la placa y deben distribuirse de manera que no produzcan superposición de las zonas de inhibición. Por lo tanto en placa de 150mm no se colocarán más de 12 discos y en placas de 100mm no más de 6 discos.

Existe una modificación al sistema de difusión mediante discos llamado Agar Spot Growth Inhibition Test donde en lugar de colocar discos sobre el agar inoculado, se depositan gotas con ayuda de una micropipeta. Las zonas de inhibición se evalúan de manera similar.⁴

Categorías de Interpretación

En cuanto a la interpretación de los resultados, como hemos confirmado el diámetro de inhibición variará de acuerdo al tipo de microorganismo y antibiótico estudiado. A continuación veremos la descripción dada por la CLSI para cada categoría.

- **Sensible (S):** cuando tenemos un halo en esta categoría esto implica que la infección dada por una cepa en particular puede ser tratada de manera apropiada con la dosis de antibiótico recomendado.^{102, 103.}
- **Intermedio (I):** en esta categoría caen las cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibióticos más elevadas (siempre y cuando las dosis puedan elevarse).^{102, 103.}
- **Resistente (R):** aquí las cepas no son inhibidas por las concentraciones alcanzadas en dosis habituales.^{102, 103.}

En el caso de los estudios de clorhexidina frente a patógenos orales no hay un estándar determinado con este tipo de estudio. Múltiples factores alteran el poder comparar los resultados entre estudios debido a las varianzas en los procedimientos metodológicos entre investigadores.

Método de *Epsilon test*

Este método es similar al método disco-placa. El *E-test*, como también se le conoce, permite mediante la lectura directa conocer la concentración mínima inhibitoria. En lugar de un disco se coloca una tira plástica de seis centímetros de largo por cinco milímetros de ancho, el cual trae una cantidad predeterminada de antimicrobiano. La preparación del inóculo es similar al establecido para el método de disco-placa. Luego de inoculada la placa se coloca la tirilla. A partir de la colocación ocurre una difusión del antimicrobiano formándose un gradiente exponencial de las concentraciones del producto probado. Luego de que se incuban las placas se observa una zona de inhibición de forma elipsoidal. La concentración mínima inhibitoria será según el valor obtenido en el punto extremo donde la zona de inhibición se cruza con la tira.¹⁰³

2.19 Métodos de Dilución

Método de dilución en agar

Este método se basa en la determinación de crecimiento bacteriano en un medio de cultivo en el cual se encuentra diluido un antimicrobiano. Con este tipo de estudio se permite conocer la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB).¹⁰¹ En el caso del uso de la clorhexidina existen protocolos preestablecidos de uso para la fase terapéutica periodontal: 15ml de clorhexidina al 0.12% por 60 segundos, 2 veces al día; esta concentración debe dar una dosis de 18mg.^{12, 79.}

Los métodos dilución son los indicados para, además de querer determinar la actividad inhibitoria, se pueda también conocer la actividad bactericida de un antimicrobiano. Múltiples variables que dependen del microorganismo, del medio de cultivo, así como del inóculo, influyen en éste tipo de método, por lo cual debe realizarse de manera estandarizada. Para su preparación el antimicrobiano se añade al agar cuando éste está aún fundido y luego se alicuota en placas Petri. Usualmente se realiza en un rango dilución donde en las placas hay distintas concentraciones del antimicrobiano a estudiar. Con la ayuda de replicadores se inoculan las placas. Con frecuencia para las placas Petri de 90mm se utilizan 20ml del medio de cultivo mezclado con el antimicrobiano. Por lo general la proporción es 9 partes de agar y 1 del antimicrobiano a estudiar.¹⁰¹

2.20 Curva de letalidad o muerte

Con este método se determina el poder bactericida de un antimicrobiano. El método consiste en juntar en un caldo un inóculo estandarizado y concentraciones fijas de un antimicrobiano. La capacidad bactericida se determina al tomar en cuenta el tiempo que el inóculo y el antimicrobiano duran en contacto. Dentro de las cepas a estudiar se hace un control sin antibiótico. El recuento usualmente se hace a las 0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas. En caso de que el antibiótico se muy bactericida puede hacerse a las 1, 2, 4, 5 y 24 horas. Luego de pasados los distintos tiempos se toman 100µl de la mezcla de suspensión bacteriana y antimicrobiano y se siembra en el medio ideal de la bacteria estudiada y transcurrido el tiempo necesario en incubación, se hace recuento bacteriano.¹⁰¹

Short Interval Kill Test

Una modificación de este ensayo es el *Short Interval Kill Test*, *Contact test* o en español ensayo de contacto. En este tipo de estudio es muy similar a la curva de letalidad solo que los tiempos varían. El objetivo de este estudio es determinar la actividad bactericida de un compuesto en un corto período de tiempo. Las soluciones bacterianas son inoculadas y son neutralizadas al terminar el tiempo. Los organismos son luego sembrados y enumerados así como comparados con el cálculo bacteriano inicial.^{4,5}

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Enfoque y Alcance de la Investigación

El presente es un estudio experimental, ensayo *in vitro* para medir superioridad entre diferentes antisépticos.

3.2 Población y Muestra

La población de estudio son todos los enjuagues de clorhexidina con concentración del 0.12%, tanto de producción nacional como extranjera. De igual modo se incluirá los enjuagues que contengan clorhexidina al 0.15% combinado con extracto de *Caesalpinia coriaria* y peróxido de hidrógeno; y una clorhexidina con concentración al 0.06%. Dado a que dentro del grupo de clorhexidinas con concentración de 0.12% solo hay 7 (siete) enjuagues y de los dos últimos grupos, hay uno de cada grupo, se decide tomar a la población total de cada grupo de clorhexidina como objeto del estudio.

Se debe recalcar que luego de finalizado el estudio salió al mercado una nueva clorhexidina al 0.12%. Se prevé en estudios futuros incluir a la misma.

3.3 Instrumentos de Recolección de Datos, Análisis y Medición de Datos

El modo de recaudar la información de los estudios fue mediante la observación, se diseñaron fichas electrónicas en el programa Microsoft Excel 2010® para la recolección de los datos de cada estudio realizado. Los instrumentos del Laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad de Chile, tales como: las micropipetas, hornos de esterilización autoclave, pesos y campana de flujo laminar, reciben mantenimiento por parte de una empresa externa que certifica el buen estado y confiabilidad de los instrumentos. Fotografías de estos documentos están colocadas en anexos.

3.5 Plan de Análisis de los Datos.

El procesamiento y análisis estadístico se realizó mediante los programas Microsoft Excel 2010® y SPSS versión 17. Se estimaron medidas descriptivas a través de proporciones para frecuencia de las variables, se asumen intervalos de confianza del 95 %.

Para el Ensayo de Dilución se trabajó bajo un Análisis Descriptivo. Un total de 470 muestras fueron evaluadas en 3 ensayos con cuatro bacterias distintas. Cada ensayo de dilución se hizo por duplicado por cada enjuague y por cada bacteria, por lo cual hubo 20 ensayos de dilución por bacteria. Los ensayos de difusión se hicieron por triplicado por bacteria y por enjuague, por lo tanto se hicieron 30 ensayos de cada uno. Finalmente se hizo el ensayo de contacto o *Short Interval Kill Test* con sólo tres de las cuatro bacterias; se realizó con tres volúmenes de suspensión bacteriana distinta y a tres tiempos, por lo cual hubo una cantidad de 9 ensayos de contacto por enjuague, con las bacterias *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *E. corrodens*, dando un total de 90 ensayos por bacteria. (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Cantidad de muestras procesadas por bacterias y por ensayos.

Enjuagues	Bacterias analizadas por tipo de ensayo											Total
	<i>P. gingivalis</i>			<i>F. nucleatum</i>			<i>E. corrodens</i>			<i>A. actinomycetemcomitans</i>		
	Dilución	Difusión	Contact Test	Dilución	Difusión	Contact Test	Dilución	Difusión	Contact Test	Dilución	Difusión	
1. CHX 0.12% (a)	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
2. CHX 0.12% + Xilitol 1.00g	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
3. CHX 0.06% + Xilitol 10.0g	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
4. CHX 0.12% (b)	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
5. CHX 0.12% (c)	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
6. CHX 0.12% + NaF	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
7. CHX 0.12% + Xilitol*	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
8. CHX 0.15% + H ₂ O ₂ 2% + Cc 5%	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
9. (Ctrl+) CHX 0.12% + CCP	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
10.(Ctrl-) Suero Fisiológico.	2	3	9	2	3	9	2	3	9	2	3	47
Σ	20	30	90	20	30	90	20	30	90	20	30	470

Fuente: Propia de los autores. (*No indica la cantidad de Xilitol añadido al producto).

Análisis Estadístico

Para la variable del crecimiento se realizó un examen descriptivo. En el caso de la variable diámetro se realizó una Prueba de Normalidad. Se hizo esta prueba para saber si la variable diámetro cumple con los supuestos de normalidad, si es así permitirá realizar una serie de pruebas estadísticas confiables.

La prueba de Kolmogorov Smirnov para una muestra, se utiliza para comprobar si la variable diámetro se distribuye normalmente. En la Tabla 2 se puede observar que el p-valor es de $0.091 > 0.05$, lo que permite aceptar H_0 y concluir que la variable diámetro se distribuye normalmente.

Tabla 2. Prueba de Kolmogorov-Smirnov

		Diámetro
N		40
Parámetros normales ^{a,b}	Media	8.2627
	Desviación típica	5.84069
Diferencias más extremas	Absoluta	.196
	Positiva	.196
	Negativa	-.159
Z de Kolmogorov-Smirnov		1.242
Sig. asintót. (bilateral)		.091

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Fuente: Propia de los autores.

A partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov se determinó realizar la prueba de homogeneidad de varianza estadística de Levene para confirmar la homogeneidad de las muestras a ser evaluadas. Esta dio un p-valor = $0.401 > 0.05$; por lo tanto se confirma la igualdad de varianza poblacional y se procede a realiza el ANOVA de un factor para determinar si existe igualdad de media en los diámetros entre las bacterias estudiadas.

Del mismo modo se realizó una tabla de comparación múltiple con la prueba de HSD Tukey la cual permite ver cuales bacterias son diferentes para p-valor <0.05 en cuanto a su diámetro de zona de inhibición. Una tabla igual se realizó comparando los enjuagues entre sí. En cuanto a la definición del margen de la zona de inhibición se observó que 29 casos tienen el límite definido con media de 10.86 y desviación de 3.77, solo existe un caso donde el límite es indefinido. Para realizar un análisis se trabajó con la Prueba T-Student solo para los valores (no acción y definido). (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de valores Prueba T-Student.

