



TESIS DOCTORAL

**ACTIVIDAD ANTIPLACA Y ANTIMICROBIANA DEL
CHICLE Y DE LA MANZANA
¿UNA LEYENDA URBANA?**

Susana Rubido Montero

**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

**SANTIAGO DE COMPOSTELA
2015**



**ACTIVIDAD ANTIPLACA Y ANTIMICROBIANA DEL
CHICLE Y DE LA MANZANA
¿UNA LEYENDA URBANA?**

Susana Rubido Montero

**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

**SANTIAGO DE COMPOSTELA
2015**



Dra. Lucía García-Caballero Pérez, profesora asociada del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

Dr. Jacobo Limeres Posse, profesor contratado doctor del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

Dra. María Teresa Abeleira Pazos, profesora asociada del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada “ACTIVIDAD ANTIPLACA Y ANTIMICROBIANA DEL CHICLE Y DE LA MANZANA ¿UNA LEYENDA URBANA?” presentada por la Licenciada en Biología Dña. Susana Rubido Montero

Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y como Directores de la misma consideran que no incurre en causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Dra. L. García-Caballero

Dr. J. Limeres

Dr. M.T. Abeleira

Dña. Susana Rubido

Santiago de Compostela, septiembre de 2015



Agradecimientos

La elaboración de esta Tesis Doctoral no sólo es el fruto del esfuerzo personal sino también del colectivo. Por este motivo, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra han sido partícipes de este trabajo.

Mi mayor reconocimiento se lo debo a mis directores de tesis. A las Dras. Lucía García-Caballero Pérez y María Teresa Abeleira Pazos, vuestro trato cercano así como la confianza depositada en mí han sido claves para el buen desarrollo de esta tesis. Al Prof. Jacobo Limeres Posse, ha sido un privilegio contar con tu ayuda, tu tiempo, tu paciencia y tu dedicación.

Mi reconocimiento a mis compañeros de la Unidad de Pacientes Especiales, por vuestro apoyo durante la realización de este proyecto y por facilitarme lo máximo posible mi completa dedicación al mismo. A la Dra. Marta García García y al Dr. Francisco Ascanio Baso, gracias por vuestra ayuda y dedicación y al Prof. Pedro Diz Dios, por su enorme implicación.

A Carmen Cadarso y a Isabel Martínez, de la Unidad de Estadística.

No quiero olvidarme del Prof. Tomás García-Caballero Parada. Sin su preciado material me hubiese sido más difícil llevar a cabo esta labor de investigación.

A los voluntarios por su colaboración y buena disposición.

A mis padres y a mi hermana, que me han brindado su apoyo en todas las etapas de mi vida, tanto en el ámbito personal como en el profesional y, sin el cual, no hubiese sido posible lograr mis objetivos.

Y, por supuesto, a Álex. Gracias por tu comprensión y por transmitirme la tranquilidad y el optimismo del que carezco en algunos momentos.



RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad antiplaca/antibacteriana de actividades cotidianas como masticar un chicle y una manzana.

Para ello se seleccionó un grupo de 20 voluntarios adultos sanos, estudiantes de Odontología en la Universidad de Santiago de Compostela. La presencia de placa sobre las superficies dentales se determinó mediante el Índice de Placa de Quigley-Hein modificado por Turesky. La actividad antibacteriana de los productos testados, se analizó evaluando la vitalidad de las bacterias salivales mediante una técnica de microscopía de epifluorescencia.

Cada voluntario se sometió a 5 experimentos diferentes: cepillado dental manual, masticación de un chicle placebo, masticación de un chicle con xilitol, masticación simultánea de 3 chicles con xilitol y masticación de una manzana. El diseño del estudio correspondió a un sistema de aleatorización equilibrada para determinar el orden en que se realizaron los experimentos, estableciendo un período de lavado de 2 semanas entre experimentos. En cada uno de estos 5 experimentos se realizó un control de placa y de la vitalidad bacteriana en 3 momentos: en condiciones basales, inmediatamente después de realizar la técnica de remoción y a las 24 horas de finalizar dicha remoción.

La eficacia clínica antiplaca de un chicle edulcorado con xilitol resultó similar a la del chicle placebo, e inferior a la de un cepillado convencional. No observamos diferencias en el recrecimiento macroscópico de la placa a las 24 horas entre el chicle placebo y el de xilitol. Por el contrario, la eficacia antibacteriana de un chicle con xilitol evaluada en términos de vitalidad bacteriana en muestras de saliva fue significativamente superior a la del chicle placebo y a la del cepillado convencional, pero su efecto se neutraliza en menos de 24 horas. Al masticar la manzana aumenta de forma inmediata la superficie dentaria recubierta por la placa, aunque su distribución macroscópica se regulariza en menos de 24 horas. Esta actividad no conlleva variaciones inmediatas de vitalidad bacteriana en muestras de saliva con respecto al cepillado pero, paradójicamente, tras un período de recrecimiento de 24 horas, el número de bacterias vivas fue mayor al detectado después de un cepillado convencional.

Palabras clave: xilitol, chicle, manzana, placa dental, vitalidad bacteriana.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. RECUERDO HISTÓRICO.....	1
1.2. PLACA DENTAL O BIOFILM DENTAL.....	1
1.3. REMOCIÓN MECÁNICA DE LA PLACA DENTAL.....	3
1.4. REMOCIÓN MECÁNICA DE LA PLACA DENTAL TRAS MASTICAR CHICLE.....	5
1.4.1. Historia del chicle.....	5
1.4.2. Composición del chicle.....	6
1.4.3. Eficacia de la remoción de placa dental.....	7
1.5 REMOCIÓN MECÁNICA DE LA PLACA DENTAL TRAS MASTICAR UNA MANZANA.....	9
1.6. CONTROL QUÍMICO DE LA PLACA DENTAL.....	11
1.6.1. Clorhexidina.....	12
1.6.2. Aceites esenciales.....	14
1.6.3. Triclosán.....	14
1.6.4. Hexetidina.....	15
1.6.5. Compuestos de amonio cuaternario.....	15
1.6.6. Delmopinol.....	16
1.6.7. Sanguinaria.....	16
1.6.8. Sales de metales pesados.....	16
1.6.9. Sustitutivos del azúcar. Xilitol.....	17
1.6.9.1. Efecto del xilitol en los recuentos bacterianos de la placa dental.....	18
1.6.9.2. El xilitol y los polisacáridos extracelulares de <i>S. mutans</i>	20
1.7 CONTROL QUÍMICO DE LA PLACA DENTAL TRAS MASTICAR CHICLE.....	21
1.7.1. Chicles con clorhexidina.....	21
1.7.2. Chicles con otros principios activos experimentales.....	23
1.7.3. Chicles con azúcar y otros edulcorantes.....	25
1.7.4. Chicles con xilitol.....	27
1.7.4.1. Estudios a corto plazo del xilitol en el recrecimiento de la placa dental.....	27
1.7.4.2. Estudios a medio plazo del xilitol en el recrecimiento de la placa dental.....	28
1.7.4.3. Estudios a largo plazo del xilitol en el recrecimiento de la placa dental.....	29
1.7.4.4. Efecto del xilitol en la transmisión materno-filial de <i>S. mutans</i>	30
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	35
3. MATERIAL Y MÉTODOS	39
3.1. SELECCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO.....	39
3.2. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA PLACA DENTAL.....	39
3.3. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SALIVALES.....	41
3.4. DISEÑO Y TEMPORALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	42
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44

4. RESULTADOS	49
4.1. CUANTIFICACIÓN DE LA PLACA DENTAL.....	49
4.1.1. Determinación de la placa dental basal.....	49
4.1.2. Determinación de la placa dental inmediata.....	50
4.1.3. Determinación de la placa dental a las 24 horas.....	54
4.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN SALIVA.....	58
4.2.1. Vitalidad bacteriana basal.....	58
4.2.2. Vitalidad bacteriana inmediata.....	58
4.2.3. Vitalidad bacteriana a las 24 horas.....	60
5. DISCUSIÓN	65
5.1. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.....	65
5.1.1. Selección del grupo de estudio.....	65
5.1.2. Formación de la placa dental basal.....	66
5.1.3. Modelos de recrecimiento de placa dental a corto plazo.....	66
5.1.4. Selección del índice de placa.....	68
5.1.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana en la flora salival aplicando microscopía de epifluorescencia	71
5.2. PLACA DENTAL BASAL.....	73
5.3. CEPILLADO DENTAL.....	75
5.3.1. Remoción mecánica inmediata de la placa dental.....	75
5.3.2. Recrecimiento de la placa dental a las 24 horas.....	75
5.3.3. Vitalidad bacteriana inmediata en la saliva.....	76
5.4. MASTICACIÓN DE CHICLES.....	77
5.4.1. Remoción mecánica inmediata de la placa dental.....	77
5.4.2. Recrecimiento de la placa dental a las 24 horas.....	78
5.4.3. Vitalidad bacteriana inmediata en la saliva.....	81
5.4.4. Vitalidad bacteriana a las 24 horas en la saliva.....	84
5.5. MASTICACIÓN DE UNA MANZANA.....	86
5.5.1. Remoción mecánica de la placa dental.....	86
5.5.2. Vitalidad bacteriana en saliva.....	90
6. CONCLUSIONES	95
7. BIBLIOGRAFÍA	99



1. INTRODUCCIÓN



1.1. RECUERDO HISTÓRICO

El cuidado y mantenimiento de la higiene oral ha sido un objetivo para el hombre desde los albores de la civilización. El uso del “palo de mascar” (*chewing stick*) para la limpieza de la dentición es un ejemplo de una costumbre ancestral preislámica que continúa utilizándose en la actualidad en poblaciones de Oriente Medio. Aunque en el pasado el palo de mascar pudo haber sido utilizado con “polvo dental” y “extractos de rosas”, actualmente es usado como un cepillo, pero sin dentífrico (van der Weijden *et al*, 1998).

La mayoría de los historiadores remontan el desarrollo de los primeros cepillos de dientes (hechos con cerdas de porcinos) al 1498 d. C. en China, aunque hay pruebas de que los chinos usaron marfil, para los mangos de los cepillos, y cerdas hechas con el pelo de las crines de los caballos en el año 1000 d. C. El cepillo de cerdas fue reinventado entre finales del siglo XVIII y comienzos del XIX pero, debido al alto precio de las cerdas (de porcinos), su empleo no se generalizó hasta finales del siglo XIX. En la primera parte del siglo XX, en Estados Unidos, un único cepillo familiar era un utensilio común entre las familias más pobres. A finales de 1930, los filamentos de nylon comenzaron a reemplazar a las cerdas naturales y la madera y el plástico sustituyeron a los mangos de hueso. Estos nuevos cepillos fueron lo suficientemente económicos como para poder ser utilizados y estar al alcance de todos los estratos sociales (van der Weijden *et al*, 1998).

1.2. PLACA DENTAL O BIOFILM DENTAL

La Placa Dental (PD) o Biofilm Dental, también denominado “biopelícula”, es una comunidad microbiana compleja que crece adherida a la superficie del esmalte dentario

(Li *et al*, 2004). Es un consorcio estructurado de bacterias embebidas en una matriz extracelular de polímeros (polisacáridos, proteínas y ADN extracelular) de origen bacteriano y del propio huésped (Scheie, 1994; Hoiby *et al*, 2011). La comunicación (denominada “*Quorum Sensing*”) entre los microorganismos integrantes del biofilm se lleva a cabo por medio de moléculas; siendo algunas de éstas las que desencadenan la activación de genes asociados a factores de virulencia bacteriana (Hoiby *et al*, 2011).

La PD se considera un modelo especializado de biofilm microbiano (McHugh, 1999); a pesar de que muchas de las propiedades de la PD son comunes a las de cualquier otro biofilm existente en la naturaleza (Haffajee y Socransky, 2006; ten Cate, 2006). Debido a la compacta distribución de las bacterias que lo integran, lo convierte en uno de los nichos ecológicos más prometedores para analizar tanto el comportamiento como las características biológicas y fisiológica del biofilm (Slavkin, 1997).

Una vez formada, la PD se mantiene estable gracias a la Homeostasis Microbiana, que es el resultado de un balance dinámico en las interacciones microbianas de sinergismo y antagonismo (Sanders y Sanders, 1984).

La PD se caracteriza por ser uno de los biofilms más complejos que existen en la naturaleza, que puede provocar infecciones en la cavidad oral como caries y enfermedades periodontales (Xiao *et al*, 2012; Chau *et al*, 2014). Para prevenir su aparición, debe aplicarse profilaxis antibiótica o una terapia antimicrobiana agresiva en las fases iniciales de formación del biofilm. También puede ser tratado con terapia antibiótica supresiva crónica. Otras estrategias a aplicar podrían incluir el uso de compuestos que disuelvan la matriz del biofilm y/o inhibidores del *Quorum Sensing*; que aumenten la susceptibilidad del biofilm a los antibióticos (Hoiby *et al*, 2011).

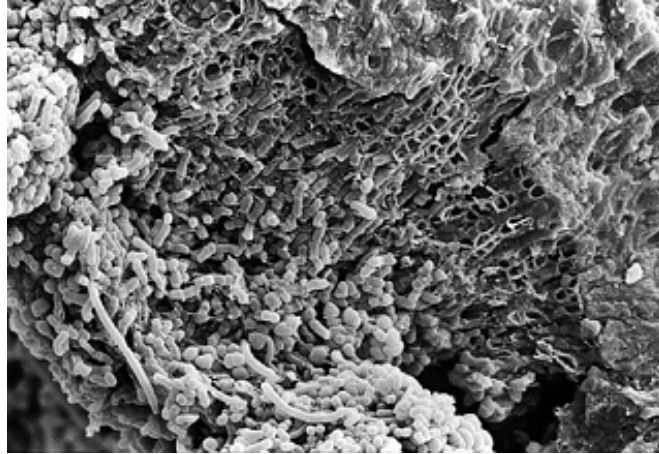


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido de una muestra de placa dental. Se observa el biofilm bacteriano creciendo sobre la superficie del diente. (Cortesía de wellcomeimages.org, referencia 0035).

1.3. REMOCIÓN MECÁNICA DE LA PLACA DENTAL

El objetivo de la remoción mecánica de la PD es mantener una cantidad de biofilm compatible con un nivel óptimo de salud oral, reduciendo el riesgo de desarrollar enfermedades causadas por un acúmulo excesivo (Marsh, 2012).

En la mayoría de la población, la remoción mecánica de la PD con un cepillo dental sigue siendo el principal método para lograr un buen mantenimiento de la higiene oral. El cepillado es efectivo cuando se realiza correctamente y durante el tiempo necesario. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes no se cumplen ninguno de estos requisitos (van der Weijden *et al*, 1998).

Durante las últimas décadas, se ha constatado una mejora en los hábitos de higiene oral en los países industrializados, estimándose entre el 80-90% el porcentaje de la población que se cepilla los dientes 1 ó 2 veces al día (Saxer y Yankell, 1997). Aunque se ha sugerido que un cepillado que elimine completamente la PD cada 24 horas podría resultar suficiente para mantener una adecuada higiene oral, la realidad es que habitualmente éste no se realiza de forma totalmente eficaz, por lo que se recomienda efectuar al menos 2 cepillados al día. La mayor cantidad de biofilm dental se elimina durante los primeros 60 segundos del cepillado, pero hay zonas menos accesibles, como los dientes posteriores y las superficies linguales anteriores, por lo que el grado de control de placa mejora cuando el tiempo de cepillado se prolonga hasta los 3 minutos (Pérez-Serrano *et al*, 2012).

En la literatura científica existe evidencia que permita confirmar la superioridad de un método de cepillado sobre los demás. En 1971, Hansen y Gjermo (Hansen y Gjermo, 1971) afirmaron que el método ideal de cepillado es el que permite una completa eliminación de la PD en el menor tiempo posible, y con una presión que no cause ninguna lesión en los tejidos. Las peculiaridades anatómicas y fisiológicas de la cavidad oral, la destreza psicomotriz de los sujetos y los aditamentos que se utilicen, determinarán en cada caso cuál debe ser el método ideal de cepillado (Gallego, 2009).

En general, el cepillo manual es más eficaz en las superficies vestibulares que en las linguales y palatinas, pero su eficacia es muy limitada en las interproximales (Pérez-Serrano *et al*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que en la mayor parte de los pacientes el uso del cepillo eléctrico puede mejorar el control de la PD. La mayoría de estudios que comparan los cepillos eléctricos con los manuales muestran una mayor eliminación de la placa supragingival con los eléctricos, especialmente en zonas de difícil acceso (Cuesta y Tejerina, 2009). Utilizado durante 2 minutos, el cepillo eléctrico elimina aproximadamente el 84% de la PD, y tras 6 minutos se logra retirar el 93%. Algunos autores afirman que un cepillado de 6 minutos realizado por un profesional con un cepillo manual, sólo elimina el 75% de la placa retirada por el eléctrico durante 1 minuto. Por lo tanto, el tiempo necesario para remover la PD es menor con los cepillos eléctricos que con los manuales (van der Weijden *et al*, 1993; 1996). Además, en prevención primaria, los cepillos eléctricos han demostrado una mayor reducción de PD que los cepillos manuales a corto y largo plazo (Cuesta y Tejerina, 2009).

Tradicionalmente la remoción mecánica diaria ha sido considerada el mejor sistema de eliminación de PD, sin embargo es frecuente que tras la misma persistan bacterias residuales. Esto es debido, en parte, a una inadecuada técnica de cepillado y/o al mal uso del hilo dental, especialmente en áreas de difícil acceso. Los métodos mecánicos requieren tiempo, motivación y destreza manual. Se ha comprobado que la motivación y el cumplimiento tienden a desaparecer con el paso del tiempo y por tanto, las técnicas mecánicas pueden no ser suficientes para controlar la PD. Estas limitaciones sugieren que podría ser necesaria la aplicación de otras medidas (métodos coadyuvantes de higiene oral), como el empleo de agentes químicos antimicrobianos (Enrile de Rojas y Buitrago, 2009).

1.4. REMOCIÓN MECÁNICA DE LA PLACA DENTAL TRAS MASTICAR CHICLE

1.4.1. Historia del chicle

Existen diversas referencias históricas de los inicios de lo que hoy conocemos como “chicle”. Los griegos endulzaban su aliento y limpiaban sus dientes mediante el uso de “mastique”, una resina de la corteza del arbusto *Pistacia lentiscus*. También se tiene constancia de que los antiguos mayas del Yucatán masticaban otra resina (denominada chicle) del árbol *Manilkara zapota* (comúnmente denominada Sapodilla) (Cloys *et al*, 1992), mientras que los indios de Norteamérica masticaron la savia de algunos árboles (*spruce*, en inglés) que pertenecen a la familia *Pinaceae*.

En 1848, la goma *Spruce* se convirtió en el primer chicle fabricado y comercializado en Estados Unidos bajo el nombre de “*State of Gum Spruce Gum Pure*”TM. Sin embargo, posteriormente fue reemplazado por parafina, que actualmente todavía se mastica en algunas regiones de Sudamérica. La primera patente conocida para un chicle fue presentada en 1869 por William Sample, un dentista de Mount Vernon, Ohio (Estados Unidos). Curiosamente, su objetivo inicial era su utilización como dentífrico (Cloys *et al*, 1992).

William Wrigley Jr. lanzó sus primeras gomas de mascar (Lotta y Vassar) en el año 1892, seguido de Juicy Fruit en 1893 y del chicle Wrigley’s Spearmint también en 1893. No sería hasta 1950 cuando se introdujeron los chicles sin azúcar, que incluían el sorbitol como sustituto del azúcar. La primera marca en comercializarlo fue HarveyTM, seguido de TridentTM y de CarefreeTM en 1975. Años más tarde, W. Wrigley Jr. introdujo el FreedentTM, una variante específicamente diseñada para portadores de dentaduras postizas (Cloys *et al*, 1992).

El consumo de chicles es un hábito que forma parte de la cultura americana y que se popularizó en Europa durante el transcurso de la II Guerra Mundial, al ser incluido en las raciones de los soldados del ejército americano (Imfeld, 1999). Masticar chicle es un hábito que realiza un elevado número de individuos en todo el mundo y su uso ha aumentado en el transcurso de la última década. Aunque no existen cifras exactas de la venta de chicles en todo el mundo, los datos disponibles en el año 1999, sugieren que el mercado del chicle a nivel mundial se estima en 560.000 toneladas por año, lo que representa aproximadamente 5 billones (US) de dólares anuales. Unos 374 billones de

chicles se venden en todo el mundo cada año, lo que representa 187 billones de horas de masticar chicle, si se estima que cada chicle se mastica durante aproximadamente 30 minutos (Imfeld, 1999).

1.4.2. Composición del chicle

Los chicles están compuestos por una goma base y por agentes edulcorantes, saborizantes y aromáticos. La goma base es una mezcla de elastómeros, resinas naturales y/o sintéticas, grasas, emulsionantes, ceras y anti-oxidantes. Actualmente, los elastómeros naturales han sido reemplazados por los sintéticos y su composición varía en función del formato (gragea o lámina) (Imfeld, 1999).

En base a los distintos ingredientes se pueden discernir dos categorías de productos, con diferentes beneficios potenciales. Por un lado están los chicles “divertidos y agradables”, con o sin azúcar; y por otro lado, los que se denominan “chicles terapéuticos o medicinales”, que afirman contener ingredientes saludables por una u otra razón (Imfeld, 1999).

En relación a estos últimos, el controlar la liberación del agente activo o fármaco es una de las principales preocupaciones en la producción de chicles medicinales o terapéuticos. Los principales determinantes en la liberación están relacionados con el consumidor (tiempo de masticado), el fármaco (solubilidad acuosa) y el proceso (composición del chicle). Las ventajas del chicle como vehículo portador de fármacos son obvias, ya que el chicle puede ser usado sin agua, en cualquier momento y lugar. Además, la estabilidad del producto es buena, porque los agentes terapéuticos incorporados están protegidos del oxígeno, de la luz y del agua. Masticar chicles medicinales puede producir tanto efectos locales como efectos sistémicos, una vez que los agentes activos son ingeridos o, preferiblemente, tras ser absorbidos en la mucosa oral. Este último punto resulta de especial interés en relación a la biodisponibilidad, ya que se evita el metabolismo del fármaco en el tracto gastrointestinal y en el hígado (Imfeld, 1999).

La masticación de chicles induce ciertos efectos potencialmente beneficiosos como el incremento de la tasa de flujo salival, que aumenta la capacidad de tamponamiento de la saliva y favorece el aclaramiento de los carbohidratos fermentables de la boca. Sin embargo, la presencia de azúcar en su composición puede contribuir al desarrollo de

caries, al provocar una disminución del pH de la PD (Imfeld, 1999). Debido a esto, se ha desarrollado un notable interés en las hipotéticas propiedades de prevención de caries que podrían tener los chicles sin azúcar. En este sentido, se ha confirmado que la estimulación salival que induce este tipo de goma de mascar promueve la remineralización de lesiones cariogénicas incipientes (Burt, 2006). Diversos ensayos clínicos han demostrado que el uso regular de chicles sin azúcar tras las comidas reduce significativamente el índice de caries, incluso en situaciones en las que la higiene oral mecánica no se puede llevar a cabo (Edgar, 1998; Imfeld, 1999; Hayes, 2002; Burt, 2006).

1.4.3. Eficacia de la remoción de placa dental

Se han descrito una serie de fuerzas fisiológicas naturales que limpian la cavidad oral, pero que resultan insuficientes para remover la PD en su totalidad. La lengua, durante sus movimientos, contacta con las superficies linguales de los dientes y, en menor medida, puede limpiar también las superficies vestibulares. Las mejillas cubren las superficies vestibulares de los dientes y por tanto, a través del roce, pueden ayudar a prevenir la acumulación de PD en estas zonas. El flujo salival tiene un potencial limitado para eliminar los restos de alimentos acumulados en los espacios interproximales y en los surcos y fosas oclusales, y es aún menos efectivo retirando la PD. Por tanto, estos mecanismos de defensa deben considerarse acciones superficiales en el control de la acumulación de placa en la cavidad oral (Cancro y Fischman, 1995). Sin embargo, se ha estudiado la posibilidad de que la masticación de chicle pudiese potenciar y/o actuar de forma sinérgica con estos mecanismos fisiológicos para lograr una remoción completa del biofilm dental.

La remoción de PD de las superficies dentales lisas derivada de la acción de masticar chicle es relativamente baja, no obstante se podría esperar un mayor efecto a nivel de las caras oclusales (Addy *et al*, 1982). Levinkind *et al* (Levinkind *et al*, 1999) estudiaron el efecto de masticar chicle en la remoción de placa establecida en las superficies oclusales y obtuvieron resultados equívocos y dependientes del centro de estudio. En el centro situado en Bristol, se constató una reducción de la presencia de placa en el grupo que masticó chicle frente al que no lo hizo. Por el contrario, en el grupo de pacientes estudiados en Berna no hallaron ninguna diferencia. Los autores

achacaron estos resultados tan dispares a posibles variaciones entre las poblaciones de estudio. Previamente, otros estudios concluyeron que masticar chicles sin azúcar tampoco ejerce ningún efecto sobre la remoción de la PD establecida (Bratthall, 1973; Ainamo *et al*, 1977; Imfeld, 1999). La remoción mecánica de la PD durante un único episodio de masticación de 20 minutos, no alcanzó ninguna diferencia destacable en los valores gravimétricos (peso fresco de la placa) obtenidos antes y después del masticado del chicle, y tampoco se vio influenciada por el uso de chicles azucarados o edulcorados (Mouton *et al*, 1975a). En relación con este aspecto, en un trabajo de Ainamo *et al* (Ainamo *et al*, 1977) se relacionó el consumo de chicles con azúcar (10 chicles en 3 horas) con un aumento significativo en el acúmulo del biofilm dental establecido. Sin embargo, el chicle edulcorado con sorbitol no indujo ningún efecto clínicamente significativo sobre la PD establecida. Esto concuerda con otros resultados previos en los que se constató que el chicle de sorbitol era incapaz de retirar la PD establecida, cuando son los chicles la única medida de higiene oral permitida (Bratthall, 1973). Los mismos autores demostraron posteriormente que masticar un chicle con xilitol cada 15 minutos, durante un período de 2,5 horas, tampoco reducía la placa establecida (Ainamo *et al*, 1979).

El único estudio contrario a estos hallazgos es el publicado por Addy *et al* (Addy *et al*, 1982). Estos autores afirmaron que la masticación de 2 chicles, con o sin azúcar, durante 1 hora reducía la PD establecida en muchas de las superficies de los dientes. Las zonas donde observaron una mayor reducción de la placa fueron en las caras linguales y palatinas, lo que podría relacionarse también con los mecanismos de remoción derivados de la actividad muscular y de la masticación de alimentos. También destacaron que la remoción de placa ocurrió principalmente en aquellas zonas alejadas del margen gingival y de las áreas interdenciales, que son precisamente las de mayor riesgo desde el punto de vista de la enfermedad periodontal y de la caries.

En la búsqueda de un chicle que durante la masticación favoreciese la remoción de PD de forma significativa, Kleber y Putt (Kleber y Putt, 1986) evaluaron el efecto de un chicle que contenía un 10% de un agente abrasivo, el silicato de zirconio. Seleccionaron a 34 niños que interrumpieron su higiene oral habitual durante 4 días, tras el cual masticaron el chicle que contenía el agente abrasivo o el chicle placebo. El chicle abrasivo redujo el área de placa en la región coronal de los dientes posteriores, así como

también el grosor de la placa. Por el contrario, el chicle placebo no provocó ningún efecto de reducción de la placa. Otro grupo de investigadores evaluó el efecto de un chicle con silicato de zirconio en su composición en un grupo de 20 voluntarios. Tras un período de 2 semanas durante el cual los voluntarios no realizaron medidas de higiene oral, fueron sometidos a un control de placa. Seguidamente masticaron el chicle durante 30 minutos y nuevamente se midió la cantidad de PD. Los autores observaron una reducción de placa del 19% (Anderson *et al*, 1990).

A la vista de todos estos estudios, se concluye que existe poca evidencia científica que confirme que masticar chicle resulte efectivo en la remoción de la PD de las superficies dentarias. El chicle *per se* no puede ser considerado un sustituto de las medidas de higiene oral mecánica tradicionales como ya afirmaron Mouton *et al* (Mouton *et al*, 1975a). Sin embargo, ciertos efectos beneficiosos de masticar chicle como la estimulación de saliva, la disolución de sustratos fermentables de la superficie de los dientes o la elevación del pH justifica que algunos autores recomienden consumir chicles sin azúcar en situaciones en las que no se puedan aplicar medidas de higiene oral mecánicas (Imfeld, 1999).

1.5. REMOCIÓN MECÁNICA DE LA PLACA DENTAL TRAS MASTICAR UNA MANZANA

La idea de finalizar una comida con un alimento duro o una fruta, ha sido clásicamente propuesta como una medida capaz de prevenir enfermedades orales como la caries o la enfermedad periodontal (Pickerill, 1912). Entre los alimentos duros, las manzanas han sido los más recomendados desde que se extendió la creencia de que “consumir manzanas frescas sin cocinar tiene una influencia regeneradora en los dientes y en las encías” (Pickerill, 1912). Es más, se aceptaba que consumir manzanas tras las comidas tenía un efecto de limpieza de los dientes. Esta fruta ha sido recomendada en programas de salud oral (Finlayson y Wilson, 1961) hasta convertirse, en cierta medida, en un símbolo de salud dental (Baker y Thomas, 1969). Esta creencia se fue ampliando y se sugirió que el uso de productos fibrosos y libres de carbohidratos, podría ser beneficioso en la limpieza de los dientes. Sin embargo, según constataron diversos autores, el hecho de masticar comida fibrosa durante 18 días no afectó a la cantidad de PD formada (Arnim, 1963; Bergenholtz *et al*, 1967). A su vez, Wade (Wade, 1971)

comprobó que la masticación de un cuarto de manzana no reducía la extensión de las áreas de PD en las caras vestibulares de los dientes antero-superiores. En este sentido, masticar una manzana entera tampoco logró ningún efecto en la eliminación de cantidades moderadas de placa presentes en niños (Birkeland y Jorkjend, 1974), confirmando los resultados obtenidos en adultos (Arnim, 1963; Bergenholtz *et al*, 1967; Lindhe y Wicén, 1969; Wade, 1971).

