



VNIVERSITAT  VALÈNCIA
Departament d'Estomatologia

ESTUDIO DE LA MUCOSA ORAL EN PACIENTES QUE EMPLEAN COLUTORIOS

TESIS DOCTORAL

Programa de doctorado:

Fisiopatología del Aparato Estomatognático

Presentado por:

Cristina Marzal Gamarra

Dirigida por:

Prof. Dr. José Vicente Bagán Sebastián

Prof. Dr. Francisco José Vera Sempere

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE LA MUCOSA ORAL EN
PACIENTES QUE EMPLEAN COLUTORIOS**

Presentado por:

Cristina Marzal Gamarra

Dirigida por:

Prof. Dr. José Vicente Bagán Sebastián

Prof. Dr. Francisco José Vera Sempere

Prof. Dr. JOSÉ VICENTE BAGÁN SEBASTIÁN, Catedrático de Estomatología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICO:

Que Dña. CRISTINA MARZAL GAMARRA, Licenciada en Odontología, ha efectuado bajo mi dirección, la presente tesis Doctoral, titulada “ESTUDIO DE LA MUCOSA ORAL EN PACIENTES QUE EMPLEAN COLUTORIOS.”, para optar al Grado de Doctor.

Para que así conste, firmo la presente en Valencia, Octubre de dos mil doce.

Fdo.: Prof. Dr. J. V. Bagán Sebastián

Prof. Dr. FRANCISCO JOSÉ VERA SEMPERE, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICO:

Que Dña. CRISTINA MARZAL GAMARRA, Licenciada en Odontología, ha efectuado bajo mi dirección, la presente tesis Doctoral, titulada “ESTUDIO DE LA MUCOSA ORAL EN PACIENTES QUE EMPLEAN COLUTORIOS.”, para optar al Grado de Doctor.

Para que así conste, firmo la presente en Valencia, Octubre de dos mil doce.

Fdo.: Prof. Dr. F. J. Vera Sempere

*Por todos los años que viví contigo, por tus besos, tus
cuidados, tus mimos, tu alegría, tu serenidad, tu
paciencia, por lo mucho que nos quisiste y por lo mucho
que te quiero.*

Siempre estarás en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS:

A mis directores de Doctorado: el Prof. Dr. José Vicente Bagán Sebastián por su continua ayuda, esfuerzo y trabajo; por su contribución no solo a enseñar sino también a educar en la vida personal y profesional, y por la confianza que depositas en mi.

Y al Prof. Dr. Fco. José Vera Sempere, por su ayuda en este proyecto.

A mis profesores de Máster, compañeros y amigos, que en dos años pasaron a formar parte de mi familia.

A mis padres, Miguel y Rosa, y a mi hermana, Mireia, por su apoyo, su comprensión y su presencia en todos los momentos importantes de mi vida. Porque sin ellos nada sería lo que es ahora.

A toda mi familia, que hace que seamos un gran equipo, en especial a Rosi y Vicenta , porque sé que celebraríais este momento como yo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	17
1. Recuerdo histológico de la mucosa oral	19
1.1. Epitelio	19
1.2. Membrana basal	21
1.3. Lámina propia o corion	21
2. Colutorios y su utilización en Odontología	22
2.1. Efectos adversos del uso de colutorios con alcohol	27
2.2. Efecto citotóxico del etanol sobre la mucosa oral	29
3. Lesiones potencialmente malignas, cáncer oral y la acción de agentes cancerígenos	33
4. La citología exfoliativa y su utilidad en la detección de alteraciones celulares en la mucosa oral	35
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODO	49
1. Pacientes	51
2. Método	52
3. Toma de muestras	54
4. Valoración de los frotis celulares	55

5. Metodologías opcionales a desarrollar en los casos que se considerara necesario para el estudio	56
6. Método estadístico	56
7. Anexo 1	59
8. Anexo 2	65
RESULTADOS	71
1. Análisis por citología	74
1.1. Análisis dentro de cada grupo	74
1.2. Análisis entre grupos	76
1.3. Resumen general por citología	79
2. Análisis por paciente	79
2.1. Análisis dentro de cada grupo	80
2.2 Análisis entre grupos	83
2.3. Resumen general por citología	84
3. Anexo	85
DISCUSIÓN	109
CONCLUSIONES	123

INTRODUCCIÓN

1. Recuerdo histológico de la mucosa oral

La cavidad bucal, como toda cavidad orgánica que se comunica con el exterior, esta tapizada por una membrana mucosa de superficie húmeda. La humedad, que es aportada por las glándulas salivales mayores y menores, es necesaria para el mantenimiento de la estructura normal de los tejidos.

La mucosa bucal, al igual que toda mucosa, esta integrada por dos capas de tejidos estructural y embriológicamente diferentes: una capa superficial constituida por tejido epitelial, de origen ectodérmico, el epitelio y otra capa subyacente de tejido conectivo, de origen ectomesenquimático (derivado de las células de la cresta neural) la lámina propia o corion, ambas conectadas por la membrana o lámina basal. El tejido conectivo emite prolongaciones hacia el epitelio, denominadas papilas coriales. A su vez el epitelio se proyecta hacia la lámina propia en forma de evaginaciones que se interdigitan con las papilas coriales y reciben el nombre de crestas epiteliales. Esta disposición estructural en papilas y crestas facilita la nutrición del epitelio de la mucosa oral al permitir una mayor proximidad entre el tejido conjuntivo vascular y el tejido epitelial avascular (1).

1.1. Epitelio

El epitelio de la mucosa bucal es de tipo plano o pavimentoso estratificado. Puede ser queratinizado, paraqueratinizado o no queratinizado; según la localización presenta diferencias estructurales y funcionales. Las células epiteliales están estrechamente unidas entre sí, de manera que forman una barrera funcional de protección entre el medio bucal y el tejido conectivo subyacente.

Mucosa labial:

Está constituida por un epitelio plano estratificado no queratinizado. A este nivel se observan numerosos puentes intercelulares o desmosomas.

Existe una submucosa poco desarrollada, que presenta cúmulos linfoides y glándulas salivales cuyos acinos están muy cerca de la superficie, aunque algunos se encuentran ubicados muy profundamente.

La mucosa labial es rosada y húmeda, con gran vascularización (1).

Mucosa yugal:

El epitelio es plano estratificado no queratinizado, característico de las superficies epiteliales húmedas sometidas a considerable roce y desgaste. Este epitelio es muy semejante al de la mucosa labial. A la altura de los molares suele presentar una línea de oclusión, de color blanquecino, con epitelio paraqueratinizado determinada por el trauma masticatorio.

En la submucosa se hallan fibras elásticas, grandes vasos sanguíneos y nervios, tejido adiposo y glándulas salivales (1).

Lengua:

Es un órgano muscular tapizado por mucosa. La lengua presenta una cara dorsal y una ventral. Y la mucosa que recubre cada una de ellas es diferente y no existe submucosa.

La cara o superficie ventral de la lengua presenta un epitelio de revestimiento plano estratificado no queratinizado delgado y liso. La cara o superficie dorsal esta dividida en dos partes por una línea en forma de V: el cuerpo o zona bucal de la lengua cuyo epitelio es plano estratificado parcialmente cornificado y la raíz o zona bucofaríngea de la lengua cuyo epitelio es plano estratificado (de origen endodérmico) en estrecha relación con nódulos linfáticos.

La membrana mucosa del suelo de la boca es muy delgada y está adherida laxamente a las estructuras subyacentes, para permitir la libre movilidad de la lengua. Tiene un epitelio no queratinizado. La submucosa contiene tejido adiposo (1).

Paladar duro:

Está revestido por epitelio plano estratificado queratinizado. Las regiones marginal y del rafe medio están íntimamente unidas al hueso lo que dificulta determinar dónde comienza el periostio y termina la submucosa. En las zonas antero y posterolateral la submucosa presenta fibras colágenas en haces que se insertan perpendicularmente al hueso. En la anterolateral hay gran cantidad de células adiposas, por eso se llama zona adiposa o grasa.

Paladar blando o velo del paladar:

Está revestido por epitelio plano estratificado no queratinizado con botones gustativos, que se continúa con el epitelio de la superficie faríngea. La subucosa es de tejido conectivo laxo y posee una capa continua de glándulas mucosas.

1.2. Membrana basal

Es la separación entre el epitelio y el tejido conjuntivo. Observada con microscopía óptica dicha región consiste en una banda acelular homogénea y estrecha que se tiñe con tinciones específicas para detectar glucoproteínas (PAS). Si se examina con microscopía electrónica la membrana basal está constituida por dos regiones: la lámina basal sintetizada por las células epiteliales y la lámina reticular elaborada por las células del tejido conectivo.

Entre las funciones de la membrana basal se destaca la de ser una estructura de fijación entre el epitelio y el tejido conectivo, y un filtro molecular no solo físico (malla de colágeno tipo IV), sino también químico, debido al alto nivel de cargas negativas que restringe el paso de moléculas con este tipo de carga.

Otra de sus funciones es la de guía para la migración celular en la reepitelización de heridas y su contribución como barrera al sistema defensivo del organismo. La membrana basal en la cavidad bucal presenta algunas características especiales: es más gruesa en su conjunto en los epitelios no queratinizados y con la edad disminuye progresivamente de espesor.