Definición del Límite ZI		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Diámetro	No acción	10	1.5667	4.95424	1.56667
	Definido	29	10.8566	3.76913	.69991

Fuente: Propia de los autores.

Como se ve en la Tabla 4 se confirmó con la Prueba de Whitmann y se obtuvieron los mismos resultados.

Tabla 4. Resultados de Prueba de Whitmann.

Definición del Límite ZI		N	Rango promedio	Suma de rangos
Diámetro	No acción	10	8.25	82.50
	Definido	29	24.05	697.50
	Total	39		

Fuente: Propia de los autores

En cuanto al Ensayo *Short Interval Kill Test* se realizó la Prueba de Friedman la cual es una prueba no paramétrica de comparación de tres o más muestras relacionadas la variable dependiente debe ser nivel ordinal. Esta se utiliza para comparar más de dos mediciones de rangos (medianas) y determinar que la diferencia no se deba al azar (que la diferencia sea estadísticamente significativa).

3.6 Materiales y Métodos

3.6.1 Especies bacterianas y medios de cultivo

En el presente estudio se trabajó con cuatro cepas de bacterias del *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA) proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Eikenella corrodens* (ATCC 23834). Las cuales fueron mantenidas en criotubos a una temperatura de -80°C en un medio de caldo con glicerol al 20%.

Las cepas de *E. corrodens*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*, fueron sembradas en agar Columbia no selectivo con 5% de sangre equina, Hemina (1µg/ml) y Menadiona (5µg/ml) en anaerobiosis a 37°C. El *A. actinomycetemcomitans* fue sembrado en agar TSBV selectivo (*Tryptic Soy Serum Bacitracin Vancomycin*) con 10% de suero equino, bacitracina (75µg/ml) y vancomicina (5µg/ml); en capnofilia a 37°C. Luego de crecidas en placa se pasaron a caldo suplementado de BHI (*Brain-Heart Infusion*).

Ya crecido en caldo, se midió la densidad óptica (OD, *optical density*) para cada caldo de bacteria con el objetivo de estandarizar la cantidad de bacterias presentes antes de iniciar cada ensayo, se procuró alcanzar una densidad óptica entre 0.5 y 1.0, medido a una longitud de onda de 600 nanómetros (OD₆₀₀), estas suspensiones fueron utilizadas para los ensayos de dilución y *Short Interval Kill Test* (SIKT). Para los ensayos de difusión en placa de determinaron suspensiones ajustadas a 0,5 Mc Farland para procesar la siembra en césped, siguiendo los protocolos de la CLSI.

3.6.2 Ensayos realizados y productos utilizados

Se utilizaron 8 colutorios de abierta comercialización en República Dominicana con distintas concentraciones de clorhexidina (CHX). Los colutorios varían en su composición estos reportan además tener otros ingredientes activos además de la clorhexidina tales como: el fluoruro de sodio (NaF), xilitol, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), extracto de *Caesalpinia coriaria* (Cc) y cloruro de cetilpiridinio (CCP). A modo de control negativo (Ctrl -) se utilizó suero fisiológico estéril. Como control positivo (Ctrl +) se utilizó un enjuague que combina CHX 0.12% + CCP 0.05g por los resultados superiores que este presenta en previos estudios en comparación con otros tres colutorios de clorhexidina con diferentes combinaciones.⁶

A cada enjuague o antiséptico se le asignó un número y se llamó por sus compuestos activos. (Ver Tabla 3).

Tabla 5. Enjuagues utilizados y sus nombres por compuestos activos:

Enjuague	Abreviatura
1. CHX 0.12% (a) (Sin Alcohol).	CHX 0.12% (a)
2. CHX 0.12% + Xilitol 1.00g (Sin Alcohol).	CHX 0.12% + Xilitol 1.00g
3. CHX 0.06% + Xilitol 10.0g (Sin Alcohol).	CHX 0.06% + Xilitol 10.0g
4. CHX 0.12% (b) (Sin Alcohol).	CHX 0.12% (b)
5. CHX 0.12% (c) (no especifica uso o no de alcohol).	CHX 0.12% (c)
6. CHX 0.12% + NaF (Sin Alcohol).	CHX 0.12% + NaF
7. CHX 0.12% + Xilitol (no especifica cantidad)* - (Sin Alcohol).	CHX 0.12% + Xilitol*
8. CHX 0.15% + H ₂ O ₂ 2% + Extracto de <i>Caesalpinia coriaria</i> 5%	CHX 0.15%+H ₂ O ₂ 2% +Cc 5%
9. (Ctrl+) CHX 0.12% + CCP 0.05g	(Ctrl+) CHX 0.12% + CCP
10. (Ctrl-) Suero Fisiológico.	(Ctrl-) Suero Fisiológico.

Fuente: Propia de los autores.

Con las bacterias de la ATCC se hicieron los siguientes ensayos:

- Dilución en placa.
- Difusión en placa o Agar *Spot Growth Inhibition Test*.
- Ensayo de contacto o *Short Interval Kill Test*.

Control de calidad: todas las placas y tubos de ensayo con medios de cultivo se trabajaron bajo una campana de flujo laminar, los que se llevaron a estufa a 37°C por un período de 24 horas para confirmar que los medios estaban estériles y que no hubo contaminación al preparar los caldos o placas.

Placa testimonio: se trabajó con cada cepa de bacteria por separado. Para control de pureza del inóculo y confirmar la viabilidad del mismo se sembró en placas con agar Columbia y agar TSBV con el caldo de cada bacteria, según su respectivo medio de crecimiento, confirmando que los cultivos correspondían a cada una de las bacterias ensayadas.

3.6.3 Ensayo de Dilución en Agar

Se realizó una modificación al ensayo clásico de dilución. En este ensayo se incorporaron por separado los distintos enjuagues a los medios de cultivo (agar) adecuados para el crecimiento de cada bacteria. Se hizo en una proporción 9:1, en el cual por cada 90 ml de medio de cultivo se añade 10ml del antiséptico y se procede a plaquear. Para las cepas ATCC de *P. gingivalis*, *E. corrodens*, y *F. nucleatum* se usaron medios de agar Columbia enriquecidos con Hemina y Menadiona. Para *A. actinomycetemcomitans* se usó *Tryptic Soy Agar Serum* sin agregar vancomicina ni bacitracina debido a que se trabajó con una cepa ATCC pura.

Luego de que cada placa estuvo lista y pasó el control de calidad, se trabajó con cada cepa por separado y se procedió a inocular cada una de las placas con 100µl de caldo de cada bacteria. Se diseminó con un asa de Drigaslky con el fin de hacer una siembra en césped. El trabajo se hizo por duplicado. Las bacterias anaerobias fueron colocadas en jarras herméticas con generadores de anaerobiosis (AnaeroGen™ 2.5L, Thermo Scientific). Las jarras fueron luego llevadas a la estufa de incubación a una temperatura de 37°C por 7 días.

Las placas con cepas anaerobias facultativas fueron colocadas en jarras de capnofilia y fueron luego llevadas a la estufa de incubación a 37°C por 48 horas. El objetivo del ensayo era poder determinar si había o no crecimiento bacteriano en el medio de cultivo combinado con los antisépticos.

3.6.4 Ensayo de Difusión en Agar o *Agar Spot Growth Inhibition Test*

En este ensayo se realizó una variación al método tradicional de difusión en placa. En lugar de utilizar los discos de papel absorbente, con ayuda de una micropipeta se depositó una alícuota de 5µl de cada antiséptico sobre placas Petri previamente inoculadas.

Se trabajó con cada cepa bacteriana por separado en placas estériles, sin antisépticos agregados. En el agar ideal para cada bacteria se sembró en césped con tórula (hisopo) girando la placa 3 veces a 90°.

Por cada cepa estudiada se rotularon dos placas, la primera con números del 1 al 5 y la segunda con números del 6 al 10 dejando suficiente espacio entre cada número y los bordes de la placa Petri. Luego de sembrado y rotulado se aplicó entonces la microgota de 5µl de cada uno de los productos, correspondiendo cada número de la placa al mismo número de la lista de antisépticos vistos en la lista previa. (Ver Tabla 5). El objetivo del ensayo era determinar si se producía o no una zona de inhibición bacteriana; si había zona de inhibición se medía su diámetro, y se examinaban los límites de la zona. De haber crecimiento dentro de la zona de inhibición se hacía un recuento de la cantidad de colonias presentes. Este proceso se realizó por triplicado.

3.6.5 Ensayo de contacto o *Short Interval Kill Test*

Este ensayo es una variación del método de curva de letalidad. En el ensayo de contacto se procura saber cómo se comporta el antiséptico en su acción antimicrobiana sobre las bacterias luego de transcurrido un período de tiempo determinado. Este ensayo se realizó solo con las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, *Eikenella corrodens* y *Fusobacterium nucleatum*. Cada bacteria se trabajó por separado.

Se rotularon 10 tubos eppendorf con los números del 1 al 10 para depositar en ellos alícuotas de 200µl de los enjuagues correspondientes a su numeración. Por cada bacteria estudiada se prepararon 30 tubos eppendorf divididos en grupos de a 10. A cada alícuota de 200µl de enjuague se le agregaron distintos volúmenes de suspensión bacteriana. Se realizaron tres grupos de estudio por cada cepa, por lo que se hicieron grupos del siguiente modo:

- 200µl de enjuague + 10µl de caldo de bacteria.
- 200µl de enjuague + 50µl de caldo de bacteria.
- 200µl de enjuague + 100µl de caldo de bacteria.

Cada producto con cada concentración bacteriana se puso en contacto con cada enjuague y fueron mezclados con vórtex por 10 segundos. El tiempo de contacto se evaluó a tres tiempos: 1 minuto, 3 minutos y 5 minutos; los tiempos fueron tomados con cronómetro y los ensayos por grupos se hicieron uno a la vez. Luego de transcurrido 1 minuto, 3 minutos y 5 minutos se tomó la cantidad de 10µl de la mezcla antiséptico-bacteria y se sembró en una placa de estéril en el número correspondiente.