Posteriormente, en el año 1986, se llevó a cabo un estudio en población infantil en el que se evaluó la reducción de la PD tras masticar una manzana o un chicle. Todas las técnicas empleadas (cepillado supervisado, no supervisado, manzana y chicle) lograron reducciones significativas en el control de placa, siendo el de la manzana semejante al obtenido por el cepillado no supervisado. Sin embargo, ambas técnicas alcanzaron la mitad de la eficacia lograda con el cepillado supervisado (con instrucción individual y control del proceso) (Schneider y Knieknecht, 1986). En base a hallazgos como éste, algunos autores señalaron que las manzanas podrían proporcionar cierto grado de limpieza, salvo en aquellas zonas de difícil acceso, como las interdetales o las próximas al margen gingival (anónimo, 1977). Por otra parte, cabe destacar que, además del contenido en azúcar, las manzanas son un alimento muy ácido, lo que provoca que tras su ingesta se produzca un descenso notable del pH de la placa, con el potencial peligro para las superficies dentales (anónimo, 1977). En este sentido, Geddes *et al* (Geddes *et al*, 1977) llevaron a cabo una investigación experimental que demostró que consumir manzanas, cuando el pH de la placa estaba bajo tras una comida, no generaba un aumento del pH, con su correspondiente protección, sino que producía el efecto contrario.

En consecuencia, en base a estos estudios, no puede esperarse una limpieza completa y correcta de la dentición derivada de la masticación de cierto tipo de alimentos (Wilcox y Everett, 1963).

1.6. CONTROL QUÍMICO DE LA PLACA DENTAL

El control químico de la PD es una práctica cada vez más extendida en los países desarrollados. El objetivo del uso de agentes químicos es alterar los mecanismos de formación del biofilm dental, bien impidiendo su constitución, bien destruyendo el biofilm existente, o bien eliminando microorganismos individuales del interior del biofilm dental (Wilson y Pratten, 1999; Marsh, 2010). Los agentes más utilizados con esta finalidad son los antisépticos orales. Existen distintos principios activos utilizados en la actualidad: clorhexidina, aceites esenciales, triclosán, hexetidina, compuestos de amonio cuaternario, delmopinol, sanguinarina y sales de metales pesados.

La mayoría de las investigaciones sugieren que los enjuagues con colutorios pueden desempeñar un papel clave y de un valor significativo como coadyuvantes de los métodos mecánicos para la prevención y el tratamiento de determinadas enfermedades orales como la caries y la enfermedad periodontal. Un prerrequisito para que un agente antimicrobiano sea eficaz, es que todas las bacterias que integran el biofilm estén expuestas a una concentración adecuada de dicho agente durante un tiempo determinado, de manera que el biofilm se reduzca de forma clínicamente objetivable (von Ohle *et al*, 2010). Por lo tanto, su mecanismo de acción dependerá de la concentración y del tiempo de contacto con la población microbiana (Marsh, 2012). Además de esto, entre las propiedades ideales de un colutorio deberían estar: rapidez de acción, seguridad, eliminación de bacterias de la placa en áreas de difícil acceso, buen sabor, bajo coste y facilidad de uso (Enrile de Rojas y Buitrago, 2009). Para que además sea considerado un buen antiséptico, debe ser un producto que en contacto con los tejidos vivos destruya o inhiba la proliferación de los microorganismos patógenos sin lesionar las células del hospedador.

Las características mínimas que deben cumplir los agentes antimicrobianos para que puedan ser utilizados en el control de la PD son las siguientes (Pérez-Serrano *et al*, 2012):

- Especificidad: capacidad del agente antimicrobiano de actuar sobre un género/especie bacterianos determinados.
- Potencia: concentración mínima requerida para tener actividad antibacteriana.
- Seguridad: ausencia de efectos secundarios.

- Sustantividad: adherencia del agente antimicrobiano a las superficies de la cavidad bucal, que permita liberarse lentamente y permanecer activo en el tiempo, proporcionando un efecto antibacteriano sostenido en el tiempo.

1.6.1. Clorhexidina

Entre todos los principios activos, la clorhexidina (CHX) destaca por su elevada eficacia, demostrada en estudios microbiológicos y clínicos, que hace que sea considerada el antiséptico “*gold standard*” (McDonnell y Russell, 1999; von Ohle *et al*, 2010; Varoni *et al*, 2012). Es un antimicrobiano de amplio espectro con efecto antiplaca, aunque, debido a su mecanismo de acción, no es capaz de eliminar la placa ya formada. Químicamente, es una bisguanida catiónica, con una superficie cargada positivamente que permite su unión a las superficies cargadas negativamente, como dientes, tejidos blandos y bacterias (figura 2). Es un antimicrobiano del tipo membrana-activo ya que actúa sobre la membrana citoplasmática. Su mecanismo de acción se puede dividir en las siguientes fases (Enrile de Rojas y Buitrago, 2009):

Fase I. Atracción hacia la superficie bacteriana. La diferencia de carga eléctrica permite la unión entre las bacterias (cargadas negativamente) y las moléculas de CHX (cargadas positivamente).

Fase II. Alteración de la pared celular y unión con la membrana plasmática. Se produce una alteración de su permeabilidad que genera fugas de elementos citoplasmáticos de bajo peso molecular.

Fase III. Coagulación y precipitación del contenido citoplasmático. Finalmente se origina la muerte celular de la bacteria.

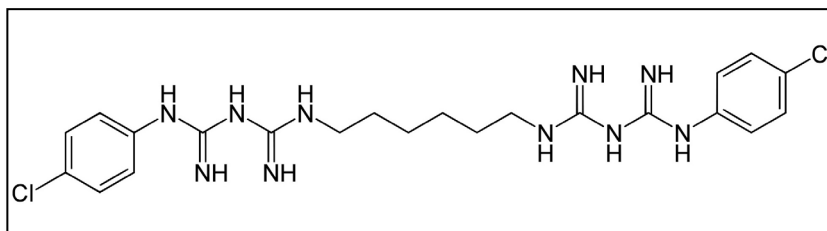


Figura 2. Estructura química de la clorhexidina.

El mecanismo de acción de la CHX es concentración-dependiente (Jenkins *et al*, 1988; Puig Silla *et al*, 2008). A bajas concentraciones (0,02-0,06%) tiene acción bacteriostática. Finalizada la Fase I, aumenta la permeabilidad de la membrana de la célula bacteriana (Fase II), provocando la fuga de componentes citoplasmáticos, desestabilizando el balance osmótico de la célula bacteriana y provocando la liberación de componentes de bajo peso molecular (Puig Silla *et al*, 2008). A altas concentraciones (0,12-0,2%) ejerce una acción bactericida. Se desencadena la alteración de la estructura proteica de la célula, ocasionando la precipitación/coagulación de las proteínas citoplasmáticas (Fase III) (Jenkins *et al*, 1988; Puig Silla *et al*, 2008).

Una de las principales propiedades de la CHX es su elevada sustentividad, asumida por la comunidad científica a raíz del trabajo publicado por Schiött *et al* en el año 1970 (Schiött *et al*, 1970). En este estudio se demostró que la sustentividad de la CHX persistía hasta 12-14 horas después de su aplicación. Posteriormente se constató que la concentración de CHX condiciona su sustentividad (a mayor concentración mayor sustentividad) (Cousido *et al*, 2010). El aumento de la sustentividad también se observa si se incrementa la duración del enjuague y, se ve sensiblemente disminuida si tras su aplicación se realizan actividades cotidianas como beber, comer o masticar chicle (Tomás *et al*, 2010).

Clínicamente el efecto bactericida de la CHX está influenciado por diversos factores. La administración de una mayor concentración (0,2% vs 0,12%) de CHX aumenta la acción bactericida de ésta (Cousido *et al*, 2010); y si se administra en forma de colutorio, el efecto antimicrobiano inmediato será superior a si se aplica en forma de gel o spray (García-Caballero *et al*, 2009).

Resultados de varios ensayos clínicos han corroborado la seguridad y eficacia de la CHX, al no provocar la aparición de microorganismos resistentes o el sobrecrecimiento de bacterias oportunistas y/o patógenas (Maynard *et al*, 1993; Grönross *et al*, 1995).

Aunque la CHX puede ser más eficaz que cualquier otro agente antiplaca, no está exenta de efectos secundarios que limitan su administración de forma generalizada. Los efectos adversos más comunes son la tinción o pigmentación de dientes, materiales de obturación, dorso lingual (Watts y Addy, 2001), y cálculo supragingival (Seymour *et al*, 1999). También se han descrito otros efectos adversos como disgeusia temporal (Helms *et al*, 1995) y descamación de la mucosa oral (Seymour *et al*, 1999).

1.6.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales poseen un amplio espectro de acción antimicrobiana, afectando a bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras. Los mecanismos bactericidas de los aceites esenciales implican la rotura de la pared celular y la inhibición enzimática, provocando la muerte bacteriana (Kubert *et al*, 1993). En este grupo se incluyen el fenol, el timol, el hexilresorcinol y el eucaliptol. Frente a otros agentes químicos tienen la ventaja de mantener su actividad en presencia de materia orgánica.

Como complemento al cepillado resultan eficaces en el control de la placa y prevención de la gingivitis, aunque su eficacia es menor que la de la CHX. La microflora oral no muestra ningún cambio en la susceptibilidad al antiséptico a lo largo del tiempo, sugiriendo que los aceites esenciales no fomentan la aparición de resistencias (Minah *et al*, 1989). Una ventaja de los aceites esenciales, en comparación con la CHX, es la ausencia de efectos secundarios a largo plazo (Charles *et al*, 2001). Entre sus potenciales efectos adversos destacan: la sensación de ardor en las mucosas (estomatodinia) y el gusto amargo (disgeusia) (Pérez-Serrano *et al*, 2012).

1.6.3. Triclosán

El triclosán es un agente antimicrobiano no iónico que presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana, particularmente frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (McDonell y Russel, 1999). A bajas concentraciones es bacteriostático, mientras que a altas concentraciones es bactericida (Escalada *et al*, 2005). Inicialmente fue incorporado como agente antimicrobiano en las formulaciones de los dentífricos y, posteriormente, en los colutorios (Enrile de Rojas y Buitrago, 2009).

El triclosán *per se* no tiene o tiene poca sustentividad aunque, su adherencia a los tejidos orales puede aumentarse si se combina con copolímeros de metoxietileno y ácido málico. En estudios realizados para evaluar la eficacia de productos que contenían triclosán en su composición, se observó que prevenía la formación de PD y el desarrollo de gingivitis, sin embargo, su efecto fue modesto en todos los casos (Davies *et al*, 2004).

Entre sus efectos adversos se incluyen: dolor y erosiones de la mucosa oral, mal sabor a sustancias que no lo poseen (cacogeusia) y tinciones dentales leves (Pérez-Serrano *et al*, 2012).

1.6.4. Hexetidina

Es un antiséptico de amplio espectro de actividad frente a Gram positivos, Gram negativos y levaduras, tanto *in vitro* como *in vivo* (Wile *et al*, 1986). Habitualmente, a una concentración del 0,1%, se emplea como colutorio para el tratamiento de infecciones locales y como complemento de la higiene oral. Su uso diario elimina bacterias patógenas, manteniendo las no patógenas con función protectora de la flora normal. Aunque la hexetidina muestra una actividad antimicrobiana *in vitro* similar a la de la CHX (Roberts y Addy, 1981), su sustentividad es marcadamente inferior. Clínicamente, los enjuagues de hexetidina tienden a ser menos efectivos que los enjuagues de CHX en términos de inhibición de placa y reducción de la inflamación gingival (Afennich *et al*, 2011). Debido a esta baja actividad antiplaca se ha propuesto su utilización en combinación con sales de zinc (Enrile de Rojas y Buitrago, 2009).

Entre sus efectos adversos destacan: alteraciones del gusto, enrojecimiento y quemazón de la mucosa oral, descamación epitelial, úlceras orales, erosiones en el esmalte y tinciones dentarias (Pérez-Serrano *et al*, 2012).

1.6.5. Compuestos de amonio cuaternario

Los representantes más destacados de este tipo de agentes son el cloruro de cetilpiridinio y el cloruro de benzalconio, que tienen una moderada actividad inhibitoria de placa. Actúan provocando la ruptura de la pared celular y alterando el citoplasma (Enrile de Rojas y Buitrago, 2009). El cloruro de cetilpiridinio es un agente de superficie catiónico ampliamente utilizado por sus propiedades antimicrobianas, ya que elimina rápidamente patógenos Gram positivos y levaduras. Aunque su actividad antibacteriana se ha comparado con la de la CHX, es menos efectivo en la inhibición de la placa y en la prevención de la gingivitis, y su sustentividad es limitada. Sin embargo, ha demostrado ser de gran utilidad en el tratamiento de la candidiasis orofaríngea (Pitten y Kramer, 2001).

Entre sus efectos adversos se han constatado tinciones dentarias, sensación de quemazón en la mucosa y aparición de úlceras (Pérez-Serrano *et al*, 2012). Las tinciones causadas por el cloruro de cetilpiridinio son similares a las inducidas por la CHX, aunque de menor severidad (Roberts y Addy, 1981).

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, el cloruro de cetilpiridinio se ha propuesto como agente activo alternativo en casos de intolerancia a la CHX en el tratamiento y prevención de enfermedades bacterianas y fúngicas de la cavidad orofaríngea (Pitten y Kramer, 2001).

1.6.6. Delmopinol

Es un amino-alcohol con acción antiplaca y antigingivitis. No es un antimicrobiano, ya que su mecanismo de acción consiste en interferir en la formación de la matriz de la placa bacteriana. El delmopinol reduce la adherencia de las bacterias a la superficie del diente, tanto de los colonizadores primarios como de los tardíos. Entre sus efectos indeseables se han descrito: tinción de dientes y lengua, sensación anestésica transitoria en el dorso lingual (Pérez-Serrano *et al*, 2012) y alteraciones del gusto (Lang *et al*, 1998).

1.6.7. Sanguinaria

La sanguinaria es un extracto alcaloide obtenido de la raíz de la planta *Sanguinaria canadensis*. Cuando es usada como adyuvante de la higiene oral mecánica presenta actividad inhibitoria de la placa. Se ha sugerido que su acción antibacteriana reduce de forma significativa los valores de la placa bacteriana e inflamación gingival, aunque su eficacia como agente antiplaca es inferior a la CHX (Paraskevas, 2005). No está exenta de efectos indeseables, como ligera sensación de quemazón transitoria y con la aparición de leucoplasias a largo plazo (Pérez-Serrano *et al*, 2012).

1.6.8. Sales de metales pesados

Algunos iones metálicos como zinc, cobre y estaño, principalmente sales de zinc y de estaño [fluoruro de estaño (II)], tienen cierta capacidad inhibitoria sobre la placa bacteriana a altas concentraciones, aunque su efecto no es tan intenso como el de la CHX (Eley, 1999).

El fluoruro de estaño (II), incorporado en dentífricos, es un agente terapéutico con una amplia gama de propiedades beneficiosas. Proporciona protección frente a la caries, bacterias patógenas, gingivitis, hipersensibilidad dental y el desarrollo de PD (Tinanoff, 1990; Miller *et al*, 1994; Beiswanger *et al*, 1995; Tinanoff, 1995; White, 1995; Williams *et al*, 1997; Gerlach *et al*, 1998). Sin embargo, su uso clínico está limitado por su sabor astringente y porque se ha constatado que también puede causar tinción en los dientes (White, 1995).

1.6.9. Sustitutos del azúcar. Xilitol

La flora comensal no cariogénica de la PD constituye el componente biótico de un ecosistema equilibrado, que es compatible con la salud dental. Los azúcares de la dieta, particularmente la sacarosa, y los sustitutivos azucarados son factores ambientales abióticos que pueden cambiar el delicado balance de un ecosistema hacia una microbiota más o menos cariogénica. La mayoría de los azúcares de la dieta son fermentados por los microorganismos del biofilm dental, lo que favorece el establecimiento de una microflora cariogénica, y contribuye a la virulencia bacteriana. Debido a esto, la industria alimentaria desde hace décadas ha incluido agentes alternativos a los azúcares en algunos alimentos. Los más utilizados son los “alcoholes de azúcar” (*sugar alcohols*), que son sustancias bajas en calorías. Químicamente son hidratos de carbono con grupos hidroxilo (OH), también denominados alcoholes o polioles. Los polioles más usados son el sorbitol y el xilitol (XLT). El sorbitol es un glucitol (molécula de 6 carbonos) derivado de la glucosa. En un 60% es tan dulce como la sacarosa y es más barato que el XLT (Burt, 2006). El XLT es un alcohol de azúcar de 5 carbonos con amplia presencia en la naturaleza (Burt, 2006; Deshpande y Jadad, 2008). Se obtiene comercialmente a partir de fuentes naturales (del abedul, el haya, la mazorca de maíz). También está presente en frutas y en algunos mamíferos, incluyendo el metabolismo humano, que produce varios gramos de XLT al día.

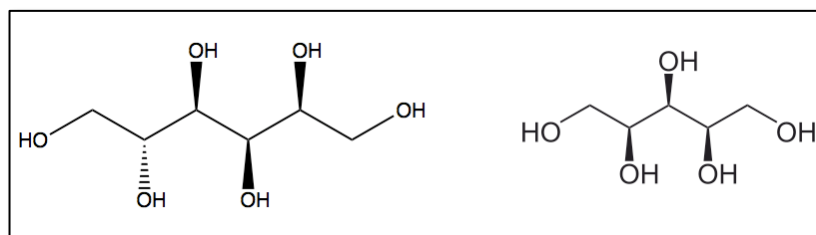


Figura 3. Estructura química del sorbitol (izquierda) y del xilitol (derecha).

El XLT promueve la mineralización del esmalte al aumentar el flujo salival. La característica única que presenta el XLT es que las bacterias orales prácticamente no pueden fermentarlo hacia productos finales ácidos y cariogénicos y contrarresta los bajos valores del pH de la cavidad oral (Havenaar *et al*, 1978; Trahan, 1995). Además, el XLT inhibe el crecimiento, el metabolismo, y la producción de polisacáridos de los *Streptococcus mutans*. Su consumo habitual también previene la transmisión madre-hijo de este tipo de bacterias (Isokangas *et al*, 2000; Söderling *et al*, 2000). Otro mecanismo de gran importancia en el descenso de los contajes y de la transmisión de los *Streptococcus mutans* inducido por el XLT, es la reducción de los polisacáridos insolubles extracelulares (Söderling, 2009).

Se piensa que las células bacterianas incorporan el XLT como xilitol-5-fosfato a través de la principal ruta de transporte de azúcares en los microorganismos, el sistema Fosfoenolpiruvato Fosfotransferasa. El xilitol-5-fosfato en el sistema anteriormente citado inhibe los enzimas glicolíticos del metabolismo del azúcar, lo que provoca la inhibición del crecimiento y de la producción de ácido (Trahan, 1995). Es más, la inhibición del crecimiento puede ocurrir como resultado de la generación del ciclo fútil del xilitol-5-fosfato, un proceso que consume energía y en el cual el xilitol-5-fosfato es desfosforilado y expulsado como XLT. Este proceso también puede ralentizar el crecimiento de los *Streptococcus mutans* (Trahan, 1995; Miyasawa-Hori *et al*, 2006).

1.6.9.1. Efecto del xilitol en los recuentos bacterianos de la placa dental

El XLT inhibe el crecimiento y metabolismo de varias especies bacterianas pero, entre las bacterias orales, los *Streptococcus mutans* parecen ser el organismo diana (Vadeboncoeur *et al*, 1983; Loesche *et al*, 1984; Bradshaw y Marsch, 1994). Algunas cepas de *S. mutans* son inhibidas por el XLT (*S. mutans*-sensibles al XLT), mientras que otras no (*S. mutans*-resistentes al XLT) (Trahan, 1995), y el grado de inhibición

puede variar entre cepas (Vadeboncoeur *et al*, 1983; Miyasawa-Hori *et al*, 2006; Söderling y Hietala-Lenkkeri, 2010).

Varios estudios llevados a cabo en población infantil demostraron que el consumo de XLT reduce los contajes salivales de *S. mutans* tras un período corto (Autio, 2002; Massoth *et al*, 2006) o largo de tiempo (Mäkinen *et al*, 2008; Campus *et al*, 2009; Duane, 2010). En este mismo colectivo también se han obtenido disminuciones en los recuentos de esta especie bacteriana en muestras de PD (Mäkinen *et al*, 2008; Seki *et al*, 2011). En adultos, el consumo de XLT, durante un corto (Simons *et al*, 1997; Caglar *et al*, 2007; Fraga *et al*, 2010; Bahador *et al*, 2012) o un largo (Haresaku *et al*, 2007) período de tiempo, también produjo disminuciones en los recuentos de *S. mutans* salivales, y en muestras de PD (Haresaku *et al*, 2007; Söderling *et al*, 2011).

El consumo habitual de XLT reduce los niveles en saliva de los *Streptococcus* cariogénicos: *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, sin afectar a los *Streptococcus* “beneficiosos”: *Streptococcus mitis* y *Streptococcus sanguinis* (Bahador *et al*, 2012).

Algunos estudios han intentado identificar la dosis más apropiada de XLT para obtener reducciones significativas de caries, sin inducir efectos secundarios o que estos sean limitados. Los estudios muestran un claro efecto dosis-respuesta del XLT en los niveles de *Streptococcus mutans* (Milgrom *et al*, 2006), sugiriendo que se precisa un consumo de entre 6-10 gramos de XLT por día, divididos en 3 o más tomas para conseguir el efecto antimicrobiano del XLT.

El mantenimiento a largo plazo de la supresión de patógenos cariogénicos puede ser factible combinando el XLT con otros productos disponibles comercialmente. Una terapia con enjuagues diarios de CHX al 0,12% durante 14 días seguida de 3 meses de masticación diaria de 3 chicles con XLT, obtuvo niveles de *S. mutans* sensiblemente más bajos que los logrados con terapias control sin chicle de XLT, comprobándose que masticar chicle con XLT prolonga el efecto de la CHX sobre los *S. mutans* orales (Hildebrandt y Sparks, 2000).

Sin embargo, los *Streptococcus mutans* constituyen un pequeño porcentaje del total de la flora oral, por lo que resulta llamativo que pocos estudios hayan evaluado los efectos del XLT en otras especies bacterianas presentes en la cavidad oral.

En varios trabajos se testó el efecto del XLT en los niveles de *Lactobacillus* salivales. La mayor parte de estas investigaciones coinciden en que, tras un corto período de tiempo consumiendo XLT, no se observan alteraciones en los niveles de esta especie bacteriana (Loesche *et al*, 1984; Simons *et al*, 1997; Caglar *et al*, 2007). Sin embargo, tras un consumo de 24 meses, Mäkinen *et al* (Mäkinen *et al*, 2008) observaron un efecto de retardo del crecimiento de estos microorganismos a largo plazo. Los resultados de Söderling *et al* (Söderling *et al*, 2011) refuerzan la idea de que el consumo de XLT no reduce los contajes de *Lactobacillus*. En un estudio piloto publicado en 2011, Söderling *et al* evaluaron el efecto del XLT sobre la flora oral. Sólo observaron disminuciones en los contajes de *S. mutans* de la placa. Los *S. mutans* y *Lactobacillus* salivales y otras 14 especies bacterianas de la PD analizadas no se vieron afectadas. En general, el consumo de XLT no afectó a la composición de la microbiota oral.

1.6.9.2. El xilitol y los polisacáridos extracelulares de *Streptococcus mutans*

Además de la inhibición del crecimiento, el efecto del XLT en los *Streptococcus mutans* se debe a la reducción de los polisacáridos extracelulares bacterianos (Söderling, 2009).

Los polisacáridos extracelulares tienen un papel fundamental en la adherencia bacteriana y en la posterior acumulación de la PD (Hardie y Bowden, 1975; Toda *et al*, 1987). Se ha sugerido en varios estudios que el XLT reduce la capacidad de adherencia de *S. mutans* (Tuompo *et al*, 1983; Birkhed, 1994; Tanzer, 1995; Trahan, 1995; Modesto y Drake, 2006; Lee *et al*, 2009) por un efecto en la expresión del gen *gtfB*, que es el encargado de controlar la producción de glucanos insolubles en la superficie de las células bacterianas. Este efecto del XLT provocaría cambios en la morfología de las colonias de *S. mutans*. Por tanto, la masticación a largo plazo de chicles que contienen XLT podría reducir el tamaño y el crecimiento de los *S. mutans*, e inducir cambios morfológicos como resultado de la expresión disminuida del gen *gtfB* (Lee *et al*, 2009).

El biofilm dental de los consumidores habituales de XLT parece contener menos polisacáridos insolubles, en comparación con el de los no consumidores (Mäkinen *et al*, 1985). Una posible explicación es que los *S. mutans* expuestos al consumo habitual de XLT *in vivo* tengan menor capacidad adhesiva, en comparación con los de los no consumidores. Además, el XLT puede reducir la síntesis de los polisacáridos

extracelulares *in vivo*, induciendo un cambio en la distribución de los *S. mutans* en la placa y la saliva. La hipótesis más plausible es que, debido a la débil unión de los *S. mutans* a la PD, éstos podrían ser liberados a la saliva durante la remoción mecánica de la misma (Söderling, 2009).

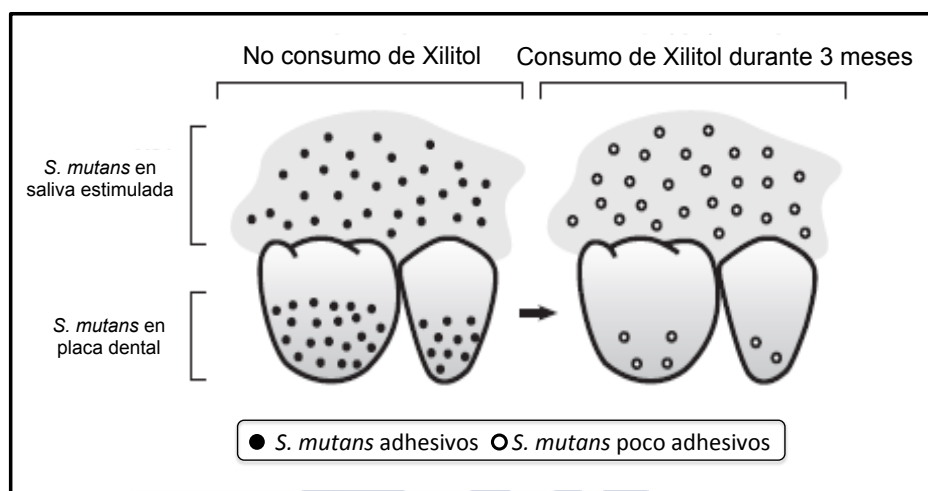


Figura 4. El efecto del consumo habitual de xilitol en los *S. mutans* basado en el descenso de recuentos bacterianos y en la disminución de la adhesividad (Söderling, 2009).

1.7. CONTROL QUÍMICO DE LA PLACA DENTAL TRAS MASTICAR CHICLE

El control mecánico de la PD supragingival es el método más efectivo para la prevención de la patología dental. Sin embargo, una gran cantidad de individuos refieren serias dificultades para conseguir establecer un régimen de higiene oral adecuado. Incluso en sujetos que llegan a alcanzar un alto nivel de limpieza bucal, el control de la placa se va deteriorando a lo largo del tiempo (Ciancio, 2003; Van der Weijden y Hioe, 2005). Por ello, al igual que ocurre con los colutorios, geles y pastas, se ha investigado la incorporación de distintos compuestos antimicrobianos en las fórmulas de los chicles para conseguir un efecto antiplaca.

1.7.1. Chicles con clorhexidina

El efecto antiplaca de la CHX, cuando es incorporada a la formulación de una pasta dentífrica, no es tan eficaz como si es usada en colutorio (Bassiouny y Grant, 1975; Johansen *et al*, 1975; Usher, 1975). Esta diferencia puede deberse a que la pasta libere menos CHX que el enjuague y a que la pasta ejerce su efecto fundamentalmente en

aquellas superficies dentales sobre las que es aplicada (Ainamo y Etemadzadeh, 1987). También se ha sugerido que la CHX es menos efectiva removiendo la PD que previniendo su formación. En uno de los primeros estudios en los que se evaluó el uso oral de la CHX se observó que, al enjuagarse 2 veces al día con CHX al 0,2%, se inhibía la formación de PD, sin embargo, se necesitaban múltiples enjuagues (6 en 1 hora) para remover la placa ya establecida (Løe y Schiött, 1970). En trabajos posteriores se demostró que enjuagarse 2 veces al día con CHX al 0,12% provocaba una mejora destacable de la salud gingival, a pesar de la presencia de placa, cálculo y gingivitis (Corbet *et al*, 1997). En el estudio de Persson *et al* (Persson *et al*, 1991), cuyos sujetos presentaban altos niveles de placa en condiciones basales, el enjuague con CHX redujo significativamente los contajes de lactobacilos, cándidas y *Streptococcus mutans*, así como los índices de placa y gingivales. En otras investigaciones se demostró que los sprays y las pastillas de CHX reducían de forma significativa, tanto la placa establecida como la gingivitis (Kalaga *et al*, 1989; Kaufman *et al*, 1989; Burtner *et al*, 1991).