La alteración de la configuración molecular de esta estructura explica numerosos procesos que afectan la patología de la mucosa bucal (1).

1.3. Lámina propia o corion

Es una lámina de tejido conjuntivo y espesor variable que confiere sostén y nutrición al epitelio. Estas funciones se ven reforzadas por la presencia de papilas que llevan vasos y nervios. Como todo tejido conectivo presenta células, fibras y sustancia fundamental. Entre las células podemos mencionar fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células cebadas y células plasmáticas.

El conocimiento de las distintas estructuras histológicas que constituyen la mucosa y los órganos de la cavidad bucal es de suma importancia para establecer el sustrato tisular en el que asientan las principales enfermedades que afectan a dicha región, y de ese modo comprender su histogénesis.

La alteración en el proceso de proliferación, que incrementa el número de células se denomina hiperplasia (1). Cuando se produce un aumento de los elementos de la capa córnea se habla de hiperqueratosis. La alteración del proceso de diferenciación queratinocítica se denomina

disqueratosis. Si la población hiperplásica se une a una alteración en el proceso de diferenciación se origina una displasia (2).

2. Colutorios y su utilización en Odontología

Los colutorios son preparaciones líquidas destinadas a ser aplicadas sobre los dientes, las mucosas de la cavidad oral y faringe con el fin de ejercer una acción local antiséptica, astringente o calmante. El vehículo más comúnmente utilizado en los colutorios es el agua y los principios activos son principalmente antisépticos, antibióticos, antifúngicos, astringentes y antiinflamatorios (3).

Los métodos de control de la placa bacteriana se enfocan a la remoción de la máxima cantidad posible de los depósitos acumulados sobre las superficies dentarias, por medio de técnicas mecánicas llevadas a cabo por el paciente, como el cepillado dental o la higiene interproximal, o bien por el profesional (4). El fundamento científico de las técnicas mecánicas de eliminación de la placa se basa en la hipótesis de la placa bacteriana inespecífica, según la cual toda placa bacteriana es igualmente patógena, por lo que el desarrollo de la caries y las enfermedades periodontales estaría ligado principalmente a la cantidad de placa acumulada sobre las superficies dentarias.

La mayoría de pacientes, con los métodos mecánicos de higiene oral incluidos la higiene interdental, no controlan la placa de forma efectiva, ya sea por falta de motivación, de conocimiento o a la dificultad que entrañan algunas de las técnicas de higiene oral, en particular, a nivel interproximal. Aun así, la higiene oral mecánica realizada de forma correcta no deja las superficies dentales completamente libres de placa, pero limita su acumulación e impide su maduración, haciéndola no patógena. Por ello, la idea de una sustancia química capaz de eliminar fácilmente la placa bacteriana sin efectos secundarios ha sido y continúa siendo objeto de investigación.

Los enjuagues bucales presentan la ventaja de que su actividad antimicrobiana puede alcanzar las zonas de difícil acceso. Casi todos los métodos químicos de control de la placa bacteriana se fundamentan también en la hipótesis de la placa bacteriana inespecífica, ya que pretenden disminuir la formación de ésta en general, evitar su adhesión a las superficies dentarias, alterar el metabolismo bacteriano, etc.

Las sustancias químicas pueden actuar sobre la placa de diversas formas; impidiendo la adhesión de la placa por agentes antiadhesivos, impidiendo o enlenteciendo la proliferación bacteriana por medio de agentes antimicrobianos, eliminando la placa ya establecida, y alterando la patogenicidad de la placa.

Agentes antiadhesivos y eliminadores de placa:

La formación de placa podría controlarse mediante agentes antiadhesivos o eliminadores de la placa, pero hasta ahora no se han comercializado ni son seguros para su uso en el medio oral (5).

Agentes antimicrobianos:

Estos agentes pueden inhibir la formación de placa por la inhibición de la proliferación bacteriana y/o por un efecto de tipo bactericida por medio del cual el agente antibacteriano destruye todos los microorganismos que se están adhiriendo o que ya están adheridos a la superficie dental.

En la actualidad la mayor parte de los agentes antiplaca son antimicrobianos e impiden la fase de proliferación bacteriana en el desarrollo de la placa (3, 6).

Agentes antipatógenos:

La alteración en la patogenicidad de la placa bacteriana mediante agentes químicos o por modificación de las bacterias requiere mayor conocimiento sobre la etiología bacteriana de la gingivitis (5).

Uno de los usos más extendido de los colutorios es, para tratar la gingivitis y periodontitis.

La gingivitis es un proceso inflamatorio de la encía en el cual el epitelio de inserción, aunque alterado por la enfermedad, se mantiene unido al diente en el nivel original, sin migración apical y por tanto sin pérdida de soporte periodontal. La gingivitis se produce por la acumulación inespecífica de placa y se elimina mediante un control cuidadoso de ésta (3,7).

A medida que la gingivitis progresa de inicial a crónica, la flora bacteriana de la placa se modifica. Contrariamente a lo que se creía, no todas las gingivitis evolucionan a periodontitis.

La periodontitis es también un proceso inflamatorio y se diagnostica cuando se ha producido la migración del epitelio y la pérdida de soporte periodontal.

El examen del estado periodontal de un paciente incluye la evaluación clínica de la inflamación, de los tejidos periodontales, el registro de la profundidad de sondeo y del nivel clínico de inserción y la evaluación radiológica del hueso alveolar de sostén. En el transcurso de los años se crearon diversos sistemas de índices para asignar puntuaciones a estos parámetros (8).

Por otro lado, en la patogénesis de las enfermedades periodontales cobran un especial interés los factores microbianos que influyen en la periodontopatogenicidad de los gérmenes (como son los factores específicos de adherencia bacteriana). En el momento del nacimiento, la cavidad oral es estéril, aunque rápidamente se inicia la colonización bacteriana, constituyéndose la llamada flora microbiana oral o microbiota, donde cohabitan aerobios, anaerobios estrictos (65%), especies saprófitas y patógenas. El equilibrio (eubiosis) puede alterarse por factores exógenos o endógenos con lo que se presenta la enfermedad (disbiosis). La placa bacteriana localizada en el margen gingival (supra y subgingival) es la iniciadora de la enfermedad, en mayor medida por supuesto la subgingival que tiene un mayor contacto con los tejidos de soporte del diente. Esta última placa está formada por bacterias anaerobias, gram negativas, formas móviles y espiroquetas, localizadas en un área donde se dan condiciones muy favorables (bolsa, anaerobiosis, PH, potencial óxido-reducción, menor autoclisis, etc). Así pues, la microbiota es polimicrobiana y mixta siendo las enfermedades muchas veces consecuencia de asociaciones bacterianas complejas (7).

La búsqueda de agentes para el control de la placa ha sido amplia, más teniendo en cuenta la importancia que ha adquirido la enfermedad periodontal en los últimos años; esto ha llevado a numerosas empresas a investigar en este campo. Hasta la fecha dos enjuagues antisépticos han recibido el sello de aceptación de la American Dental Association Council on Scientific Affairs basados en estudios clínicos: Peridex® (Zila Pharmaceuticals, Phoenix, AZ, EEUU), es una solución al 0,12% de clorhexidina y Listerine® (Pfizer Consumer Healthcare, Morris Plains, NJ, EEUU; aceite esencial, AE). Los ingredientes activos de Listerine® son cuatro aceites esenciales: timol al 0,064%, eucaliptol al 0,092%, salicilato de metilo al 0,060% y mentol al 0,042%. Además, los colutorios que contienen clorhexidina o aceites esenciales han sido aceptados por múltiples asociaciones dentales nacionales de todo el mundo. Los datos muestran que los colutorios con clorhexidina o con aceites esenciales tienen los efectos antimicrobianos más extensos.

La clorhexidina tiene gran afinidad por las superficies dentarias y tisulares y ello sirve como depósito incluso después del enjuague o la irrigación con el agente. Debido a su alta sustantividad se considera el “gold standard” de los antisépticos. Estudios clínicos demuestran claramente que los enjuagues de clorhexidina al 0,12% y de agentes esenciales presentan unos excelentes perfiles de seguridad, eficacia y tolerancia (9,10). Además, los agentes esenciales no han mostrado ninguna evidencia de manchas dentales extrínsecas en comparación con los controles y los exámenes de los tejidos blandos intraorales no han señalado aberraciones de ningún tipo.

La clorhexidina se ha estudiado en un número de ensayos clínicos controlados durante periodos de seis meses o más. En estos estudios la reducción de la placa se situó entre el 16 y el 45% y la reducción de la gingivitis entre el 27 y el 80%. El colutorio de clorhexidina presenta ciertas desventajas; puede provocar tinciones de las superficies dentarias, de la lengua y las restauraciones. Dichas tinciones se eliminan mediante copa de goma con pastas abrasivas o bicarbonato pulverizado a presión. La CHX puede también alterar la percepción del gusto hasta cuatro horas después del enjuague y, en algunos casos, su uso ha sido asociado a la aparición de cálculos supragingivales, descamaciones y úlceras en la mucosa. Estos efectos no deseados que se derivan del uso regular, no se han observado de forma habitual con los enjuagues de agentes esenciales, sin embargo, si que existen algunas quejas sobre su sabor.