Siendo así el número del antiséptico, el del eppendorf y el de la placa el mismo. Por lo que de la alícuota de 200µl de producto + 10µl caldo de bacteria se tomó y sembró la cantidad de 10µl al 1, 3 y 5 minutos. Se hicieron grupos similares con 200µl de producto + 50µl de caldo y 200µl de producto + 100µl de caldo, tomándose igualmente cantidad de 10µl a los 1, 3 y 5 minutos. Con esto se pretendía conocer si el antiséptico tenía algún tipo de efecto sobre la bacteria y si se mantendría viable luego de sembrado en placa. Esto nos permitiría ver si la efectividad dependería de la cantidad de producto, cantidad de bacterias y tiempo de aplicación.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 Resultados

En la evaluación del crecimiento bacteriano en el ensayo de dilución como se muestra en la Tabla 6 el enjuague de CHX 0.12% (c) evidenció un patrón de crecimiento positivo para todas las bacterias similar a lo encontrado con el Suero fisiológico (Ctrl -), por lo tanto no fue posible hacer recuento bacteriano. En las clorhexidinas: CHX 0.012% (a), CHX 0.12% (b), CHX 0.12% + Xilitol 1.00g, CHX 0.12% + NaF y CHX 0.12% + Xilitol* no fue detectado crecimiento de ninguna de las bacterias ensayadas dando un resultado similar al (Ctrl +). La CHX 0.06%+Xilitol 10g inhibió el crecimiento de *P. gingivalis*, más no fue efectiva frente a las demás bacterias

Tabla 6. Distribución de crecimiento bacteriano en Ensayo de Dilución.

Enjuagues	Bacterias			
	<i>P. gingivalis</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
1. CHX 0.12% (a)	-	-	-	-
2. CHX 0.12% + Xilitol 1.00g	-	-	-	-
3. CHX 0.06% + Xilitol 10.0g	-	Incontable	Incontable	Incontable
4. CHX 0.12% (b)	-	-	-	-
5. CHX 0.12% (c)	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
6. CHX 0.12% + NaF	-	-	-	-
7. CHX 0.12% + Xilitol*	-	-	-	-
8. CHX 0.15% + H ₂ O ₂ 2% + Cc 5%	-	Incontable	Incontable	-
9. (Ctrl+) CHX 0.12% + CCP	-	-	-	-
10.(Ctrl-) Suero Fisiológico.	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable

Crecimiento bacteriano en ensayo de dilución. (-) = 0 crecimiento. Incontable: Crecimiento excesivo que no permite recuento.

Fuente: Propia de los autores.

En la evaluación de los resultados de los ensayos de difusión se tomó en cuenta la presencia o no de zona de inhibición, el tamaño de la zona, delimitación de los márgenes de la zona (si estaban o no definidos) y crecimiento bacteriano dentro de la zona de inhibición. Se realizaron intervalos para determinar la sensibilidad de las bacterias frente a los enjuagues tomando como parámetro el halo/zona de inhibición formada a partir del (Ctrl +).

En cuanto al crecimiento bacteriano dentro de la zona de inhibición en el Ensayo de Difusión, sólo se reportó un caso correspondiente a la CHX 0.06% + Xilitol 10g frente a *P. gingivalis*, donde del mismo modo la zona de inhibición fue indefinida con un crecimiento bacteriano de 1-10 bacterias. El resto presentó zona de inhibición limpia o por el contrario total ausencia de zona de inhibición.

El diámetro de la zona de inhibición de un antimicrobiano variará de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria de una bacteria frente a determinado antimicrobiano. Para este estudio se determinaron los siguientes intervalos:

Resistente: 0mm – 4.99mm
Intermedio: 5mm – 8.99mm
Sensible: \geq 9mm

Se realizó el ANOVA del factor diámetro de la zona de inhibición para determinar si existe una diferencia en diámetro respecto a las bacterias.

Tabla 7. Distribución de diámetro de zona de inhibición por bacteria evaluada.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10	8.2000	4.83608	1.52930	4.7405	11.6595	.00	14.00
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10	4.9333	4.25441	1.34536	1.8899	7.9768	.00	8.67
<i>Eikenella corrodens</i>	10	6.7167	5.78688	1.82997	2.5770	10.8564	.00	11.83
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10	13.2007	5.54806	1.75445	9.2318	17.1695	.00	16.83
Total	40	8.2627	5.84069	.92349	6.3947	10.1306	.00	16.83

Fuente: Propia de los autores.

Se puede observar en la Tabla 7, el diámetro promedio de la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es de 13.20 con desviación estándar de 5.54. Es importante destacar que la bacteria *Porphyromonas gingivalis* presenta menor variabilidad respecto al promedio de 8.20 ± 4.84 .

La Tabla 8 del análisis de ANOVA explica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los intergrupos respecto a su diámetro por bacteria estudiada. Esto debido a que el estadístico F de Snecor presenta un nivel de significación de $0.007 < 0.05$, lo que rechaza la igualdad de medias.

Tabla 8. Comparación del diámetro de zona de inhibición en inter-grupos e intra-grupos por bacteria estudiada.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	378.623	3	126.208	4.774	.007
Intra-grupos	951.809	36	26.439		
Total	1330.432	39			

Fuente: Propia de los autores.

Se realizó una comparación múltiple mediante la prueba HSD de Tukey, esta prueba permite ver cuales bacterias son diferentes para p -valor < 0.05 . Al comparar los diámetros entre bacterias se confirmó que existe una diferencia significativa entre los diámetros de *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum* (p -valor de .005), así como entre *E. corrodens* y *A. actinomycetemcomitans* (p -valor .037) frente a los distintos enjuagues. Esto podría interpretarse como mayor resistencia por parte de *E. corrodens* y *F. nucleatum* al compararse con *A. actinomycetemcomitans*. Se puede apreciar la diferencia en tamaños de diámetros entre las bacterias comentadas en la Figura 2.

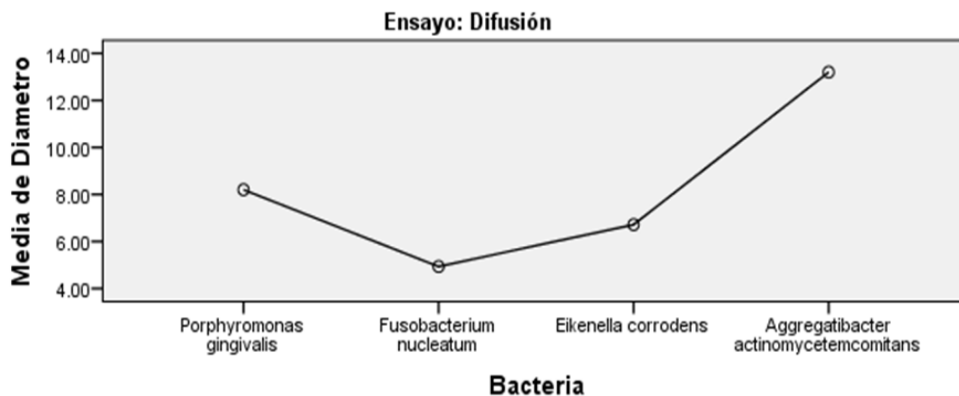


Figura 2. Diferencia de diámetro en milímetros por bacteria. Fuente: Propia de los autores.

En cuanto al análisis de los diámetros por enjuagues, para poder analizarlo se removió del grupo al suero fisiológico pues si se dejaba mostraría diferencias estadísticamente significativas que no tienen aplicación clínica.

De los enjuagues que hicieron un diámetro promedio mayor fue el (Ctrl+) CHX 0.12+CCP con media de 12.501 ± 3.48 , seguido de CHX 0.12% (a) 11.80 ± 3.51 y la CHX 0.12% (b) con media de 11.63 ± 3.54 . De los enjuagues que menor diámetro promedio hicieron se encuentran el CHX 0.12% (c) con media de 3.5 ± 4.12 y el CHX 0.15% + H₂O₂ + Cc con media 5.96 ± 7.71 . (Ver Tabla 9).

Tabla 9. Promedio de diámetros de zona de inhibición por enjuagues evaluados.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
1. CHX 0.12% (a)	4	11.7917	3.51551	1.75775	6.1977	17.3856	8.67	16.83
2. CHX 0.12%+Xilitol 1g	4	11.5425	3.35253	1.67626	6.2079	16.8771	8.17	16.17
3. CHX 0.06% + Xilitol 10g	4	3.9167	7.83333	3.91667	-8.5479	16.3812	.00	15.67
4. CHX 0.12% (b)	4	11.6250	3.54958	1.77479	5.9768	17.2732	8.33	16.67
5. CHX 0.12% (c)	4	3.5000	4.12311	2.06155	-3.0608	10.0608	.00	8.00
6. CHX 0.12% + NaF	4	11.5000	3.28577	1.64289	6.2716	16.7284	8.50	16.17
7. CHX 0.12% + Xilitol*	4	10.2917	1.90698	.95349	7.2572	13.3261	7.67	12.00
8. CHX 0.15% + H ₂ O ₂ +Cc	4	5.9583	7.70567	3.85283	-6.3031	18.2198	.00	16.17
9. (Ctrl+) CHX 0.12%+CCP	4	12.5008	3.48393	1.74197	6.9571	18.0445	8.00	16.17
Total	36	9.1807	5.41691	.90282	7.3479	11.0136	.00	16.83

Fuente: Propia de los autores.

En la Tabla 10 se observa que al realizar el ANOVA entre los distintos enjuagues el p-valor es igual a $0.04 < 0.05$ lo que indica que existen diferencias significativas entre las medias de los diámetros por enjuague.

Tabla 10. Evaluación de medias de diámetro inter e intra grupos de los enjuagues evaluados.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	425.482	8	53.185	2.387	.043
Intra-grupos	601.521	27	22.279		
Total	1027.003	35			

Fuente: Propia de los autores.

Del mismo modo se realizó una comparación múltiple con la prueba de HSD de Tukey para comparar a los enjuagues de acuerdo a los su semejanza en diámetros de zona de inhibición. Como se puede observar en la Tabla 11 esta prueba dividió los enjuagues en dos grupos:

- **Grupo 1:** CHX 0.12 (c), CHX 0.06% + Xilitol 10g y CHX 0.15% + H₂O₂ +Cc.
- **Grupo 2:** CHX 0.12% + Xilitol*, CHX 0.12% + NaF, CHX 0.12%+Xilitol 1g, CHX 0.12% (b), CHX 0.12% (a) y (Ctrl+) CHX 0.12%+CCP.

Tabla 11. Agrupación de enjuagues según tamaño de diámetro de zona de inhibición.