El chicle puede ser utilizado como un vehículo de liberación de agentes preventivos o terapéuticos como la CHX (Ainamo y Etemadzadeh, 1987; Ainamo *et al*, 1990; Smith *et al*, 1996), permitiendo alcanzar una cantidad suficiente de CHX en boca para conseguir un efecto antiplaca. La ventaja del chicle es que permanece más tiempo en la boca que la pasta dentífrica. De esta forma, si el agente activo incluido en el chicle se libera correctamente a la saliva, podría mantenerse el tiempo suficiente en la cavidad oral (Rölla *et al* 1970; Bonesvoll *et al* 1974). Se estima que la liberación *in vivo* del acetato de CHX de un chicle (5 mg CHX/chicle) es del 35%, tras masticarlo 5 minutos, y del 68%, tras 15 minutos (Ainamo y Etemadzadeh, 1987).

Los resultados obtenidos en varios estudios a corto plazo avalan el efecto antiplaca de los chicles con CHX en ausencia de otras medidas de higiene oral mecánicas (Ainamo y Etemadzadeh, 1987; Tellefsen *et al*, 1996; Simons *et al*, 1999; Kolahi *et al*, 2008). En un trabajo publicado en 1987, se comprobó que el consumo diario de 50 mg de CHX en chicles inhibía completamente el crecimiento de la placa (Ainamo y Etemadzadeh, 1987). La CHX en chicles, en una dosis diaria de 20 mg, puede inhibir la placa mostrando un efecto equivalente al de enjuagarse 2 veces al día con 10 mL de CHX al 0,2%. Sin embargo, con dosis más bajas (16, 12 y 10 mg/día) la formación de placa puede aumentar (Ainamo *et al*, 1990).

En la literatura encontramos estudios que afirman que los chicles con CHX resultan más efectivos inhibiendo la formación de PD que los chicles edulcorados, e incluso que presentan un efecto mayor que las propias medidas de higiene oral mecánicas llevadas a cabo por voluntarios (Tellefsen *et al*, 1996; Simons *et al*, 1999). Los resultados de estos estudios sugieren que los chicles con CHX podrían ser útiles en situaciones que requieran un control de placa a corto plazo, como después de una cirugía oral. También podrían utilizarse en aquellas situaciones en las que las medidas de higiene oral mecánicas o los enjuagues no resultan prácticos, suponiendo los agentes antiplaca masticables una alternativa más atractiva (Tellefsen *et al*, 1996).

La CHX es de gran ayuda en aquellos pacientes que ven comprometida su capacidad para llevar a cabo una higiene oral adecuada (Jones, 1997), como pueden ser individuos de la tercera edad. La eliminación de placa en este colectivo se dificulta debido a la recesión gingival y presencia de prótesis removibles (Addy y Bates, 1979); así como por una disminución en la destreza manual, problemas de visión o limitaciones físicas como apoplejía o artritis (Schou *et al*, 1996). Debido a que la higiene oral proporcionada por cuidadores ha demostrado ser en algunos casos inadecuada, puede resultar tentador utilizar coadyuvantes químicos para ayudar al control de la placa en personas de edad avanzada (Tenovuo y Söderling, 1992). En un estudio a largo plazo llevado a cabo en una población de individuos de la tercera edad que vivían en residencias, se comprobó que el grupo que masticó el chicle que contenía CHX/XLT presentaba índices de placa y gingivales más bajos, en comparación con los sujetos que masticaron el chicle que contenía sólo XLT y con el grupo que no masticó ningún chicle (Simons *et al*, 2001). Masticar chicles que contienen agentes antimicrobianos (XLT y CHX/XLT) mejoró la salud periodontal en este colectivo institucionalizado. Por tanto, el uso de chicles con CHX a largo plazo podría mejorar las rutinas de higiene oral en una población mayor dependiente (Simons *et al*, 2001).

1.7.2. Chicles con otros principios activos experimentales

Etemadzadeh (Etemadzadeh, 1991) evaluó el efecto de un chicle que liberaba peróxido de hidrógeno sobre la formación de la PD. En un modelo de recrecimiento de 4 días, se comparó frente a un chicle placebo, a otro que contenía sorbitol, y frente a una goma base que no contenía edulcorantes ni peróxido de hidrógeno. La masticación del

chicle liberador de peróxido de hidrógeno provocó un menor aumento de PD que la masticación de la goma base, pero no hubo diferencias destacables en sus efectos antiplaca comparado con el chicle placebo. Los autores concluyeron que el efecto inhibitor del chicle con peróxido de hidrógeno en el crecimiento de placa tiene una importancia clínica limitada.

También se ha estudiado la inclusión de compuestos como funoran y extractos de eucalipto en la composición de los chicles para analizar su posible efecto en la formación de biofilm dental. Los resultados revelaron que la concentración al 0,3% de funoran y de 0,3% de extractos de eucalipto, resultaba suficiente para inhibir la formación de placa durante un período de recrecimiento de 4 días (Sato *et al*, 1998).

Ciertas plantas usadas tradicionalmente como remedios caseros, pueden servir como agentes terapéuticos por su contenido en compuestos antibacterianos y medicinales (Takahashi *et al*, 2003). Este es el caso de la almáciga (también denominada “mastique”), un exudado resinoso obtenido del tallo y hojas principales del arbusto *Pistacia lentiscus*. La almáciga contiene algunas sustancias con propiedades antibacterianas y antiinflamatorias (Al-Habbal *et al*, 1984; Huwez y Al-Habbal, 1986). Al estudiar el efecto antiplaca de un chicle de almáciga en la cavidad oral durante un período de recrecimiento de 7 días, se observó que inhibía la acumulación de placa *de novo*, en comparación con el chicle placebo. Estos resultados sugieren que la almáciga tiene efecto antifórmula de placa dental (Takahashi *et al*, 2003).

La goma de *Acacia arábica* es descrita en la farmacopea británica como “...una fuente de medicamentos”. Se cree que tiene utilidad en el tratamiento de la gingivitis y en la reducción de PD. Se han realizado 2 ensayos con el objetivo de evaluar el potencial antiplaca del chicle de acacia. En el primero, tras masticar 7 días chicle de acacia, las puntuaciones medias de PD fueron más bajas que con chicle sin azúcar, aunque las diferencias no fueron significativas. En el segundo ensayo, las evaluaciones fotográficas diarias de PD teñida con eritrosina, revelaron puntuaciones más bajas tras masticar chicle de acacia en comparación con el chicle sin azúcar. Estos resultados implican la presencia de sustancias que inhiben el depósito inicial de placa en la goma acacia (Gazi, 1991).

También se ha sugerido que la incorporación de otros aditivos como enzimas, iones divalentes y abrasivos en los chicles podría mejorar su actividad antiplaca (Pizzo *et al*, 2007). Los chicles con abrasivos fueron eficaces cuando se utilizaron como complemento al cepillado diario (Kleber *et al*, 2001a, b). Pizzo *et al* (Pizzo *et al*, 2007) investigaron el efecto inhibitorio en la formación de la PD de tres chicles comerciales sin azúcar que contenían lactoperoxidasa, microgránulos de dióxido de silicio y gluconato de zinc. La efectividad de los chicles con aditivos durante un período de recrecimiento de PD de 4 días fue similar al logrado con un chicle control sin aditivos. Éste último mostró ser eficaz reduciendo la acumulación de placa en las superficies oclusales, mientras que no tuvo ningún tipo de efecto sobre las superficies lisas (Hanham y Addy, 2001). Basándose en estos resultados, los autores afirmaron que los chicles que contienen lactoperoxidasa, microgránulos de dióxido de silicio y gluconato de zinc no proporcionan ningún efecto inhibitorio de PD en las superficies más susceptibles a la gingivitis (Pizzo *et al*, 2007).

1.7.3. Chicles con azúcar y otros edulcorantes

En un estudio llevado a cabo por Ainamo *et al* (Ainamo *et al*, 1977), el consumo de chicles con azúcar durante 4 días se relacionó con un aumento significativo de la tasa de crecimiento de la placa. Este hallazgo no se obtuvo en el caso de chicles edulcorados con sorbitol, que se mostró inerte en relación a los cambios cuantitativos acaecidos en la PD, sin alterar la tasa normal de crecimiento de la misma (Bratthall, 1973; Ainamo *et al*, 1977). Los autores de estos estudios concluyeron que el control de PD con chicles con azúcar o con sorbitol no es posible. Sin embargo, el chicle con azúcar parece inducir aumentos significativos en el crecimiento de la placa (Ainamo *et al*, 1977) y su uso frecuente puede favorecer la acumulación de PD, por el aporte adicional de azúcar que implica (Fleisch, 1942). En relación con este aspecto, se ha constatado que la ingesta de azúcar provoca una PD más voluminosa que la derivada de una dieta proteica debido a que las ingestas frecuentes de azúcar aumentan la tasa de crecimiento de la placa (Carlsson y Egelberg, 1965; Newbrun, 1967).

Sin embargo, Addy *et al* (Addy *et al*, 1982), al comparar chicles con y sin azúcar, encontraron que ambos tipos de chicles redujeron significativa y comparablemente el acúmulo de PD tras un período experimental de 5 días en que

masticar chicle fue la única medida de higiene oral. El uso regular de chicles (con o sin azúcar) provocó menos placa en la totalidad de la boca que no masticar chicle. Los resultados obtenidos por Hoerman *et al* (Hoerman *et al*, 1990) confirmaron los datos del estudio anterior, ya que observaron que, tras masticar chicle, se acumula menos placa que cuando no se mastica chicle. También afirmaron que, en un ambiente en el que no se lleva a cabo la higiene oral, la acumulación de placa tras masticar chicles que contienen sorbitol o chicles con azúcar fue la misma. El masticar chicle, independientemente del edulcorante utilizado, provoca una acumulación de PD menor que cuando no se mastica chicle.

El chicle *per se*, en ausencia de azúcar, podría tener un efecto retardante en la formación de PD visible, sin embargo, no hay razón para creer que esta tendencia pueda ser considerada terapéutica (Ainamo *et al*, 1977). Debido a la capacidad del azúcar para provocar caries y crecimiento excesivo del biofilm dental (Ainamo *et al*, 1979), algunos autores señalan que cualquier sustancia inerte, incluso un placebo, consumida en lugar del azúcar podría ser catalogada como anticariogénica o reductora de la PD (Plüss, 1978).

Hanham y Addy evaluaron los efectos de masticar chicle sin azúcar en el recrecimiento de la placa en las superficies lisas y en las oclusales de los dientes comparándolos con no masticar chicle, y observaron que el chicle sin azúcar reducía la PD de forma significativa en aquellas zonas más propensas a desarrollar caries (superficies oclusales) pero tenía poco, o ningún efecto, en las zonas más propensas a desarrollar gingivitis (superficies lisas). Estos resultados apoyan la idea de que la zona del margen gingival está relativamente protegida de los efectos derivados de la masticación. Sin embargo, los autores afirmaron que, si los estudios se llevasen a cabo durante un período más largo de ausencia de higiene oral, puede que surgieran diferencias (Hanham y Addy, 2001).

Recientemente, Tangade *et al* (Tangade *et al*, 2012) evaluaron el efecto de masticar chicles con y sin azúcar en la formación de PD en un modelo de recrecimiento de placa de 4 días, y obtuvieron mínimas diferencias favorables al chicle sin azúcar, que no alcanzaron significación estadística.

1.7.4. Chicles con xilitol

Históricamente, el chicle comercialmente disponible estaba edulcorado con azúcar (sacarosa) y favorecía la aparición de caries (Ly *et al*, 2008). Hoy en día, la mayoría de los chicles vendidos en Europa están endulzados con sustitutos del azúcar. Fue durante la II Guerra Mundial, debido a la escasez de azúcar en Europa, cuando empezó la producción masiva de XLT como edulcorante. Se observó que el XLT se absorbía más lentamente que el azúcar y causaba menos picos de azúcar en sangre o en los niveles de insulina tras su consumo (Montague *et al*, 1967; Spitz *et al*, 1970). Por estas razones, sus primeros usos fueron en el campo de la Medicina, en los preparados para alimentación parenteral y como alternativa al azúcar en dietas para diabéticos. La investigación de sus propiedades dentales se inició a comienzos de la década de 1970 (Milgrom y Ly, 2012). Ha sido utilizado como un sustitutivo del azúcar blanco refinado durante más de 30 años, por su efecto inhibitor del *Streptococcus mutans* (Maguire y Rugg-Gunn, 2003).

1.7.4.1. Estudios a corto plazo del xilitol en el recrecimiento de la placa dental

Mouton *et al* fueron los primeros investigadores que evaluaron la inhibición a corto plazo del recrecimiento de PD al masticar chicles con XLT. Tras un período experimental de 3 días, en el que no estuvieron permitidas las prácticas de higiene oral, se comprobó cómo se formaba menos placa al masticar el chicle con XLT (6 unidades/día) que al masticar el chicle con azúcar (6 unidades/día) teniendo en cuenta los datos gravimétricos (peso fresco de la placa). Cuando no se permitió la masticación de ningún tipo de chicle, se registraron los valores gravimétricos intermedios de la misma (Mouton *et al*, 1975a). Sin embargo, con respecto al índice de placa, se obtuvo una puntuación más alta con el consumo de chicles con XLT frente al consumo de chicles con azúcar. Según estos autores, este controvertido resultado en relación a los valores gravimétricos, debe entenderse en el contexto de que la primera medida es subjetiva y no lineal. En otro estudio realizado por los mismos autores, se concluyó que el peso fresco de placa en el grupo que masticó el chicle con XLT, era un 40% menor que en el grupo que masticó el chicle con azúcar. También se obtuvo un índice de placa medio menor al final de los 3 días del período experimental de recrecimiento de placa (Mouton *et al*, 1975b).

Cuando se evalúa la influencia de la dieta sobre el efecto de los chicles con XLT, los resultados son menos destacables. En un estudio de Plüss (Plüss, 1978) en el que se evaluó el recrecimiento de la placa durante un período de 3 días manteniendo los hábitos dietéticos normales, ni el chicle con XLT ni con azúcar tuvieron efectos destacables en las puntuaciones de la placa (valorada gravimétrica y/o planimétricamente). Sin embargo, cuando prácticamente se eliminó el azúcar de la dieta, la formación de placa fue mayor en el grupo que masticó chicle con azúcar, en comparación con los grupos que masticaron chicle con XLT y con el chicle placebo. La formación de placa en el grupo que masticó chicle con XLT fue menor que en el grupo que masticó el chicle placebo, pero la diferencia no fue significativa (Plüss, 1978).

También se estudió el efecto de XLT sobre los niveles de PD en relación a la miel de Manuka y a un enjuague de CHX al 0,2%. Este ensayo constaba de 3 períodos experimentales de 3 días de duración cada uno. En ninguno de estos períodos estuvieron permitidas medidas de higiene oral mecánica. Durante el período 1, se aplicó miel en el surco gingival, 2 veces al día. En el período 2, se realizó un enjuague con 10 mL de CHX al 0,2% durante 60 segundos, 2 veces al día. Por último, en el período 3, se masticó un chicle con XLT durante 5 minutos, 3 veces al día. La reducción en la formación de placa resultó superior cuando se aplicó la miel o al realizar el enjuague de CHX, en comparación con la masticación del chicle con XLT (Nayak *et al*, 2010).

1.7.4.2. Estudios a medio plazo del xilitol en el recrecimiento de la placa dental

En un trabajo publicado en 1997, se demostró que el consumo de chicles con XLT y XLT/sorbitol conseguía reducir la cantidad de placa en sujetos con altos niveles de *Streptococcus mutans* resistentes (no inhibidos por el XLT), tras masticar los chicles de 3 a 5 veces/día durante 2 semanas. Sin embargo, este efecto no se consiguió con la goma base. Los autores concluyeron que los polioles son los ingredientes activos de los chicles capaces de modular la cantidad de placa y su composición microbiana (Söderling *et al*, 1997).

Scheie *et al* (Scheie *et al*, 1998) evaluaron el efecto de masticar chicles con XLT sobre la PD y compararon el efecto de estos chicles con otros que contenían XLT/sorbitol o sacarosa. Tras masticar los chicles durante un período de 33 días, los autores observaron que masticar chicles con XLT o XLT/sorbitol no tenía ningún efecto

en el depósito bacteriano sobre las superficies dentales (Scheie *et al*, 1998). Sin embargo, Holgerson *et al* (Holgerson *et al*, 2007a) obtuvieron resultados muy diferentes al analizar el efecto de los chicles con XLT sobre la formación de PD. El grupo de estudio estuvo formado por 128 niños, con y sin antecedentes de caries. Uno de los grupos recibió 2 chicles con sorbitol y maltitol, que masticaban 3 veces al día durante 10 minutos durante 4 semanas, mientras que el otro grupo recibió los correspondientes chicles con XLT como único edulcorante. Tras 4 semanas, el resultado obtenido fue que la cantidad de PD visible se redujo en ambos grupos (sorbitol/maltitol y XLT), y no encontraron diferencias en los valores de placa entre niños con y sin antecedentes de caries, aunque parte del éxito los propios autores lo atribuyen al hecho de haber reforzado las técnicas relacionadas con el cepillado diario.

El estudio de Holgerson *et al* (Holgerson *et al*, 2007a) está en consonancia con otro publicado previamente por Steinberg *et al* en 1992. En este estudio se evaluó el efecto de masticar durante 6 semanas chicles edulcorados con XLT o sorbitol en la acumulación de placa. Se observó que la disminución en los índices de placa fue relevante en ambos grupos de estudio, en comparación con el grupo que no masticó chicle (Steinberg *et al*, 1992).

1.7.4.3. Estudios a largo plazo del xilitol en el recrecimiento de la placa dental

En una población de niños de 5 años de edad, tras consumir durante 6 meses chicles con polioles (XLT o sorbitol), se observó que el índice de placa tendió a disminuir en el grupo que masticó chicles con XLT, mientras que no observaron ninguna tendencia en el grupo que masticó chicles con sorbitol (Mäkinen *et al*, 2005).

En este sentido, la prescripción a ancianos dentados de chicles con XLT 2 veces al día durante 15 minutos por un período de 6 meses, logró una mejora significativa en el índice de placa, en comparación con el grupo que no masticó ningún chicle (Al-Haboubi *et al*, 2012).

Los chicles de XLT también se han evaluado en un ensayo clínico de 18 meses de duración, en un grupo de parejas saudís (madre-hijo), que presentaban altos niveles de *Streptococcus mutans*. Las madres del grupo experimental recibieron XLT en chicles y sus hijos en comprimidos masticables, 3 veces al día durante 3 meses. Al grupo control se le aplicó un barniz de flúor. Se evaluaron los niveles de placa a los 6, 12 y 18

meses. En los niños, se obtuvo una diferencia significativa en el nivel de PD entre los grupos experimental y control, a los 6 y 12 meses. En el caso de las madres, también se detectó un descenso importante en el grupo experimental a los 18 meses, en comparación con los registros basales (Alamoudi *et al*, 2012a). Previamente, el mismo grupo había evaluado parejas (madre-hijo) durante 3 meses, y sólo obtuvieron un descenso evidente del índice de placa entre los niños que recibieron los comprimidos masticables de XLT (Hanno *et al*, 2011).

Cronin *et al* (Cronin *et al*, 1994) realizaron tres ensayos clínicos para investigar la capacidad de reducción de PD de los chicles que contenían XLT o una mezcla de XLT/sorbitol, en comparación con un chicle que contenía exclusivamente sorbitol. En el primer ensayo, el chicle combinado XLT/sorbitol provocó una mayor reducción en el crecimiento de placa, frente al efecto del chicle con sorbitol. En el segundo ensayo, compararon diferentes regímenes de chicles con XLT/sorbitol o sólo sorbitol, la media combinada en el recrecimiento de placa para los sujetos que masticaron chicle con XLT/sorbitol fue mejor que para los que masticaron chicle con sorbitol. En el tercer ensayo, evaluaron dos regímenes (chicle con XLT *vs* un chicle con sorbitol) en dos formas distintas de presentación (lámina o gragea), se observó que el chicle con XLT fue superior al chicle con sorbitol retrasando el recrecimiento de placa en ambas formas de presentación.

Estos resultados están en consonancia con los autores que defienden la teoría de que el XLT en chicles podría ser más efectivo que el sorbitol y que, una dosis alta de XLT liberada de manera fraccionada, proporciona resultados beneficiosos sin efectos secundarios (Holgerson *et al*, 2007b).

1.7.4.4. Efecto del xilitol en la transmisión materno-filial de *Streptococcus mutans*

Antes de la erupción dental, la boca del bebé sólo contiene las superficies de la mucosa expuestas al flujo del fluido salival. Los *Streptococcus mutans* pueden persistir en dicho ambiente formando colonias adheridas a estas superficies o viviendo libres en la saliva, proliferando y multiplicándose a una velocidad menor que la velocidad de lavado causada por el flujo del fluido salival (Berkowitz, 2006). El promedio de divisiones de la flora oral es de 2 a 4 veces al día (Gibbons, 1964), mientras que la

deglución ocurre cada pocos minutos. Debido a esto, es razonable asumir que las bacterias no se pueden mantener libres por sí solas en la saliva por proliferación, si no que deben fijarse a una superficie de la cavidad oral.

Varias investigaciones han demostrado que los *S. mutans* pueden colonizar las bocas de los bebés en la etapa pre-eruptiva (Wan *et al*, 2001a, b; Tanner *et al*, 2002). Wan *et al* (Wan *et al*, 2001a, b) en bebés de 6 meses de edad sin dientes, encontraron que el 50% de los bebés prematuros y el 60% de los bebés llegados a término albergaban *S. mutans* en muestras obtenidas con hisopos bucales. La adquisición de *S. mutans* a una edad temprana es un factor de riesgo para desarrollar caries en la primera infancia y para la futura experiencia de caries (Alaluusua y Renkonen, 1983; Köhler *et al*, 1988; Grønderfjord *et al*, 1996).

Se ha señalado que el principal reservorio a partir del cual los niños adquieren los *S. mutans* son sus madres (Berkowitz, 2006; Kishi *et al*, 2009) a través de los contactos de saliva madre-hijo y que la adquisición inicial ocurre durante un período específico de tiempo denominado “Ventana de Infectividad”, que transcurre entre los 6 y 30 meses de edad del niño, con un pico de mayor riesgo entre los 18 y 30 meses (Carletto Körber *et al*, 2005). Una reducción en los niveles de *S. mutans* salivales, en madres infectadas, podría inhibir o retrasar el establecimiento de estos microorganismos en sus hijos (Köhler *et al*, 1983).

Numerosos estudios han confirmado la efectividad de la exposición temprana materna a los chicles con XLT en la reducción de la transmisión materno-filial de los *S. mutans*, tanto en estudios a corto como a largo plazo. El uso de chicles con XLT por parte de las madres y de comprimidos masticables de este compuesto por sus hijos, durante un período de 3 meses, redujo los niveles de *S. mutans* del binomio madre-hijo a los 18 meses, comparado con los recuentos basales (Alamoudi *et al*, 2012a). El consumo materno de XLT proporcionó mejores resultados preventivos en los niveles de *S. mutans*, en comparación con el tratamiento con el barniz de flúor (Alamoudi *et al*, 2012b).

Por su parte, en un trabajo publicado por Söderling *et al* (Söderling *et al*, 2000) se comparó el efecto de tres estrategias a largo plazo en madres, cuando los niños tenían entre 3 y 24 meses: 1) tratamiento con barnices de CHX, 2) tratamiento con barnices de flúor y 3) masticación de chicles con XLT. Se observó que, cuando los niños

alcanzaban los 2 años de edad, la prevalencia de *S. mutans* era del 9,7% en el grupo del XLT, del 28,6% en el grupo de la CHX y del 48,5% en el grupo del flúor. El consumo materno habitual de XLT estuvo asociado a una reducción de la probabilidad de transmisión madre-hijo de los *S. mutans*, en niños de 2, 3 y 6 años (Söderling *et al*, 2000; Söderling *et al* 2001).





2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



En la actualidad, una alta proporción de individuos mastica chicle a diario e incluso en muchas sociedades ha llegado a formar parte del estilo de vida. Es una actividad frecuente, considerada divertida por niños y adultos, aunque se cree que los mayores consumidores son los adolescentes. El consumo mundial de chicles genera un mercado que mueve miles de millones al año (Imfeld, 1999; Ly *et al*, 2008; Keukenmeester *et al*, 2013). Sin embargo, existe poca evidencia científica de que masticar chicles sea efectivo en la remoción y/o alteración de la PD (Bratthall, 1973; Ainamo *et al*, 1977).

Resultados de varios estudios avalan el efecto antiplaca de incorporar antimicrobianos como la CHX en los chicles (Ainamo y Etemadzadeh, 1987; Tellefsen *et al*, 1996; Simons *et al*, 1999; Kolahi *et al*, 2008), sin embargo, el efecto antiplaca del XLT no está tan claro (Plüss, 1978; Söderling *et al*, 1997; Scheie *et al*, 1998; Mäkinen *et al*, 2005; Nayak *et al*, 2010; Al-Haboudi *et al*, 2012). Por consiguiente, el primer objetivo de esta tesis doctoral será:

- 1. Evaluar la eficacia clínica antiplaca de un chicle edulcorado con xilitol, cuantificando la eliminación de placa dental tras la masticación del chicle (remoción) y la neo-formación de placa a las 24 horas (recrecimiento) mediante un índice visual convencional.**

Los mayoría de estudios que evalúan la eficacia antibacteriana de chicles con XLT se centran en los contajes de *Streptococcus mutans*; en saliva (Simons *et al*, 1997; Autio, 2002; Massoth *et al*, 2006; Caglar *et al*, 2007; Haresaku *et al*, 2007; Mäkinen *et al*, 2008; Campus *et al*, 2009; Duane, 2010; Fraga *et al*, 2010; Bahador *et al*, 2012) y en la PD (Haresaku *et al*, 2007; Mäkinen *et al*, 2008; Seki *et al*, 2011; Söderling *et al*, 2011). Sin embargo, en el ecosistema oral se han identificado más de 1000 especies bacterianas diferentes (ten Cate, 2006), por tanto, este tipo de estudios estarían

valorando una mínima parte de la bacteriología de la cavidad oral. Por esta razón, como segundo objetivo se plantea:

2. Evaluar la eficacia antibacteriana en saliva de un chicle que contiene xilitol mediante microscopía de epifluorescencia.

Se ha sugerido que son necesarios de 6 a 10 g de XLT al día, divididos en 3 o más tomas para conseguir un efecto antimicrobiano (Milgrom *et al*, 2006)). Para alcanzar esta cantidad, se requiere consumir al día, al menos 5 chicles de 2 g edulcorados con XLT como único poliol y con un 60% de XLT (Keukenmeester *et al*, 2013). En base a los resultados de estos estudios, el tercer objetivo consistirá en:

3. Evaluar el efecto de la dosis de xilitol, en un único episodio de masticación, sobre la remoción de placa dental y la actividad antibacteriana (recrecimiento de placa dental y vitalidad bacteriana en saliva).

Existe la “leyenda urbana” de que comer una manzana tras una comida o un aperitivo limpia los dientes. Esta fruta ha sido recomendada en programas de salud oral (Finlayson y Wilson, 1961) y se ha convertido, en cierta medida, en un símbolo de salud dental. Recientemente, en un tríptico publicitario del “Colegio Oficial de Odontólogos y Estomatólogos” de la provincia de A Coruña, aparece una manzana como icono de salud oral. A pesar de que esta idea está muy arraigada en la sociedad actual, trabajos realizados en los años 60 y 70 del siglo pasado afirmaban que comer manzanas no ejerce ningún efecto limpiador en los dientes (Arnim, 1963; Bergenholtz *et al*, 1967; Lindhe y Wicén, 1969; Wade, 1971; Birkeland y Jorkjend, 1974). Debido a la controversia existente entre los trabajos publicados y la creencia popular, se plantea como cuarto objetivo de la presente tesis:

4. Analizar si masticar una manzana induce algún efecto en la remoción mecánica y en el recrecimiento de la placa dental, así como en la vitalidad bacteriana en muestras de saliva.



3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. SELECCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO

El grupo de estudio lo conformaron 20 voluntarios adultos sanos, estudiantes de Odontología en la Universidad de Santiago de Compostela (España), que presentaban un buen estado de salud oral en base a los siguientes parámetros: mínimo de 24 dientes permanentes explorables, sin evidencia de gingivitis ni periodontitis (Community Periodontal Index score=0) (World Health Organization, 1997), y ausencia de caries. Los criterios de exclusión aplicados fueron: consumo regular de tabaco o de chicles con xilitol, ser portador de prótesis dentales removibles o aparatos ortodóncicos, haber recibido antibióticos o utilizar de forma rutinaria antisépticos orales durante los últimos 3 meses, o padecer alguna enfermedad sistémica que provoque una alteración en la producción y/o composición de la saliva.

Previo al inicio, todos los participantes fueron informados de los términos del estudio y dieron su consentimiento por escrito para la participación en el mismo.

3.2. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA PLACA DENTAL

La presencia de PD sobre las superficies dentales se determinó mediante la inspección visual de la placa teñida con eritrosina (Plac control[®], Dentaïd, Barcelona, España) en 6 localizaciones por diente (Lobene *et al*, 1982): mesiovestibular, mediovestibular, distovestibular; mesiolingual, mediolingual y distolingual (figura 5). Para cuantificar la PD se aplicó la modificación del Índice de Placa (IP) de Quigley-Hein propuesta por Turesky (Quigley y Hein, 1962; Turesky *et al*, 1970). Esta escala se inicia con el valor 0 (ausencia de placa) hasta el 5 (la PD cubre 2/3 o más de la superficie del diente) (figura 6). Por tanto, la puntuación máxima asignable a un diente es de 30. La PD fue evaluada por un único examinador.



Figura 5. Placa dental teñida tras la aplicación de la solución reveladora (Plac control[®], Dentaïd, Barcelona, España).

El IP medio para cada sujeto se determinó sumando todos los índices individuales (6 por diente) y dividiendo esta suma por el número total de medidas (número dientes puntuables multiplicado por 6).