Además de la clorhexidina, entre los antisépticos comunes en los colutorios se incluyen otros que están comercializados, entre ellos destacan otras bisguanidas como la alexidina y la octenidina. Éstas son muy similares a la clorhexidina, y su efecto antiplaca es parecido, pero se han estudiado mucho menos y se utilizan poco. El triclosan, es un derivado fenólico que ha sido introducido en dentífricos y colutorios para controlar la placa y la gingivitis. Se recomienda su uso continuado por las siguientes razones:

- Por su mecanismo de acción, que le permite actuar no solo como agente antiplaca, sino también como antiinflamatorio específico en la gingivitis y posiblemente como inhibidor de la progresión de la periodontitis.
- Por su fácil formulación en dentífricos.
- Por no provocar efectos indeseables como tinciones o irritaciones de la mucosa oral.

Otros fenoles y aceites esenciales; el mas antiguo de los agentes antiplaca utilizados en clínica es el Listerine®, que pertenece a este grupo. Su efecto antiplaca y antigingivitis es apreciable, aunque menor que el de la clorhexidina. Provoca tinciones en ocasiones y sensación de quemazón al utilizarlo.

Durante muchos años se han apreciado los efectos de los antimicrobianos de las sales metálicas entre ellos la inhibición de la placa, y el interés más reciente se ha centrado en el cobre, el estaño y cinc. Los resultados son contradictorios pero parecen depender de la sal metálica usada, de su concentración y de la frecuencia de su utilización.

Las sales metálicas combinadas con otros antisépticos producen una sumatoria de efectos inhibitorios de la placa y de la gingivitis.

El fluoruro estañoso tiene una acción antigingivitis y además es capaz de reducir el número de Streptococos Mutans, pero produce tinciones dentales. El cinc no tiene efecto antiplaca por sí

solo, pero asociado con otros antisépticos (triclosán, hexetidina) potencia su efecto. El citrato de cinc se utiliza en dentífricos anticálculo.

Los compuestos de amonio cuaternario como el cloruro de benzalconio y más particularmente el cloruro de cetilpiridinio son los más estudiados de esta familia de antisépticos. En los colutorios, el cloruro de cetilpiridinio posee cierta acción química inhibidora de la placa, sin embargo las evidencias acerca de sus efectos beneficiosos sobre la gingivitis son inciertos, en particular cuando las formulaciones se usan junto con el cepillado dental con pasta dentífrica. La hexetidina es un agente catiónico, al igual que la clorhexidina, pero su efecto antiplaca es moderado, viéndose potenciado al combinarlo con cinc. Al aumentar la concentración, se incrementa el riesgo de tinciones y lesiones mucosas.

Productos naturales como la sanguinarina, cuyos efectos sobre el control de la placa bacteriana no está demostrado claramente.

Detergentes, como el laurilsulfato de sodio (LSS), se utiliza ampliamente tanto en dentífricos como en colutorios. Los dentífricos con LSS inhiben el crecimiento de nueva placa.

El flúor es eficaz para el control de la gingivitis y la caries, pero causan tinciones dentales en algunos casos. La combinación de fluoruro de estaño y fluoruro de aminas produce un compuesto estable que se usa como colutorio para el control de la caries y la gingivitis, aunque su efecto antimicrobiano no parece estar ligado a la presencia de flúor.

Los agentes antioxidantes se han utilizado en el tratamiento de la gingivitis ulceronecrotizante aguda, y se ha demostrado algún efecto de estos enjuagues sobre el crecimiento de la placa, pero no hay resultados a largo plazo que apoyen su utilización.

Existen enzimas que pueden interferir en los mecanismos de adhesión bacteriana específicos o inespecíficos, ya que tienen el potencial de degradar la matriz inicial de la placa, con lo cual eliminan las bacterias de la superficie dental, aunque los resultados en el control de la caries y la gingivitis no han sido concluyentes (5).

Otro de los usos de los colutorios es combatir la halitosis. Entre los antisépticos disponibles en el mercado para combatir el mal olor se incluyen: peróxido de hidrógeno, enjuagues con zinc, enjuagues con clorhexidina, triclosan, compuestos fenólicos “aceites esenciales”, dióxido de cloro, peróxido de carbamida y la sanguinarina (11).

También se han empleado como tratamiento sintomático de las úlceras aftosas, con resultados equívocos o con varias interpretaciones ya que pueden inducir dolor oral (12).

Otro de los usos de los colutorios es en el tratamiento de las infecciones por *Candida* y como alivio del dolor y malestar causado por la inflamación a nivel bucal (13).

2.1. Efectos adversos del uso de colutorios con alcohol

Los colutorios pueden iniciar reacciones alérgicas orales o sistémicas de tipo inmediato o tardío, pueden modificar los tejidos duros del diente, causando desmineralización y tinción del esmalte. También se incluyen sensación de ardor bucal y sequedad de las mucosas. Además, los colutorios pueden variar la dureza de los materiales de restauración (14).

Se consideran irritantes potenciales en los colutorios su elevada concentración de etanol, un valor bajo de pH y otros ingredientes como los edulcorantes y colorantes artificiales y los agentes saporíferos (15).

El alcohol puede emplearse en los colutorios como disolvente de los principios activos y además de proporcionar sus propiedades antisépticas se ha reconocido su uso como conservante activo al 10-12% (16).

La elevada cantidad de alcohol en algunos colutorios, así como el hecho de que permanecen en contacto con la mucosa oral durante más tiempo que una bebida alcohólica, pueden hacer pensar en un efecto nocivo a partir de un mecanismo local. El enjuague oral aumenta el tiempo de exposición de la mucosa al alcohol y se ha demostrado que colutorios con alto contenido en alcohol producen lesiones hiperqueratósicas tanto en hombres como en animales de estudio. El alcohol puede producir una sensación dolorosa que guarda relación con la concentración del enjuague (17, 18).

La presencia de alcohol en proporciones de hasta un 5% en las formulaciones de clorhexidina parecía aumentar la efectividad del producto, sin embargo, la formulación de la clorhexidina sin alcohol es igualmente efectiva en el control de la placa bacteriana y la reducción de la inflamación gingival (19). La clorhexidina, introducida por Løe en 1969 (20), también se ha asociado con efectos adversos, como alteraciones en el gusto, descamaciones superficiales de la mucosa oral, discoloraciones de la lengua y de los dientes y un incremento en la formación de cálculos supragingivales.

Los colutorios con contenido alcohólico están contraindicados en pacientes en los que por distintas causas la mucosa oral se encuentre alterada. Este es el caso de pacientes con mucositis por diversas causas, inmunodeprimidos, irradiados de cabeza y cuello, etc.

No se recomienda el uso de colutorios con alcohol en pacientes que tienen alguna lesión previa en la mucosa y en pacientes con mucosas sensibles se recomienda diluir el producto las primeras veces y disminuir progresivamente la disolución.

También se contraindican en niños ya que se corre el riesgo de intoxicación accidental, en alcohólicos, ya que pueden ingerir el colutorio como sustituto de una bebida alcohólica en situaciones desesperadas y en pacientes embarazadas (21-23).

Kowitz y cols. (24) describió como efectos adversos tras el uso de colutorios la descamación del epitelio, ulceraciones mucosas e inflamación, gingivitis y petequias.

Bernstein, (25) presentó dos casos de lesiones blancas mucosas asociadas al uso del colutorio Listerine®.

También se han descrito reacciones alérgicas desencadenadas por colutorios (14). Fisher (26) describe un caso de una dermatitis alérgica causada por la presencia de timol en el colutorio Listerine®. Lim y cols. (27) describe el caso de un edema mucoso y perioral causados por dos antisépticos.

El riesgo de desarrollar cáncer oral se ha demostrado que está relacionado con la intensidad y duración de la exposición al alcohol y al tabaco (28- 31). Un estudio de caso-control estimó que el riesgo de desarrollar cáncer oral era aproximadamente 50 veces mayor en los grandes fumadores y bebedores que en aquellos que nunca habían fumado ni bebido (32).

La preocupación sobre la posible asociación de la ingesta de alcohol con el cáncer bucofaríngeo se ha extendido hasta incluir a los colutorios que contienen alcohol. Desde finales de los 70 se publicaron estudios de casos y controles a propósito de la posible asociación entre el uso de colutorios y el desarrollo del cáncer oral (33-48).

Actualmente no se ha podido establecer una relación causal entre el uso de colutorios con alcohol y el desarrollo del cáncer oral. Tampoco existe evidencia de que el alcohol aumente el efecto de los agentes antiplaca en los colutorios.

La falta de consistencia entre los hallazgos de los estudios publicados que evalúan la relación entre el uso de colutorios y el riesgo de desarrollar cáncer orofaríngeo puede relacionarse con las variables metodológicas, las limitaciones en los tamaños de las muestras, las dificultades de medir las exposiciones y los bajos niveles de riesgo.

En los estudios de Blot y cols. (34) y Wynder y cols. (35), la asociación existía solo en mujeres, mientras que Winn y cols. (38) encuentra relación en ambos sexos. Del mismo modo, en algunos estudios se observaba asociación en personas que ni fumaban ni bebían, y en otros, en fumadores y bebedores. Por lo tanto, el tamaño y el análisis de las muestras de los estudios de casos y controles publicados carecen de homogeneidad.