Enjuague		N	Subconjunto para alfa = 0.95		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	CHX 0.12 (c)	4	3.5000		
	CHX 0.06% + Xilitol 10g	4	3.9167		
	CHX 0.15% + H ₂ O ₂ +Cc	4	5.9583		
	CHX 0.12% + Xilitol*	4		10.2917	
	CHX 0.12% + NaF	4		11.5000	
	CHX 0.12%+Xilitol 1g	4		11.5425	
	CHX 0.12% (b)	4		11.6250	
	CHX 0.12% (a)	4		11.7917	
	(Ctrl+) CHX 0.12%+CCP	4		12.5008	
	Sig.			.998	.999

Es importante resaltar que CHX 0.15% + H₂O₂ + Cc y CHX 0.12 (c), quienes tienen concentraciones de clorhexidina de 0.12% o más, concentraciones indicadas para la fase I o etiológica, reaccionaron de manera similar al CHX 0.06% + Xilitol 10g el cual tiene la mitad de la concentración de clorhexidina y es usado en la fase de mantenimiento, donde la carga bacteriana es menor.

Al comparar los diámetros evaluados con nuestra tabla de dimensión de sensibilidad o resistencia bacteriana se observó que sobre *P. gingivalis* la CHX 0.06% + Xilitol 10g, CHX 0.12% (c) y la CHX 0.15% + H₂O₂ + Cc, mostraron ser de acción intermedia, mientras que frente al resto de los enjuagues fue sensible. *F. nucleatum* mostró acción intermedia frente a todas las clorhexidinas a excepción de CHX 0.06% + Xilitol 10g, CHX 0.12% (c) y la CHX 0.15% + H₂O₂ + Cc a las cuales se mostró resistente. Al evaluar *E. corrodens* ésta presenta sensibilidad frente a todos los enjuagues excepto frente a CHX 0.06% + Xilitol 10g, CHX 0.12% (c) y la CHX 0.15% + H₂O₂ + Cc a las cuales presentó resistencia. Finalmente con respecto a *A. actinomycetemcomitans* ésta se mostró resistente a la CHX 0.06% + Xilitol 10g, acción intermedia para CHX 0.12% (c) y la CHX 0.15% + H₂O₂ + Cc y sensible ante el resto.

Una de las variables fue la delimitación de los márgenes de la zona de inhibición en el ensayo de difusión. Debido a que se realizó por triplicado, las repeticiones de los ensayos de cada enjuague fueron comparadas entre sí. Todas mostraban un mismo patrón de resultados variando por bacteria y por enjuague. Se computó los tres resultados por bacteria y por enjuague como un solo resultado. Por lo tanto los grupos se evaluaron como 40 muestras en lugar de 120. (Ver Tabla 12). De esas 40 muestras, 29 presentaban tener límites definidos y solo 1 indefinido correspondiente a la CHX 0.06% + Xilitol 10g frente a *P. gingivalis*; se infiere con esto que hubo algún tipo de zona de inhibición en estos enjuagues. Se encontraron 10 casos en donde no hubo una acción por parte del antiséptico frente a la bacteria, a esto se le denominó “zona sin evidencia de actividad antimicrobiana”. Estos 10 casos corresponden a: CHX 0.06% + Xilitol 10g en *F. nucleatum*, *E. corrodens* y *A. actinomycetemcomitans*. La CHX 0.12% (c) en *F. nucleatum* y *E. corrodens*.

Finalmente CHX 0.15 + H₂O₂ + Cc en *F. nucleatum* y *E. corrodens*. El resto no se considera pues fueron los controles negativos para cada bacteria.

Tabla 12. Distribución de casos reportados de zonas sin evidencia de actividad antimicrobiana (No acción) y con zonas de inhibición definidas e indefinidas.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
No acción	10	1.5667	4.95424	1.56667	-1.9774	5.1107	.00	15.67
Definido	29	10.8566	3.76913	.69991	9.4229	12.2903	.00	16.83
Indefinido	1	.000000	.00
Total	40	8.2627	5.84069	.92349	6.3947	10.1306	.00	16.83

Fuente: Propia de los autores.

Con los resultados de los límites de zona de inhibición se realizó la Prueba T-Student tomando solo en cuenta los valores “definido” y “no acción” (zonas sin evidencia de actividad antimicrobiana). Los resultados de la prueba T-Student fueron utilizados para realizar la Prueba de Levene para igualdad de varianzas. Se observa que la prueba de Levene muestra que estas son bastante diferentes p-valor=0.924; por lo que se debe considerar la significancia de la Prueba T-Student cuando no hay igualdad de varianzas. En este caso el p-valor es igual a 0.000 lo que permite concluir que las diferencias de la definición del límite de la zona de inhibición (no acción y definido) son estadísticamente significativas y no solo al azar. (Ver Tabla 13)

Tabla 13. Resultados de análisis de igualdad de varianza que indican diferencias significativas entre la delimitación de la zona de inhibición para grupos “Definido” y “No acción”.

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Diámetro	Se han asumido varianzas iguales	.009	.924	-6.195	37	.000	-9.28989	1.49956	-12.32829	-6.25148
	No se han asumido varianzas iguales			-5.414	12.787	.000	-9.28989	1.71590	-13.00314	-5.57663

Finalmente para la evaluación del último objetivo, se realizó la Prueba de Friedman la cual es una prueba no paramétrica de comparación de tres o más muestras relacionadas la variable dependiente debe ser nivel ordinal. Esta se utiliza para comparar más de dos mediciones de rangos (medianas) y determinar que la diferencia no se deba al azar (que la diferencia sea estadísticamente significativa). En la Tabla 14 se puede observar la distribución del crecimiento bacteriano luego de realizado el *Short Interval Kill Test* por tiempo y por volumen de suspensión bacteriana aplicada a los distintos enjuagues.

La prueba de Friedman nos concluye que existe diferencia significativa en el crecimiento bacteriano cuando a las alícuotas de los enjuagues se les aumenta el volumen de caldo bacteriano. Sin embargo no hay diferencias significativas en el crecimiento o inhibición de las bacterias transcurridos los distintos tiempos.

Tabla 14. Distribución de crecimiento bacteriano por tiempo de contacto y por volumen bacteriano con diferentes enjuagues.

Bacterias	Enjuagues	Volumen del producto y tiempo de contacto								
		10µl_1 min	10µl_3 min	10µl_5 min	50µl_1 min	50µl_3 min	50µl_5 min	100µl_1 min	100µl_3 min	100µl_5 min
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1. CHX 0.12% (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. CHX 0.12% + Xilitol 1.00g	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3. CHX 0.06% + Xilitol 10.0g	+	-	-	+	+	-	+	+	-
	4. CHX 0.12% (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5. CHX 0.12% (c)	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	6. CHX 0.12% + NaF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7. CHX 0.12% + Xilitol*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8. CHX 0.15% + H ₂ O ₂ 2% + Cc 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9. (Ctrl+) CHX 0.12% + CCP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10. (Ctrl-) Suero Fisiológico.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1. CHX 0.12% (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. CHX 0.12% + Xilitol 1.00g	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3. CHX 0.06% + Xilitol 10.0g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4. CHX 0.12% (b)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	5. CHX 0.12% (c)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6. CHX 0.12% + NaF	-	-	-	+	+	-	+	+	+
	7. CHX 0.12% + Xilitol*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8. CHX 0.15% + H ₂ O ₂ 2% + Cc 5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9. (Ctrl+) CHX 0.12% + CCP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10. (Ctrl-) Suero Fisiológico.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Eikenella corrodens</i>	1. CHX 0.12% (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. CHX 0.12% + Xilitol 1.00g	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3. CHX 0.06% + Xilitol 10.0g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4. CHX 0.12% (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5. CHX 0.12% (c)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6. CHX 0.12% + NaF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7. CHX 0.12% + Xilitol*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8. CHX 0.15% + H ₂ O ₂ 2% + Cc 5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9. (Ctrl+) CHX 0.12% + CCP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10. (Ctrl-) Suero Fisiológico.	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CAPÍTULO 5: CONCLUSIÓN

4.2 Discusión

Los antisépticos orales han demostrado su eficacia en el control de la biopelícula y son una herramienta útil en manos del profesional y del paciente, siempre y cuando las indicaciones de uso sean seguidas al pie de la letra. La clorhexidina al 0.12% es una de las concentraciones más utilizadas como coadyuvante en el tratamiento periodontal luego de la remoción mecánica de cálculo en el proceso de fase I. Concentraciones de clorhexidina al 0.05% o 0.06%, como la evaluada en el estudio, son utilizadas más como coadyuvantes en la terapia de mantenimiento, en donde los principales factores etiológicos de enfermedad periodontal tales como el cálculo dental y biopelícula han sido removidos. El uso de clorhexidina al 0.12% en volúmenes de 15ml, por 60 segundos 2 veces al día, liberará la cantidad de 18mg de medicamento; si es al 0.20% en volúmenes de 10ml al día, por 30 segundos 2 veces por día se liberará la cantidad de 20mg.¹² Cantidades menores han demostrado efecto antiplaca. Se sabe además que la clorhexidina comienza a tener efectos a partir de los 5-6mg usándose 2 veces al día.⁸

Los hallazgos reportados en el presente estudio en cuanto a la no viabilidad bacteriana de *P. gingivalis* luego de pasado los 5 minutos de contacto con el antiséptico, son similares a los reportados por Sassone *et al.*^{3,7} y por Herrera *et al.*⁶

En los hallazgos del ensayo de contacto *E. corrodens* no presentó viabilidad luego de entrar en contacto con CHX 0.12% + NaF, por lo que difiere de lo expresado por Herrera *et al.*⁶ quien observó resistencia bacteriana.

Las clorhexidinas CHX 0.12 + Xilitol 1.00g, CHX 0.12% + NaF y CHX 0.12% + CCP que usamos para nuestros ensayos, son las mismas que las reportadas por Herrera *et al.*⁶ como CHX 0.12%, CHX + NaF y CHX 0.12% + CPC, respectivamente. Los resultados expresados en el presente estudio corroboran lo expresado por Herrera *et al.*⁶ pues frente a estos productos no hubo viabilidad bacteriana de *F. nucleatum*.

En cuanto a *F. nucleatum* al menos 4 de los 8 productos evaluados con concentraciones de 0.12%, presentaron efectividad en el ensayo de contacto en todos lo tiempo y en todos los volúmenes de caldo bacteriano lo cual apoya lo expresado por Sassone *et al.*⁷

El laboratorio que produce la CHX 0.06% + Xilitol 10g, produce también una concentración al 0.12% pero solo en la presentación de *spray* y no como colutorio; por esta razón no agregamos este producto al estudio. Con respecto a la CHX 0.06% + Xilitol 10g entendemos que su indicación no es para la fase tratamiento etiológico o fase I, sino para una fase de mantenimiento, por lo tanto el desafío bacteriano encontrado en el presente estudio pudo haber sido muy alto para la misma. Aun así se observó que ésta concentración tuvo efectos inhibitorios sobre ciertas cepas, especialmente sobre *P. gingivalis* en el ensayo de dilución; se observó además que en los ensayos de contacto en los tres tiempos y frente a los tres volúmenes de suspensión bacteriana de *P. gingivalis*, ésta clorhexidina tuvo efectos inhibitorios a los 5 minutos, esto es importante pues *P. gingivalis* es una de las bacterias encontradas en mayor prevalencia en pacientes dominicanos con gingivitis.⁴⁹ Podemos concluir que esta clorhexidina cumpliría con su efecto inhibitorio en menores concentraciones bacterianas tales como las encontradas en pacientes ya tratados mecánicamente con destrataje y raspado y alisado radicular. En un estudio futuro esta concentración del 0.06% podría evaluarse sobre patógenos cariogénicos y utilizar como control positivo una concentración de clorhexidina al 0.05% de la misma compañía que produce la CHX 0.12% + CCP (la cual fue nuestro control positivo); este colutorio antes se traía a la República Dominicana pero ya no se importa al país.