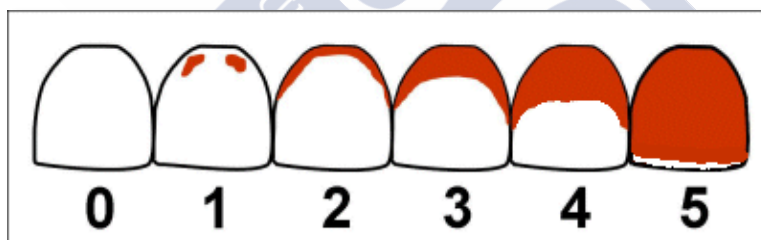


Figura 6. Representación del Índice de Placa de Quigley-Hein modificado por Turesky.
0: ausencia de placa, **1:** flecos de placa separados en el margen cervical, **2:** banda continua y estrecha de placa (hasta 1 mm) en el margen cervical, **3:** banda de placa > 1 mm pero que cubre menos de 1/3 de la superficie del diente, **4:** banda de placa que cubre al menos 1/3 pero menos que 2/3 de la superficie del diente, **5:** la placa cubre más de 2/3 de la superficie del diente.

El IP de la cara vestibular (IP-V) se determinó sumando todos los índices individuales (3 por diente) de la cara vestibular superior (VS) y vestibular inferior (VI) y dividiendo esta suma por el número total de medidas (número de dientes puntuables multiplicado por 3).

El IP de la cara palatina/lingual (IP-P/L) se determinó sumando todos los índices individuales (3diente) de la cara palatina (P) y de la lingual (L) y dividiendo esta suma por el número total de medidas (número de dientes puntuables multiplicado por 3).

El cálculo del IP de la cara vestibular superior (IP-VS), vestibular inferior (IP-VI), palatina (IP-P) y lingual (IP-L) se determinó sumando todos los IP individuales (3 por diente) de la cara y dividiendo esta suma por el número total de medidas (número de dientes puntuables multiplicado por 3).

Todos los participantes debían tener al menos 20 dientes naturales en boca que fueron evaluados a excepción de los terceros molares, de los que presentaban prótesis fijas o amplias restauraciones.

Tras llevar a cabo el último examen oral de la PD en cada uno de los experimentos, las superficies linguales, palatinas y vestibulares de los dientes fueron pulidas para retirar toda la placa supragingival y la solución reveladora de PD.

3.3. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SALIVALES

La actividad antibacteriana de los productos testados se analizó evaluando la vitalidad de las bacterias salivales mediante una técnica de microscopía de epifluorescencia (utilizando la solución LIVE/DEAD[®] BacLight[™], Molecular Probes, Leiden, Holanda). Esta solución está compuesta por dos fluorocromos: SYTO-9 y yoduro de propidio con máximos de excitación/emisión de 480/500 nm para SYTO9 y 490/635 nm para el yoduro de propidio. Su aplicación simultánea permite diferenciar las bacterias con membranas citoplasmáticas intactas (emiten fluorescencia verde) de las bacterias que presentan sus membranas dañadas (emiten fluorescencia roja) (figura 7).

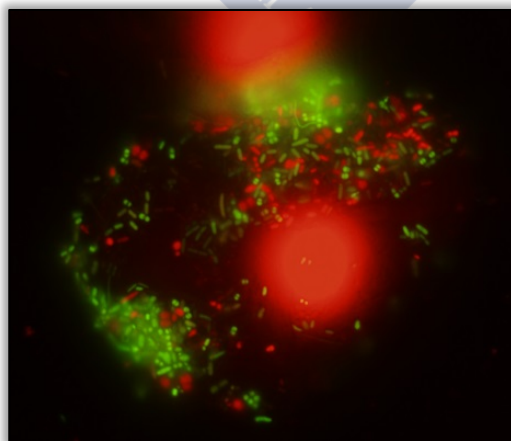


Figura 7. Imagen de microscopía de epifluorescencia obtenida tras la aplicación de la solución LIVE/DEAD[®] BacLight[™] a una muestra de saliva. Las bacterias con membranas citoplasmáticas intactas emiten fluorescencia verde frente a las que presentan sus membranas dañadas que emiten fluorescencia roja.

La solución de fluorescencia LIVE/DEAD[®] BacLight[™] se preparó, siguiendo las recomendaciones del fabricante, en 5 mL de agua esterilizada filtrada con un filtro de membrana Millipore de 0,22 µm (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España), alcanzando una proporción 1:1 de ambos fluorocromos y conservándose a -20°C. Las muestras de saliva no estimulada se recogieron aplicando métodos previamente descritos (“spitting method”) (Navazesh y Christensen, 1982) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 6 minutos. El sobrenadante se desechó y el “pellet” obtenido fue resuspendido en 100 µL de agua estéril. Tras agitar la suspensión para homogeneizarla, se mezcló con 100 µL de la solución de fluorescencia y se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La observación microscópica fue realizada por 2 investigadores empleando un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con un set de filtros para fluoresceína y Texas Red.

El conteo de bacterias viables y no-viables se realizó a gran aumento (100x) en 20 campos microscópicos (10 campos por portaobjetos) que presentaban un mínimo de 100 bacterias sin incluir agregados bacterianos. Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada muestra salival.

3.4. DISEÑO Y TEMPORALIZACIÓN DEL ESTUDIO

Previamente al inicio del estudio, a todos los voluntarios se les efectuó una tartrectomía y profilaxis dental.

Los experimentos se realizaron siempre por la mañana. Los participantes no podían aplicar ninguna técnica de higiene oral desde las 24 horas previas al comienzo de cada experimento, ni consumir alcohol o alimentos que promoviesen la remoción mecánica de la PD, como chicles o manzanas, pero debían de mantener sus hábitos dietéticos normales.

Cada voluntario se sometió a 5 experimentos diferentes en los que debían realizar una técnica distinta de remoción de PD:

Cepillado dental manual (CEP)

La remoción en este primer experimento se realizó utilizando únicamente un cepillo Vitis[®] de dureza media (Dentaid, Barcelona, España) y agua estéril (10 mL), sin pasta

dentífrica. Se empleó la técnica de cepillado de Bass durante un total de 2 minutos (30 segundos por cuadrante de la cavidad oral).

Masticación de un chicle placebo (PLA)

El chicle placebo (PLA), suministrado por el fabricante (Chupa Chups S.A.U, Sector Industrial Serra, Barcelona, España), tuvo la misma forma (lámina), tamaño, peso, color y composición que el chicle test, pero carecía de XIL. La masticación del chicle se realizó durante un único episodio de 10 minutos de duración y debía realizarse alternando ambos lados de la cavidad oral.

Masticación de un chicle con xilitol (XIL)

El chicle testado fue HAPPYDENT XYLIT+[®] (Chupa Chups S.A.U, Sector Industrial Serra, Barcelona, España). La composición del chicle incluía: sorbitol, goma base, XIL (13%), jarabe de maltitol, manitol, glicerina, aroma, ácido cítrico, acesulfamo potásico, aspartamo en la goma base, lecitina de soja, antioxidante BHA y una fuente de fenilalanina. El protocolo de masticación fue el mismo que el empleado con el PLA.

Masticación de 3 chicles con xilitol (EXTRA)

Los chicles empleados también fueron los HAPPYDENT XYLIT+[®]. Los voluntarios debían masticar 3 chicles simultáneamente en un único bolo siguiendo el protocolo de masticación anteriormente descrito

Masticación de una manzana (MANZ)

Las manzanas empleadas fueron todas de la variedad Golden Delicious, con un peso medio de 160 g. En este caso, la masticación debía realizarse alternando ambos lados pero no se estableció ningún límite de tiempo.

En cada uno de estos 5 experimentos se realizó un control de PD de los participantes en 3 momentos:

- 1) a su llegada a la clínica en condiciones basales (IP-B)
- 2) inmediatamente después de realizar la técnica de remoción (IP-I)
- 3) a las 24 horas de finalizar dicha remoción (IP-24)

Asimismo, en cada uno de los experimentos se tomaron muestras de saliva no estimulada, en los 3 mismos momentos en los que se evaluó la presencia de PD, para determinar la Vitalidad Bacteriana (VB) en saliva: en condiciones basales (VB-B), inmediatamente tras la técnica de remoción (VB-I) y a las 24 horas (VB-24).

Durante las 24 horas siguientes a la remoción de PD, hasta el registro de PD-24 y VB-24, los participantes no efectuaron sus rutinas de higiene oral ni ingirieron alcohol o alimentos que promoviesen la remoción mecánica de la placa, pero debían de seguir con sus hábitos dietéticos normales.

Todos los voluntarios efectuaron los 5 experimentos aplicando un sistema de aleatorización equilibrada para determinar el orden en que los realizaron. Se estableció un “período de descanso” de 2 semanas entre los diferentes experimentos.

La temporalización de los experimentos se representa en la figura 8.



Figura 8. Secuencia temporal aplicada en cada uno de los 5 experimentos.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron con la ayuda de la Unidad de Bioestadística de la Facultad de Medicina y Odontología (Carmen Cadarso e Isabel Martínez), utilizando el programa SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). Los resultados absolutos se expresaron utilizando los valores convencionales de estadística descriptiva (cuartiles, media, mediana y rango) para las variables analizadas (IP y VB), teniendo en cuenta los tiempos en los que se hicieron las determinaciones (basal, inmediato y a las 24 horas) y los diferentes experimentos que se llevaron a cabo (CEP, PLA, XIL, EXTRA Y MANZ).

Tanto los valores del IP como los de la VB mostraron una distribución normal (test Kolmogorov-Smirnov). Para analizar conjuntamente la influencia tanto del momento (tiempo) en el que se hizo la determinación del IP y de la VB, como del experimento llevado a cabo (experimento), se utilizaron modelos mixtos con dos efectos fijos (tiempo y experimento) y un efecto aleatorio (cada participante). Para determinar si existían diferencias en el IP detectado en superficies dentarias diferentes (vestibular, lingual/palatina, superior e inferior), se aplicó un test de ANOVA de medidas repetidas para datos con distribución Gamma. El cálculo del tamaño muestral *a priori*, considerando un error alfa de 0,05 y una potencia estadística del 80%, reveló que el grupo de estudio debía incluir 15 participantes.







4. RESULTADOS



4.1. CUANTIFICACIÓN DE LA PLACA DENTAL

4.1.1. Determinación de la placa dental basal

El valor medio del IP-B en el total del colectivo de estudio fue 2,639 con un rango que osciló desde el 1,100 obtenido en el grupo CEP hasta 3,850 correspondiente al grupo MANZ. Las determinaciones del IP-B por grupos fueron: CEP 2,338 (rango 1,100-3,130); PLA 2,598 (rango 1,500-3,130); XIL 2,644 (rango 1,920-3,030); EXTRA 2,764 (rango 1,190-3,240) y MANZ 2,849 (rango 1,900-3,850).

La diferencia del IP-B del grupo CEP en relación a todos los demás grupos fue estadísticamente significativa. No se encontraron otras diferencias reseñables a excepción de la existente entre los IP-B de los grupos PLA y MANZ (tabla 1).

	CEP	PLA	XIL	EXTRA
PLA	p=0,005			
XIL	p=0,001	p=0,614		
EXTRA	p<0,001	p=0,069	p=0,188	
MANZ	p<0,001	p=0,018	p=0,053	p=0,425

CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 1. Significación estadística del Índice de placa basal entre los distintos grupos de estudio (n=20).

El IP-B en caras P/L fue inferior a las V en los grupos CEP y EXTRA (p=0,014 y p=0,004 respectivamente) (Figura 9), no detectándose diferencias en los grupos PLA, XIL y MANZ (p=0,965; p=0,089 y p=0,105, respectivamente).

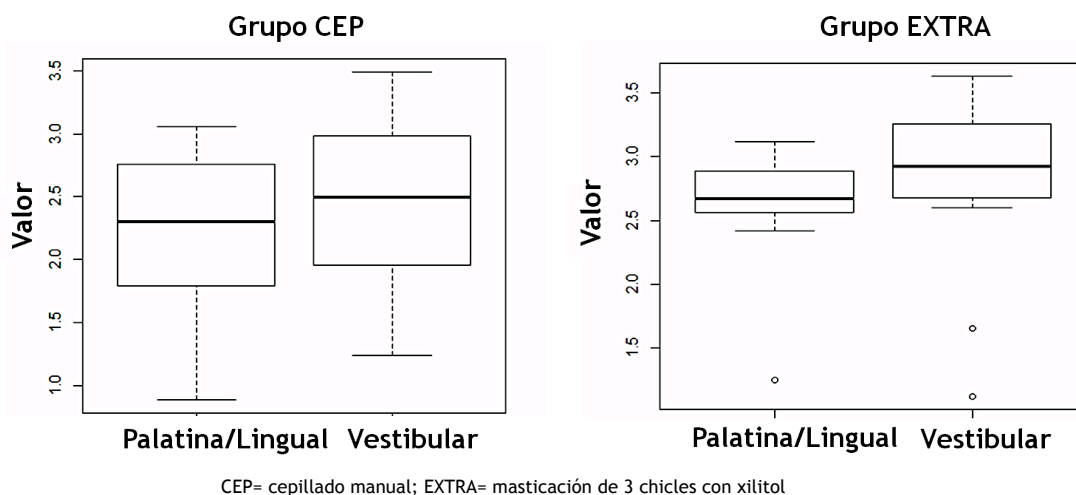


Figura 9. Índice de placa basal palatina/lingual y vestibular en los grupos CEP y EXTRA.

4.1.2. Determinación de la placa dental inmediata

El valor promedio del IP-I en el total del colectivo de estudio fue 2,668 con un rango que osciló desde el 0,930 obtenido en el grupo CEP hasta el 4,780 correspondiente al grupo MANZ. Todos los valores del IP-I se recogen en la tabla 2.

	IP-I Media (Rango)	IP-B Media (Rango)	Significación estadística p-valor
CEP	1,743 (0,930-2,910)	2,338 (1,100-3,130)	p<0,001
PLA	2,411 (1,160-2,910)	2,598 (1,500-3,130)	p=0,041
XIL	2,538 (1,730-3,030)	2,644 (1,920-3,030)	p=0,246
EXTRA	2,650 (1,670-3,210)	2,764 (1,190-3,240)	p=0,211
MANZ	3,998 (2,740-4,780)	2,849 (1,900-3,850)	p<0,001

IP-I= Índice de Placa Inmediata; IP-B= Índice de Placa Basal; CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 2. Índices de placa inmediata y basal en los diferentes grupos de estudio (n=20).

En el grupo CEP, la diferencia entre el IP-I y el IP-B fue estadísticamente significativa ($p<0,001$) (tabla 2) (Figura 10). En este grupo, las caras V presentaron una menor cantidad de PD inmediata que las P/L ($p=0,002$) (Figura 11).

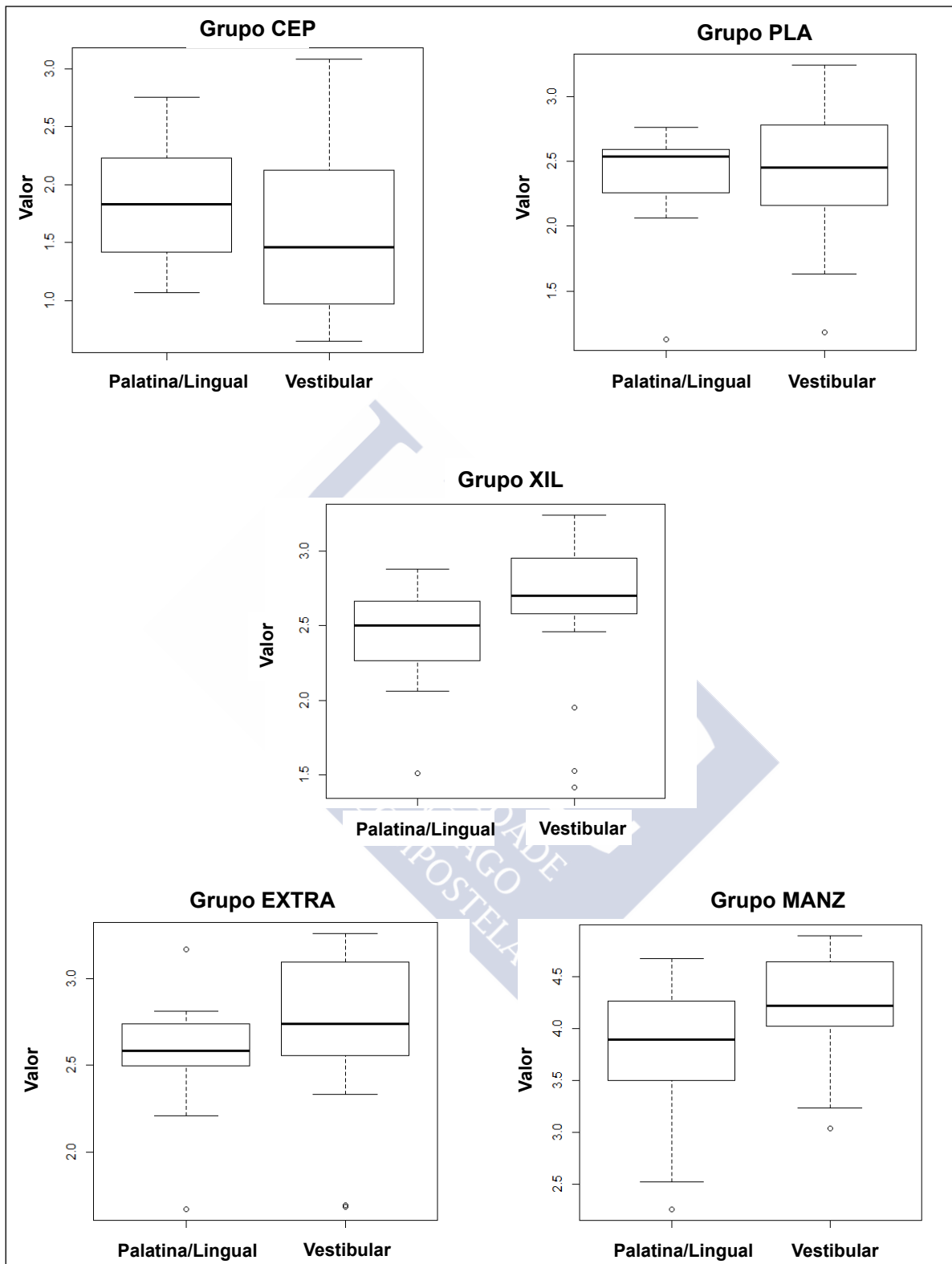
Tras la masticación del PLA, el IP-I obtenido también resultó significativamente inferior al IP-B ($p=0,041$) (tabla 2). A diferencia del experimento anterior, no se encontraron diferencias entre las superficies V y P/L (Figura 11).

Con los métodos de remoción XIL y EXTRA no se alcanzaron diferencias significativas entre el IP-I y el IP-B ($p=0,246$ y $p=0,211$, respectivamente). Sin embargo, se apreció que las superficies V presentaron mayor cantidad de PD inmediata que las P/L ($p=0,004$ y $p=0,003$ respectivamente) (Figura 11).

A diferencia de todos los otros grupos, en el MANZ, no sólo no hubo una menor presencia de PD inmediata, si no que el valor del IP-I resultó significativamente superior al de IP-B ($p<0,001$) (tabla 2) (Figura 12). Las caras V presentaron mayor cantidad de PD que las P/L ($p<0,001$) (Figura 11).



Figura 10. Efecto del cepillado con agua estéril sobre el índice de placa dental. A= tinción de placa basal; B= tinción de placa inmediata tras el cepillado con agua estéril.



CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Figura 11. Índice de placa palatina/lingual y vestibular inmediata en los diferentes grupos de estudio.



Figura 12. Efecto de la masticación de la manzana sobre el índice de placa dental. A= tinción de placa basal; B= tinción de placa inmediata tras masticar la manzana.

Al comparar los IP-I de los distintos métodos de remoción entre si, se comprobó que el IP-I del grupo CEP fue estadísticamente significativo respecto a todos los demás. El grupo PLA, a pesar de tener el segundo IP-I más bajo, sólo resultó significativo respecto a los grupos EXTRA y MANZ. En el caso de MANZ, se obtuvieron diferencias significativas respecto a todos los demás grupos debido a su efecto paradójico sobre la PD (tabla 3).

	CEP	PLA	XIL	EXTRA
PLA	p<0,001			
XIL	p<0,001	p=0,165		
EXTRA	p<0,001	p=0,009	p=0,221	
MANZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 3. Significación estadística del Índice de placa inmediata entre los distintos grupos de estudio (n=20).

4.1.3. Determinación de la placa dental a las 24 horas

El valor promedio del IP-24 en el total del colectivo de estudio fue 2,918 con un rango que osciló desde el 1,760 obtenido en el grupo PLA hasta el 4,140 correspondiente al grupo MANZ (tabla 4).

	IP-24 Media (Rango)	IP-I Media (Rango)	Significación estadística p-valor
CEP	2,575 (1,800-3,700)	1,743 (0,930-2,910)	p<0,001
PLA	2,871 (1,760-3,540)	2,411 (1,160-2,910)	p<0,001
XIL	2,867 (2,310-3,500)	2,538 (1,730-3,030)	p<0,001
EXTRA	2,943 (2,050-3,600)	2,650 (1,670-3,210)	p=0,001
MANZ	3,333 (2,560-4,140)	3,998 (2,740-4,780)	p<0,001

IP-24= Índice de Placa a las 24 horas; IP-I= Índice de Placa Inmediata; CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 4. Índices de placa a las 24 horas e inmediata en los diferentes grupos de estudio (n=20).

Tras realizar el CEP, el IP-24 obtenido fue estadísticamente superior al IP-I (p<0,001). En esta determinación se detectó una mayor presencia de PD en las caras V que en las P/L (p<0,001).

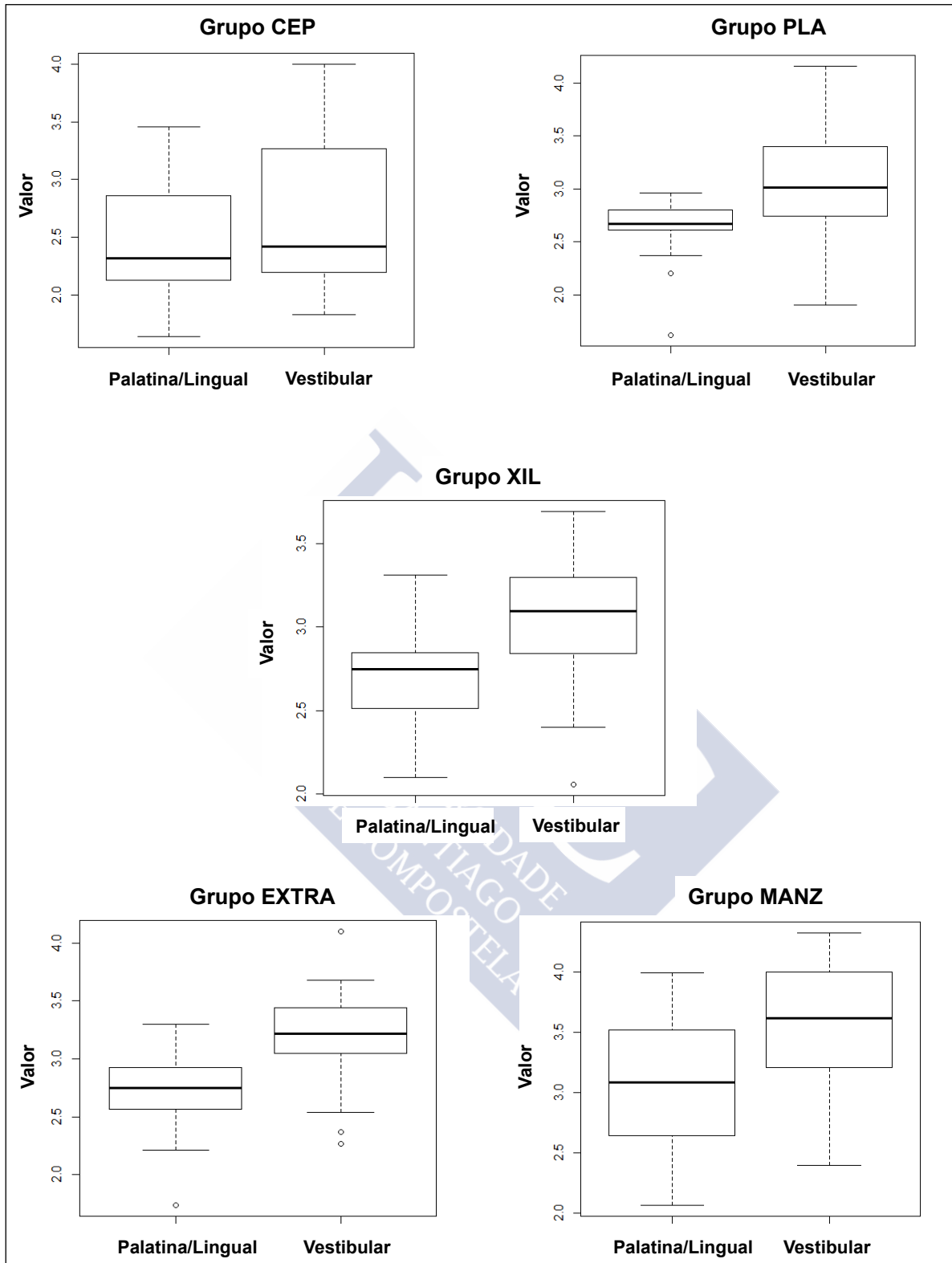
El IP-24 tras masticar el PLA fue significativamente superior al IP-I ($p < 0,001$). En el análisis por superficies se observó que las V registraron una mayor presencia de PD a las 24 horas que las P/L ($p < 0,001$).

En el caso del XIL, el IP-24 también resultó significativamente superior al IP-I ($p < 0,001$). De nuevo fueron las áreas V las que registraron una mayor cantidad de PD a las 24 horas respecto a las P/L ($p < 0,001$).

El IP-24 obtenido tras masticar el EXTRA fue significativamente superior al IP-I ($p = 0,001$). Se registró una mayor presencia de PD a las 24 horas en las superficies V que en las P/L ($p < 0,001$).

El grupo MANZ no siguió la tendencia de los experimentos anteriores y fue el único donde se registró un IP-24 significativamente inferior al IP-I ($p < 0,001$). Sin embargo, la presencia de PD por superficies fue similar a la del resto de grupos, con una mayor cantidad en las caras V que en las P/L ($p < 0,001$).

En resumen, el IP-24 obtenido con cada método de remoción fue significativamente superior a su respectivo IP-I, a excepción del MANZ, cuyo IP-24 fue inferior al IP-I (tabla 4). Si hubo uniformidad en el análisis de superficies dentarias, ya que en todos los grupos el IP-V a las 24 horas fue mayor que el IP-P/L (figura 13).



CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Figura 13. Índice de placa palatina/lingual y vestibular a las 24 horas en los diferentes grupos de estudio.

Al comparar los IP-24 de los distintos métodos de remoción entre sí, el IP-24 del grupo CEP se mostró estadísticamente significativo respecto a todos los demás. Entre los grupos PLA, XIL y EXTRA las diferencias de IP-24 fueron mínimas y no alcanzaron significación estadística. El método MANZ de nuevo marcó diferencias significativas respecto a todos los demás, ya que fue el único que redujo la presencia de PD respecto a la observación previa (tabla 5).

	CEP	PLA	XIL	EXTRA
PLA	p=0,001			
XIL	p=0,001	p=0,965		
EXTRA	p<0,001	p=0,427	p=0,402	
MANZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 5. Significación estadística del Índice de placa a las 24 horas entre los diferentes grupos de estudio (n=20).

El IP-24 fue significativamente superior al IP-B en todos los métodos de remoción, a excepción del EXTRA (p=0,051) (tabla 6).

	IP-24 Media (Rango)	IP-B Media (Rango)	Significación estadística p-valor
CEP	2,575 (1,800-3,700)	2,338 (1,100-3,130)	p=0,010
PLA	2,871 (1,760-3,540)	2,598 (1,500-3,130)	p=0,003
XIL	2,867 (2,310-3,500)	2,644 (1,920-3,030)	p=0,015
EXTRA	2,943 (2,050-3,600)	2,764 (1,190-3,240)	p=0,051
MANZ	3,333 (2,560-4,140)	2,849 (1,900-3,850)	p<0,001

IP-24= Índice de Placa a las 24 horas; IP-B= Índice de Placa Basal; CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 6. Índices de placa a las 24 horas y basal en los diferentes grupos de estudio (n=20).

4.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN SALIVA

4.2.1. Vitalidad bacteriana basal

El valor medio de VB-B en el total del colectivo de estudio fue de 86,82% con un rango que osciló desde el 60,00% obtenido en el grupo PLA hasta el 97,00% correspondiente a los grupos CEP y PLA. Todos los grupos presentaron una media de VB-B superior al 80%, pero sólo en el CEP ésta se situó por encima del 90%.

Las determinaciones del VB-B por grupos fueron: CEP 91,25% (rango 86,00-97,00%); PLA 87,91% (rango 60,00-97,00%); XIL 84,33% (rango 77,00-89,00%); EXTRA 88,44% (rango 70,70-96,00%) y MANZ 82,15% (rango 72,80-89,90%).