2.2. Efecto citotóxico del etanol sobre la mucosa oral

El alcohol etílico o etanol, cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$, es el componente activo esencial de las bebidas alcohólicas. Tras la ingesta de una bebida alcohólica, el etanol es absorbido a nivel del intestino delgado y en menor proporción en el grueso y en el estómago, llegando por vía portal al hígado donde es metabolizado en su mayoría. Este metabolismo se divide en dos etapas:

La primera, consistente en la transformación del etanol en acetaldehído, que puede ser realizada por tres vías, la vía de la alcohol deshidrogenasa (ADH), la vía microsomal hepática (MEOS) y la vía catalasa.

La segunda etapa se caracteriza por la oxidación del acetaldehído obtenido anteriormente a acetato a través de la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH).

El consumo de bebidas alcohólicas tiene repercusiones prácticamente en todo el organismo: sistema nervioso, cardiovascular, digestivo, sexual o a nivel de la médula ósea. En la cavidad oral se caracteriza por la aparición de una serie de signos y síntomas clínicos originados bien por el efecto directo del etanol en el organismo o bien derivados del descuido del aseo personal.

El consumo crónico de bebidas alcohólicas está asociado con un riesgo aumentado de cáncer del tracto gastrointestinal superior. Aunque existen múltiples explicaciones que tratan de explicar el efecto promotor del alcohol, el mecanismo patógeno no está claro. La base de la que se parte es que el etanol per se no ha demostrado ser carcinógeno. Por ello se han propuesto distintas hipótesis que tratan de explicar como por vía local y/o sistémica el etanol puede actuar como factor de riesgo en el desarrollo del cáncer oral (49).

Efecto local:

Aumento de la permeabilidad.

El alcohol en contacto con la mucosa oral es capaz de producir una alteración en su morfología caracterizada por una atrofia epitelial, lo que supone un incremento en la susceptibilidad de dicho tejido frente a otros carcinógenos químicos. Se ha sugerido que el etanol es capaz de aumentar la penetración de carcinógenos a través de la mucosa oral, debido tanto a un aumento de la solubilidad de los mismos, como a un aumento en la permeabilidad la mucosa (30). Dicho aumento se explica por el efecto disolvente del etanol, capaz de eliminar el contenido lípido de la barrera que presenta la cavidad oral formada por lípidos derivados de la membrana que rodea los gránulos del estrato espinoso del epitelio.

Acción del acetaldehído.

El incremento en la permeabilidad de la mucosa oral no es suficiente para explicar el mayor riesgo de desarrollo de cáncer oral en personas bebedoras. Debido a que el etanol *per se* no ha demostrado ser carcinógeno, se ha postulado el papel de su primer metabolito, el acetaldehído, como potencial factor implicado. La Agencia Internacional para la Investigación y el Cáncer (IARC) ha establecido que existe suficiente evidencia para identificar al acetaldehído como carcinógeno en animales, siendo posiblemente carcinógeno para humanos (50).

Distintos estudios se han centrado en identificar los efectos del acetaldehído encontrando que en cultivos celulares a corto plazo causa mutaciones y otros daños a nivel del ADN; interfiere en la síntesis y reparación del ADN, y consecutivamente en el desarrollo de tumores; induce intercambio en las cromátidas hermanas; produce mutaciones puntuales en genes; inhibe la O⁶ metilguanitransferasa, enzima encargada de reparar los daños causados por agentes alquilantes; se une a proteínas celulares y ADN provocando daños celulares. Por tanto, debido al importante papel que parece jugar el acetaldehído en el desarrollo del cáncer oral se considera que todas aquellas situaciones que determinen una acumulación del mismo supone un mayor riesgo (51).

Metabolismo del acetaldehído a nivel oral:

El metabolismo del etanol en la cavidad oral se caracteriza por una primera oxidación que lo transforma en acetaldehído a través de la ADH presente tanto en la microflora oral como en las células de la mucosa oral, así como a través del citocromo P 4502. El inducido por el etanol. Posteriormente el acetaldehído sufrirá una segunda oxidación vía ALDH, que lo transformará en acetato, impidiendo la actividad tóxica del primer metabolito (49).

Por tanto la acumulación de acetaldehído puede deberse a un aumento en la actividad de la ADH de la microflora oral, la ADH de las células de la mucosa oral y del citocromo P4502E1 o una disminución de la actividad de la ALDH.

Papel de la enzima alcohol deshidrogenasa de la microflora oral:

El papel de la microflora oral en la oxidación del etanol ha sido estudiado por Homann (52) que ha demostrado la producción de cantidades considerables de acetaldehído durante el consumo social de alcohol. Este autor ha demostrado que los sujetos con tendencia a la flora aeróbica (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus viridans* hemolítico var., *Corynebacterium* sp., *Stomatococcus* sp., hongos) presentan una mayor producción de acetaldehído salival. De tal modo que el etanol parece incrementar la producción bacteriana de acetaldehído de forma dosis dependiente, y a partir de cantidades superiores a 40 gramos de etanol al día (51).

En esta misma línea de investigación Homann (52) ha encontrado una asociación entre los bajos niveles de higiene oral presentes en los sujetos alcohólicos y un sobrecrecimiento bacteriano, lo

que repercutiría en una mayor concentración de acetaldehído salival por esta vía. Esto explicaría el aumento del riesgo de cáncer oral en pacientes alcohólicos con mala salud oral (51).

Papel de la alcohol deshidrogenasa de la mucosa oral:

El etanol es capaz de atravesar las membranas celulares por simple difusión y esto permite que la actividad ADH de las células epiteliales orales lo transforme en acetaldehído que se acumulará intracelularmente, ejerciendo sus efectos sobre el ADN epitelial (30). Se ha descrito que la ADH que se encuentra en las células de la mucosa oral presenta una elevada constante de afinidad (K_m), lo que implica que va a contribuir en pequeña medida al metabolismo del etanol (a mayor valor de la constante de afinidad, menor afinidad de la ADH por el etanol, y por tanto menor transformación en acetaldehído).

Citocromo P450:

El citocromo P450E1 se encuentra localizado en el retículo endoplasmico liso, y participa en la oxidación del etanol cuando los niveles de este son superiores a 50-80 mg/dl.

Por otro lado el citocromo P450E1 es capaz de incrementar el riesgo de desarrollo de cáncer oral de un modo indirecto, mediante la activación de procarcinógenos y el incremento en la producción de radicales tóxicos (51). Estos efectos han sido mayoritariamente estudiados en relación con el cáncer de colon. Sin embargo son necesarias futuras investigaciones que aproximen estos conocimientos al campo de la cavidad oral.

Actividad de la acetaldehído deshidrogenasa:

La segunda vía a través de la cual el acetaldehído puede acumularse a nivel de la cavidad oral, es consecuencia de una disminución en su eliminación. Para que el acetaldehído sea transformado a acetato es necesaria la actuación de la enzima aldehído deshidrogenasa, principal responsable de su metabolismo (50). De este modo, cualquier alteración a nivel de esta enzima supondrá un incremento en la acumulación de acetaldehído (49, 53).

Alteración del metabolismo de retinoides.

A pesar de que el papel del acetaldehído parece quedar bastante claro en el desarrollo del cáncer oral, se ha propuesto una nueva vía de investigación con el papel de los retinoides en el desarrollo de lesiones precancerosas. El consumo crónico de etanol se encuentra asociado con niveles disminuidos de retinoides a nivel de la cavidad oral. La vitamina A y sus derivados sintéticos constituyen los retinoides, moléculas pequeñas involucradas en distintas funciones biológicas tales como regular el crecimiento y diferenciación de una amplia variedad de células (51, 54); por lo que cualquier alteración en su metabolismo y activación va a repercutir en un incremento en la susceptibilidad de la mucosa oral a otros carcinógenos. En animales de

experimentación se ha encontrado una asociación entre la deficiencia de vitamina A y una alta incidencia del cáncer, así como un incremento de la susceptibilidad a los carcinógenos químicos (54, 55).

Para que los retinoides puedan ejercer sus funciones se requiere una conversión enzimática del retinol (vitamina A) a un ligando activo (ácido retinoico) que será capaz de unirse a los receptores de ácido retinoico localizados en el núcleo celular, controlando la expresión de los genes que median sus efectos.

El etanol es un inhibidor competitivo del metabolismo del retinol, debido a que la misma enzima (ADH) se encarga de catalizar dos reacciones, por la que se va producir una acumulación de retinol, a expensas de la disminución de ácido retinoico, siendo ésta la forma activa (51). A su vez el primer metabolito del etanol, el acetaldehído, también es capaz de inhibir la generación de ácido retinoico. Por otro lado, el etanol parece causar una deficiencia de ácido retinoico en el hígado debido a un incremento en el catabolismo del mismo mediado por la acción del citocromo P4502E1 inducido por el etanol.

Los bajos niveles de ácido retinoico suponen una falta de control en el crecimiento de los epitelios, lo que podría iniciar el desarrollo de lesiones malignas. Actualmente los retinoides se están empleando en el tratamiento de lesiones cancerosas y precancerosas habiéndose demostrado remisiones totales y parciales de leucoplasia en un 40-60% de los pacientes en tratamiento con vitamina A, aunque su uso tópico parece tener un efecto limitado (54).