A pesar de que el laboratorio que produce la CHX 0.15%+H₂O₂+Cc no la comercializa con fines de eliminación de bacterias periodontales, ésta presenta una concentración de clorhexidina al 0.15%, así como el peróxido al 2% y el extracto de *Caesalpinia coriaria* al 5%, por lo que, tomando estudios previos de inhibición bacteriana reportados por el uso de peróxido⁸⁵, peróxido con clorhexidina⁸⁵⁻⁸⁸ y el extracto de la *Caesalpinia coriaria*,^{10, 97, 98} sobre bacterias orales, se esperaría que este tuviera igual o mayor efectividad que las clorhexidinas al 0.12%.

Los resultados mostraron que su efecto no fue el esperado al no poder compararse con el (Ctrl +) ni con las demás clorhexidinas con concentración al 0.12%.

Sin embargo, dado a que hay estudios demuestran la efectividad de la clorhexidina junto al peróxido, se podría evaluar la posibilidad de que tal vez al integrar el extracto de *Caesalpinia coriaria* a los otros dos medicamentos, se inactive o antagonice uno de los dos. Para esto se recomendaría estudios bioquímicos de las combinaciones expuestas para determinar si alguno provoca inhibición de la efectividad del otro.

Otra vertiente sería hacer estudios con patógenos periodontales y el extracto de *Caesalpinia coriaria* solamente, para conocer su interacción directa.

En cuanto a la CHX 0.12% (c), ésta no presentó actividad inhibitoria bacteriana en los ensayos de dilución frente a ninguna de las cuatro bacterias, así como tampoco provocó inhibición bacteriana en los ensayos de difusión y de contacto frente a *E. corrodens* y *F. nucleatum*. Por lo que en el análisis HSD Tukey ésta es agrupada junto a la CHX 0.06% + 10g Xilitol y la CHX 0.15%+H₂O₂+Cc. Un estudio acerca de la composición química de este enjuague podría llevarse a cabo. Es necesario acotar que CHX 0.15%+H₂O₂+Cc y CHX 0.12% (c) son producidos por el mismo laboratorio.

Como recomendación para poder aplicar de manera más certera los resultados obtenidos lo ideal sería realizar una prueba similar sobre patógenos periodontales cultivados de pacientes dominicanos con enfermedad periodontal, pues a pesar de tener resultados concluyentes, se debe resaltar que este estudio evaluó a las bacterias por separado y no como el conjunto de comunidades bacterianas que se encuentran en la boca funcionando en sinergismo. Se debe considerar que a pesar de que la muestra se coloque en un líquido reductor (RTF) la viabilidad bacteriana va descendiendo a medida que pasa el tiempo. Algunas bacterias dejan de ser viables a las 3 horas fuera de su medio de tensión de oxígeno ideal. Es por esto que para realizar cultivos a partir de muestras tomadas en pacientes dominicanos y enviarlos a Chile disminuiría las posibilidades de la viabilidad bacteriana al menos que sea transportada con hielo seco a temperaturas de -20°C.

Vemos esto como una posibilidad con el desarrollo de un Laboratorio de Microbiología Oral en la PUCMM.

Se debe resaltar que enjuagues de fabricación local tales como el CHX 0.12% (b), tuvieron resultados similares al del (Ctrl +) en todos los ensayos.

A pesar de que los estudios *in-vitro* se encuentran en el escalón más bajo de la pirámide de investigación, estos constituyen el primer paso para si quiera considerar un estudio a nivel clínico. Actualmente no hay un reporte de la literatura en la que se prueben tal cantidad de clorhexidinas al mismo tiempo; aún así sugerimos más investigación al respecto, donde se puedan repetir estos estudios de manera independiente. Aclaremos también que no existe ningún tipo de conflicto de intereses con ninguna de las compañías cuyos enjuagues fueron evaluados.

5.1 Conclusión

En cuanto a la sensibilidad de los cultivos de periodontopatógenos estudiados frente a las distintas concentraciones de clorhexidina con y sin agregados, *P. gingivalis*, *E. corrodens* y *A. actinomycetemcomitans* mostraron similar sensibilidad frente a todas las clorhexidinas. Los diámetros de zona de inhibición más grandes se encontraron en *A. actinomycetemcomitans*, sin embargo la menor variación entre los diámetros lo presentó *P. gingivalis*. Con respecto a los enjuagues los diámetros de inhibición más grandes los dio la CHX 0.12% +CCP seguido de CHX 0.12% (a) y CHX 0.12% (b). Los diámetros más pequeños los dieron CHX 0.12% (c) y CHX 0.15%+H₂O₂+Cc. En cuanto al crecimiento bacteriano las clorhexidinas CHX 0.12% (a), CHX 0.12% +Xilitol 1g, CHX 0.12% (b), CHX + NaF, CHX 0.12% + Xilitol* y la CHX 0.12% + CCP presentaron inhibición en los ensayos de dilución y difusión en todas las bacterias.

En relación a la resistencia de los patógenos periodontales estudiados frente a las distintas clorhexidina, *P. gingivalis* fue la única que no presentó resistencia frente a las distintas clorhexidinas.

En cuanto a *F. nucleatum*, esta presentó resistencia a CHX 0.06% +Xilitol 10g, CHX 0.12% (c) y CHX 0.15%+H₂O₂+Cc. En el ensayo con *E. corrodens* se reportó resistencia a las mismas tres clorhexidinas mencionadas, en el resto de las clorhexidinas tuvo un efecto intermedio. Finalmente *A. actinomycetemcomitans* solo presentó resistencia ante la CHX 0.06% +Xilitol 10g.

Con respecto a la viabilidad bacteriana luego de haber estado en contacto con las distintas clorhexidinas, el volumen de suspensión bacteriana si influyó en la viabilidad luego de que se puso en contacto con las clorhexidinas. Sin embargo el tiempo de contacto no presentó resultados significativos. Las clorhexidinas que lograron la no viabilidad bacteriana en todos los tiempos y frente a todos los volúmenes fueron: CHX 0.12% (a), CHX 0.12% + Xilitol 1g, CHX + Xilitol* y (Ctrl +) CHX 0.12%+CCP.

En cuanto a nuestra hipótesis, a pesar de que la CHX 0.15%+H₂O₂+Cc tiene compuestos y concentraciones similares a las clorhexidinas al 0.12%, esta se desestima debido a que su efecto no fue el esperado al no poder compararse con el (Ctrl +) ni con las demás clorhexidinas con concentración al 0.12% evaluadas en este estudio.

Bibliografía

1. Rode SM, Gimenez X, Montonya VC, Gómez M, Blanc S, M M, et al. Daily Biofilm Control and Oral Health: an Epidemiological Challenge Consensus – Brazilian Advisory Panel in Oral Health. *Brazilian Oral Res (São Paulo)*. 2012;26(1):133–43.
2. Godoy J, Canepa G EM. Revisión Bibliográfica: Biofilm Periodontal: Conocimiento de su Estructura y Dinámica. *Rev Chil Oseoint*. 2007;4(2):3–10.
3. Sassone L, Rivail A, Fidel S, Fidel SR, Dias M, Junior RH. Antimicrobial Activity of Different Concentrations of NaOCl and Chlorhexidine Using a Contact Test. *Braz Dent J*. 2003;14(2):99–102.
4. Lai K-Y. *Liquid Detergents: Volume 129 of Surfactant Science*. 2nd ed. Lai K-Y, editor. CRC Press; 2005.
5. Johansson I, Somasundaran P. *Handbook for cleaning/decontamination of surfaces*. 1ra ed. Elsevier; 2007.
6. Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2003;30:307–14. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694428>
7. Sassone LM, Antonio R, Fidel S, Murad CF, Fidel SR, Jr RH. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. 2008;(5):19–24.
8. Solmaz G, Korachi M. Inhibition and Disruption Properties of Chlorhexidine Gluconate on Single and Multispecies Oral Biofilms. *Jundishapur J Microbiol*. 2013;6(1):61–6.
9. Raangs G, Winkel E, van Winkelhoff A. In vitro antimicrobial effects of two antihalitosis mouth rinses on oral pathogens and human tongue microbiota. *Inte*. 2013;(11):203–8.
10. Cruz-Minier C. “Pruebas de Sensibilidad y Resistencia bacteriana frente a diferentes concentraciones de Extracto de *Caesalpinia coriaria* (Guatapaná).” *Cienc Soc*. 2007;XXXII(1):8–20.
11. DePaola LG, Eshenaur A. Safety and Efficacy of Antimicrobial Mouthrinses in Clinical. *J Dent Hyg*. 2007;Vol. 81(No. 5):1–16.