4.2.2. Vitalidad bacteriana inmediata

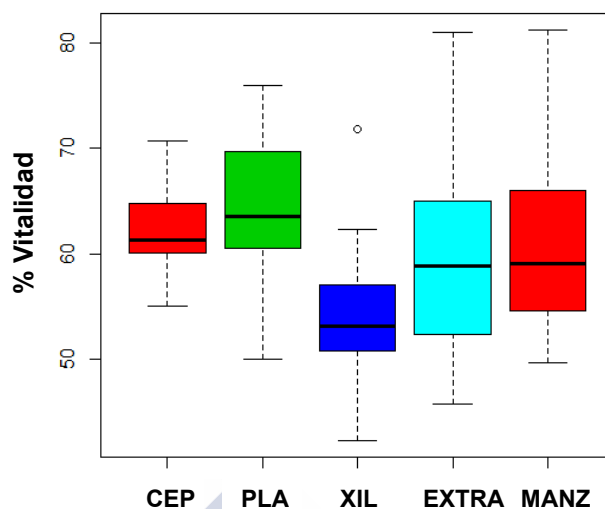
El valor medio de VB-I en el total del colectivo de estudio fue de 60,04% con un rango que osciló desde el 42,30% obtenido en el grupo XIL hasta el 81,20% correspondiente al grupo MANZ. Ninguno de los grupos alcanzó un porcentaje de VB-I superior al 65%, destacando la baja vitalidad obtenida en el XIL (figura 14).

La VB-I fue significativamente inferior a la VB-B en los 5 métodos de remoción de PD evaluados ($p < 0,001$) (tabla 7 y figura 14). La figura 15 ilustra esta situación en el grupo XIL.

	% VB-I Media (Rango)	% VB-B Media (Rango)	Significación estadística p-valor
CEP	62,21 (55,00-70,70)	91,25 (86,00-97,00)	$p < 0,001$
PLA	64,00 (50,00-76,00)	87,91 (60,00-97,00)	$p < 0,001$
XIL	53,83 (42,30-71,80)	84,33 (77,00-89,00)	$p < 0,001$
EXTRA	59,56 (45,70-81,00)	88,44 (70,70-96,00)	$p < 0,001$
MANZ	60,77 (49,60-81,20)	82,15 (72,80-89,90)	$p < 0,001$

VB-I= Vitalidad bacteriana inmediata; VB-B= Vitalidad bacteriana basal; CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 7. Vitalidad bacteriana inmediata y basal en los diferentes grupos de estudio (n=20).



CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Figura 14. Vitalidad bacteriana inmediata en los distintos grupos de estudio.

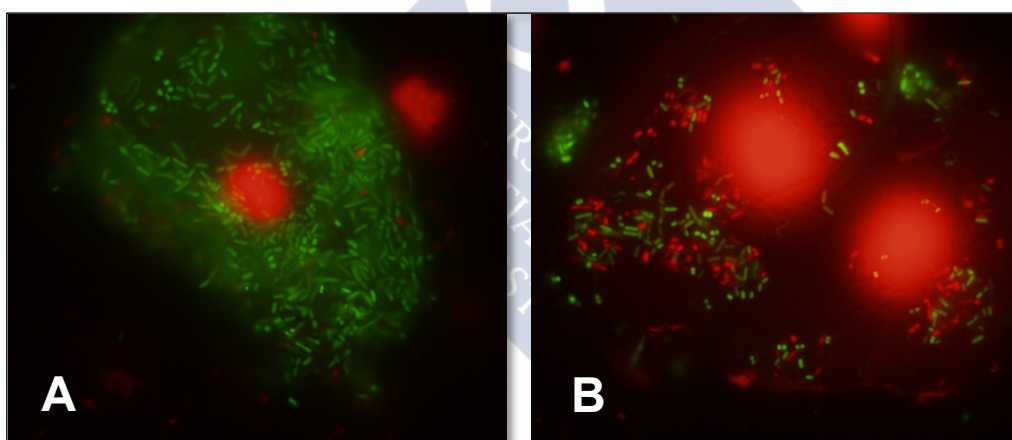


Figura 15. Efecto de la masticación del chicle de xilitol sobre la vitalidad bacteriana (100x). A= vitalidad bacteriana basal (84,33% de vitalidad); B= vitalidad bacteriana inmediata (53,83%) de vitalidad.

A pesar de ser una diferencia significativa respecto a la VB-B, en los grupos CEP y PLA la VB-I media obtenida fue superior al 62% (tabla 7).

Al comparar las VB-I de los distintos métodos de remoción entre sí, se comprobó que el menor porcentaje de VB-I del grupo XIL fue estadísticamente significativo

respecto a todos los demás. Únicamente se obtuvo otra diferencia significativa y fue la obtenida entre los grupos EXTRA y PLA (tabla 8).

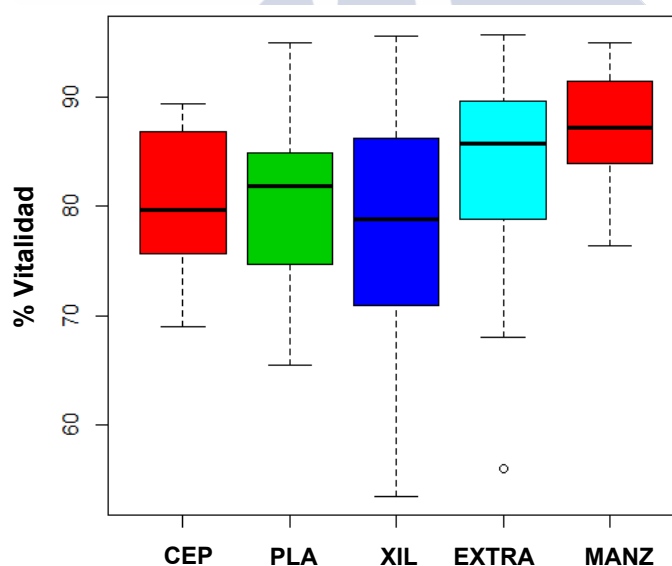
	CEP	PLA	XIL	EXTRA
PLA	p=0,503			
XIL	p<0,001	p<0,001		
EXTRA	p=0,146	p=0,032	p=0,006	
MANZ	p=0,377	p=0,110	p=0,001	p=0,598

CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 8. Significación estadística de la vitalidad bacteriana inmediata entre los distintos grupos de estudio (n=20).

4.2.3. Vitalidad bacteriana a las 24 horas

El valor medio de VB-24 en el total del colectivo de estudio fue de 81,69% con un rango que osciló desde el 53,50% obtenido en el grupo XIL hasta el 95,70% correspondiente al grupo EXTRA (figura 16).



CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Figura 16. Vitalidad bacteriana a las 24 horas en los distintos grupos de estudio.

En ninguno de los grupos se alcanzó una vitalidad media superior al 88%, destacando de nuevo el bajo promedio del grupo XIL, que se situó en el 77,34% (rango

53,50-95,60). Por el contrario, la vitalidad media del grupo MANZ se situó en el 87,11% (rango 76,40-95,00). Todos estos valores se incluyen en la tabla 9.

	% VB-24 Media (Rango)	% VB-I Media (Rango)	Significación estadística p-valor
CEP	80,26 (69,00-89,40)	62,21 (55,00-70,70)	p<0,001
PLA	80,58 (65,50-95,00)	64,00 (50,00-76,00)	p<0,001
XIL	77,34 (53,50-95,60)	53,83 (42,30-71,80)	p<0,001
EXTRA	83,17 (56,00-95,70)	59,56 (45,70-81,00)	p<0,001
MANZ	87,11 (76,40-95,00)	60,77 (49,60-81,20)	p<0,001

VB-24= Vitalidad bacteriana a las 24 horas; VB-I= Vitalidad bacteriana inmediata; CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chiclos con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 9. Vitalidad bacteriana a las 24 horas e Inmediata en los diferentes grupos de estudio.

En todos los métodos de remoción los registros de VB-24 fueron, significativamente superiores a los de VB-I (tabla 9).

La elevada VB-24 obtenida en el grupo MANZ resultó ser estadísticamente superior a la obtenida con todos los demás excepto con el EXTRA. Así mismo, la VB-24 del grupo EXTRA fue significativamente superior a la del XIL. Las restantes diferencias entre grupos no alcanzaron significación estadística (tabla 10).

	CEP	PLA	XIL	EXTRA
PLA	p= 0,877			
XIL	p= 0,157	p= 0,117		
EXTRA	p= 0,158	p= 0,209	p= 0,005	
MANZ	p= 0,009	p= 0,001	p< 0,001	p= 0,053

CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chiclos con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 10. Significación estadística de la vitalidad bacteriana a las 24 horas entre los distintos grupos de estudio (n=20).

La VB-24 fue significativamente inferior a la VB-B en todos los grupos de estudio a excepción del MANZ. En este último método, fue en el único en el que se obtuvo una VB-24 superior a la VB-B, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística (Tabla 11).

	% VB-24 Media (Rango)	% VB-B Media (Rango)	Significación estadística
CEP	80,26 (69,00-89,40)	91,25 (86,00-97,00)	p= 0,003
PLA	80,58 (65,50-95,00)	87,91 (60,00-97,00)	p= 0,004
XIL	77,34 (53,50-95,60)	84,33 (77,00-89,00)	p< 0,001
EXTRA	83,17 (56,00-95,70)	88,44 (70,70-96,00)	p= 0,107
MANZ	87,11 (76,40-95,00)	82,15 (72,80-89,90)	p= 0,769

VB-24= Vitalidad bacteriana a las 24 horas; VB-B= Vitalidad bacteriana basal; CEP= cepillado manual; PLA= masticación de chicle placebo; XIL= masticación de chicle con xilitol; EXTRA= masticación de 3 chicles con xilitol; MANZ= masticación de una manzana.

Tabla 11. Vitalidad bacteriana a las 24 horas y basal en los diferentes grupos de estudio (n=20).





5. DISCUSIÓN



5.1. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

5.1.1. Selección del grupo de estudio

Un adecuado control de la PD aplicando métodos mecánicos consigue mantener el biofilm dentro de un nivel compatible con un correcto estado de salud oral. Para lograrlo, los sujetos deben de estar motivados, tener buena técnica y destreza manual y llevar un estilo de vida saludable (Marsh, 2012). Se ha señalado que los estudiantes de Odontología se caracterizan por su eficiencia y habilidad a la hora de poner en práctica las técnicas mecánicas de higiene oral, que se traduce en una óptima condición periodontal (Wade, 1971; Mouton *et al*, 1975a; Ainamo *et al*, 1977, 1979; Tellefsen *et al*, 1996). Otro argumento esgrimido previamente para realizar este tipo de ensayos entre estudiantes de Odontología es que entienden la naturaleza del estudio y la importancia de seguir las instrucciones del mismo, lo que les motiva a cumplir las condiciones experimentales del estudio (Amoian *et al*, 2010).

Entre los posibles inconvenientes de este colectivo podemos destacar el hecho de que, por las características anteriormente descritas, los resultados podrían no ser extrapolables a otros grupos de edad, ni a grupos poblacionales de la misma edad pero de ambientes socioculturales diferentes. Además, Mouton *et al* destacaron que el factor psicológico de este colectivo es otro aspecto que podría condicionar los resultados (Mouton *et al*, 1975a,b). Estos autores sugieren que los estudiantes de Odontología “sufren” al no poder llevar a cabo las medidas de higiene oral. Durante períodos consecutivos de ausencia de higiene oral podrían reducir el contenido de azúcar de su dieta, presentando así valores inferiores de PD en valoraciones consecutivas (Sjöblom *et al*, 1976). En consecuencia, en el presente estudio se pueden haber obtenido unos valores de IP inferiores a los de la población general.

El número de alumnos se estableció en base al cálculo del tamaño muestral y siguiendo las normas de la Asociación Dental Americana (ADA) para la evaluación de chicles sin azúcar, que establecen un número no inferior a 15 sujetos para cumplir correctamente con los objetivos del estudio. Según la ADA un número reducido de sujetos podría afectar de manera negativa a los resultados obtenidos y al poder estadístico del trabajo (American Dental Association [ADA], 2013).

5.1.2. Formación de la placa dental basal

La PD debe establecerse durante un período mínimo de dos días para alcanzar el nivel crítico del metabolismo del azúcar, que reduce el pH y provoca la desmineralización del esmalte (Imfeld y Lutz, 1980). Por esta razón, y para no perjudicar la salud buco-dental de los participantes, se les realizó el control de PD tras 24 horas de evolución, como ya propusieron Cugini *et al* en 2006 (Cugini *et al*, 2006). Este biofilm de 24 horas resulta menos dañino que un biofilm más maduro y tiene la ventaja de que es fácilmente puntuable o valorable con un índice visual convencional.

Además, estos autores (Cugini *et al*, 2006) comprobaron que niveles de PD-B más elevados no condicionaban una mayor remoción de PD con el cepillado posterior. Este hecho también se comprobó con la masticación de chicles, que no lograron una mayor reducción de PD establecida de 4 días (Ainamo *et al*, 1979)

Nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Cugini *et al* (Cugini *et al*, 2006), en el sentido de que no es necesario partir de un IP-B elevado para que la remoción sea efectiva. De hecho, los valores más bajos de los IP-B de nuestro estudio se registraron en los grupos CEP y PLA y en ambos casos el IP-I fue significativamente inferior.

5.1.3. Modelos de recrecimiento de placa dental a corto plazo

En la literatura, el diseño más empleado en estudios de recrecimiento de la PD es el denominado “recrecimiento de la placa de 4 días” (Binney *et al*, 1997; Moran *et al*, 1997; Riep *et al*, 1999; Claydon *et al*, 2004). Este diseño se utiliza fundamentalmente con el objetivo de comparar los efectos químicos inhibitorios sobre la PD de determinadas fórmulas (pastas de dientes, colutorios, etc.), frente a un control positivo y/o negativo. Se ha usado frecuentemente desde que fue descrito por Addy *et al* en 1983

(Addy *et al*, 1983), pero sólo permite evaluar la inhibición química de la fórmula a testar a corto plazo y en ausencia de medidas de higiene oral mecánicas.

En estudios de pastas dentífricas, se comparan dosis más elevadas que la empleada en un cepillado convencional siguiendo el “*slurry method*” (Duke y Forward, 1982). Éste consiste en diluir la cantidad de pasta a testar en un volumen de agua y mediante el enjuague se reproduce la cantidad de sustancia activa presente en la boca durante el cepillado, pero eliminando el efecto de la limpieza mecánica (Arweiler *et al*, 2002). Aunque inicialmente la cantidad de pasta empleada es mayor que la utilizada habitualmente en el cepillado, la concentración final obtenida es similar a la alcanzada en la cavidad oral tras la dilución salival (Duke y Forward, 1982). En este modelo de recrecimiento de la placa durante 4 días, en primer lugar a todos los participantes se les realiza una profilaxis dental para retirar la PD en su totalidad, el cálculo supragingival y las tinciones extrínsecas. Tras la profilaxis, se suspende el cepillado habitual y los sujetos se enjuagan 2 veces al día durante 4 días con el producto asignado. Al quinto día se tiñen los dientes con un agente revelador para evaluar la PD empleando un índice determinado. Existe una alternativa a este diseño (Vastola y Winston, 1998; He *et al*, 2009, 2010), y es la utilización de un método de cepillado limitado durante 4 días. Según este sistema, un dentífrico es utilizado para el cepillado de las superficies linguales de los dientes y también como enjuague (*slurry method*). Lo característico de este modelo es que permite una evaluación por separado de: 1) la remoción de la PD mediante el cepillado y 2) las propiedades inhibitorias sobre la PD de las fórmulas dentífricas a corto plazo.

Aunque el modelo de recrecimiento de PD durante 4 días es el más empleado en este tipo de estudios, en la presente tesis no se siguió este esquema de trabajo por varias razones. En primer lugar para evitar que los voluntarios tuviesen que abstenerse de realizar las medidas de higiene oral habituales (cepillado, hilo dental...) durante 4 días, lo que podría favorecer la aparición de patología oral. Por otro lado, se optó por evaluar la eficacia antiplaca del chicle/s con XIL y de la manzana en un período de tiempo más corto (24 horas), tras un único episodio de masticación. Consideramos que este modelo de recrecimiento a corto plazo propuesto es más factible que se produzca en la vida cotidiana (Rubido *et al*, 2014) y, ha demostrado su eficacia para la evaluación de agentes potencialmente inhibidores de placa y nuevos principios activos (Claydon y

Addy, 1995; White *et al*, 2006; Barnes *et al*, 2010; Moazzez *et al*, 2010; Rubido *et al*, 2014).

Durante los períodos de 24 horas de formación inicial del biofilm y a lo largo del período de recrecimiento del mismo, los participantes no podían ingerir alimentos que pudiesen remover la placa o potenciar la autoclisis, así como evitar el consumo de alcohol (ya que puede ejercer un efecto antimicrobiano tanto en la saliva como en la placa). También tuvieron que renunciar al consumo de chicles con XLT durante todo el estudio debido a que su consumo frecuente provoca cambios en la flora oral, que pueden persistir a lo largo de varias semanas tras el cese del consumo (Loesche *et al*, 1984). Es más, su consumo propicia la selección de cepas de *Streptococcus mutans* resistentes a este polirol. Estas cepas se caracterizan por ser células mutantes naturales que han perdido su sensibilidad a la acción inhibitoria del XIL (Trahan y Mouton, 1987; Trahan *et al*, 1992), aunque parecen ser menos virulentas (Söderling *et al*, 1997). Por otra parte, el consumo regular podría alterar el equilibrio existente entre los *Streptococcus mutans* en los dientes y en la saliva (Söderling *et al*, 1991; Trahan *et al*, 1992).

5.1.4. Selección del índice de placa

El empleo de índices clínicos en la población general o en un grupo determinado ha sido tradicionalmente el método más efectivo para valorar su estado de salud (Antonio *et al*, 2007). Los índices utilizados no sólo permiten valorar el estado de salud de los individuos, sino también su grado de potencialidad patológica (Davies, 1968).

Un índice debe de ser simple, fácil de usar, fiable, reproducible, tratable para el análisis estadístico e igualmente sensible a lo largo de la escala (Davies, 1968). En el caso de los IP, deben de ser lo suficientemente sensibles como para poder valorar la placa del margen gingival, y de áreas de difícil acceso al cepillado (Furuichi *et al*, 1992; Saxer y Yankell, 1997), estimando la cantidad de PD existente según el área de diente cubierta (Fischman, 1986).

Los IP tienen diversas aplicaciones aunque generalmente se usan para testar la eficacia de agentes potencialmente inhibidores de placa o diferentes productos de higiene oral (Addy *et al*, 1999). En los estudios clínicos es muy importante poder cuantificar de manera fiable la PD. En muchos de estos trabajos epidemiológicos, se

utilizan IP subjetivos (Silness y Løe, 1964; Turesky *et al*, 1970), ya que la valoración de las áreas de placa (teñidas o sin teñir) se basa en el criterio del examinador clínico.

Los problemas de este tipo de metodologías derivan de la naturaleza subjetiva de los índices y de la necesidad de incorporar un examinador cualificado y experimentado en el manejo de los mismos. Aunque permiten garantizar que en un ensayo clínico todos los examinadores están calibrados, no avalan la reproducibilidad intraexaminador en distintos períodos de tiempo (Pretty *et al*, 2005). Además, valorar niveles de placa marginal en sujetos con una higiene oral normal es logísticamente complicado con las técnicas convencionales (White *et al*, 2006) y, por otro lado, este tipo de metodología no permite la creación de bases de datos que puedan ser re-evaluadas posteriormente o utilizadas en futuras investigaciones clínicas.

Las limitaciones de los índices clínicos a la hora de medir la PD han impulsado a los investigadores a buscar nuevas tecnologías para poder cuantificarla de manera más fiable y reproducible. La tecnología del análisis de la imagen es una herramienta útil para los investigadores que permite trabajar con bancos de registros clínicos, bases de datos de excelente calidad y durabilidad (Kelly *et al*, 2008). Los registros fotográficos de la zona de la placa pueden ser reevaluados con posterioridad en futuras investigaciones. También pueden ser convertidos en otros índices, así como transformados en distintos formatos (Smith *et al*, 2001; Kelly *et al*, 2008). El análisis de la imagen permite cuantificar con gran precisión, tanto áreas de placa simple como complejas, y sin la necesidad de un clínico. En la actualidad esta tecnología está limitada a los dientes anteriores y esto acota su uso en aquellos ensayos en los se necesite el valor de la PD de determinadas localizaciones o de toda la dentición (Smith *et al*, 2001).

Uno de los sistemas que ha ganado especial relevancia en los últimos años es el uso de imágenes de fluorescencia, que permite una evaluación cuantitativa no invasiva de la placa a lo largo del margen gingival, región generalmente evaluada mediante sondaje con índices convencionales (White *et al*, 2006). La base de esta técnica (Análisis de la Imagen Digital de la Placa, *DPIA*, por sus siglas en inglés) es la adherencia de fluoresceína a la placa para la posterior medición digital del componente fluorescente. A partir de las imágenes obtenidas se puede cuantificar la PD con exactitud (Sagel *et al*, 2000). Además, esta técnica permite medir pequeñas cantidades

de placa y ha sido aplicada con éxito en pacientes portadores de aparatos de ortodoncia, permitiendo un análisis detallado de determinadas regiones de interés (Klukowska *et al*, 2011). Entre las desventajas destacan que es un sistema caro y que las cuantificaciones de PD están limitadas a las superficies V de los dientes anteriores (Sagel *et al*, 2000).

La elección de un sistema u otro de medición de placa podría afectar a la posibilidad de obtener diferencias detectables en la velocidad de formación de la placa incipiente (Quirynem *et al*, 1991). La elección del índice que vaya a utilizarse en cualquier ensayo clínico es dependiente de: los objetivos del ensayo, del tamaño poblacional y de la duración del estudio (Fischman, 1986). Addy *et al* (Addy *et al*, 1999) demostraron que los IP ofrecen discriminación suficiente para los ensayos de recrecimiento de placa.

Las dos principales razones por las que en este estudio se optó por utilizar un IP convencional fueron: 1) la imposibilidad de afrontar el coste que supone la adquisición de la infraestructura necesaria para emplear la tecnología de análisis de la imagen y 2) la limitación que supone no poder valorar la PD en toda la dentición, puesto que esta técnica está limitada al sector anterior.

En base a estos argumentos se decidió emplear la modificación de Turesky del IP de Quigley-Hein (Quigley y Hein, 1962; Turesky *et al*, 1970). Este índice ha sido previamente validado y es uno de los más usados para la evaluación de productos de higiene oral en los que se cuantifica la presencia de PD (Claydon y Addy, 1995; Claydon *et al*, 2004; Cugini *et al*, 2006; Rubido *et al*, 2014). La modificación de Turesky del IP de Quigley-Hein (Quigley y Hein, 1962; Turesky *et al*, 1970) lo convierte en un índice fiable para medir la placa mediante una estimación de las áreas de las superficies V y P/L cubiertas por placa teñida centrándose en el tercio gingival del diente.

Para minimizar los errores intra e inter-examinador en el uso de los índices clínicos, éstos deben ser meticulosamente entrenados y, si el estudio se prolonga durante un largo período de tiempo, deben ser recalibrados (Mojon *et al*, 1996). En este estudio, los controles de placa fueron realizados por un único examinador familiarizado con el uso del índice y que previamente había sido calibrado, logrando así un alto nivel de reproducibilidad en la valoración de la PD al ser analizada de forma independiente. La

posibilidad de formar a diferentes individuos en el uso de un índice permite que se pueda valorar la reproducibilidad del mismo (Levinkind *et al*, 1999).

5.1.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana en la flora salival aplicando microscopía de epifluorescencia

La saliva es un vehículo de diseminación de los microorganismos orales de un nicho ecológico a otro. Para su estudio presenta una serie de ventajas frente a otros ecosistemas ubicados en la cavidad oral:

- Es fácilmente accesible.
- Es sencilla y asequible para muestrear.
- No se requiere de un período de neoformación, como ocurre con la PD, ni exige un cambio de hábitos en el individuo (higiene oral, alimenticios, tabaquismo,...).
- Se pueden obtener varias muestras simultánea o consecutivamente.
- Es fácil de conservar y almacenar.

Tradicionalmente, los recuentos bacterianos se han hecho con las técnicas de cultivo en placa, sin embargo, la fiabilidad de esta técnica para la valoración de la VB es cuestionada (Barer y Harwood, 1999).

Algunos autores consideran que los métodos de cultivo se encuentran sesgados por representar un análisis retrospectivo de las muestras (Postgate, 1989). Son técnicas laboriosas que requieren mucho tiempo (Li *et al*, 1996), y proporcionan información de una pequeña parte de la microflora oral (las bacterias cultivables con capacidad para dividirse), quedando excluidas parte de la población que, aún pudiendo ser viable, no son cultivables en los medios disponibles (Barer y Harwood, 1999; Boulos *et al*, 1999). También se achaca a estas técnicas que sólo miden Unidades Formadoras de Colonias, no células viables individuales (Weiger *et al*, 1998), y para obtener estos resultados son precisos varios días (Nadkarni *et al*, 2002; Boulos *et al*, 1999). Otras de las limitaciones que presentan son la sensibilidad a las condiciones de cultivo (temperatura, medios de cultivo, duración de la incubación,...) (McFeters, 1990) y la dificultad para garantizar

las necesidades fisiológicas y/o metabólicas de las comunidades polimicrobianas *in vitro* (Nadkarni *et al*, 2002), como es la PD. Todos estos factores, bien sea de manera individual o en su conjunto, condicionan la reproducibilidad de la comunidad bacteriana, y podrían favorecer la infravaloración de la VB (Boulos *et al*, 1999) o incluso, la sobreestimación de algunos géneros bacterianos.

Una de las alternativas a las técnicas de cultivo para el recuento bacteriano, implica el uso de marcadores fluorescentes que permiten analizar distintas funciones celulares o la integridad de estructuras celulares (Joux y Lebaron, 2000), mediante microscopía de epifluorescencia, microscopía confocal, citometría de flujo o con un lector de microplaca de fluorescencia (Berney *et al*, 2007).

La solución SYTO9/YP permite valorar la integridad de la membrana plasmática, al distinguir las bacterias con las membranas citoplasmáticas inalteradas de aquellas que la tienen dañada mediante microscopía de epifluorescencia (Singh, 2006). Sin embargo, normalmente se usa para diferenciar las células activas de las muertas (Tomás *et al*, 2009; Tomás *et al*, 2010; Rubido *et al*, 2014).

Entre las ventajas de este sistema se incluyen las siguientes: es fiable, rápido y fácil de usar (Boulos *et al*, 1999; Singh, 2006), cuantifica vitalidad bacteriana en “tiempo real” (Boulos *et al*, 1999), permite detectar bacterias no cultivables con técnicas de cultivo en placa (Joux y Lebaron, 2000; Berney *et al*, 2007), no requiere tiempo de incubación (Joux y Lebaron, 2000), permite el contaje simultáneo de células viables y totales (Boulos *et al*, 1999), las preparaciones son fáciles de leer debido al alto contraste entre el color verde (de las bacterias viables) y el rojo (de las bacterias muertas) (Boulos *et al*, 1999). Además, es una técnica que posibilita marcar un rango amplio de microorganismos tales como eubacterias (Boulos *et al*, 1999; Tomás *et al*, 2009; Tomás *et al*, 2010; Rubido *et al*, 2014), arqueas (Leuko *et al*, 2004) y células eucariotas como levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Zhang y Fang, 2004).

Entre los factores que pueden afectar a la fiabilidad de los resultados de esta técnica destacan el daltonismo, que afecta al 8-12% de los hombres y casi al 1% de las mujeres (Hope *et al*, 2002), la coagregación bacteriana (incluso después de la homogenización de la muestra), la tinción de elementos celulares y/o del material contaminante que dificultan la cuantificación bacteriana al interferir con la microscopía de epifluorescencia (Veal *et al*, 2000). También se ha descrito la influencia del estado

fisiológico de la bacteria sobre las propiedades de la tinción (Berney *et al*, 2007), la observación de estados intermedios (amarillo o naranja) de difícil interpretación (Berney *et al*, 2007). Se ha especulado que estos colores intermedios podrían ser una consecuencia de diferentes grados de alteración de la membrana (Berney *et al*, 2007) o de la penetración lenta de SYTO9 a través de las membranas intactas (Lehtinen *et al*, 2004) especialmente de las bacterias Gram negativas (Berney *et al*, 2007). Es más, algunos autores opinan que la examinación de las bacterias tratadas con fármacos es tediosa, lleva mucho tiempo y es inadecuada para testar un gran número de muestras (Singh, 2006).

5.2. PLACA DENTAL BASAL

La salud oral y la nutrición mantienen una relación sinérgica. La dieta tiene un efecto local en la salud oral, fundamentalmente en la integridad de los dientes, en el pH y en la composición de la PD y la saliva. La malnutrición puede afectar de manera negativa en el volumen y en las propiedades antibacterianas y físico-químicas de la saliva (Touger-Decker y van Loveren, 2003).

La dieta proporciona azúcares y otros carbohidratos fermentables (almidón) que, tras ser hidrolizados por la amilasa salival, son metabolizados a ácidos por las bacterias de la PD provocando un descenso en el pH de la placa y de la saliva (Featherstone, 2000). La forma de presentación de estos carbohidratos fermentables influye de manera directa en la duración de la exposición y en la retención de la comida sobre las superficies de los dientes. La retención prolongada de componentes cariogénicos provoca períodos más extensos de producción de ácidos y demineralización y períodos más breves de remineralización (Kashket *et al*, 1991; Lingström *et al*, 2000).

Una ingesta frecuente de azúcar da lugar a una placa más voluminosa que una dieta proteica (Carlsson y Egelberg, 1965; Newbrun, 1967). El patrón de ingesta de bebidas y sólidos azucarados juega un papel clave en el inicio y desarrollo de PD. Las bebidas azucaradas pasan a través de la cavidad oral rápidamente con una adherencia y un tiempo de contacto con los dientes limitado. Por el contrario, el mantener bebidas que contienen azúcar en la cavidad oral durante un período prolongado de tiempo o el sorbo constante de este tipo de fluidos aumenta el riesgo de caries. Fuentes de azúcar de larga duración, como pueden ser los caramelos duros, se mantienen durante más tiempo en la

cavidad oral, y así los azúcares son liberados de manera gradual (Touger-Decker y van Loveren, 2003).