Efecto sistémico:

A nivel hepático:

El aumento de los niveles de etanol en el hígado supone que todas sus funciones se van a centrar en la transformación metabólica del mismo, lo cual va a originar una alteración en el metabolismo del resto de sustancias. Esto determina que se va a impedir la detoxificación de determinados compuestos y la activación de otros con potencial actividad carcinógena.

A nivel de glándulas salivales:

Las glándulas salivales se ven alteradas desde el punto de vista morfológico y funcional, vía degeneración de su inervación autónoma, vía una infiltración grasa de las mismas, con un aumento bilateral, simétrico e indoloro de las parótidas, y una disminución del flujo salival, lo que lleva a una mayor acumulación de carcinógenos sobre la superficie de la mucosa oral, incrementando el riesgo de cáncer oral (56).

El alcohol se emplea en los colutorios, en principio, como un disolvente de otros ingredientes y como un conservante de la preparación. Se han usado diferentes formulaciones de colutorios

durante años, sin embargo, recientemente se ha expresado la preocupación sobre si su contenido de alcohol podría ser una amenaza para la salud. La elevada cantidad de alcohol en algunos colutorios, así como el hecho de que permanezcan en contacto con la mucosa oral durante más tiempo que una bebida alcohólica, puede hacer pensar en un efecto nocivo a partir de un efecto local (3).

Se ha observado que en personas que han usado colutorios con 25% o más de alcohol se producen alteraciones locales como desprendimiento del epitelio, ulceraciones en la mucosa, gingivitis, petequias y dolor oral (25, 45). También se ha descrito la aparición de lesiones blancas asociadas al uso prolongado de colutorios con alcohol en mucosa oral humana y en animales de experimentación. (3, 17). A partir de esta concentración también se ha observado un aumento significativo del riesgo de desarrollar cáncer oral.

3. Lesiones potencialmente malignas, cáncer oral y la acción de agentes cancerígenos

El carcinoma oral es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral. Los tumores malignos de la cavidad oral suponen un 4% del total de tumores malignos del organismo, del cual el 90% corresponden a carcinoma oral de células escamosas (57).

La incidencia del cáncer parece estar aumentando y la mortalidad apenas ha mejorado en los últimos 25 años (58). En España, la incidencia del cáncer oral es de 12 a 15 casos/100.000 habitantes/año en varones y de 2 a 4 casos/100.000 habitantes/año en mujeres, y representa entre el 2 y el 3% de todas las muertes por cáncer en nuestro país. La tasa de supervivencia a los 5 años es de 80% en estadios iniciales, 40% en neoplasias con afectación regional y menos de 20% para pacientes con metástasis a distancia. La detección precoz en estadios asintomáticos garantiza no sólo un aumento en las tasas de supervivencia sino también una mejora en la calidad de vida en consecuencia a tratamientos menos agresivos y mutilantes (59).

El cáncer oral es el resultado de mutaciones espontáneas en el ADN y otras producidas por la acción de diversos agentes mutagénicos como son el tabaco y el alcohol. Éstos parecen tener una importancia particular.

El consumo de tabaco está extendido en todo el mundo e incrementado en los países en desarrollo. Todas las formas de tabaco son cancerígenas y capaces de causar cáncer oral y faríngeo. En las personas que fuman tabaco y exponen con ello su tracto aerodigestivo superior

a los carcinógenos del mismo, se producen unos cambios genéticos que afectan a toda la mucosa aerodigestiva (boca, nariz, faringe, tráquea, bronquios, pulmones) y que persisten durante muchos años, incluso dejando de fumar (31, 60).

Desordenes potencialmente malignos y segundos tumores primarios son observados en la parte superior del tracto aerodigestivo de alrededor del 20% de estos pacientes.

El consumo de alcohol (etanol) es un hábito muy extendido por todo el mundo. El alcohol es la droga de la que más comúnmente se abusa, y como ya se ha mencionado con anterioridad el mecanismo más importante por el que el alcohol puede ser cancerígeno es por su oxidación química a acetaldehído por acción de las enzimas aldehído deshidrogenasa. El consumo de tabaco aumenta la carga de acetaldehído tras el consumo de alcohol y el consumo de alcohol aumenta la activación de los pro-carcinógenos presentes en el tabaco. El riesgo atribuible de cáncer oral debido a la combinación de alcohol y tabaco se estima en más del 80%. Los grandes fumadores y bebedores tienen un incremento 38 veces mayor de padecer cáncer respecto a los abstemios en ambos productos (58).

Otros factores de riesgo en el cáncer oral descritos en la literatura son el estilo de vida y una higiene oral deficiente (61). A menudo los pacientes con cáncer oral presentan una higiene oral deficiente, es decir, múltiples caries y periodontitis. Se ha demostrado que la enfermedad periodontal aumenta el riesgo estadístico de padecer cáncer de cabeza y cuello y esta asociación se mantiene en sujetos que nunca habían consumido alcohol o tabaco.

Diversos microorganismos orales pueden producir, a partir del alcohol, acetaldehídos cancerígenos. Esto puede explicar por qué una pobre higiene oral está frecuentemente asociada al cáncer oral en grandes fumadores y bebedores.

Otros agentes infecciosos relacionados con el cáncer oral son la *Candida albicans*, que es la levadura más frecuentemente aislada en el medio oral. Éstas pueden invadir el epitelio oral y ser causantes de cambios displásicos (62).

También se ha asociado a la carcinogénesis las infecciones por el virus del papiloma humano como posible factor etiológico y se han observado que los tipos más frecuentemente hallados son el 16 y el 18 (63, 64).

El virus del herpes simple (HSV) se ha asociado también con la carcinogénesis. Los ácidos nucleicos HSV se han encontrado en el cáncer de labio, los niveles de anticuerpos contra el VHS-1 y -2 son más altos en pacientes con cáncer oral en comparación con los controles, y la seropositividad HSV junto con el tabaquismo se ha asociado con mayor riesgo de cáncer (65). También se ha descrito una asociación con el virus de Epstein-Baar, aunque esta evidencia es objeto de controversia (66).

Otro factor asociado, es la dieta deficiente en antioxidantes. Esto se ha descrito como un factor que predispone hacia el desarrollo de cáncer oral y de lesiones precancerosas (67). Otros factores de riesgo descritos son el nivel socioeconómico, factores ambientales y factores genéticos. Sobre estos últimos se postula que el desarrollo del cáncer es el resultado de la acumulación de errores genéticos en un mismo tejido, donde también se encuentran implicadas la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (2, 68).

4. La citología exfoliativa y su utilidad en la detección de alteraciones celulares en la mucosa oral

La citología exfoliativa oral se define como el estudio e interpretación de las células que se descaman, natural o artificialmente, de la mucosa oral. Consiste en observar al microscopio la morfología de las células epiteliales superficiales después de su toma, fijación y tinción.

Es una técnica sencilla, no agresiva, relativamente indolora y bien aceptada por los pacientes, por lo que podría ser útil en el diagnóstico precoz del cáncer oral. Sin embargo, el uso de la citología exfoliativa oral para el diagnóstico de atipias epiteliales y especialmente del carcinoma oral de células escamosas ha perdido importancia, sobre todo debido a su baja sensibilidad representada por el elevado número de resultados falsos negativos (69). Se atribuye esta baja sensibilidad a diversos factores, entre ellos: toma inadecuada de la muestra, error en la técnica e interpretación subjetiva de los hallazgos citológicos (70, 71).

En los últimos tiempos ha resurgido en base a su aplicación en el precáncer y cáncer oral, tanto como metodología diagnóstica como predictiva y para la monitorización de los pacientes. La detección precoz de una lesión oral premaligna o cancerosa va a mejorar tanto la supervivencia como la morbilidad asociada al tratamiento.

Los métodos diagnósticos clásicos para las lesiones precancerosas y cancerosas orales son el examen clínico y el estudio histopatológico del material obtenido por biopsia. El análisis histológico es todavía la técnica más aceptada para determinar de un modo fiable la naturaleza de las lesiones de la mucosa oral (70, 72).

Este examen, conocido como frotis citológico convencional fue originalmente ideado para la detección precoz de células cervicales cancerosas. Desde ese momento la citología comenzó a utilizarse en la cavidad oral como un método de diagnóstico citopatológico.

Otro de las utilidades de la citología exfoliativa es el ensayo de micronucleos (MN). Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario, denominado “micronúcleo” (MN), visible fácilmente al microscopio óptico. El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica (73).

El uso de la técnica del recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesto por primera vez por Countryman y Heddle en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica (74).

Más tarde, en 1985, el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley, consiguiendo frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo hubiese sufrido una división mitótica, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: cytokinesis- block micronucleus) cuyo fundamento es la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B cuya función es impedir la citocinesis celular (75). La citocalasina-B es una molécula aislada del hongo *Helminthosporium dematoideum*, que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis, necesario para la partición celular en telofase mitótica. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo, por lo que origina células binucleadas y que han sufrido una sola división (76, 77).

El ensayo de MN, ha sido una técnica validada a nivel mundial y considerada como un biomarcador efectivo de daño en el ADN. Para la validación se creó un Proyecto Internacional de Colaboración en materia en frecuencia de micronúcleos en las poblaciones humanas en 1997 (HUMN: HUman MicroNucleus Project), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi con el fin de recopilar las frecuencias basales de MN obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo. El principal objetivo consistió en identificar las fuentes y niveles de variabilidad capaces de influir en la frecuencia basal de micronúcleos en linfocitos humanos y células epiteliales exfoliadas, comparar las distintas técnicas utilizadas para definir un protocolo estándar y realizar así un estudio prospectivo por parte de todos los laboratorios implicados e incluso intentar establecer una asociación entre la frecuencia de MN y enfermedades como el cáncer (78,79).