12. Calsina-Gomis G, Serrano-Granger J. ¿Existen realmente diferencias clínicas entre las distintas concentraciones de clorhexidina?: Comparación de colutorios. RCOE. 2005;10(4):457–64.
13. Merriam-Webster Dictionary. Anion [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/anion>
14. Merriam-Webster Dictionary. Apoptosis [Internet]. [citado 2015 Nov 13]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/apoptosis>
15. Merriam-Webster Dictionary. Bactericidal [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/bactericidal>
16. Merriam-Webster Dictionary. Bacteriostasis [Internet]. 2015 [cited 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/medical/bacteriostasis>
17. Negroni M. Célula Bacteriana. Microbiología Estomatológica, Fundamentos y guía práctica. 2da ed. Buenos Aires, Argentina.: Editorial Panamericana.; 2009. p. 17–30.
18. Merriam-Webster Dictionary. Cation [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/cation>
19. Merriam-Webster Dictionary. Endotoxin [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/endotoxin>
20. Merriam-Webster Dictionary. Phenotype [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/phenotype>
21. Feito Grande L. El sueño de lo posible: bioética y terapia génica. Madrid: Universidad Pontificia Comillas; 1999.
22. Stathopoulou P. Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. J Clin Perio. 2010;37:24–9.
23. Merriam-Webster Dictionary. Glycolysis [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/glycolysis>
24. Merriam-Webster Dictionary. Hemagglutination [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/hemagglutination>
25. Merriam-Webster Dictionary. Hemagglutinin [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/hemagglutinin>

26. Merriam-Webster Dictionary. Leucotoxin [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/medical/leucotoxin>
27. Rojas N. El Lipopolisacarido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. *Rev Cost Cienc Méd.* 1995;16(3):71–84.
28. Merriam-Webster Dictionary. Polyssacharide [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/polysaccharide>
29. Merriam-Webster Dictionary. Protease [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/protease>
30. Merriam-Webster Dictionary. Proteolysis [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/proteolysis>
31. Merriam-Webster Dictionary. Saccharolytic [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/medical/saccharolytic>
32. Merriam-Webster Dictionary. Serotype [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.merriam-webster.com/medical/serotype>
33. Lafuente J, Garc B. Control químico de biopelículas orales. Clorhexidina [Internet]. 2015 [citado 2015 Nov 14]. Disponible en: <http://www.ugr.es/~pbaca/p4controlquimicodebiopeliculasorales/02e60099f4106531c/prac04.pdf>
34. Negroni M. Agentes Químicos Antisépticos y Desinfectantes. *Microbiología Estomatológica, Fundamentos y guía práctica.* 2da ed. Buenos Aires, Argentina.: Editorial Panamericana.; 2009. p. 107–21.
35. Bascones Martínez A, Figuero Ruiz E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004;9(S):92–107.
36. Torres López, M., Díaz, M., Acosta A. Revisión bibliográfica: La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en la estomatología. *Gac Médica Espirituana.* 2009;11(1).
37. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(I):1–6.
38. Armitage GC. Diagnóstico y clasificación de las enfermedades periodontales. *Periodontol 2000 (Ed Esp).* 2005;9:9–21.
39. Kinane DF. Causas y patogenia de la enfermedad periodontal. *Periodontol 2000 (Ed Esp).* 2002;1:8–20.

40. Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2002;29(3):136–59. Disponible en: http://jcd.r.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2015&volume=9&issue=7&page=ZE06&issn=0973-709x&id=6210
41. Kolenbrander PE. ORAL MICROBIAL COMMUNITIES : Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:413–37.
42. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004;34:49–56.
43. Koseki T, Nishihara T. Origen microbiano de la periodontitis. *Periodontol 2000 (Ed Esp)*. 2005;11:14–26.
44. Socransky SS, Haffajee a D, Cugini M a, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25:134–44.
45. Huerta J, Gajardo M, Silva N, Gómez L, Palma P, Zillman G. Acción Fisiológica de las Bacteras. *Fisiología Bacteriana*. In: Huerta J, editor. *Manual de Laboratorio Microbiológico Clínico en Odontología*. 1ra. ed. Santiago de Chile: Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Departamento de Patología. Área de Microbiología.; 2010. p. 77–89.
46. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco C a. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*. 1999;20:168–238.
47. Díaz Zúñiga J, Yáñez Figueroa J, Melgar Rodríguez S, Álvarez Rivas C, Rojas Lagos C, Vernal Astudillo R. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev clínica periodoncia, Implantol y Rehab oral*. 2012;5(1):40–5.
48. Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol*. 1991;62(9):543–7.
49. Collins JR, Arredondo A, Roa A, Valdez Y, León R, Blanc V. Periodontal pathogens and tetracycline resistance genes in subgingival biofilm of periodontally healthy and diseased Dominican adults. *Clin Oral Investig*. 2015;
50. Dahlén G, Gmür R, Yoshino T. Phenotypes , serotypes and antibiotic susceptibility of Swedish *Porphyromonas gingivalis* isolates from periodontitis and periodontal abscesses. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:80–6.

51. Newman M, Takei H, Kokklevold P, Carranza F, Quirynen M, Teughels W, et al. Microbiología de las enfermedades periodontales. In: Cochran D, Kenney EB, Giannobile W, Novak J, editors. Periodontología Clínica. 10ma ed. St. Louis, Missouri: McGraw-Hill; 2006. p. 134–63.
52. Huerta J, Gajardo M, Silva N, Gómez L, Palma P, Zillman G. Medios de Cultivo. In: Huerta J, editor. Manual de Laboratorio Microbiológico Clínico en Odontología. 1ra ed. Santiago de Chile: Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Departamento de Patología. Área de Microbiología.; 2010. p. 42–52.
53. Kuboniwa M, Inaba H, Amano A. Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010;54:136–59.
54. Amano A. Host-parasite interactions in periodontitis: Microbial pathogenicity and innate immunity. *Periodontol 2000*. 2010;54:9–14.
55. Díaz L, Hoare A, Soto C, Bugueño I, Silva N, Dutzan N, et al. Changes in lipopolysaccharide profile of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates correlate with changes in colony morphology and polymyxin B resistance. *Anaerobe* [Internet]. 2015;33:25–32. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996415000104>
56. Aberg CH, Sjödin B, Lakio L, Pussinen PJ, Johansson A, Claesson R. Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in young individuals: a 16-year clinical and microbiological follow-up study. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2009;36:815–22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19678862>
57. Brigido J, da Silveira V, Rego R, Nogueira N. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal* [Internet]. 2014;19(2):e184–91. Disponible en: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv19_i2_p184.pdf
58. Jaramillo RD, Suárez P, Barraza B, Lara P, Teherán L, Escamilla, José EdgardoUárez PAS. *Eikenella corrodens*: Patogénesis y aspectos clínicos. *Colomb Med*. 2006;37(3):228–41.
59. Barco CT. Prevention of Infective Endocarditis: A Review of the Medical and Dental Literature. *J Periodontol*. 1991;62(8):510–23.
60. Mühlhause M. *Eikenella corrodens*. *Rev Chil Infectol*. 2013;30(2):163–4.
61. Citron DM. Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus *fusobacterium*. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2002;35(Suppl 1):S22–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12173104>

62. Ji S, Shin JE, Kim YC, Choi Y. Intracellular degradation of *Fusobacterium nucleatum* in human gingival epithelial cells. *Mol Cells*. 2010;30:519–26.
63. Xie H, Gibbons R, Hay D. Adhesive properties of strains of *Fusobacterium nucleatum* of the subspecies *nucleatum*, *vincentii* and *polymorphum*. *Oral Microbiol Immunol*. 1991;6:257–63.
64. Polak D, Shapira L, Weiss EI, Hourii-Haddad Y. The role of coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* on the host response to mixed infection. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2012;39:617–25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22607053>
65. Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: Bone loss and host response. *J Clin Periodontol*. 2009;36:406–10.
66. Saito A, Inagaki S, Kimizuka R, Okuda K, Hosaka Y, Nakagawa T, et al. *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2008;54:349–55. Disponible en: <http://femsim.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-695X.2008.00481.x>
67. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguilon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: Levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol*. 2008;35(November 2007):206–14.
68. Matesanz-Pérez P, García-Gargallo M, Figuero E, Bascones-Martínez A, Sanz M, Herrera D. A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2013;40:227–41. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcpe.12026>
69. Van Winkelhoff a J, Winkel E. Diagnóstico microbiológico en periodoncia: alcance biológico y validez clínica. *Periodontol 2000 (Ed Esp)*. 2006;14:40–52.
70. Lewis M. Chlorhexidine may be “The Gold Standard” in dentistry – but when and for what? *Br Dent Nurses J*. 2012;(Autum):20–2.
71. Sekino S, Ramberg P, N GU, Socransky S, The LJ. The effect of a chlorhexidine regimen on de novo plaque formation. 2004;609–14.

72. Breschi L, Visintini E, Vita F, Di R, Pashley D. Influence of Chlorhexidine Concentration on the Durability of Etch-and-Rinse Dentin Bonds: A 12-month. *J Adhes Dent.* 2009;11(3):191–8.
73. Santos S, Herrera D, López E, O'Connor A, González I, Sanz M. A randomized clinical trial on the short-term clinical and microbiological effects of the adjunctive use of a 0.05% chlorhexidine mouth rinse for patients in supportive periodontal care. *J Clin Periodontol.* 2004;31:45–51.
74. Kaner D, Bernimoulin J-P, Hopfenmüller W, Kleber B-M, Friendmann A. Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin / metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2007;34:880–91.
75. Heasman PA, Heasman L, Stacey F, McCracken GI. Local delivery of chlorhexidine gluconate (PerioChip TM) in periodontal maintenance patients. *J Clin Periodontol.* 2001;28:90–5.
76. Francetti L, Del Fabbro M, Basso M, Testori T, Taschieri S, Weinstein R. Chlorhexidine spray versus mouthwash in the control of dental plaque after implant surgery. *J Clin Periodontol.* 2004;31:857–62.
77. Cosyn J, Verelst K. An efficacy and safety analysis of a chlorhexidine chewing gum in young orthodontic patients. *J Clin Periodontol.* 2006;33:894–9.
78. Van Strydonck D, Timmerman MF, van Der Velden U, Van Der Weijden F. Clinical efficacy of a chlorhexidine-delivering toothbrush. *J Clin Periodontol.* 2008;35:584–90.
79. Heitz F, Heitz-Mayfield LJ a, Lang NP. Effects of post-surgical cleansing protocols on early plaque control in periodontal and/or periimplant wound healing. *J Clin Periodontol.* 2004;31:1012–8.
80. Van der Weijden GA, ten Heggeler J, Slot D, Rosema N, Van der Velden U. Parotid gland swelling following mouthrinse use. *Int J Dent Hyg.* 2010;8:276–9.
81. Van Maanen-Schakel N, Slot D, Bakker E, Van der Weijden G. The effect of an oxygenating agent on chlorhexidine-induced extrinsic tooth staining: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2012;198–208.