La frecuencia de la ingesta *per se* está relacionada con el desarrollo de caries y con el tiempo del que disponen los microorganismos para metabolizar el azúcar (Bowen *et al*, 1983). La duración del descenso del pH tras la ingesta de una comida cariogénica es otro factor importante en el desarrollo de la PD. El descenso del pH dura 30 min (Stephan y Miller, 1943), sin embargo, las mediciones de telemetría del pH muestran que en PD de pocos días el descenso en el pH puede durar varias horas, a menos que la zona afectada se limpie por un flujo de saliva estimulada o mediante la remoción de la comida adherida (Imfeld, 1983).

El aclaramiento oral tiene un papel fundamental ayudando a eliminar la mayoría de los carbohidratos. Esta propiedad es específica de cada persona, ya que depende del metabolismo de los microorganismos, de la adhesión a las superficies del diente, de la degradación producida por las enzimas salivales y de la PD, del flujo salival y de la deglución (Touger-Decker y van Loveren, 2003).

La tasa/velocidad de aclaramiento salival de la comida con alto contenido en almidón es baja (Edgar *et al*, 1975; Bibby *et al*, 1986). Este tipo de comida, como las patatas fritas, permanece retenida sobre las superficies de los dientes en grandes cantidades, más fácilmente que aquellos alimentos que tienen un menor contenido en almidón, como pueden ser el chocolate con leche o los caramelos (Kashket *et al*, 1991).

Por el contrario, existen ciertos alimentos con propiedades anticariogénicas, como el queso. Los mecanismos que pueden explicar sus efectos son: aumento del flujo salival y, por consiguiente, aumenta el efecto de tamponamiento que puede neutralizar los ácidos de la placa; inhibición de las bacterias de la PD, reduciendo así la producción de ácido; aumento del aporte de sustancias alcalinas (calcio, fosfato inorgánico y caseína), que disminuyen la desmineralización y fomentan la remineralización (Kashket y DePaola, 2002). Otras sustancias con efecto anticariogénico son los polifenoles extraídos de diversos tipos de plantas (Ito *et al*, 1984; Kakiuchi *et al*, 1986; Tagashira *et al*, 1997).

Los hábitos de consumo y las influencias sociales y socioculturales juegan un papel importante a la hora de minimizar el inicio y/o desarrollo del biofilm y la caries. La ecología del biofilm oral puede alterarse de manera beneficiosa excluyendo los

carbohidratos fermentables de la dieta o estimulando el flujo salival (Beighton, 2009). Además, diversos autores demostraron que la sustitución en la dieta del azúcar por otros elementos reducía la cantidad de PD provocando también ciertos cambios en su composición química (Scheinin y Mäkinen, 1971, 1972; Mäkinen y Scheinin, 1971; 1972).

5.3. CEPILLADO DENTAL

5.3.1. Remoción mecánica inmediata de la placa dental

Al revisar la literatura hemos encontrado un trabajo en el que se compara el efecto en la remoción mecánica de la PD de dos modalidades de cepillado dental (supervisado vs no supervisado) de 2 minutos de duración (Schneider y Knieknecht, 1986). Los resultados obtenidos demostraron que ambas técnicas de cepillado lograron mayor reducción de PD en la cara V que en la P, sin embargo, entre ambas técnicas se encontraron diferencias con respecto a la eficacia en la retirada del biofilm dental, puesto que el cepillado no controlado logra la mitad de la eficacia que el controlado (Schneider y Knieknecht, 1986).

Estos resultados están en consonancia con los del presente estudio, en el que el IP-I en las caras P/L fue superior a las V en el grupo CEP. De todas las técnicas de remoción evaluadas, el CEP fue la más eficaz retirando la placa dental establecida (IP-B).

5.3.2. Recrecimiento de la placa dental a las 24 horas

Rubido *et al* (Rubido *et al*, 2014) llevaron a cabo un estudio en el que testaron la actividad antiplaca y antimicrobiana de tres pastas dentífricas comestibles. Observaron que la PD a las 24 horas tras llevar a cabo el cepillado con los tres dentífricos fue significativamente superior al valor de PD a las 24 horas obtenido tras realizar el cepillado con agua estéril. Algo similar ocurrió en el presente trabajo, el valor de PD-24 tras la remoción con el CEP fue significativamente inferior al logrado con el resto de métodos de remoción. La diferencia entre ambos trabajos estriba en que en el primero (Rubido *et al*, 2014) se llevó a cabo un cepillado hasta obtener un valor 0 de PD, mientras que en el presente trabajo, tras realizar un CEP de 2 min de duración, el valor medio de IP-I fue de 1,743 y por tanto, es razonable que tras un período de

recrecimiento de la PD de 24 horas se obtenga un valor mayor (2,575) frente al 1,163 obtenido en el trabajo de Rubido *et al* (Rubido *et al*, 2014).

En el presente trabajo, a las 24 horas de haber realizado el cepillado se registró un IP-24 mayor en la cara V que en la P/L.

En consonancia con nuestros resultados, Addy *et al* (Addy *et al*, 1982) afirmaron que la cara V, y especialmente la VS, parece proporcionar un ambiente idóneo para el acúmulo de PD cuando las medidas de higiene oral mecánicas no se llevan a cabo.

Se ha sugerido que la mayoría de los individuos sólo eliminan el 40% de la PD en una única sesión de cepillado, siendo la placa remanente la responsable del rápido recrecimiento (De la Rosa *et al*, 1979). Por lo tanto, en los estudios en los que se cuantifica la placa dental antes y después del cepillado, el recrecimiento de PD podría estar condicionado por una técnica de cepillado deficiente o por el propio diseño metodológico del estudio (Parizotto *et al*, 2003; Paraskevas *et al*, 2007; Gallagher *et al*, 2009).

5.3.3. Vitalidad bacteriana inmediata en la saliva

Rubido *et al* (Rubido *et al*, 2014) encontraron que el porcentaje de bacterias vivas en muestras de saliva inmediata fue significativamente superior tras llevar a cabo el cepillado dental con agua estéril con respecto al resto de cepillados con las 3 pastas dentífricas comestibles. En el presente trabajo, fue en el grupo CEP donde se registró el segundo valor más alto de VB-I con respecto al resto de procedimientos. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que el CEP se llevó a cabo con agua estéril y en ausencia de agentes antimicrobianos (normalmente incorporados en pastas de dientes) que puedan provocar la muerte celular bacteriana y que, en este caso, se plasmaría en un descenso en la VB-I.

En la literatura, no hemos encontrado ningún trabajo que valore la VB-24 en muestras de saliva tras realizar un cepillado. En el presente trabajo, a las 24 horas de realizar el cepillado, el 80,26% de las bacterias presentes en la saliva eran viables.

5.4. MASTICACIÓN DE CHICLES

5.4.1. Remoción mecánica inmediata de la placa dental

El chicle ha sido universalmente aceptado para favorecer tanto el mantenimiento como la promoción de la salud oral (Hayashi *et al*, 2007). Los efectos mecánicos de limpieza de los chicles han sido estudiados fundamentalmente en depósitos de PD establecidos y los resultados que se han obtenido son equívocos (Ainamo *et al*, 1977; Addy *et al*, 1982; Levinkind *et al*, 1999).

En la mayoría de los estudios se valoran los efectos de los chicles en los depósitos de placa de las caras V y P/L (Mouton *et al*, 1975a; Ainamo *et al*, 1977; Addy *et al*, 1982; Hanham y Addy, 2001), siendo de especial interés los beneficios potenciales que podrían tener en la salud gingival. Por el contrario, en otros trabajos se valora el efecto del chicle en las superficies oclusales de los dientes (Levinkind *et al*, 1999; Hanham y Addy, 2001; Pizzo *et al*, 2007), que son las caras del diente con mayor riesgo de desarrollar caries dental.

Masticar chicle es un hábito muy común que elimina de media el 80% de los residuos orales (Volker, 1948) y, por tanto, la limpieza total de la dentición no es posible exclusivamente con el uso de chicles (Möller y Poulsen, 1973; Bratthall, 1973). En la década de los 70 se llevaron a cabo estudios a corto plazo que demostraron que los chicles sin azúcar no eran capaces de retirar la PD establecida (Bratthall, 1973; Ainamo *et al*, 1977). Algunos autores evaluaron el efecto de aumentar la dosis de XLT pero tampoco obtuvieron una mejora significativa de la capacidad de remoción mecánica de la PD. La remoción durante un único episodio de masticación de 20 minutos de duración (2 chicles de XLT, masticados durante 10 minutos cada uno) no afectó a la cantidad de placa, al no encontrarse diferencias entre los valores gravimétricos obtenidos antes y después de la masticación de los chicles con XLT que pesaban 4 g (contenido de XLT 2 g; 50%) (Mouton *et al*, 1975a). Ainamo *et al* (Ainamo *et al*, 1979) observaron que masticar 10 chicles de XIL durante 2,5 horas (1 chicle cada 15 minutos) tampoco lograba ninguna reducción, ni significativa ni clínica, en la PD establecida de 4 días.

Estos resultados corroboran la incapacidad del chicle *per se* para retirar la PD de las superficies de los dientes o, al menos, no sería suficiente para alcanzar los propósitos de higiene oral (Mouton *et al*, 1975a). Kakodkar y Mulay (Kakodkar y Mulay, 2010)

sugirieron que al utilizar un único chicle podría ser el pequeño tamaño del bolo (teniendo en cuenta la contracción que sufre durante la masticación) el que podría obstaculizar la acción mecánica del chicle sin llegar a eliminar PD. Por esta razón, sugieren la necesidad de utilizar más de un chicle para potenciar su acción mecánica.

Sin embargo, en el presente trabajo, cuando se masticaron tres chicles (EXTRA) y se testó su eficacia en la remoción mecánica de la PD se observó que no fue superior a la de un único chicle (XIL). Las dos variantes de aplicación de chicles con XLT (XIL y EXTRA) removieron la placa establecida de las superficies lisas de los dientes, pero no de forma significativa. Estos resultados apoyan la idea de que el margen gingival está relativamente bien protegido de los efectos derivados de la masticación (Hanham y Addy, 2001) y confirman el planteamiento de que la PD se encuentra firmemente fijada al diente y que un aumento del flujo de saliva, estimulado por la masticación del chicle, no es capaz de retirar cantidades significativas de PD (Kakodkar y Mulay, 2010).

Addy *et al* (Addy *et al*, 1982) comprobaron que la masticación de 2 chicles con o sin azúcar (sorbitol) durante 1 hora lograba reducir en ambas arcadas la placa establecida durante 3 días. Levinkind *et al* (Levinkind *et al*, 1999) también observaron que la masticación de un chicle durante 20 minutos conseguía reducir la placa establecida de 4 días sobre las superficies oclusales.

La remoción mecánica de la placa demostrada en los trabajos anteriores puede que se consiguiese por haber estado un largo período de tiempo masticando el chicle (Addy *et al*, 1982; Levinkind *et al*, 1999). Teniendo en cuenta que la masticación ocurre principalmente en el sector posterior, es lógico que la retirada mecánica de la PD mediante la masticación de chicles sea efectiva especialmente en las superficies oclusales (Levinkind *et al*, 1999).

5.4.2. Recrecimiento de la placa dental a las 24 horas

Al igual que en las pastas de dientes, un ingrediente activo ideal en los chicles no sólo debería tener un efecto inhibitorio sobre la PD remanente si no que el efecto debería durar tras la masticación y prevenir el establecimiento de nueva placa (Arweiler *et al*, 2002).

A la hora de valorar la eficacia antiplaca de cualquier tipo de chicle en la formación de la placa *de novo* (Addy *et al*, 1982; Hanham y Addy, 2001; Pizzo *et al*, 2007;

Tangade *et al*, 2012), la metodología más utilizada es la que aplica el diseño de “recrecimiento de la placa durante 4 días”, período durante el cual el cepillado dental no está permitido (Addy *et al*, 1983).

Hanham y Addy (Hanham y Addy, 2001) determinaron los efectos de masticar chicle sin azúcar (sorbitol) en el recrecimiento de PD durante 4 días, examinando las superficies lisas (V y P/L) y oclusales y comparando con no masticar chicle. Masticar chicle no provocó ningún efecto en el recrecimiento de PD en las superficies lisas, comparado con no masticar chicle. Por el contrario, redujo de manera considerable la acumulación de placa en las superficies oclusales. Resultados similares obtuvieron Pizzo *et al* (Pizzo *et al*, 2007) cuando evaluaron los efectos inhibitorios de la placa de 3 chicles comerciales con aditivos (enzimas, abrasivos e iones metálicos divalentes) y los compararon con un chicle sin azúcar, libre de aditivos, en un modelo de recrecimiento de placa de 4 días. El chicle sin azúcar fue efectivo reduciendo la formación de PD en las caras oclusales, mientras que no ejerció ninguna acción relevante en las superficies lisas.

Estos resultados apoyan la idea ya comentada de que la zona del margen gingival está bien protegida de los efectos de la masticación. Masticar chicle puede reducir la acumulación de placa en los sitios “predilectos” para la caries, pero tiene poco o ningún efecto en los sitios “predilectos” para la gingivitis (Hanham y Addy, 2001).

En los estudios en los que se valora la inhibición de la PD tras el consumo de chicles frente a la aplicación de medidas de higiene oral rutinarias, se obtienen resultados contradictorios.

Tellefsen *et al* (Tellefsen *et al*, 1996) comprobaron en un grupo de estudiantes de Odontología con una higiene oral excelente que, el control de placa ejercido por el chicle con XLT durante 6 días fue similar al logrado con las medidas de higiene oral rutinarias. Por el contrario, Simons *et al* (Simons *et al*, 1999) demostraron que el control mecánico ejercido por el chicle con XIL durante 5 días no fue tan efectivo como la higiene oral rutinaria de los voluntarios a la hora de retirar la PD. Este hecho es remarcable, ya que los sujetos participantes en este trabajo tenían más de 40 años de edad y no eran profesionales en el ámbito de la salud bucodental y, aún así, mostraron un buen control de la placa.

Las discrepancias obtenidas entre los resultados de ambos estudios podrían deberse a: las diferentes poblaciones de estudio (jóvenes *vs* adultos) (Tellefsen *et al*, 1996; Simons *et al*, 1999), la variedad en el número de participantes (14 *vs* 8) (Tellefsen *et al*, 1996; Simons *et al*, 1999) o al empleo de distintos IP (modificación de Turesky del índice de placa de Quigley-Hein *vs* índice de Silness y Løe) (Tellefsen *et al*, 1996; Simons *et al*, 1999).

El uso diario de chicles con XLT (6 chicles al día) a lo largo de 3 días, durante los cuales no se llevaron a cabo medidas de higiene oral, supuso un 47% menos de placa formada que al masticar un chicle azucarado y entre un 20%-41% menos cuando se comparó con no masticar ningún tipo de chicle (Mouton *et al*, 1975a).

Estudios a corto plazo demostraron que los chicles con azúcar aumentan el ritmo de formación de PD, tanto en la placa *de novo* como en la placa ya establecida (Ainamo *et al*, 1977).

La masticación de un chicle con o sin azúcar 5 veces al día, durante 30 minutos a lo largo de 5 días, logró reducir el acúmulo de PD, teniendo en cuenta que en este estudio la única medida de higiene oral permitida fue la masticación de los chicles. Los registros de PD obtenidos fueron superiores en la arcada superior, debido a que los valores de placa en la cara VS resultaron siempre mayores a los obtenidos en cualquier otra cara (Addy *et al*, 1982). Tangade *et al* (Tangade *et al*, 2012) obtuvieron resultados similares cuando determinaron los efectos de chicles con y sin azúcar (XLT) en el recrecimiento de placa. En este estudio los sujetos masticaron 1 chicle durante 30 minutos, 3 veces al día durante 4 días. Los autores observaron una diferencia mínima, no significativa, entre los chicles con y sin azúcar (XLT), siendo este último el que tuvo una menor puntuación media de placa. Los valores más bajos de PD se registraron en las caras P/L, tanto con el chicle con azúcar como con el chicle con XLT.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los obtenidos en los trabajos anteriormente comentados (Addy *et al*, 1982; Tangade *et al*, 2012), a pesar de que el período de recrecimiento fue sensiblemente inferior. En nuestro estudio, el valor del IP-24, tras la masticación del chicle PLA, XIL y EXTRA, fue significativamente superior en las caras V que en las P/L, a expensas de un mayor depósito de placa en las caras VS que en las VI.

Como ya describieron Addy *et al* (Addy *et al*, 1982), los registros de placa fueron sensiblemente mayores en las caras V, especialmente en la arcada superior, donde parece generarse un ambiente que propicia el acúmulo de placa en ausencia de métodos mecánicos de higiene oral. Los valores más bajos registrados en las caras P/L (Addy *et al*, 1982; Tangade *et al*, 2012) sugieren que los mecanismos naturales de limpieza derivados de la actividad muscular y de la masticación de alimentos alterarían la placa depositada sobre las superficies de los dientes (Addy *et al*, 1982).

Cabe resaltar que la “European Food Safety Authority” (EFSA), tras un proceso exhaustivo de revisión científica, no ha aprobado ninguna de las siguientes afirmaciones: “los chicles sin azúcar reducen la formación de la placa dental” ni “los chicles sin azúcar edulcorados con xilitol ayudan a reducir la placa dental”.

En los estudios en los que se evaluó el efecto antiplaca de chicles que contienen XLT en comparación con los chicles que contienen CHX, los resultados demostraron que son estos últimos los que poseen una mayor eficacia antiplaca, tanto a corto (Tellefsen *et al*, 1996; Simons *et al*, 1999) como a largo plazo (Simons *et al*, 2001).

Con los chicles de acetato de CHX (5 mg de acetato de clorhexidina/chicle) se registraron valores más bajos de PD que con los chicles que contenían XLT (0,8 g/chicle, 80%) en estudios de recrecimiento de PD a corto plazo (5-6 días), y en ausencia de medidas de higiene oral mecánicas (Tellefsen *et al*, 1996, Simons *et al*, 1999). Cuando se valora el efecto de estos chicles en un período de tiempo más amplio (1 año) se vuelve a poner de manifiesto la superioridad del chicle con CHX (5 mg de acetato de clorhexidina/chicle), frente al chicle con XLT (36,7%) (Simons *et al*, 2001). Se ha sugerido que la CHX es menos efectiva removiendo la placa que previniendo su formación, posiblemente porque la CHX es un componente muy reactivo que se une a las proteínas, pero que penetra poco en la PD debido a que se une débilmente a las capas más externas de ésta (Löe y Schiott, 1970).

5.4.3. Vitalidad bacteriana inmediata en la saliva

La masticación de chicle provoca un aumento de la tasa de flujo salival, que conlleva un efecto mecánico de lavado de las bacterias presentes en la cavidad oral. El consumo habitual de chicles sin azúcar estimula la secreción salival y podría suponer

una medida importante en la prevención de caries, debido a los efectos de lavado y tamponamiento que produce (Edgar, 1998).

Si el chicle con XLT no es capaz de retirar la PD, el descenso detectado en la formación de ésta, asociado al uso diario de un producto con XIL, se explicaría por la presencia de alguna propiedad química que afectase al crecimiento o a la colonización bacteriana. Un posible efecto tóxico del XLT en el crecimiento de *Streptococcus mutans* podría afectar a la síntesis de polisacáridos extracelulares, dando lugar a una menor cantidad de PD (Mouton *et al*, 1975a).

La adición de XLT a un chicle puede ser un método efectivo para controlar la población de bacterias cariogénicas, sobre todo en situaciones en las que resulta difícil cepillarse. El XLT reduce los niveles de *Streptococcus mutans*, tanto en la PD como en la saliva (Loesche *et al*, 1984; Birkhed, 1994), y su eficacia está relacionada con la dosis consumida y la frecuencia de la ingesta (Mäkinen *et al*, 1995).

El efecto del XLT en las bacterias podría estar influenciado por la forma de presentación del mismo en la dieta. El contacto directo, sostenido y frecuente del XLT con las superficies del diente se produce con el uso de caramelos o chicles y es necesario para lograr un efecto beneficioso. En el presente estudio, escogimos los chicles como vehículo de liberación para poder obtener cantidades comparables de estimulación salival en todos los grupos (Caglar *et al*, 2007). Los chicles empleados tenían la misma forma, tamaño, peso, color y composición. Las diferencias en el peso podrían afectar a la tasa de flujo salival (Keukenmeester *et al*, 2014). Sin embargo, no se han observado diferencias en la tasa de flujo salival entre chicles con distinta masa (de 1 a 9 gramos), ni entre la goma base y el chicle edulcorado (Rosenhek *et al*, 1993).

Como el XIL no puede interactuar con las bacterias del biofilm dental tan fácilmente como con las de la saliva, debido a la difusión del XIL a través de la biopelícula (Fraga *et al*, 2010), se optó por analizar la actividad antibacteriana de este polioli, en términos de VB, en muestras de saliva y no de PD. Previamente, se ha referido que los niveles disminuidos de *Streptococcus mutans* salivales derivados del uso de XLT, también se relacionan con una reducción de estos microorganismos en la PD (Haresaku *et al*, 2007; Mäkinen *et al*, 2008).

Hasta la fecha, sólo hemos encontrado un trabajo en la literatura científica que valore el efecto antibacteriano en saliva de un único episodio de masticación de un

chicle edulcorado con XLT durante 15 minutos (Ribelles Llop *et al*, 2010). Estos autores evaluaron los niveles de *Streptococcus mutans* salivales, comparando el efecto del chicle con XLT con el de un chicle placebo (parafina). Ambos grupos mostraron diferencias en relación a sus respectivos valores basales. Sin embargo, cuando se compararon ambos grupos entre sí (XLT vs parafina), se observó que masticar chicles de parafina producía una reducción mayor en los niveles salivales de *Streptococcus mutans* que la masticación del chicle con XLT.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, en el que se observó un descenso en la VB-I en las muestras de saliva recogidas tras la masticación de las 3 modalidades de chicle (PLA, XIL, EXTRA), en comparación con sus respectivos valores basales (VB-B). Sin embargo, los niveles más bajos de VB-I se detectaron tras la masticación del chicle con XIL (53,83%), seguido del chicle EXTRA (59,56%), mientras que el valor más alto se registró tras la masticación del chicle PLA (64%). Al comparar las VB-I entre sí, tras la masticación de las distintas modalidades de chicle, el porcentaje más bajo de bacterias vivas se registró tras la masticación del chicle XIL, mientras que la VB-I tras masticar el EXTRA fue inferior a la obtenida con el PLA.

En el presente trabajo, tras la masticación de los chicles XIL y EXTRA se lograron los valores más bajos de VB-I en saliva, a pesar de no alcanzar la dosis recomendada de 6 g XLT/día, necesarios para afectar a la ecología oral (Milgrom *et al*, 2006).

Durante la masticación, los componentes solubles son liberados a lo largo de los primeros 5 minutos, al igual que sucede con la mayor parte de los edulcorantes (Dodds, 2012). Sin embargo, la liberación total de un ingrediente soluble no se logra hasta los 10-15 minutos de masticación (Jacobsen *et al*, 2004). Cabe destacar que, tras masticar el chicle EXTRA, en el presente trabajo no se lograron mejores resultados de actividad antibacteriana inmediata, a pesar del mayor contenido de XLT. Esto podría ser atribuido a que la masticación simultánea de 3 chicles resulta más difícil que la de 1 solo (al formarse un bolo de mayor tamaño y volumen) y que esta situación podría obstaculizar la liberación del poliol. En este sentido, se necesitarían futuras investigaciones que profundicen en la relación existente entre la liberación del XLT y el tamaño del bolo.

Las notables diferencias observadas entre el presente estudio y el publicado por Ribelles Llop *et al* (Ribelles Llop *et al*, 2010) pueden deberse a que estos autores

valoraron el efecto antibacteriano del XLT en una única especie, *Streptococcus mutans*, que supone un pequeño porcentaje de la flora oral. Por el contrario, en el presente trabajo, se testó el porcentaje de bacterias vivas que se encuentran en un momento determinado en la saliva. Teniendo en cuenta que la saliva es un nicho ecológico en el que cohabitan multitud de especies bacterianas distintas, el posible espectro de acción antibacteriano del XLT es lógicamente mayor en el presente trabajo. Otro factor a tener en consideración es que los autores no especifican la concentración de XLT en el chicle que emplearon y, por tanto, no se puede valorar si era o no suficiente para reducir los niveles salivales de *Streptococcus mutans*, en relación a sus valores basales. No encontraron diferencias en la tasa de flujo salival entre ambos grupos (parafina y XLT). Previamente se ha señalado que la parafina estimula la masticación debido a su dureza, lo que provoca un aumento del flujo salival y, como consecuencia, se produce un efecto mecánico de lavado de las bacterias de la cavidad oral (Edgar, 1998). En el presente estudio, para evitar este tipo de sesgos, los chicles PLA fueron idénticos a los chicles evaluados a excepción de la ausencia de XLT en su composición.

5.4.4 Vitalidad bacteriana a las 24 horas en la saliva

Existen varios trabajos en la literatura científica en los que se evaluó la capacidad del XLT para interferir en la composición microbiana del ecosistema salival a corto-medio plazo, tanto en población adulta (Simons *et al*, 1997; Caglar *et al*, 2007; Fraga *et al*, 2010) como en niños (Holgerson *et al*, 2007a).

En una población de la tercera edad, tras la utilización de chicles con XLT (34% XLT y 28% sorbitol) durante 14 días, se observó que los niveles de *Streptococcus mutans* salivales disminuían con respecto a los valores basales. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de *Lactobacillus* spp. ni en los de las levaduras salivales (Simons *et al*, 1997). Consumir durante un período de 3 semanas una dosis diaria de aproximadamente 6 g XLT/día en chicles provocó una reducción de los *Streptococcus mutans* salivales, en comparación con los valores basales. Por el contrario, el chicle placebo (carente de ingredientes activos) no logró tal propósito. A pesar de esto, tampoco se detectó ninguna alteración en los niveles de *Lactobacillus* spp. salivales en ninguno de los dos grupos (Caglar *et al*, 2007).

Holgerson *et al* (Holgerson *et al*, 2007a) obtuvieron resultados similares a los obtenidos por Caglar *et al* (Caglar *et al*, 2007) en una población infantil. El consumo diario durante 4 semanas de 6,18 g de XLT/día en chicles, interfirió en la composición microbiana salival al reducir la proporción de *Streptococcus mutans*, en comparación con los registros basales. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en el grupo control (sorbitol/maltitol) (Holgerson *et al*, 2007a). Estos resultados concuerdan con estudios publicados previamente (Loesche *et al*, 1984; Söderling *et al*, 1989), en los que se manifiesta una ligera superioridad del XLT frente al sorbitol.

En una población adulta altamente infectada por *Streptococcus mutans* ($\geq 10^5$ UFC/mL de saliva), la ingesta diaria de 1 g XLT/día durante 30 días, en chicles (15% XLT, concentración similar a la utilizada en el presente estudio) logró reducir los niveles salivales de esta especie bacteriana tras el cese del consumo y, además, esta reducción persistió durante al menos un mes (Fraga *et al*, 2010).

El XLT puede promover un cambio ecológico creando un ambiente menos cariogénico (Trahan *et al*, 1992; Aguirre-Zero *et al*, 1993; Stecksén-Blicks *et al*, 2004) y, aunque el efecto del XLT en las bacterias orales se observa generalmente tras un uso prolongado (Isokangas *et al*, 2000; Söderling *et al*, 2001; Thorild *et al*, 2006; Haresaku *et al*, 2007), estos trabajos ponen de manifiesto su eficacia antibacteriana en saliva a corto-medio plazo (Simons *et al*, 1997; Caglar *et al*, 2007; Holgerson *et al*, 2007a; Fraga *et al*, 2010).

En el presente estudio, tras un único episodio de masticación, pudo observarse que la VB en saliva se fue recuperando con el transcurso del tiempo, tal y como se refleja en los valores de VB-24. Estos valores resultaron ser inferiores a los basales en los grupos PLA, XLT y EXTRA. Sin embargo, el porcentaje de bacterias vivas a las 24 horas fue, en todos los casos, superior a los porcentajes de VB-I.

La metodología utilizada, basada en técnicas de fluorescencia, tiene la ventaja de que permite distinguir bacterias vivas de las muertas en una población mixta, como es la saliva. Sin embargo, al no ser una técnica de identificación no podemos saber qué especies bacterianas son las que se fueron recuperando con el transcurso del tiempo y cuáles permanecieron inalteradas.

Söderling *et al* (Söderling *et al*, 2011) realizaron un estudio piloto en el que valoraron el efecto del consumo de un chicle con XLT sobre la flora oral. En este

estudio los participantes consumieron diariamente 6 g/XLT en chicles durante 4 semanas. En general, el consumo de XLT no afectó a la composición microbiana. Los contajes de *Streptococcus mutans* salivales no disminuyeron, ni tampoco se detectaron cambios en los niveles salivales de los *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. totales. Los autores obtuvieron un efecto bastante pobre de la eficacia del XLT sobre los *Streptococcus mutans*, en comparación con estudios previos en los que se emplearon dosis de XLT y frecuencias de consumo similares (Milgrom *et al*, 2006; Ly *et al*, 2008). Este hecho se podría explicar porque los voluntarios del estudio de Söderling *et al* eran consumidores habituales de XLT y el consumo habitual puede llegar a provocar cambios a largo plazo en los contajes de *Streptococcus mutans* (Mäkinen, 2009), al seleccionar cepas naturales de “*Streptococcus mutans* resistentes”, no inhibidas por el XLT (Trahan, 1995). Este fenómeno, en parte, podría explicar por qué el efecto del XLT fue relativamente pobre en el estudio (Söderling *et al*, 2011).

5.5. MASTICACIÓN DE UNA MANZANA

5.5.1. Remoción mecánica de la placa dental

Una de las ideas que apoyan los efectos beneficiosos obtenidos tras ingerir manzanas es su sabor ácido, que estimula el flujo de una saliva más alcalina, de forma que cualquier ácido formado por la PD tras la ingesta de azúcares sería neutralizado y tamponado por la saliva estimulada por la manzana (Pickerill, 1912). También se ha afirmado que las manzanas tienen una repercusión positiva en el estado periodontal (Grobler y Blignaut, 1989).