Las células epiteliales orales representan una localización donde se producen los primeros eventos genotóxicos inducidos por agentes cancerígenos que entran en el cuerpo por inhalación e ingestión. Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos se originan en las células epiteliales (80).

El epitelio oral mantiene su estructura debido a una renovación celular continua en el que las nuevas células producidas en la capa basal por mitosis migran a la superficie para sustituir a las que se desprenden. La capa basal contiene las células madre que pueden expresar el daño genético (rotura o pérdida cromosómica) como los MN durante la división nuclear. Las células hijas, que pueden o puede no contener MN, finalmente se diferencian en la capa espinosa y la capa superficial queratinizada y, a continuación exfoliar en la cavidad bucal. Algunas de estas células puede degenerar en células con cromatina condensada, núcleos fragmentados (células con cariorrexis), núcleos picnóticos, o pueden perder por completo su material nuclear (cariolisis). Estos biomarcadores de daño genético y muerte celular se pueden observar tanto en linfocitos como en células bucales, y por lo tanto proporcionar información más completa sobre daños en el genoma (81, 82).

En la actualidad, la aplicación de técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) permite la identificación del origen de los MN, permitiendo determinar con precisión el efecto clastogénico y/o aneugénico de cualquier agente genotóxico (83).

El ensayo de MN en células bucales exfoliadas:

La recolección de células bucales es sin duda el método menos invasivo disponible para medir el daño en el ADN en seres humanos, especialmente en comparación con la obtención de muestras de sangre para ensayos de linfocitos y eritrocitos, o en comparación con biopsias, por tanto supone un excelente candidato para servir como biomarcador.

El ensayo de MN en células bucales exfoliadas se propuso por primera vez en 1983 y sigue ganando popularidad como un biomarcador de daño genético en numerosas aplicaciones; para el estudio de lesiones cancerosas y precancerosas y para monitorizar el efecto de numerosos agentes quimiopreventivos (84-86).

También ha sido empleado para investigar el efecto de múltiples factores como la exposición ambiental y ocupacional, la radiación, el estilo de vida y factores del huésped y como se ha comentado anteriormente para monitorizar pacientes con cáncer y otras enfermedades.

Exposición ambiental y ocupacional:

En los últimos 15-20 años los ensayos de MN se han empleado para evaluar el daño cromosómico para monitorizar poblaciones expuestas a una variedad de agentes físicos y

químicos mutagénicos y carcinógenos. Muchos estudios reportan una elevación estadísticamente significativa de los niveles de MN en individuos expuestos en comparación con los grupos de control, aunque los efectos observados son relativamente pequeños, y muchos otros estudios no concluyen datos estadísticamente significativos (82).

También se ha demostrado que trabajadores de las zonas hospitalarias o de fábricas cuya labor diaria les hace estar sometidos a la exposición de agentes tóxicos, presentan una mayor frecuencia de MN (87-90).

El ensayo de MN también ha sido aplicado para conocer el efecto de determinados pesticidas y plaguicidas, productos químicos considerados de riesgo para los seres vivos; existen estudios tanto con ratones como con humanos donde se demuestra el efecto potenciador de estos productos sobre el índice de MN (91, 92).

Radiación:

Las radiaciones ionizantes juegan un papel importante en el tratamiento de muchas neoplasias, pero también produce daño genético. Como consecuencia, segundos tumores pueden desarrollarse años después del tratamiento del tumor primario. Varios estudios evaluaron la frecuencia de MN en células bucales de pacientes sometidos a radioterapia en la región de cabeza y cuello. Sin embargo, estos resultados pueden estar influenciados por la inclusión de células degeneradas, dado que los criterios para distinguir células viables y células degeneradas aun no estaba establecido (82).

Estilo de vida y factores del huésped:

La edad ha sido ampliamente estudiada, relacionándose una mayor edad con un mayor índice de MN (79, 87, 93).

En el caso del análisis del género, las mujeres presentan una frecuencia basal superior de MN en linfocitos al de los hombres; sin embargo la frecuencia de estos en células bucales entre hombres y mujeres no difieren sustancialmente, con un ligero, pero no significativo en varones.

Con respecto a la edad el número de MN aumenta con la edad (94).

La presencia de homocisteína en plasma, el déficit de folato y vitamina B12 conducen a un incremento de la frecuencia basal de MN.

En el caso de las mujeres, la entrada en la menopausia y el posible desarrollo de osteoporosis se relacionan con un mayor índice de MN (95).

Otros estudios relacionan un descenso del número de MN al suplementar la dieta con agentes antioxidantes como la vitamina E, vitamina C, β - caroteno, guisen e incluso infusiones de té (96-99).

Con respecto al efecto de los metabolitos tóxicos del tabaco medido mediante el ensayo de MN existe una gran controversia, ya que varios trabajos han demostrado que el hábito fumador no se veía reflejado en la frecuencia de MN frente a grupos controles no fumadores (89, 93, 100). Al contrario, varias publicaciones han detectado diferencias entre grupos de fumadores y no fumadores: en un estudio realizado en personas expuestas a bajas dosis de radiación por su actividad laboral se observaron frecuencias de MN significativamente incrementadas en el grupo de personas expuestas a radiación que fumaban frente a los no fumadores expuestos (90). En otro estudio se observó un ligero aumento en el número de MN del grupo fumador frente al no fumador y una clara asociación entre años de consumo de tabaco e incremento de la frecuencia de MN (101). La mayoría de los estudios describen un aumento significativo de MN en las células de la mucosa bucal relacionado con el riesgo de cáncer oral en subgrupos de sujetos con estilos de vida específicos, como masticar betel y otras prácticas similares (102).

Los resultados de estos estudios puede verse afectados por una sobrestimación de la frecuencia de MN, porque tanto el hábito de fumar como el de masticar mezclas de tabaco, son conocidos como causas de degeneración nuclear y la aparición de células en descamación, pueden producir confusión con la presencia de MN.

En varios estudios sobre el estilo de vida, sin embargo, era difícil diferenciar el efecto del alcohol al de fumar. En un estudio se observó que el efecto sinérgico del consumo de tabaco y alcohol conllevó un aumento de MN en las células bucales de hasta 5,5 veces en relación a los controles (no fumadores ni bebedores) (103).

En el mismo año se realizó otro estudio donde concluyeron que la frecuencia de células micronucleadas en el grupo de fumadores era 70% más alta que el observado en el grupo de no fumadores (104). El mismo resultado fue observado por otros autores quienes concluyeron que el consumo de alcohol sumado al hecho de ser fumador activo incrementaba significativamente el número de MN y además, el consumo de té disminuía el número de MN producidos por el hábito fumador (96). Dos estudios en años consecutivos volvieron a demostrar el incremento de la frecuencia de MN en los grupos fumadores siendo el índice de MN 25% mayor que el de los grupos no fumadores (105, 106).

Cáncer y otras enfermedades:

Diversos estudios se han centrado en el estudio de las drogas citostáticas utilizadas en los protocolos antitumorales en pacientes con cáncer, cuya acción está dirigida a frenar la

proliferación celular. La exposición reiterada a agentes citostáticos puede causar efectos adversos tales como mutaciones, inmunotoxicidad y cáncer debido a que pueden inducir daños genéticos y alterar los mecanismos de división en células que se multiplican rápidamente. El resultado de estos trabajos demostró que los complejos químicos utilizados incrementan de modo significativo el número de MN (87, 107).

Monitorizar los cambios en los pacientes con enfermedades diagnosticadas o cambios patológicos que pueden llevar al desarrollo de cáncer y otras enfermedades es cada vez más popular, y puede ser el área de crecimiento más rápido de la aplicación del ensayo de MN en las células epiteliales.

Los MN en células de la mucosa bucal se utilizaron para estudiar los efectos preneoplásicas recogiendo las células directamente de los tejidos afectados. Las frecuencias de MN en los pacientes con lesiones orales como la fibrosis oral submucosa, la leucoplasia oral y el liquen plano oral aumentó en relación con los sujetos sanos, pero no hubo diferencias significativas en las tasas de MN entre los distintos grupos de pacientes (108). En otro estudio de pacientes con cáncer no tratados se observó un aumento de la inestabilidad genómica en células somáticas (linfocitos de sangre y células orales exfoliadas) en comparación con los sujetos control sanos (109). Se sugirió que los MN en células de la mucosa bucal podría predecir el riesgo de cáncer para el tracto aerodigestivo superior, incluyendo estadios precancerosos como la leucoplasia (110).

Bloching y cols. (110) demostró que la tasa de MN era dos veces más alta en pacientes con cáncer de faringe en comparación con los sujetos sanos.

Burgaz y cols. (111) en su estudio, utilizaron la prueba de MN en células bucales, así como en linfocitos para detectar inestabilidad cromosómica en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello. En el presente estudio, el análisis de la frecuencia de MN en células bucales de los pacientes que tenían cáncer de cabeza y cuello reveló un aumento de la inestabilidad cromosómica, similar a las de los linfocitos, aunque la extensión del daño varió entre dos tejidos. En base a estos resultados estos autores también sugieren que la inestabilidad cromosómica detectada en los linfocitos se puede utilizar como un indicador de riesgo, sin embargo, no es el caso de la frecuencia de MN en células bucales.