82. Miyasaki KT, Wilson ME, Reynolds HS, Genco RJ. Resistance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and differential susceptibility of oral *Haemophilus* species to the bactericidal effects of hydrogen peroxide. *Infect Immun* [Internet]. 1984;46(3):644–8. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=261590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Zubko EI, Zubko MK. Co-operative inhibitory effects of hydrogen peroxide and iodine against bacterial and yeast species. *BMC Res Notes* [Internet]. 2013;6:272. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856115>
84. Miyasaki KT, Genco RJ, Wilson ME. Antimicrobial properties of hydrogen peroxide and sodium bicarbonate individually and in combination against selected oral, gram-negative, facultative bacteria. *J Dent Res*. 1986;65:1142–8.
85. Afennich F, Slot DE, Hossainian N, Van Der Weijden G a. The effect of chlorhexidine mouthwash on the prevention of plaque and gingival inflammation: A systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2011;9:182–90.
86. Dona BL, Gründemann LJ, Steinfort J, Timmerman MF, van der Weijden G a. The inhibitory effect of combining chlorhexidine and hydrogen peroxide on 3-day plaque accumulation. *J Clin Periodontol*. 1998;25:879–83.
87. Grundemann LJ, Timmerman MF, Ijzerman Y, van der Weijden G a. Stain, plaque and gingivitis reduction by combining chlorhexidine and peroxyborate. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2000;27:9–15. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10674956>
88. Mirhadi H, Azar MR, Abbaszadegan A, Geramizadeh B, Torabi S, Rahsaz M. Cytotoxicity of chlorhexidine-hydrogen peroxide combination in different concentrations on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res*. 2011;90(6):0–4.
89. De Araujo D, Campos E, Bastos I, de Paula D, Tenório Junior E, de Araujo R. Mouthrinses: active ingredients, pharmacological properties and indications. *Rev Gaúcha Odontol*. 2012;60(3):349–57.
90. Sajadi F, Moradi M, Pardakthy A, Yazdizadeh R, Madani F. Effect of Fluoride, Chlorhexidine and Fluoride-chlorhexidine Mouthwashes on Salivary. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2015;9(1):49–52.
91. Subramaniam P, Nandan N. Effect of xylitol, sodium fluoride and triclosan containing mouth rinse on *Streptococcus mutans*. *Contemp Clin Dent* [Internet]. 2011;2(4):287–90. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3276854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

92. Yates RJ, Newcombe RG, Addy M. Dentine hypersensitivity: A randomised, double-blind placebo-controlled study of the efficacy of a fluoride-sensitive teeth mouthrinse. *J Clin Periodontol*. 2004;31:885–9.
93. Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Saxton C a, Cummins D. The effect of mouthrinses containing zinc and triclosan on plaque accumulation and development of gingivitis in a 3-week clinical test. *J Clin Periodontol* [Internet]. 1994;21:360–4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8783053>
94. Almerich JM, Cabedo B, Ortolá JC, Poblet J. Influence of alcohol in mouthwashes containing triclosan and zinc: an experimental gingivitis study. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005. p. 539–44.
95. Giertsen E, Scheie AA, Rolla G. In vivo Effects of Zinc and Chlorhexidine on Dental Plaque Ureolysis and Glycolysis. 1989;(Table 2).
96. Giertsen E, Scheie a a. Effects of mouthrinses with chlorhexidine and zinc ions combined with fluoride on the viability and glycolytic activity of dental plaque. *Eur J Oral Sci* [Internet]. 1995;103(9):306–12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521122>
97. Waizel-Bucay J, Martínez I. Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *RevADM*. 2011;LXVIII(2):73–88.
98. Vieira DRP, Amaral FMM, Maciel MCG, Nascimento Flávia FRF, Libério a. S. Plantas e constituintes químicos empregados em Odontologia: Revisão de estudos etnofarmacológicos e de avaliação da atividade antimicrobiana in vitro em patógenos orais. *Rev Bras Plantas Med*. 2014;16(1):135–67.
99. Huerta J, Gajardo M, Silva N, Gómez L, Palma P, Zillman G. Siembra Bacteriana. In: Huerta J, editor. *Manual de Laboratorio Microbiológico Clínico en Odontología*. 1ra. ed. Santiago de Chile: Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Departamento de Patología. Área de Microbiología.; 2010. p. 53–63.
100. Huerta J, Gajardo M, Silva N, Gómez L, Palma P, Zillman G. Crecimiento Bacteriano y Desarrollo Bacteriano. En: Huerta J, editor. *Manual de Laboratorio Microbiológico Clínico en Odontología*. 1ra. ed. Santiago de Chile: Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Departamento de Patología. Área de Microbiología.; 2010. p. 69–76.
101. Rodríguez García JA, Cantón R, Gomez-Lus ML, Rodríguez-Avial C, Vila J. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Picazo JJ, editor. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2000. p. 1–39.

102. Ministerio de Salud. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán.” Buenos Aires, Argentina.; 2001 p. 1–69.
103. Rodríguez García JA, Cantón R, Gomez-Lus ML, Rodríguez-Avial C, Vila J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Picazo EJJ, editor. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2000 p. 1–54.

Anexos



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA MADRE Y MAESTRA
VICERRECTORÍA DE POSTGRADO
Unidad de Investigación**

POSTULACIÓN DE TEMAS PARA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FINAL

Programa: Maestría Periodoncia e Implantología Oral

Postulantes

Nombre	Matrícula	Email	Firma
Johannes Olsen Cruz	2013-6183	olsencruz@gmail.com	

Título de la investigación:

Prueba de sensibilidad bacteriana de periodontopatógenos frente a clorhexidinas al 0.12% y clorhexidina al 0.15% combinada con peróxido de hidrógeno y *Caesalpinia coriaria*.

Breve explicación sobre en qué consistirá la investigación:

Se pretende realizar pruebas de sensibilidad en cultivos de los patógenos periodontales conocidos como los más virulentos de la enfermedad periodontal, frente a los distintos enjuagues de clorhexidina al 0.12% que se comercializan en el mercado dominicano y usando una combinación que existe en el mercado de clorhexidina al 0.15% más peróxido de hidrógeno y extracto de fluido de *Caesalpinia coriaria* (Guatapaná). El fin es poder determinar de manera *in-vitro* si todos tienen la misma efectividad o si existe alguno que sea de mayor eficacia.

Periodo académico: Enero-Abril 2015

Asesor sugerido: Dra. Aimée Cuesta

Para uso de la Unidad de Investigación y la Coordinación del Programa

Tema aprobado

Tema aprobado, sujeto a las observaciones indicadas en el dorso

Asesor asignado:

Tema rechazado. Justificación:

Coordinador del Programa

Unidad de Investigación:



Nº 276

ANT.: Carta PUCMM, 09.04.2015

MAT.: Estadía alumno PUCMM en
Laboratorio de Microbiología

Santiago, 29 de mayo de 2015

Señor
Dr. James Collins
Coordinador Maestría Periodoncia
Facultad de Odontología
Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra
República Dominicana

Estimado Dr. Collins:

Tengo el agrado de informar a usted que en el marco del Convenio suscrito entre nuestra Facultad y la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra de República Dominicana, se ha aprobado la estadía del Dr. Johannes Olsen en el Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, bajo la responsabilidad de la Dra. Patricia Palma Fluxá.

Esta solicitud se basa en el proyecto de investigación "*Prueba de sensibilidad bacteriana de periodonto-patógenos frente a clorhexidinas al 0,12% y clorhexidina al 0,15% combinado con peróxido de hidrógeno y extracto de caesalpinia coriaria*" que están realizando en la PUCM.

Esta estadía será sin costo para el Dr. Olsen. Los costos de pasajes, estadía y alimentación deberán ser cubiertos por el estudiante.

Solicito informar al suscrito las fechas en que el Dr. Olsen realizará la estadía, para comunicarlo a quienes corresponda.

La saluda atentamente,

DR. JORGE GAMONAL ARAVENA
DECANO



C.c.
1.- Archivo
JGA efv.



Santiago, 25 de mayo de 2015

DPMP: N° 59/15

Señor Profesor
Dr. Jorge Gamonal Aravena
Decano
Facultad de Odontología
Presente

Estimado Sr. Decano:

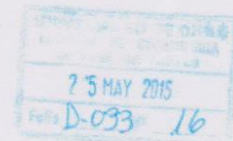
En respuesta a su carta N° 198/15, presentamos a usted las excusas por el retraso a la carta enviada por el Dr. James Collins, Coordinador de la Maestría en Periodoncia de la Universidad Católica Madre y Maestra de República Dominicana; la Dra. Patricia Palma Fluxá, está dispuesta a colaborar con el estudio y brindar toda la ayuda que sea necesaria.

Le saluda cordialmente,

Dra. Denisse Bravo Rodríguez
Directora Interina
Departamento de Patología y Medicina Oral



C.c.: archivo



C-5968



**CERTIFICADO
DE
VALIDACION
UNIVERSIDAD DE CHILE**

SANTIAGO

EQUIPO : CABINA DE FLUJO LAMINAR
MARCA : FACTOMET
MODELO : V24301
SERIE : A02850888
SECCION : FAC. DE ODONTOLOGIA
LAB. DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO

USUARIO : SRA. LEYLA GOMEZ

FECHA : MAYO 26 DE 2015



Doctor Pedro Lautaro Ferrer 3112 - Providencia - fono: 2434 0600 - fax: 2209 5689
contacto@filtromet.cl - www.filtromet.cl



Nº de Muestra: 37

Nº Muestras: 1

**CONTROL BIOLÓGICO DE ESTERILIZADORES
AUTOCLAVE**

Procedencia: Laboratorio Microbiología Fac. Odontología U. de Chile.

Examen solicitado por: Daniela Salinas

Fecha de recepción: 25/06/2015

Fecha de rótulo: 25/06/2015

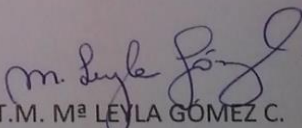
Fecha de entrega: 26/06/2015

Resultado: Negativo

Conclusión:

Sugerencias: **Solicito controles semanales.**

Santiago, junio 26 de 2015


T.M. Mª LEYLA GÓMEZ C.
Profesora Asistente
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA



Importadora y distribuidora de equipos y artículos para laboratorio
 Jose Manuel Borgoño n° 2736 – Santiago – Chile- Fono 6418465

Informe Técnico

Cliete	Universidad de Chile.	Equipo	Micro pipeta
Contacto	Yenny Inostroza.	Marca	Accumax.
Dirección	Sergio Livingstone N° 943.-	Modelo	p20
Ciudad	Santiago.	Serie	GI193330.
Fono	29785058.	Cod. Int.	-
Fecha de Trabajo	13-03-2014.-	Fecha Ent. Inf.	14-03-2014.-

A la micropipeta se le realizan las siguientes tareas:

Desmontaje completo:	*Cambio de sellos (O-Rings)
Limpieza:	*Limpieza interna y externa
Descontaminación	*A base de alcohol isopropilico
Lubricación	*A base de grasa vegetal
Calibración	*Con ambiente controlado a 20°C *Pesada con microbalanza *Pruebas con agua destilada a 20°C

La calibración se efectúa tomando 5 pesadas en su volumen mínimo, medio y máximo, estando en todos los parámetros dentro de lo establecido por el fabricante y la norma ISO8655

	2	10	20
E%	Menor a 3.0%	Menor a 1.0%	Menor a 0.8%
Precisión	Menor a 1.5%	Menor a 0.5%	Menor a 0.3%

Servicio de Mantención y calibración, ejecutado:

- Desmontaje completo de micropipeta.
- Limpieza.
- Descontaminación.
- Lubricación.
- Calibración.
- Se recuerda que en la succion y descarga el movimiento del motor debe ser lento, para evitar que salte parte de la muestra en el interior de la punta.