Geddes *et al* (Geddes *et al*, 1977) demostraron que comer manzanas tras ingerir comidas azucaradas, cuando el pH de la PD ya es bajo, no provoca un aumento “protector” del pH. El efecto favorable de la saliva alcalina se equilibra más o menos por la acidez fuerte y puede que también por el contenido de azúcar de la manzana (Anónimo, 1977). La naturaleza ácida de la manzana anula cualquier efecto beneficioso (Moynihan, 2000), mientras que su consumo en grandes cantidades puede contribuir, de manera significativa, a la caries dental (Grobler y Blignaut, 1989).

Durante décadas uno de los paradigmas de la higiene oral afirmaba la necesidad de finalizar las comidas con alimentos fibrosos o fruta para la prevención de patologías como la caries y la enfermedad periodontal (Pickerill, 1912). Por número de referencias

y por su amplia difusión como creencia popular, se podría decir que entre estos alimentos el “gold standard” ha sido la manzana, por su “atribuída” capacidad para retirar restos de comida y PD (Finlayson y Wilson, 1961; Baker y Thomas, 1969). Esta creencia sigue vigente en la actualidad en muchos ámbitos.

Sin embargo, han sido varios los estudios publicados en los que no se confirma esta capacidad para retirar la PD. Wade (Wade, 1971) comprobó que la masticación de la manzana no reducía la extensión de placa en las caras V de los dientes anterosuperiores. El autor atribuye la poca capacidad de limpieza de la manzana al hecho de que la acción de masticar ocurre principalmente en los dientes posteriores y que el tiempo dedicado a la incisión supone una mínima parte en el proceso de masticación.

En una población infantil de 12 años de edad, comer una manzana no logró retirar cantidades moderadas de PD en incisivos y primeros molares superiores e inferiores, a pesar de que en este trabajo estaba permitida también la higiene oral convencional (Birkeland y Jorkjend, 1974), confirmando resultados obtenidos previamente en adultos (Arnim, 1963; Bergenholtz *et al*, 1967; Lindhe y Wicén, 1969; Wade, 1971).

Schneider y Knieknecht (Schneider y Knieknecht, 1986) testaron en una población infantil (de 4 a 6 años de edad) la eficacia de la remoción mecánica de una manzana, un chicle, un cepillado no supervisado y un cepillado supervisado, en dientes temporales del primer y cuarto cuadrante. Con los cuatro métodos se lograron reducciones significativas de PD. La remoción de PD lograda con la manzana fue la mitad que la conseguida con el cepillado supervisado. Tras masticar la manzana, la reducción de la PD fue similar en las caras V y en las P.

En el presente estudio, la masticación de la MANZ no sólo no consiguió reducir el IP-B, si no que aumentó su registro (IP-I). Cabe destacar que, tras la masticación de la MANZ, el IP-I en las caras V fue superior al de las caras P/L.

Las diferencias notables observadas en los distintos trabajos que evalúan la eficacia de la remoción mecánica de una manzana podrían estar condicionadas por la propia metodología de los estudios. Factores como las poblaciones de estudio empleadas: niños (Birkeland y Jorkjend, 1974; Schneider y Knieknecht, 1986) vs adultos (Arnim, 1963; Bergenholtz *et al*, 1967; Lindhe y Wicén, 1969; Wade, 1971;

presente trabajo). También los dientes analizados: sector posterior (Birkeland y Jorkjend, 1974; Schneider y Knieknecht, 1986) vs sector anterior (Birkeland y Jorkjend, 1974; Schneider y Knieknecht, 1986) o dentición completa (presente trabajo). En tercer lugar se podría citar la variedad de manzana empleada: Cox's Orange (Wade, 1971), Golden Delicious (Longhurst y Berman, 1973; presente trabajo), Granny Smith (Longhurst y Berman, 1973), White Winter Pearmain (Longhurst y Berman, 1973); y las diferencias en la cantidad de manzana utilizada: un cuarto (Wade, 1971) vs manzana entera (Birkeland y Jorkjend, 1974; Schneider y Knieknecht, 1986; este trabajo); como último aspecto a destacar cabe citar la presencia de la piel (Wade, 1971; Birkeland y Jorkjend, 1974; presente trabajo).

A la vista de los resultados tan controvertidos obtenidos en el presente estudio en el grupo MANZ, en los que observamos que no sólo resultaba ineficaz en la remoción de PD, sino que su registro aumentaba tras su masticación, decidimos hacer un ensayo adicional que nos permitiese entender mejor los resultados obtenidos.

Se realizó el siguiente experimento, en el que nos planteamos dos hipótesis alternativas:

- 1^a. La manzana no sólo no retiraría la PD establecida (basal) en los dientes, si no que además la “extendería” a lo largo de la corona (desde el margen gingival al borde incisal).
- 2^a. La existencia de algún componente/compuesto en la manzana con capacidad para adherirse a la superficie de los dientes y que, tras aplicar el revelador de placa (eritrosina), también se tiñese.

Para llevar a cabo el ensayo, un voluntario estudiante de Odontología efectuó un cepillado dental con una técnica convencional durante 2 minutos (Schneider y Knieknecht, 1986), con el objetivo de retirar la PD. Transcurrido este tiempo, se le proporcionó una pastilla reveladora de placa (eritrosina) que utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Como seguía presentando restos de placa, el voluntario repitió el cepillado dental, esta vez sin límite de tiempo, hasta la retirada completa de toda la PD. Se consideró que los dientes estaban libres de placa cuando, tras usar las pastillas reveladoras, no se evidenció ningún tipo de material teñido en la superficie los

dientes. Seguidamente, el voluntario masticó una manzana (*Golden delicious*) (Longhurst y Berman, 1973), sin límite de tiempo y alternándola entre los dos lados de la boca. Al finalizar, se le suministró otra pastilla reveladora.

Las imágenes nos permiten afirmar que un cepillado convencional durante 2 minutos es insuficiente para retirar la PD establecida. Es más, cuando se lleva a cabo un cepillado minucioso, sin límite de tiempo, se consigue retirar la placa remanente en su totalidad, quedando únicamente teñidas las mucosas y la lengua. Tras masticar la manzana y aplicar el agente revelador, en los dientes se visualizó una tenue biopelícula. Este experimento nos permite afirmar que la manzana no retira ni extiende la placa establecida, ya que cuando una dentadura desprovista de placa mastica una manzana, se forma una biopelícula que previamente no existía. Por tanto, debe de existir algún componente en la manzana capaz de adherirse a la superficie del diente y que se visualiza con la eritrosina.

Hasta la fecha, sólo hemos encontrado un trabajo en el que se evalúe la eficacia de masticar una manzana en el recrecimiento de la placa a corto plazo. Longurst y Berman (Longurst y Berman, 1973) comprobaron en un ambiente escolar que comer una manzana tras la comida del mediodía, durante un período de 10 semanas, provocaba un aumento en el acúmulo de placa. En nuestro estudio, el IP-24 del grupo MANZ fue inferior al IP-I; registrándose mayor cantidad de PD en la cara V que en la P/L, a expensas de un mayor depósito en la cara VS que en la VI.

Teniendo en cuenta que durante este período de tiempo no se permitió ningún tipo de higiene oral, no hubo ninguna perturbación que afectase al biofilm ya establecido. Esta situación, sumada a la presencia de condiciones ideales para su proliferación (presencia de nutrientes, bajo pH,...), hizo que se detectase un mayor recrecimiento en la cara V y no en la P/L, y teniendo en cuenta que el IP-I fue superior en la cara V frente a la P/L.

A día de hoy, con los datos disponibles, no se puede defender o justificar el hecho de que terminar una comida con una manzana pueda provocar algún efecto de limpieza en la dentición, como se viene aconsejando desde el siglo pasado (Pickerill, 1912; Birkeland y Jorkjend, 1974).

5.5.2 Vitalidad bacteriana en saliva

En el reino *Plantae*, las frutas comestibles son una de las fuentes más ricas en polifenoles (Yanagida *et al*, 2000). En las últimas dos décadas, se han publicado muchos estudios sobre el efecto anticariogénico de los polifenoles extraídos de diversos tipos de plantas (Ito *et al*, 1984; Kakiuchi *et al*, 1986; Tagashira *et al*, 1997).

Los polifenoles de la manzana y sus componentes podrían tener importantes propiedades anticariogénicas (Yanagida *et al*, 2000). Yanagida *et al* (Yanagida *et al*, 2000) comprobaron que los polifenoles extraídos de manzanas inmaduras inhibían la actividad glucosiltransferasa y la adherencia de las bacterias cariogénicas en crecimiento *in vitro*. Previamente, se demostró que los polifenoles de la manzana fueron efectivos inhibiendo la formación de PD en humanos *in vivo* (Matsudaira *et al*, 1998).

No hemos encontrado en la literatura ningún trabajo que evalúe la actividad antibacteriana de la manzana en la saliva tras su masticación, en términos de VB. En el presente trabajo, se produjo un descenso significativo de la VB-I en saliva en el grupo MANZ (60,77% inmediata vs 82,15% basal). Esta disminución de la VB podría deberse al mayor flujo de saliva alcalina producido por la masticación de la manzana. El posible aumento del pH, derivado de una saliva más alcalina, hace que el ambiente sea menos ácido, perjudicando de esta forma a las bacterias cariogénicas.

El aumento del volumen salival tendría las siguientes consecuencias: aumentaría el efecto lavado de la saliva, mientras que la concentración bacteriana por mL de saliva disminuiría considerablemente (las bacterias se encontrarían más diluidas en el medio salival), lo que es muy favorable para evitar patologías.

Tampoco hemos encontrado trabajos que evalúen la recuperación de la VB en la saliva después de varias horas de masticar una manzana. En nuestros resultados, la VB-24 (87,11%) fue superior a la VB-B (82,15%) y a la VB-I (60,77%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa sólo en el último caso. A la vista de los resultados podemos afirmar que existe una recuperación de la población bacteriana en el ecosistema salival con el transcurso del tiempo.

Una posible explicación sería que al finalizar la masticación de la manzana, deja de producirse una saliva más alcalina, de esta manera, la acidez remanente de la manzana y los restos de comida presentes en la cavidad oral propiciarían el establecimiento de un ambiente idóneo (presencia de nutrientes, condiciones del

medio,...) para la proliferación, tanto de bacterias salivales, como de las que integran el biofilm de la PD.

Como ya afirmaron Sekino *et al* (Sekino *et al*, 2003), las bacterias salivales contribuyen a la formación de la PD, por lo que en los pacientes con elevadas concentraciones de bacterias en saliva la placa se desarrolla más rápidamente y es más abundante. Esta puede ser una de las razones por la que los valores de PD a las 24 horas tras masticar la manzana fuesen tan elevados. Otra posible explicación podría ser que la manzana no logra retirar la PD establecida, es más, en el presente estudio tras su masticación el IP aumentó.

A la vista de los resultados de este trabajo y de otros publicados previamente parece justificarse la afirmación de que la capacidad de limpieza de la manzana ha sido, en gran medida, sobrestimada. Los efectos perniciosos, en el esmalte de los dientes, de los ácidos y los carbohidratos de las manzanas han sido ignorados en las campañas promocionales (Grobler y Blignaut, 1989).







6. CONCLUSIONES



- 1. La eficacia clínica antiplaca de un chicle edulcorado con xilitol es similar a la de un chicle placebo, es inferior a la de un cepillado convencional y no está condicionada por la dosis de xilitol. El recrecimiento macroscópico de la placa a las 24 horas sigue un patrón similar al del chicle placebo.**
- 2. La eficacia antibacteriana de un chicle edulcorado con xilitol evaluada en términos de vitalidad bacteriana en muestras de saliva es superior a la de un chicle placebo y a la de un cepillado convencional, pero su efecto se neutraliza en menos de 24 horas.**
- 3. Al masticar una manzana aumenta de forma inmediata la superficie dentaria recubierta por la placa, aunque su distribución macroscópica se regulariza en menos de 24 horas. Esta actividad no conlleva variaciones inmediatas de vitalidad bacteriana en muestras de saliva con respecto al cepillado pero, paradójicamente, tras un período de recrecimiento de 24 horas, el número de bacterias vivas fue mayor al detectado después de un cepillado convencional.**





7. BIBLIOGRAFÍA



Addy M, Bates JF. Plaque accumulation following the wearing of different types of removable partial dentures. *J Oral Rehabil* 1979; 6: 111-117.

Addy M, Perriam E, Sterry A. Effects of sugared and sugar-free chewing gum on the accumulation of plaque and debris on the teeth. *J Clin Periodontol* 1982; 9: 346-354.

Addy M, Willis L, Moran J. Effect of toothpaste rinses compared with chlorhexidine on plaque formation during a 4-day period. *J Clin Periodontol* 1983; 10: 89-98.

Addy M, Renton-Harper P, Newcombe R. Plaque regrowth studies: discriminatory power of plaque index compared to plaque area. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 110-112.

Afennich F, Slot DE, Hossainian N, Van der Weijden GA. The effect of hexetidine mouthwash on the prevention of plaque and gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 2011; 9: 182-190.

Aguirre-Zero O, Zero DT, Proskin HM. Effect of chewing xilitol chewing gum on salivary flow rate and the acidogenic potential of dental plaque. *Caries Res* 1993; 27: 55-59.

Ainamo J, Etemadzadeh H. Prevention of plaque growth with chewing gum containing chlorhexidine acetate. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 524-527.

Ainamo J, Sjöblom M, Ainamo A, Tiainen L. Growth of plaque while chewing sucrose and sorbitol flavoured gum. *J Clin Periodontol* 1977; 4: 151-160.

Ainamo J, Asikainen S, Ainamo A, Lahtinen A, Sjöblom M. Plaque growth while chewing sorbitol and xylitol simultaneously with sucrose flavored gum. *J Clin Periodontol* 1979; 6: 397-406.

Ainamo J, Nieminen A, Westerlund U. Optimal dosage of chlorhexidine acetate in chewing gum. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 729-733.

Alaluusua S, Renkonen OV. *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 453-457.

Alamoudi NM, Hanno AG, Masoud MI, Sabbagh HJ, Almushayt AS, Masoud IM. Effects of xylitol on salivary *Mutans Streptococcus*, plaque level, and caries activity in a group of Saudi mother-child pairs. An 18-month clinical trial. *Saudi Med J* 2012a; 33: 186-192.

Alamoudi NM, Hanno AG, Sabbagh HJ, Masoud MI, Almushayt AS, El Derwi DA. Impact of maternal xylitol consumption on mutans streptococci, plaque and caries levels in children. *J Clin Pediatr Dent* 2012b; 37: 163-166.

Al-Habbal MJ, Al-Habbal Z, Huwez FU. A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1984; 11: 541-544.

Al-Haboubi M, Zoitopoulos L, Beighton D, Gallagher JE. The potential benefits of sugar-free chewing gum on the oral health and quality of life of older people living in the community: a randomized controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol* 2012; 40: 415-424.

American Dental Association. Guideline for Product Acceptance. http://www.ada.org/sections/scienceAndResearch/pdfs/guide_sugarfree_chewinggums.pdf (Acceso el 15 de agosto de 2013).

Amoian B, Moghadamnia AA, Barzi S, Sheykholeslami S, Rangiani A. *Salvadora Persica* extract chewing gum and gingival health: improvement of gingival and probe-bleeding index. *Complement Ther Clin Pract* 2010; 16: 121-123.

Anderson GB, McLean TN, Caffesse RG, Smith BA. Effects of zirconium silicate chewing gum on plaque and gingivitis. *Quintessence Int* 1990; 21: 479-489.

Anónimo. Apples and the teeth – “nature’s toothbrush” reappraised. *Br Med J* 1977; 1: 1116.

Antonio AG, Kelly A, Valle DD, Vianna RB, Quintanilha LE. Long-term effect of an oral health promotion program for schoolchildren after the interruption of educational activities. *J Clin Pediatr Dent* 2007; 32: 37-41.

Arnim SS. The use of disclosing agents for measuring tooth cleanliness. *J Periodontol* 1963; 34: 227-245.

Arweiler NB, Auschill TM, Reich E, Netuschil L. Substantivity of toothpaste slurries and their effect on reestablishment of the dental biofilm. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 615-621.

Autio JT. Effect of xylitol chewing gum on salivary *Streptococcus mutans* in preschool children. *ASDC J Dent Child* 2002; 69: 81-86, 13.

Bahador A, Lesan S, Kashi N. Effect of xylitol on cariogenic and beneficial oral streptococci: a randomized, double-blind crossover trial. *Iran J Microbiol* 2012; 4: 75-81.

Baker C, Thomas J. Apple Club in a London primary school. *Dent Health (London)* 1969; 8: 23-24.

Barer MR, Harwood CR. Bacterial viability and culturability. *Adv Microb Physiol* 1999; 41: 93-137.

Barnes VM, Richter R, DeVizio W. Comparison of the short-term antiplaque/antibacterial efficacy of two commercial dentifrices. *J Clin Dent* 2010; 21: 101-104.

Bassiouny MA, Grant AA. The toothbrush application of chlorhexidine. A clinical trial. *Br Dent J* 1975 139: 323-327.

Beighton D. Can the ecology of the dental biofilm be beneficially altered? *Adv Dent Res* 2009; 21: 69-73.

Beiswanger BB, Doyle PM, Jackson RD, Mallatt ME, Mau Ms, Bollmer BW, Crisanti MM, Guay CB, Lanzalaco AC, Lukacovic MF, Majeti S, McClanahan SF. The clinical effect of dentifrices containing stabilized stannous fluoride on plaque formation and gingivitis – a six-month study with *ad libitum* brushing. *J Clin Dent* 1995; 6 Spec No: 46-53.

Bergenholtz A, Hugoson A, Sohlberg F. An evaluation of the plaque-removing ability of some aids to oral hygiene. *Sven Tandlak Tidskr* 1967; 60: 447-454.

Berkowitz RJ. Mutans streptococci: acquisition and transmission. *Pediatr Dent* 2006; 28: 106-109.

Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 3283-3290.

Bibby BG, Mundorff SA, Zero DT, Almekinder KJ. Oral food clearance and the pH of plaque and saliva. *J Am Dent Assoc* 1986; 112: 333-337.

Binney A, Addy M, Owens J, Faulkner J. A comparison of triclosan and stannous fluoride toothpastes for inhibition of plaque regrowth. A crossover study designed to assess carry over. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 166-170.

Birkeland JM, Jorkjend L. The effect of chewing apples on dental plaque and food debris. *Community Dent Oral Epidemiol* 1974; 2: 161-162.

Birkhed D. Cariologic aspects of xylitol and its use in chewing gum: a review. *Acta Odontol Scand* 1994; 52: 116-127.

Bonesvoll P, Lökken P, Rölla G, Paus PN. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouthrinses. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 209-212.

Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 1999; 37: 77-86.

Bowen WH, Amsbaugh SM, Monell-Torrens S, Brunelle J. Effects of varying intervals between meals on dental caries in rats. *Caries Res* 1983; 17: 466-471.

Bradshaw DJ, Marsh PD. Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. *Caries Res* 1994; 28: 251-256.

Bratthall D. Does chewing gum clean the teeth? *Tandläkartidningen* 1973; 65: 582-584.

Burt BA. The use of sorbitol -and xylitol- sweetened chewing gum in caries control. *J Am Dent Assoc* 2006; 137: 190-196.

Burtner AP, Low DW, McNeal DR, Hassell TM, Smith RG. Effects of chlorhexidine spray on plaque and gingival health in institutionalized persons with mental retardation. *Spec Care Dentist* 1991; 11: 97-100.

Caglar E, Kavaloglu SC, Kuscu OO, Sandalli N, Holgerson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig* 2007; 11: 425-429.

Campus G, Cagetti MG, Sacco G, Solinas G, Mastroberardino S, Lingström P. Six months of daily high-dose xylitol in high-risk schoolchildren: a randomized clinical trial on plaque pH and salivary mutans streptococci. *Caries Res* 2009; 43: 455-461.

Cancro LP, Fischman SL. The expected effect on oral health of dental plaque control though mechanical removal. *Periodontol 2000* 1995; 8: 60-74.

Carletto Körber FP, Cornejo LS, Giménez MG. Early acquisition of *Streptococcus mutans* for children. *Acta Odontol Latinoam* 2005; 18: 69-74.

Carlsson J, Egelberg J. Effect of diet on early plaque formation in man. *Odontol Revy* 1965; 16: 112-125.

Charles CH, Sharma NC, Galustians HJ, Qaqish J, McGuire JA, Vincent JW. Comparative efficacy of an antiseptic mouthrinse and an antiplaque/antigingivitis dentifrice. A six-month clinical trial. *J Am Dent Assoc* 2001; 132: 670-675.

Chau NP, Pandit S, Jung JE, Jeon JG. Evaluation of *Streptococcus mutans* adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *J Dent* 2014; 42: 726-734.

Ciancio S. Improving oral health: current considerations. *J Clin Periodontol* 2003; 30 Suppl 5: 4-6.

Claydon N, Addy M. The use of plaque area and plaque index to measure the effect of fluoride and chlorhexidine toothpastes on 24-h plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 540-542.

Claydon N, Yates R, Labello R, Hall C, Armstrong R, Addy M. A methodology using subjective and objective measures to compare plaque inhibition by toothpastes. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 1106-1109.

Cloys LA, Christen AG, Christen JA. The development and history of chewing gum. *Bull Hist Dent* 1992; 40: 57-65.

Corbet EF, Tam JO, Zee KY, Wong MC, Lo EC, Mombelli AW, Lang NP. Therapeutic effects of supervised chlorhexidine mouthrinses on untreated gingivitis. *Oral Dis* 1997; 3: 9-18.

Cousido MC, Tomás Carmona I, García-Caballero L, Limeres J, Álvarez M, Diz P. *In vivo* substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig* 2010; 14: 397-402.

Cronin M, Gordon J, Reardon R, Balbo F. Three clinical trials comparing xylitol – and sorbitol – containing chewing gums for their effect on supragingival plaque accumulation. *J Clin Dent* 1994; 5: 106-109.

Cuesta S, Tejerina JM. Cepillado eléctrico. Fundamentos y Procedimientos. En: Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración (SEPA). Manual de Higiene Bucal. Enrile de Rojas y Fuenmayor V (eds). Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2009, pp 83-88.

Cugini M, Thompson M, Warren PR. Correlations between two plaque indices in assessment of toothbrush effectiveness. *J Contemp Dent Pract* 2006; 7: 1-9.

Davies GN. The different requirements of periodontal indices for prevalence studies and clinical trials. *Int Dent J* 1968; 18: 560-569.

Davies RM, Ellwood RP, Davies GM. The effectiveness of a toothpaste containing triclosan and polyvinyl-methyl ether maleic acid copolymer in improving plaque control and gingival health: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 1029-1033.

De la Rosa M, Zacarías Guerra J, Johnston DA, Radike AW. Plaque growth and removal with daily toothbrushing. *J Periodontol* 1979; 50: 661-664.

Deshpande A, Jadad AR. The impact of polyol-containing chewing gums on dental caries: a systematic review of original randomized controlled trials and observational studies. *J Am Dent Assoc* 2008; 139: 1602-1614.

Dodds MW. The oral health benefits of chewing gum. *J Ir Dent Assoc* 2012; 58: 253-261.

Duane B. Xylitol gum, plaque pH and mutans streptococci. *Evid Based Dent* 2010; 11: 109-110.

Duke SA, Forward GC. The conditions occurring *in vivo* when brushing with toothpastes. *Br Dent J* 1982; 152: 52-54.

Edgar WM. Sugar substitutes, chewing gum and dental caries – a review. *Br Dent J* 1998; 184: 29-32.

Edgar WM, Bibby BG, Mundorff S, Rowley J. Acid production in plaques after eating snacks: modifying factors in foods. *J Am Dent Assoc* 1975; 90: 418-425.

Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque- a review. *Br Dent J* 1999; 186: 286-296.

Enrile de Rojas FJ, Buitrago PJ. Agentes químicos para el control de la placa. Tipos e indicaciones. En: Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración (SEPA). Manual de Higiene Bucal. Enrile de Rojas F y Fuenmayor V (eds). Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2009, pp 105-110.

Escalada MG, Russell AD, Maillard JY, Ochs D. Triclosan–bacteria interactions: single or multiple target sites? *Lett Appl Microbiol* 2005; 41: 476-481.

Etemadzadeh H. Plaque-growth inhibiting effect of chewing gum containing urea hydrogen peroxide. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 337-340.

Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* 2000; 131: 887-899.

Finlayson DA, Wilson WA. Dental Health Education - Dundee's Dental Health Education Campaign – Results of Survey Six Months Later'. *Br Dent J* 1961; 111: 103-106.

Fischman SL. Current status of indices of plaque. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 371-374, 379-380.

Fleisch LM. Is chewing gum a safe dental therapeutic agent? *J Am Dent Assoc* 1942; 29: 1011-1016.

Fraga CP, Mayer MP, Rodrigues CR. Use of chewing gum containing 15% of xylitol and reduction in mutans streptococci salivary levels. *Braz Oral Res* 2010; 24: 142-146.

Furuichi Y, Lindhe J, Ramberg P, Volpe AR. Patterns of *de novo* plaque formation in the human dentition. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 423-433.

Gallagher A, Sowinski J, Bowman J, Barrett K, Lowe S, Patel K, Bosma ML, Creeth JE. The effect of brushing time and dentifrice on dental plaque removal *in vivo*. *J Dent Hyg* 2009; 83: 111-116.

Gallego M. Cepillado manual. Fundamentos y Procedimientos. En: Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración (SEPA). Manual de Higiene Bucal. Enrile de Rojas F y Fuenmayor.V (eds). Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2009, pp 77-82.

García-Caballero L, Carmona IT, González MC, Posse JL, Taboada JL, Dios PD. Evaluation of the substantivity in saliva of different forms of application of chlorhexidine. *Quintessence Int* 2009; 40: 141-144.

Gazi MI. The finding of antiplaque features in *Acacia Arabica* type of chewin gum. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 75-77.

Geddes DA, Edgar WM, Jenkins GN, Rugg-Gunn AJ. Apples, salted peanuts and plaque pH. *Brit Dent J* 1977; 142: 317-319.

Gerlach RW, Hyde JD, Poore CL, Stevens DP, Witt JJ. Breath effects of three marketed dentifrices: a comparative study evaluating single and cumulative use. *J Clin Dent* 1998; 9: 83-88.

- Gibbons RJ.** Bacteriology of dental caries. *J Dent Res* 1964; 43Suppl: 1021-1028.
- Grindefjord M, Dahllöf G, Nilsson B, Modéer T.** Stepwise prediction of dental caries in children up to 3.5 years of age. *Caries Res* 1996; 30: 256-266.
- Grobler SR, Blignaut JB.** The effect of a high consumption of apples or grapes on dental caries and periodontal disease in humans. *Clin Prev Dent* 1989; 11: 8-12.
- Grönroos L, Mättö J, Saarela M, Luoma AR, Luoma H, Jousimies-Somer H, Pyhälä L, Asikainen S, Alaluusua S.** Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 894-898.
- Haffajee AD, Socransky SS.** Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000* 2006; 42: 7-12.
- Hanham A, Addy M.** The effect of chewing sugar-free gum on plaque regrowth at smooth and occlusal surfaces. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 255-257.
- Hanno AG, Alamoudi NM, Almushayt AS, Masoud MI, Sabbagh HJ, Farsi NM.** Effect of xylitol on dental caries and salivary *Streptococcus mutans* levels among a group of mother-child pairs. *J Clin Pediatr Dent* 2011; 36: 25-30.
- Hansen F, Gjermo P.** The plaque removal effect of four tooth-brushing methods. *Scand J Dent Res* 1971; 79: 502-506.
- Hardie JM, Bowden GH.** Bacterial flora of dental plaque. *Br Med Bull* 1975; 31: 131-136.
- Haresaku S, Hanioka T, Tsutsui A, Yamamoto M, Chou T, Gunjishima Y.** Long-term effect of xylitol gum use on mutans streptococci in adults. *Caries Res* 2007; 41: 198-203.
- Havenaar R, Huis in't Veld JHJ, Backer Dirks O, de Stoppelaar JD.** Some bacteriological aspects of sugar substitutes. En: Health and Sugar Substitutes: Proceedings of the ERGOB Conference on Sugar Substitutes. B. Guggenheim (ed). Basel: Karger, Geneva, 1978, pp 192-198.

Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Nakamura T, Sato M. Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 290-294.

Hayes C. Xylitol gum decreases the decayed, missing, and filled surfaces (DMFS) score over a 3-year period by an average of 1.9. *J Evid Based Dent Pract* 2002; 2: 14-15.

He T, Dunavent J, Booker D, Fiedler S, Baker R. Antiplaque effects of various dentifrices using a 4-day plaque model. *J Dent Res* 2009; 88 (Sp Is A): Abstr 722.

He T, Sun L, Li S, Ji N. The anti-plaque efficacy of a novel stannous-containing sodium fluoride dentifrice: a randomized and controlled clinical trial. *Am J Dent* 2010; 23 Spec No B: 11B-16B.

Helms JA, Della-Fera MA, Mott AE, Frank ME. Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Arch Oral Biol* 1995; 40: 913-920.

Hildebrandt GH, Sparks BS. Maintaining mutans streptococci suppression with xylitol chewing gum. *J Am Dent Assoc* 2000; 131: 909-916.

Hoerman KC, Gasior EJ, Zibell SE, Record D, Flowerdew G. Effect of gum chewing on plaque accumulation. *J Clin Dent* 1990; 2: 17-21.

Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011; 3: 55-65.

Holgerson PL, Sjöström I, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Dental plaque formation and salivary mutans streptococci in schoolchildren after use of xylitol-containing chewing gum. *Int J Paediatr Dent* 2007a; 17: 79-85.