También se ha aplicado el ensayo de MN en pacientes con enfermedad de Alzheimer, en la cual no ha observado un aumento en la frecuencia de MN (112).

En pacientes con síndrome de Down se ha observado un aumento en la frecuencia de MN (113).

Un aumento en la frecuencia de MN en células bucales se observó en pacientes con diabetes mellitus en comparación con los controles (114) y en los pacientes pediátricos tratados con colitis ulcerosa en comparación con los controles o los niños con enfermedad de Crohn (115).

La heterogeneidad de los métodos utilizados para la recolección, la tinción, y la puntuación de los MN de células bucales sigue siendo la fuente más importante de la variabilidad, lo que representa el 38% de la variabilidad total de la frecuencia de MN entre los 30 laboratorios. Otro factor importante es el efecto de la exposición a agentes genotóxicos, que representaron el 15% de la variabilidad total. El papel de los factores del huésped se limita al 3%, mientras que la fracción más grande sobre la variabilidad que es del 44%, es todavía inexplicable (94).

Aspectos metodológicos que afectan a la identificación de MN en células bucales:

A pesar del considerable potencial ensayo de MN para el biomonitoreo, la diversidad de las posibles variables metodológicas, y su impacto en el rendimiento del ensayo, podría obstaculizar la coherencia entre los laboratorios con respecto a la medición de los efectos del estilo de vida, de la dieta, y factores genéticos.

En este contexto, es obligatorio realizar un protocolo para estandarizar y crear unos criterios de puntuación para el ensayo de MN en células bucales y realizar unos criterios de puntuación. Esto permitiría que los datos de los diferentes laboratorios y diferentes países pudieran ser comparables y eliminar o minimizar errores debido a las variables metodológicas (115, 116).

En base a la experiencia del proyecto de MN humanos (HUMN) que inicialmente se centró en la técnica del bloqueo de la citocinesis en linfocitos de sangre periférica, se llevó a cabo un estudio de colaboración internacional sobre la frecuencia de MN y otras anomalías nucleares en células bucales exfoliadas en la Conferencia sobre mutágenos ambientales en las poblaciones humanas, que se celebró en Antalya, Turquía, en 2007 (117, 118). Este nuevo proyecto fue denominado HUMNXL ('XL', refiriéndose a las células exfoliadas), y fue diseñado específicamente para:

- Identificar las variables técnicas que afectan a la medición de frecuencia de MN en las poblaciones humanas.
- Identificar las variables de estilo de vida que pueda influir en ésta frecuencia.
- Identificar las variables de protocolo que afectan a la recogida y puntuación de MN.
- Utilizar esta información para diseñar estudios de validación intra-e inter-laboratorio sobre criterios metodológicos y de puntuación.
- Determinar el papel de los MN bucales y otras alteraciones nucleares en monitorizar el daño genómico y la predicción de cáncer y otras enfermedades degenerativas.

Algunos factores metodológicos que pueden afectar los niveles de MN en células bucales son las diferencias en la recolección celular (el tiempo y los instrumentos utilizados), las técnicas de fijación y tinción, la selección y el número de células contadas, y los criterios de puntuación para MN y otras anomalías nucleares en células normales y degeneradas.

Muchos de estos factores metodológicos para las células bucales se superponen con los ensayos de MN en linfocitos, pero las diferencias tisulares pueden contribuir a la variabilidad. Por lo tanto, los datos publicados por el Proyecto Internacional de MN humanos (HUMN) en linfocitos (119) se pueden aplicar a las células bucales pero con cautela, aunque es necesario un estudio de validación especial para las células bucales.

Recolección celular:

La recogida de células exfoliadas de la mucosa oral puede realizarse mediante un depresor lingual de madera, una espátula de metal o mediante un cytobrush.

El cytobrush parece ser el instrumento más efectivo para recoger un gran número de células bucales (115, 120).

Técnicas de fijación y tinción:

Los fijadores comúnmente usados incluyen 80% de metanol, etanol absoluto, o una mezcla de metanol-ácido acético. La rigurosidad en la fijación y las condiciones de las células antes de la fijación pueden afectar a la integridad celular y a la preservación de las células normales y degeneradas pudiendo crear confusión con MN y otras anomalías.

Existen varios métodos de tinción, aunque las tinciones específicas de ADN son las más empleadas para teñir núcleos, MN, y otras anomalías nucleares en células exfoliadas bucales.

La tinción de Feulgen-Fast Green (FFG) se ve apoyada por muchos investigadores debido a su especificidad de ADN y porque proporciona una apariencia clara y transparente del citoplasma, permitiendo así identificar fácilmente los MN.

La tinción May-Grünwald Giemsa (Giemsa) se ha utilizado en varios laboratorios. Algunos de los estudios informaron de una frecuencia aumentada de MN con tinción de Giemsa y sugieren la posibilidad de que éstos se asemejan a estructuras celulares, tales como gránulos de queratohialina o bacterias, pudiendo conducir a falsos positivos (121, 122).

Otro factor que puede interferir con la puntuación de MN es la contaminación por las bacterias que se encuentran comúnmente en la boca. Las bacterias pueden ser diferenciadas de los MN por su forma característica, menor tamaño, el color, la intensidad de la tinción, y su presencia en y entre las células bucales.

Debido a que diferentes estudios llegaron a conclusiones distintas, es evidente que las tinciones, el procedimiento de tinción, y los procedimientos de medición en el laboratorio, pueden contribuir a esta variabilidad.

Aunque muchos estudios han demostrado un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de MN de células bucales en las poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos, o una disminución de éstos, como resultado de la suplementación con micronutrientes, la magnitud de los cambios es relativamente pequeña.

Existen diferentes factores de confusión como el género, la edad o el estilo de vida que influyen en la frecuencia de MN en linfocitos periféricos, los cuales también han sido considerados para el ensayo de MN en células bucales. Sin embargo, la mayoría de los estudios no han demostrado ninguna influencia de la edad o el sexo.

Actualmente con el progreso de la técnica citológica, que se ha traducido en el desarrollo de preparaciones de base líquida, técnica empleada como herramienta auxiliar en el diagnóstico de lesiones de la mucosa oral ha despertado un renovado interés. En las preparaciones de base líquida, la muestra y el dispositivo de recolección se transportan en un recipiente que contiene un líquido conservador. Eso permite la inmediata fijación de las células, con lo cual todo el material removido puede usarse. Esta técnica permite obtener preparaciones con abundancia de células dispersas en una fina capa y homogénea. Comparado con los frotis convencionales, el uso de preparaciones de base líquida ha permitido reducir el número de preparaciones no válidas o válidas pero limitadas. La desventaja de éstas es que exige un laboratorio con equipos más sofisticados y personal mejor entrenado (70).

Además, en los últimos tiempos, el desarrollo del análisis cuantitativo, la citomorfología, el análisis del ADN, la detección de marcadores tumorales y los métodos de diagnóstico molecular han contribuido al resurgir de esta técnica (71).

**HIPÓTESIS DE TRABAJO Y
OBJETIVOS**

Hipótesis de trabajo

Debido a la controversia que existe en la literatura sobre las alteraciones en la mucosa oral que pueden producir la utilización continuada de los colutorios con contenido alcohólico, nos planteamos el siguiente estudio.

Los colutorios orales han sido ampliamente utilizados en nuestra higiene oral, con una gran variación en su formulación y en sus aplicaciones (3)

En la composición de los colutorios los vehículos que con mayor frecuencia se utilizan son el agua y el alcohol.

Dentro de los efectos adversos en el uso de los colutorios, se le ha dedicado una especial atención al contenido de alcohol. Este, tiene un efecto cáustico y por lo tanto puede destruir tejidos de la cavidad oral y producir alteraciones como descamación epitelial, ulceraciones, gingivitis y petequias sobre todo con las concentraciones de 25% o más de alcohol. A partir de esta concentración también se ha observado un aumento significativo del riesgo de desarrollar cáncer oral. Riesgo que varía también en proporción a la dosis, aumentando cuando aumenta la duración y frecuencia de utilización del colutorio (39).

Estudios de experimentación en animales, han inducido el desarrollo de lesiones leucoplásicas asociadas al uso prolongado de colutorios con alta concentración en alcohol (17) y estudios clínicos no han demostrado una mayor eficacia de los colutorios con alcohol en comparación con los que no lo presentan en su formulación (19) , por lo tanto, la introducción del alcohol en la formulación de los colutorios está en debate y necesita ser comprobada y justificada por el amplio uso que se realiza de los mismos.

Nuestra hipótesis de trabajo que pretendemos demostrar a través de los objetivos de esta investigación es que los colutorios con alcohol no producen alteraciones citológicas en las células epiteliales de la mucosa oral.

Objetivo general

Comprobar los posibles cambios clínicos y citológicos en la mucosa oral de los pacientes que utilizan el colutorio Listerine ®, comparado con el grupo que emplean un colutorio sin contenido alcohólico.