Jorge García
 Técnico Electrónico
 TCL Ltda.



Importadora y distribuidora de equipos y artículos para laboratorio
 José Manuel Borgoño n° 2736 – Santiago – Chile- Fono6418465

Informe Técnico

Cliente	Universidad de Chile	Equipo	Micro pipeta
Contacto	Yenny Inostroza.	Marca	Gilson
Dirección	Sergio Livingstone N° 943.	Modelo	P200
Ciudad	Santiago.	Serie	H8516640.
Fono	29785058.	Cod. Int.	
Fecha de Trabajo	13-03-2014.-	Fecha Ent. Inf.	14-03-2014.-

A la micropipeta se le realizan las siguientes tareas:

Desmontaje completo:	*Cambio de sellos (O-Rings)
Limpieza:	*Limpieza interna y externa
Descontaminación	*A base de alcohol isopropílico
Lubricación	*A base de grasa vegetal
Calibración	*Con ambiente controlado a 20°C *Pesada con microbalanza *Pruebas con agua destilada a 20°C

La calibración se efectúa tomando 5 pesadas en su volumen mínimo, medio y máximo, estando en todos los parámetros dentro de lo establecido por el fabricante y la norma ISO8655

	10	100	200
E%	Menor a 0.6%	Menor a 0.6%	Menor a 0.5%
CV%	Menor a 1.2%	Menor a 0.5%	Menor a 0.4%

Servicio de Mantenimiento y calibración, ejecutado:

- Desmontaje completo de micropipeta.
- Limpieza.
- Descontaminación.
- Lubricación.
- Calibración.
- Se recuerda que en la succion y descarga el movimiento del motor debe ser lento, para evitar que salte parte de la muestra en el interior de la punta.

Jorge García
Técnico Electrónico
TCL Ltda.



Importadora y distribuidora de equipos y artículos para laboratorio
 Jose Manuel Borgoño n° 2736 – Santiago – Chile- Fono6418465

Informe Técnico

Cliente	Universidad de Chile.	Equipo	Micro pipeta
Contacto	Yenny Inostroza.	Marca	Labnet
Dirección	Sergio Livingstone N° 943.	Modelo	P1000
Ciudad	Santiago.	Serie	140762062.
Fono	29785058.	Cód. Int.	
Fecha de Trabajo	13-03-2014.-	Fecha Ent. Inf.	18-03-2014.-

A la micropipeta se le realizan las siguientes tareas:

- Desmontaje completo:** *Cambio de sellos (O-Rings)
- Limpieza:** *Limpieza interna y externa
- Descontaminación** *A base de alcohol isopropilico
- Lubricación** *A base de grasa vegetal
- Calibración** *Con ambiente controlado a 20°C
 *Pesada con microbalanza
 *Pruebas con agua destilada a 20°C

La calibración se efectúa tomando 5 pesadas en su volumen mínimo, medio y máximo, estando en todos los parámetros dentro de lo establecido por el fabricante y la norma ISO8655

	100	500	1000
E%	Menor a 0.9%	Menor a 0.7%	Menor a 0.6%
Precisión	Menor a 0.4%	Menor a 0.2%	Menor a 0.15%

Servicio de Mantención y calibración, ejecutado:

- Desmontaje completo de micropipeta.
- Limpieza.
- Descontaminación.
- Lubricación.
- Calibración.
- Se recuerda que en la supcion y descarga el movimiento del motor debe ser lento, para evitar que salte parte de la muestra en el interior de la punta.

Jorge García
Técnico Electrónico
TCL Ltda.

Fotos Ensayo de Dilución

Anexo 9. Memoria fotográfica.



Plaqueado de Agar-Sangre con el enjuague añadido. Fuente: Propia de los autores

Anexo 10. Memoria fotográfica



Placas con medio de cultivo con enjuagues añadidos. Fuente: Propia de los autores

Anexo 11. Memoria fotográfica



Ejemplo de crecimiento bacteriano en placa (Ctrl -) luego de siembra en césped de P. gingivalis

Anexo 12. Memoria fotográfica



Ejemplo de inhibición de crecimiento bacteriano en placa (Ctrl +) luego de siembra en césped de P. gingivalis

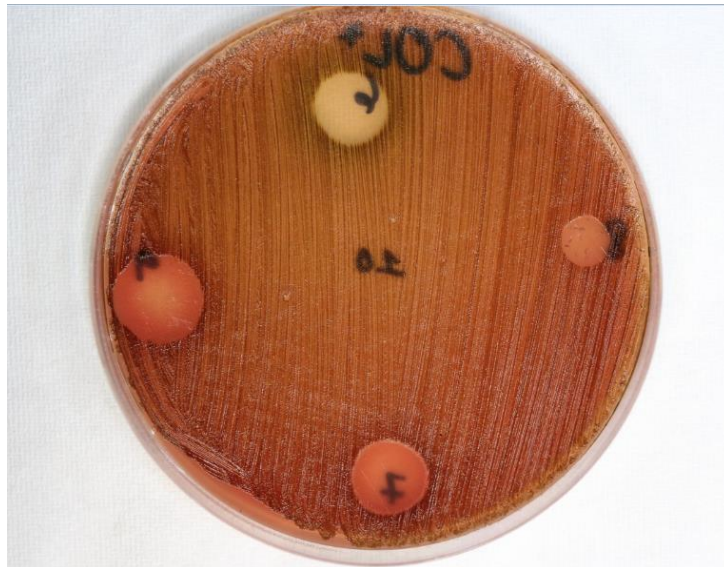
Fotos Ensayo de Difusión

Anexo 13. Memoria fotográfica



Zonas de inhibición bacteriana por las distintas clorhexidinas (1-5) sobre *P. gingivalis*

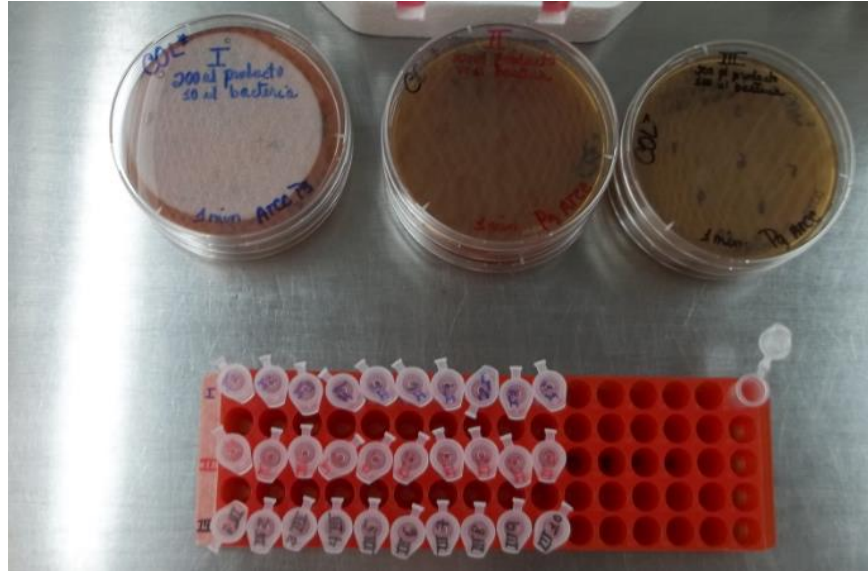
Anexo 14. Memoria fotográfica



Zonas de inhibición bacteriana por las distintas clorhexidinas y (Ctrl -) (6-10) sobre *P. gingivalis*

Fotos de Ensayo de Contacto o *Short Interval Kill Test*

Anexo 15. Memoria fotográfica



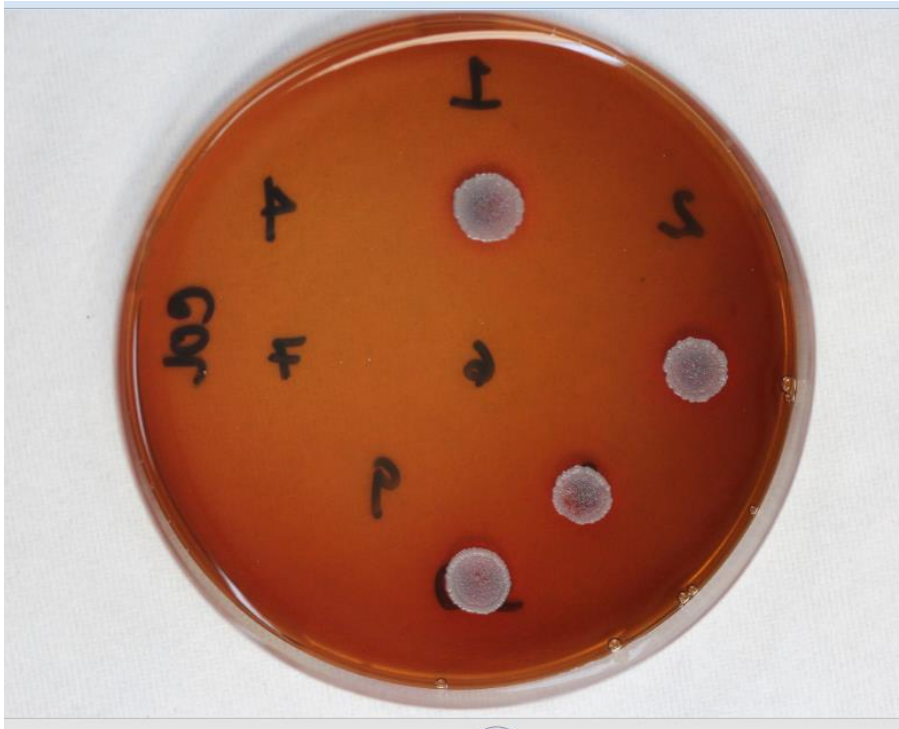
Alicuotas de enjuagues en tubos eppendorf y placas rotuladas previo al inicio del ensayo.

Anexo 16. Memoria fotográfica



Acercamiento de placa rotulada para ensayo SKIT de *E. corrodens* luego de realizado.

Anexo 17. Memoria fotográfica



Resultados luego de incubación de *E. corrodens* después de realizado el ensayo de SKIT