Holgerson PL, Sjöström I, Twetman S. Decreased salivary uptake of (¹⁴C)-xylitol after a four-week xylitol chewing gum regimen. *Oral Health Prev Dent* 2007b; 5: 313-319.

Hope CK, Clements D, Wilson M. Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. *J Appl Microbiol* 2002; 93: 448-455.

Huwez FU, Al-Habbal MJ. Mastic in treatment of benign gastric ulcers. *Gastroenterol Jpn* 1986; 21: 273-274.

Imfeld TN. Identification of low caries risk dietary components. *Monogr Oral Sci* 1983; 11: 1-198.

Imfeld T. Chewing gum – facts and fiction: a review of gum-chewing and oral health. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 405-419.

Imfeld T, Lutz F. Intraplaque acid formation assessed *in vivo* in children and young adults. *Pediatr Dent* 1980; 2: 87-93.

Isokangas P, Söderling E, Pienihäkkinen K, Alanen P. Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum, a follow-up from 0 to 5 years of age. *J Dent Res* 2000; 79: 1885-1889.

Ito M, Uyeda M, Iwanami T, Nakagawa Y. Flavonoids as a Possible Preventive of Dental Caries. *Agric Biol Chem* 1984; 48: 2143-2145.

Jacobsen J, Christrup LL, Jensen NH. Medicated chewing gum. Pros and Cons. *Am J Drug Deliv* 2004; 2: 75-88.

Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts *in vivo*. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 415-424.

Johansen JR, Gjermo P, Eriksen HM. Effects of 2-years' use of chlorhexidine-containing dentifrices on plaque, gingivitis, and caries. *Scand J Dent Res* 1975; 83: 288-292.

Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000* 1997; 15: 55-62.

Joux F, Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect* 2000; 2: 1523-1535.

Kakiuchi N, Hattori M, Nishizawa M, Yamagishi T, Okuda T, Namba T. Studies on dental caries prevention by traditional medicines. VIII. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 1986; 34: 720-725.

Kakodkar P, Mulay S. Effect of sugar-free gum in addition to toothbrushing on dental plaque and interdental debris. *Dent Res J(Isfahan)* 2010; 7: 64-69.

Kalaga A, Addy M, Hunter B. The use of 0.2% chlorhexidine spray as an adjuvant to oral hygiene and gingival health in physically and mentally handicapped adults. *J Periodontol* 1989; 60: 381-385.

Kashket S, DePaola DP. Cheese consumption and the development and progression of dental caries. *Nutr Rev* 2002; 60: 97-103.

Kashket S, Van Houte J, Lopez LR, Stocks S. Lack of correlation between food retention on the human dentition and consumer perception of food stickiness. *J Dent Res* 1991; 70: 1314-1319.

Kaufman AY, Tal H, Perlmutter S, Schwartz MM. Reduction of dental plaque formation by chlorhexidine dihydrochloride lozenges. *J Periodontal Res* 1989; 24:59-62.

Kelly A, Antonio AG, Maia LC, Luiz RR, Vianna RB, Quintanilha LE. Reliability assesmmnt of a plaque scoring index using photographs. *Methods Inf Med* 2008; 47: 443-447.

Keukenmeester RS, Slot DE, Putt MS, Van der Weijden GA. The effect of sugar-free chewing gum on plaque and clinical parameters of gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 2013; 11: 2-14.

Keukenmeester RS, Slot DE, Rosema NAM, Van Loveren C, Van der Weijden GA. Effects of sugar-free chewing gum sweetened with xylitol or maltitol on the development of gingivitis and plaque: a randomized clinical trial. *Int J Dent Hyg* 2014; 12: 238-244.

Kishi M, Abe A, Kishi K, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Yonemitsu M. Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of mutans streptococci in plaque in their 2.5-years-old children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2009; 37: 241-249.

Kleber CJ, Putt MS. Plaque removal by a chewing gum containing zirconium silicate. *Compend Contin Educ Dent* 1986; 7: 681-685.

Kleber CJ, Davidson KR, Rhoades ML. An evaluation of sodium bicarbonate chewing gum as a supplement to toothbrushing for removal of dental plaque from children's teeth. *Compend Contin Educ Dent* 2001a; 22: 36-42.

Kleber CJ, Putt MS, Milleman JL, Davidson KR, Proskin HM. An evaluation of sodium bicarbonate chewing gum in reducing dental plaque and gingivitis in conjunction with regular toothbrushing. *Compend Contin Educ Dent* 2001b; 22: 4-12.

Klukowska M, Bader A, Erbe C, Bellamy P, White DJ, Anastasia MK, Wehrbein H. Plaque levels of patients with fixed orthodontic appliances measured by digital plaque image analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011; 139: e463-e470.

Köhler B, Bratthall D, Krasse B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. *Arch Oral Biol* 1983; 28: 225-231.

Köhler B, Andréen I, Jonsson B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3: 14-17.

Kolahi J, Soolari A, Ghalayani P, Varshosaz J, Fazilaty M. Newly formulated chlorhexidine gluconate chewing gum that gives both anti-plaque effectiveness and an acceptable taste: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Int Acad Periodontol* 2008; 10: 38-44.

Kubert D, Rubin M, Barnett ML, Vincent JW. Antiseptic mouthrinse-induced microbial cell surface alterations. *Am J Dent* 1993; 6: 277-279.

Lang NP, Hase JC, Grassi M, Hämmerle CH, Weigel C, Kelty E, Frutig F. Plaque formation and gingivitis after supervised mouthrinsing with 0.2% delmopinol hydrochloride, 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo for 6 months. *Oral Dis* 1998; 4: 105-113.

Lee YE, Choi YH, Jeong SH, Kim HS, Lee SH, Song KB. Morphological changes in *Streptococcus mutans* after chewing gum containing xylitol for twelve months. *Curr Microbiol* 2009; 58: 332-337.

Lehtinen J, Nuutila J, Lilius EM. Green fluorescent protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability. *Cytometry A* 2004; 60: 165-172.

Leuko S, Legat A, Fendrihan S, Stan-Lotter H. Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight kit for detection of extremophilic archaea and visualization of microorganisms in environmental hypersaline samples. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 6884-6886.

Levinkind M, Owens J, Morea C, Addy M, Lang NP, Adair R, Barton I. The development and validation of an occlusal site-specific plaque index to evaluate the effects of cleaning by tooth brushes and chewing gum. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 177-182.

Li RC, Lee SW, Lam JS. Novel method for assessing postantibiotic effect by using the Coulter counter. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1751-1753.

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 1311-1318.

Lindhe J, Wicén PO. The effects on the gingivae of chewing fibrous foods. *J Periodontal Res* 1969; 4: 193-200.

Lingström P, van Houte J, Kashket S. Food starches and dental caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 366-380.

LIVE/DEAD and BacLight™ Product Literature of Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA.

Lobene RR, Soparkar PM, Newman MB. Use of dental floss. Effect on plaque and gingivitis. *Clin Prev Dent* 1982; 4: 5-8.

Löe H, Schiött CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1970; 5: 79-83.

Loesche WJ, Grossman NS, Earnest R, Corpron R. The effect of chewing xylitol gum on the plaque and saliva levels of *Streptococcus mutans*. *J Am Dent Assoc* 1984; 108: 587-592.

Longhurst P, Berman DS. Apples and gingival health. Report of a feasibility study. *Br Dent J* 1973; 134: 475-479.

Ly KA, Milgrom P, Rothen M. The potential of dental-protective chewing gum in oral health interventions. *J Am Dent Assoc* 2008; 139: 553-563.

Maguire A, Rugg-Gunn AJ. Xylitol and caries prevention – is it a magic bullet? *Br Dent J* 2003; 194: 429-436.

Mäkinen KK. An end to crossover designs for studies on the effect of sugar substitutes on caries? *Caries Res* 2009; 43: 331-333.

Mäkinen KK, Scheinin A. The effect of the consumption of various sugars on the activity of plaque and salivary enzymes. *Int Dent J* 1971; 21: 331-339.

Mäkinen KK, Scheinin A. The effect of various sugars and sugar mixtures on the activity and formation of enzymes of dental plaque and oral fluid. *Acta Odontol Scand* 1972; 30: 259-275.

Mäkinen KK, Söderling E, Hurttia H, Lehtonen OP, Luukkala E. Biochemical, microbiologic, and clinical comparisons between two dentifrices that contain different mixtures of sugar alcohols. *J Am Dent Assoc* 1985; 111: 745-751.

Mäkinen KK, Mäkinen PL, Pape HR Jr, Allen P, Bennett CA, Isokangas PJ, Isotupa KP. Stabilisation of rampant caries: polyol gums and arrest of dentine caries in two long-term cohort studies in young subjects. *Int Dent J* 1995; 45 (Suppl 1): 93-107.

Mäkinen KK, Isotupa KP, Mäkinen PL, Söderling E, Song KB, Nam SH, Jeong SH. Six-month polyol chewing –gum programme in kindergarten-age children: a feasibility study focusing on mutans streptococci and dental plaque. *Int Dent J* 2005; 55: 81-88.

Mäkinen KK, Alanen P, Isokangas P, Isotupa K, Söderling E, Mäkinen PL, Wenhui W, Weijian W, Xiaochi C, Yi W, Boxue Z. Thirty-nine-month xylitol chewing-gum programme in initially 8-year-old school children: a feasibility study focusing on mutans streptococci and lactobacilli. *Int Dent J* 2008; 58: 41-50.

Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent* 2010; 38 (Suppl 1): S11-S15.

Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J* 2012; 212: 601-606.

Massoth D, Massoth G, Massoth IR, Laflamme L, Shi W, Hu C, Gu F. The effect of xylitol on *Streptococcus mutans* in children. *J Calif Dent Assoc* 2006; 34: 231-234.

Matsudaira F, Kitamura T, Yamada H, Fujimoto I, Arai M, Karube H, Yanagida A. Inhibitory effects of polyphenol extracted from immature apples on dental plaque formation. *J Dent Health* 1998; 48: 230-235.

Maynard JH, Jenkins SM, Moran J, Addy M, Newcombe RG, Wade WG. A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidiene toothpaste (II). Effects on the oral microflora. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 207-211.

McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147-179.

McFeters, GA. Enumeration, occurrence and significance of injured indicator bacteria in drinking water. En: *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments*. McFeters GA (ed). Springer-Verlag, New York, 1990, pp 478-492.

McHugh WD. Dental plaque: thirty years on. En: *Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease*. Newman HN, Wilson M (eds): Cardiff: Bioline, Cardiff, 1999, pp 1-4.

Milgrom P, Ly KA. The role of sugar alcohols, xylitol, and chewing gum in preventing dental caries. En: Limeback H (ed). *Comprehensive Preventive Dentistry*. John Wiley and son, Ltd, 2012, pp 7-8.

Milgrom P, Ly KA, Roberts MC, Rothen M, Mueller G, Yamaguchi DK. Mutans streptococci dose response to xylitol chewing gum. *J Dent Res* 2006; 85: 177-181.

Miller S, Truong T, Heu R, Stranick M, Bouchard D, Gaffard A. Recent advances in stannous fluoride technology: antibacterial efficacy and mechanism of action towards hypersensitivity. *Int Dent J* 1994; 44 (Suppl 1): 83-98.

Minah GE, DePaola LG, Overholser CD, Meiller TF, Niehaus C, Lamm RA, Ross NM, Dills SS. Effects of 6 months use of an antiseptic mouthrinse on supragingival dental plaque microflora. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 347-352.

Miyasawa-Hori H, Aizawa S, Takahashi N. Difference in the xylitol sensitivity of acid production among *Streptococcus mutans* strains and the biochemical mechanism. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 201-205.

Moazzez R, Booth V, Barnes VM, Richter R, Xu T, DeVizio W. The use of Modified Gingival Margin Plaque Index (MGMPI) method to investigate the inhibitory effect of various toothpastes on dental plaque formation. *J Clin Dent* 2010; 21: 1-3.

Modesto A, Drake DR. Multiple exposures to chlorhexidine and xylitol: adhesion and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol* 2006; 52: 418-423.

Mojon P, Chung JP, Favre P, Budtz-Jørgensen E. Examiner agreement on periodontal indices during dental surveys of elders. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 56-59.

Möller IJ, Poulsen S. The effect of sorbitol-containing chewing gum on the incidence of dental caries; plaque and gingivitis in Danish schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol* 1973; 1: 58-67.

Montague W, Howell SL, Taylor KW. Pentitols and the mechanism of insulin release. *Nature* 1967; 215: 1088-1089.

Moran J, Addy M, Newcombe R. A 4-day plaque regrowth study comparing an essential oil mouthrinse with a triclosan mouthrinse. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 636-639.

Mouton C, Scheinin A, Mäkinen KK. Effect on plaque of a xylitol-containing chewing gum. A clinical and biochemical study. *Acta Odontol Scand* 1975a; 33: 33-40.

Mouton C, Scheinin A, Mäkinen KK. Effect of a xylitol chewing gum on plaque quantity and quality. *Acta Odontol Scand* 1975b; 33: 251-257.

Moynihan P. Foods and factors that protect against dental caries. *Nutr Bull* 2000; 25: 281-286.

Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002; 148: 257-266.

Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 1982; 61: 1158-1162.

Nayak PA, Nayak UA, Mythili R. Effect of Manuka honey, chlorhexidine gluconate and xylitol on the clinical levels of dental plaque. *Contemp Clin Dent* 2010; 1: 214-217.

Newbrun E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. *Odontol Revy* 1967; 18: 373-386.

Paraskevas S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int J Dent Hyg* 2005; 3: 162-178.

Paraskevas S, Rosema NA, Versteeg P, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. The additional effect of a dentifrice on the instant efficacy of toothbrushing: a crossover study. *J Periodontol* 2007; 78: 1011-1016.

Parizotto SP, Rodrigues CR, Singer Jda M, Sef HC. Effectiveness of low cost toothbrushes, with or without dentifrice, in the removal of bacterial plaque in deciduous teeth. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17: 17-23.

Pérez-Serrano ME, Limeres-Posse J, Fernández-Feijoo J. Manual de Higiene Oral para Personas con Discapacidad. P. Diz Dios (ed). Santiago de Compostela, 2012.

Persson RE, Truelove EL, LeResche L, Robinovitch MR. Therapeutic effects of daily or weekly chlorhexidine rinsing on oral health of a geriatric population. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol* 1991; 72: 184-191.

Pickerill HP. The Prevention of Dental Caries and Oral Sepsis. Baillière, Tindall and Cox (eds), London, 1912, pp 11.

Pitten FA, Kramer A. Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneimittelforschung* 2001; 51: 588-595.

Pizzo G, Licata ME, La Cara M, Pizzo I, Guiglia R, Melilli D. The effects of sugar-free chewing gums on dental plaque regrowth: a comparative study. *J Dent* 2007; 35: 503-508.

Plüss EM. Effect on plaque growth of xylitol and sucrose-containing chewing gums. *J Clin Periodontol* 1978; 5: 35-40.

Postgate JR. A microbial way of death. *New Sci* 1989; 122: 43-47.

Pretty IA, Edgar WM, Smith PW, Higham SM. Quantification of dental plaque in the research environment. *J Dent* 2005; 33: 193-207.

Puig Silla M, Montiel Company JM, Almerich Silla JM. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13: E257-E260.

Quigley GA, Hein JW. Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J Am Dent Assoc* 1962; 65: 26-29.

Quirynen M, Dekeyser C, van Steenberghe D. Discriminating power of five plaque indices. *J Periodontol* 1991; 62: 100-105.

Ribelles Llop M, Guinot Jimeno F, Mayné-Acién R, Bellet Dalmau LJ. Effects of xylitol chewing gum on salivary flow rate, pH, buffering capacity and presence of *Streptococcus mutans* in saliva. *Eur J Paediatr Dent* 2010; 11: 9-14.

Riep BG, Bernimoulin JP, Barnett ML. Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 164-168.

Roberts WR, Addy M. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol* 1981; 8: 295-310.

Rölla G, Löe H, Schiött CR. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *J Periodontol Res* 1970; 5: 90-95.

Rosenhek M, Macpherson LM, Dawes C. The effects of chewing-gum stick size and duration of chewing on salivary flow rate and sucrose and bicarbonate concentrations. *Arch Oral Biol* 1993; 38: 885-891.

Rubido S, Fernández-Feijoo J, Limeres J, García-Caballero L, Abeleira MT, Diz P. *In vivo* antiplaque effect of three edible toothpastes. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014; 19: E88-E92.

Sagel PA, Lapujade PG, Miller JM, Sunberg RJ. Objective quantification of plaque using digital image analysis. *Monogr Oral Sci* 2000; 17: 130-143.

Sanders WE, Sanders CC. Modification of normal flora by antibiotics: effects on individuals and the environment. En: *New dimensions in antimicrobial therapy. Contemporary issues in infectious diseases series.* Koot RK, Sande MA (eds). Churchill Livingstone, New York, 1984, pp 217-241.

Sato S, Yoshinuma N, Ito K, Tokumoto T, Takiguchi T, Suzuki Y, Murai S. The inhibitory effect of funoran and eucalyptus extract-containing chewing gum on plaque formation. *J Oral Sci* 1998; 40: 115-117.

Saxer UP, Yankell SL. Impact of improved toothbrushes on dental diseases. I. *Quintessence Int* 1997; 28: 513-525.

Saxer UP, Yankell SL. Impact of improved toothbrushes on dental diseases. II. *Quintessence Int* 1997; 28: 573-593.

Scheie AA. Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 1994; 8: 246-253.

Scheie AA, Fejerskov O, Danielsen B. The effects of xylitol-containing chewing gums on dental plaque and acidogenic potential. *J Dent Res* 1998; 77: 1547-1552.

Scheinin A, Mäkinen KK. The effect of various sugars on the formation and chemical composition of dental plaque. *Int Dent J* 1971; 21: 302-321.

Scheinin A, Mäkinen KK. Effect of sugar and sugar mixtures on dental plaque. *Acta Odontol Scand* 1972; 30: 235-257.

Schiött CR, Löe H, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Periodontal Res* 1970; 5: 84-89.

Schneider HG, Knieknecht I. Reduction of dental plaque by apples and chewing gum. *Nahrung* 1986; 30: 907-912.

Schou L, Holm-Pedersen P, Lang NP. En: Preventive dental care for elderly people. Textbook of geriatric dentistry (2^a ed). Pederson PH, Löe H (eds). Munksgaard, Copenhagen, 1996.

Seki M, Karakama F, Kawato T, Tanaka H, Saeki Y, Yamashita Y. Effect of xylitol gum on the level of oral mutans streptococci of preschoolers: block-randomised trial. *Int Dent J* 2011; 61: 274-280.

Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimen on salivary bacteria and *de novo* plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 919-925.

Seymour RA, Meechan JG, Yates MS. Pharmacological control of dental caries and periodontal disease. En: Pharmacology and Dental Therapeutics. Seymour RA, Meechan JG, Yates MS (eds). Oxford University Press, Oxford, 1999, pp 179-196.

Silness J, Löe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; 22: 121-135.

Simons D, Kidd EA, Beighton D, Jones B. The effect of chlorhexidine/xylitol chewing-gum on cariogenic salivary microflora: a clinical trial in elderly patients. *Caries Res* 1997; 31: 91-96.

Simons D, Beighton D, Kidd EA, Collier FI. The effect of xylitol and chlorhexidine acetate/xylitol chewing gums on plaque accumulation and gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 388-391.

Simons D, Brailsford S, Kidd EA, Beighton D. The effect of chlorhexidine acetate/xylitol chewing gum on the plaque and gingival indices of elderly occupants in residential homes. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 1010-1015.

Singh MP. Rapid test for distinguishing membrane-active antibacterial agents. *J Microbiol Methods* 2006; 67: 125-130.

Sjöblom M, Ainamo A, Ainamo J. Antimicrobial effect of four different toothpastes. *Scand J Dent Res* 1976; 84: 377-380.

Slavkin HC. Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. *J Am Dent Assoc* 1997; 128: 492-495.

Smith AJ, Moran J, Dangler LV, Leight RS, Addy M. The efficacy of an anti-gingivitis chewing gum. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 19-23.

Smith RN, Brook AH, Elcock C. The quantification of dental plaque using an image analysis system: reliability and validation. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 1158-1162.

Söderling EM. Xylitol, mutans streptococci, and dental plaque. *Adv Dent Res* 2009; 21: 74-78.

Söderling EM, Hietala-Lenkkeri AM. Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. *Curr Microbiol* 2010; 60: 25-29.

Söderling E, Mäkinen KK, Chen CY, Pape HR Jr, Loesche W, Mäkinen PL. Effect of sorbitol, xylitol, and xylitol/sorbitol chewing gums on dental plaque. *Caries Res* 1989; 23: 378-384.

Söderling E, Isokangas P, Tenovuo J, Mustakallio S, Mäkinen KK. Long-term xylitol consumption and mutans streptococci in plaque and saliva. *Caries Res* 1991; 25: 153-157.

Söderling E, Trahan L, Tammiala-Salonen T, Häkkinen L. Effects of xylitol, xylitol-sorbitol, and placebo chewing gums on the plaque of habitual xylitol consumers. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 170-177.

Söderling E, Isokangas P, Pienihäkkinen K, Tenovuo J. Influence of maternal xylitol consumption on acquisition of mutans streptococci by infants. *J Dent Res* 2000; 79: 882-887.

Söderling E, Isokangas P, Pienihäkkinen K, Tenovuo J, Alanen P. Influence of maternal xylitol consumption on mother-child transmission of mutans streptococci: 6-years follow up. *Caries Res* 2001; 35: 173-177.

Söderling E, Hirvonen A, Karjalainen S, Fontana M, Catt D, Seppä L. The effect of xylitol on the composition of the oral flora: a pilot study. *Eur J Dent* 2011; 5: 24-31.

Spitz IM, Rubenstein AH, Bersohn I, Bäessler KH. Metabolism of xylitol in healthy subjects and patients with renal disease. *Metabolism* 1970; 19: 24-34.

Stecksén-Blicks C, Holgerson PL, Olsson M, Bylund B, Sjöström I, Sköld-Larsson K, Kalfas S, Twetman S. Effect of xylitol on mutans streptococci and lactic acid formation in saliva and plaque from adolescents and young adults with fixed orthodontic appliances. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 244-248.

Steinberg LM, Odusola F, Mandel ID. Remineralizing potential, antiplaque and antigingivitis effects of xylitol and sorbitol sweetened chewing gum. *Clin Prev Dent* 1992; 14: 31-34.

Stephan RM, Miller BF. A quantitative method for evaluating physical and chemical agents which modify production of acids in bacterial plaques on human teeth. *J Dent Res* 1943; 22: 45-51.

Tagashira M, Uchiyama K, Yoshimura T, Shirota M, Uemitsu N. Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan synthesis of mutans streptococci. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61: 332-335.

Takahashi K, Fukazawa M, Motohira H, Ochiai K, Nishikawa H, Miyata T. A pilot study on antiplaque effects of mastic chewing gum in the oral cavity. *J Periodontol* 2003; 74: 501-505.

Tangade P, Mathur A, Chaudhary S, Gupta R. The effect of sugar-free and sugar chewing gums on plaque deposition. *Dent Res J (Isfahan)* 2012; 9: 309-313.

Tanner AC, Milgrom PM, Kent R Jr, Mokeem SA, Page RC, Riedy CA, Weinstein P, Bruss J. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J Dent Res* 2002; 81: 53-57.

Tanzer JM. Xylitol chewing gum and dental caries. *Int Dent J* 1995; 45: 65-76.

Tellefsen G, Larsen G, Kaligithi R, Zimmerman GJ, Wikesjö ME. Use of chlorhexidine chewing gum significantly reduces dental plaque formation compared to use of similar xylitol and sorbitol products. *J Periodontol* 1996; 67: 181-183.

ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 2006; 94: 1-9.

Tenovuo J, Söderling E. Chemical aids in the prevention of dental diseases in the elderly. *Int Dent J* 1992; 42: 355-364.

Thorild I, Lindau B, Twetman S. Caries in 4-year-old children after maternal chewing of gums containing combinations of xylitol, sorbitol, chlorhexidine and fluoride. *Eur Arch Paediatr Dent* 2006; 7: 241-245.

Tinanoff N. Review of the antimicrobial action of stannous fluoride. *J Clin Dent* 1990; 2: 22-27.

Tinanoff N. Progress regarding the use of stannous fluoride in clinical dentistry. *J Clin Dent* 1995; 6 Spec No: 37-40.

Toda Y, Moro I, Koga T, Asakawa H, Hamada S. Ultrastructure of extracellular polysaccharides produced by serotype c *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 1987; 66: 1364-1369.

Tomás I, García-Caballero L, Cousido MC, Limeres J, Álvarez M, Diz P. Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. *Oral Dis* 2009; 15: 428-433.

Tomás I, Cousido MC, García-Caballero L, Rubido S, Limeres J, Diz P. Substantivity of a single chlorhexidine mouthwash on salivary flora: influence of intrinsic and extrinsic factors. *J Dent* 2010; 38: 541-546.

Touger-Decker R, van Loveren C. Sugar and dental caries. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 881S-892S.

Trahan L. Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque – its clinical significance. *Int Dent J* 1995; 45: 77-92.

Trahan L, Mouton C. Selection for *Streptococcus mutans* with an altered xylitol transport capacity in chronic xylitol consumers. *J Dent Res* 1987; 66: 982-988.

Trahan L, Söderling E, Dréan MF, Chevrier MC, Isokangas P. Effect of xylitol consumption on the plaque-saliva distribution of mutans streptococci and the occurrence and long-term survival of xylitol-resistant strains. *J Dent Res* 1992; 71: 1785-1791.

Tuompo H, Meurman JH, Lounatmaa K, Linkola J. Effect of xylitol and other carbon sources on the cell wall of *Streptococcus mutans*. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 17-25.

Turesky S, Gilmore ND, Glickman I. Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *J Periodontol* 1970; 41: 41-43.

Usher PJ. Oral hygiene in mentally handicapped children. A pilot study of the use of chlorhexidine gel. *Br Dent J* 1975; 138: 217-221.

Vadeboncoeur C, Trahan L, Mouton C, Mayrand D. Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. *J Dent Res* 1983; 62: 882-884.

Van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol* 2005; 32 (Suppl 6): 214-228.

Van der Weijden GA, Timmerman MF, Nijboer A, Lie MA, Van der Velden U. A comparative study of electric toothbrushes for the effectiveness of plaque removal in relation to toothbrushing duration. Timerstudy. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 476-481.

Van der Weijden GA, Timmerman MF, Snoek IM, Reijerse E, Van der Velden U. Toothbrushing duration and plaque removing efficacy of electric toothbrushes. *Am J Dent* 1996; 9 Spec No: S31-S36.

Van der Weijden GA, Timmerman MF, Danser MM, van der Velden U. The role of electric toothbrushes: Advantages and limitations. En: Proceedings of the European Workshop on Mechanical Plaque Control. Lang NP, Attström R, Loe H (eds). Quintessenz Verlag, Berlin, 1998, pp 138-155.

Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol* 2012; 61: 399-419.

Vastola KA, Winston JL. The cleaning effectiveness of experimental, multiple-benefit triclosan dentifrice. *J Dent Res* 1998; 77 (Sp 1s): Abstr 1942.

Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J Immunol Methods* 2000; 243: 191-210.

Volker JF. The effect of gum chewing on the teeth and supporting structures. *J Am Dent Assoc* 1948; 36: 23-27.

von Ohle C, Gieseke A, Nistico L, Decker EM, DeBeer D, Stoodley P. Real-time microsensor measurement of local metabolic activities in *ex vivo* dental biofilms exposed to sucrose and treated with chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2326-2334.

Wade AB. Effect on dental plaque of chewing apples. *Dent Pract Dent Rec* 1971; 21: 194-196.

Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old pre-dentate infants. *J Dent Res* 2001a; 80: 2060-2065.

Wan AK, Seow WK, Walsh LJ, Bird P, Tudehope DL, Purdie DM. Association of *Streptococcus mutans* infection and oral developmental nodules in pre-dentate infants. *J Dent Res* 2001b; 80: 1945-1948.

Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J* 2001; 190: 309-316.

Weiger R, Netuschil L, Wester-Ebbinghaus T, Brex M. An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses *in vivo*. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 559-565.

White DJ. A "return" to stannous fluoride dentifrices. *J Clin Dent* 1995; 6 Spec No: 29-36.

White DJ, Kozak KM, Gibb R, Dunavent J, Klukowska M, Sagel PA. A 24-hour dental plaque prevention study with a stannous fluoride dentifrice containing hexametaphosphate. *J Contemp Dent Pract* 2006; 7: 1-11.

Wilcox CE, Everett FG. Friction on the teeth and the gingiva during mastication. *J Am Dent Assoc* 1963; 66: 513-520.

Wile DB, Dinsdale JR, Joynson DH. Hexetidine ("Oraldene"): a case report on its antibacterial and antifungal properties on the oral flora in healthy subjects. *Curr Med Res Opin* 1986; 10: 82-88.

Williams C, McBride S, Bolden TE, Mostler K, Petrone DM, Petrone ME, Chaknis P, DeVizio W, Volpe AR, Proskin HM. Clinical efficacy of an optimized stannous fluoride dentifrices, Part 3: A 6-month plaque/gingivitis clinical study, southeast USA. *Compend Contin Educ Dent* 1997; 18 Spec No: 16-20.

Wilson M, Pratten J. Laboratory assessment of antimicrobials for plaque-related diseases. En: Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease. Newman HN, Wilson M (eds). Cardiff: Bioline, Cardiff, 1999.

World Health Organization. Oral health surveys, Basic methods, 4th ed. WHO: Geneva, 1997.

Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Heydorn A, Koo H. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002623. doi: 10.1371/journal.ppat.1002623. Epub 2012 Apr 5.

Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira Cordero JG. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors on mutans streptococci. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 5666-5671.

Zhang T, Fang HH. Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using BacLight. *Biotechnol Lett* 2004; 26: 989-992.