Objetivos específicos

- 1- Realizar un análisis de las posibles alteraciones citológicas en un grupo de pacientes que utilizan un colutorio con alcohol (Listerine®) tras seis meses de su empleo. Comprobaremos comparativamente si hay diferencias en el momento basal con los hallazgos a los seis meses.
- 2- Análisis de los posibles cambios clínicos en la mucosa oral tras el empleo de un colutorio con alcohol.
3. Constatar si habían diferencias significativas en los hallazgos citológicos de la mucosa oral entre un grupo de pacientes que utilizaron un colutorio con alcohol, comparativamente con otro grupo de pacientes que utilizaron un colutorio con la misma composición excepto que no tenía alcohol.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes

Este estudio se realizó en el Departamento de Medicina Oral de la Universidad de Valencia, y en el Departamento de Patología del Hospital General Universitario La Fe, Valencia, España, en el período de 2009 a 2010. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Valencia.

Nuestra muestra está comprendida por dos grupos de personas:

1. **Grupo 1.** Personas que diariamente, como método complementario al cepillado dental, emplearon un colutorio comercializado con el nombre Listerine® (Pfizer).

Número de personas: 30

2. **Grupo 2.** Personas que diariamente, como método complementario al cepillado dental, emplearon un colutorio sin contenido alcohólico

Número de personas: 30

Entre ambos grupos no deberá haber diferencias estadísticas en la edad y sexo, así como tampoco en el grado de higiene oral (índice medio de placa, CAO, índice de sangrado y periodontograma)

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1- Se incluyeron a aquellas personas que acudían a la Clínica Odontológica de la Universidad de Valencia para que se les realizase un tratamiento dental.

2- Personas comprendidas entre los 30 y 50 años.

3- Que adquieran el compromiso, voluntariamente, de realizar de forma diaria un enjuague bucal con el colutorio que se les facilitó.

4- Personas que aceptarán el acudir periódicamente a las revisiones establecidas.

5- Pacientes que acepten voluntariamente formar parte del estudio, tras consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1- Los fumadores y exfumadores en los últimos 5 años.
- 2- Los bebedores habituales de alcohol en exceso (más de 80ml/día).
- 3- Mujeres embarazadas.
- 4- Los que tomasen medicaciones xerostomizantes.
- 5- Los que tengan lesiones en la mucosa oral previamente.
- 6- En el supuesto de tratarse de mujeres que están en el periodo menopáusico.
- 7- Los que en los dos meses previos al estudio hayan realizado enjuagues diarios con colutorios

2. Método

Este fue un estudio a doble ciego, prospectivo, clínico aleatorizado llevado a cabo durante un periodo de 6 meses. Hubieron 60 pacientes cuya edad media fue de $41,27 \pm 6,26$, de los cuales 19 (31,7%) eran hombres y 41 (68,3%) mujeres.

GRUPO “1” (GRUPO ESTUDIO): 30 sujetos tratados con un fármaco o producto a evaluar (Listerine®) a dosis y tiempo de exposición conocidos. Se les realizaron **dos tomas**: una primera toma en situación basal antes de iniciar la toma o el tratamiento de la sustancia o fármaco en estudio y una segunda toma al finalizar el periodo de toma del fármaco o sustancia en estudio y en **dos localizaciones** distintas en cada una de las tomas (borde lateral de lengua y mucosa bucal)

GRUPO “2” (GRUPO CONTROL): 30 sujetos sanos sin hábitos tóxicos (tabaco, alcohol, etc.) y sin patología oral y que no hayan sido sometidos a ningún tipo de tratamiento farmacológico tópico a nivel oral en los últimos 12 meses ó a los que únicamente se les haya suministrado un placebo o producto inocuo (suero fisiológico o una solución salina isotónica). Se les realizaron **dos tomas**: una primera toma en situación basal y una segunda toma al finalizar el periodo de toma de placebo o solución inocua y en dos localizaciones distintas en cada una de las tomas (borde lateral de lengua y mucosa bucal).

En todos los dos grupos de pacientes llevamos a cabo los siguientes estudios:

- El estado de las mucosas orales.
- El estado dental mediante el índice CAOd (cariados/ausentes/obturados) (123).

- El grado de higiene oral, cuantificado principalmente por el índice de placa (124).
- El estado periodontal mediante el índice periodontal y la valoración de la pérdida de inserción (8).

Primero de todo, se les pasó una hoja informativa del motivo por el que se les realizaba la exploración y posteriormente firmaron un consentimiento informado (ANEXO 1) en el caso de que aceptaron entrar en el estudio.

Una primera parte de este protocolo consistió en realizar una historia clínica.

En el sillón dental, se exploraron en el paciente los siguientes parámetros:

- Estado de las mucosas orales: Las revisamos mediante inspección clínica, registrando la posible existencia de alguna patología de la mucosa oral al mes de tratamiento, a los 3 y 6 meses.

- Valoración de la higiene oral: Preguntamos al paciente la frecuencia con la que se cepilla los dientes y además comprobamos con un espejo dental si esta higiene es eficaz, de manera que se cataloga en tres categorías: Higiene nula o escasa (si no se cepilla nunca), moderada (si se cepilla todos los días una vez) y buena (cuando lo hagan más de una vez al día y de forma correcta. Además del cepillado, preguntamos al paciente si tiene otros hábitos higiénicos como usar la seda dental, cepillos interproximales.

- Valoración del índice CAOd: Con ayuda de un espejo dental y una sonda de exploración de caries, valoramos el número de dientes cariados, ausentes por caries y obturados que presenta el paciente, la suma de estos tres valores, nos dio el resultado del índice CAOd. En caso de presentar un diente obturado con caries recidivante, se considerara el diente como cariado. Los terceros molares fueron excluidos del estudio de este índice (123).

- Índice de placa: Se valoró con ayuda de un espejo dental y una sonda periodontal. Se exploraron todos los dientes del paciente por la superficie vestibular y lingual/palatino y se catalogaron según el índice de Silness y Løe (123, 124);

0- No presencia de placa

1- No se visualiza placa, pero se recoge con sonda

2- Presencia de placa hasta 1/3 de la corona

3- Placa en más de 1/3 de la corona.

El valor del índice de placa de cada paciente se calculó como la media aritmética de todos los valores obtenidos de todos los dientes. Para ello, sumamos todos los valores y dividimos entre el nº de dientes multiplicado por dos (porque valoramos dos superficies).

•Índice de hemorragia: Se valoró la hemorragia al sondaje en todos los dientes presentes en tres puntos de cada superficie vestibular y lingual. Se expresó como un porcentaje ya que se tienen en cuenta el número de superficies sangrantes respecto al número total de superficies existentes (125).

•Valoración de la profundidad de sondaje periodontal: Se realizó con la ayuda de un espejo dental y una sonda periodontal. Cada diente que el paciente presentaba en boca fue valorado por vestibular y lingual/palatino, siendo a su vez cada superficie sondada en tres puntos, mesial, medio y distal. El valor promedio de profundidad de bolsa obtenido en cada paciente, resultará de calcular la media aritmética sumando todos los valores obtenidos de todos los dientes explorados y dividiéndolo por el número total de superficies exploradas (8).

•Valoración de la pérdida de inserción: También fue valorada en todos los dientes que el paciente presentaba en boca. El valor resultó de sumar a la profundidad de bolsa, la distancia entre la unión amelodentinaria y la encía marginal; y obtuvimos el promedio de calcular la media aritmética de los valores de pérdida de inserción en cada diente explorado. Se expresó, al igual que la pérdida de inserción en milímetros (8).

- Los datos los recogimos en el protocolo del ANEXO 2.

3. Toma de muestras

Toma de citología exfoliativa inducida mediante scrapping (raspado con espátula o con cytobrush) obtenido de diversas localizaciones orales (borde lateral de lengua, mucosa bucal) por un mismo personal facultativo odontológico entrenado en la toma de muestras.

Lavado del material obtenido con suero fisiológico y colocación del material obtenido (3-5 cc) en tubo estéril con remisión de la muestra al laboratorio de Anatomía Patológica.

Centrifugación de la muestra celular obtenida en medio líquido a 1500 r.p.m durante 10'. Decantación del sobrenadante y extensión del sedimento en un portaobjetos. Fijación inmediata del preparado citológico en alcohol etílico de 95° mediante inmersión repetida durante 15''. Tinción del preparado mediante una tinción de Papanicolaou (hematoxilina de Harris -EA50-, Orange G y eosina) con la que se obtienen los siguientes resultados de tinción citológica en los epitelios pavimentosos malphigianos:

- núcleos celulares: tinción azul

- micronucleos: tinción azul

-células acidófilas (superficiales): tinción rojo o naranja claro

-células basófilas: tinción verde a azul verdoso

-células queratinizadas: tinción naranja intensa

-eritrocitos: tinción roja

-células o fragmentos de tejido impregnados de sangre: tinción naranja o naranja verdoso

Todos los procedimientos de fijación, tinción y montaje de los frotis celulares han sido realizados por un mismo personal técnico de laboratorio debidamente entrenado (ATL).

Las muestras fueron remitidas al laboratorio con un código de identificación sin que el patólogo conociera si pertenecen al grupo de estudio o al grupo control. Tan solo en la segunda toma se hizo constar el código de la primera toma para poder hacer el estudio comparativo: 1ª toma versus 2ª toma tanto en el grupo de estudio como en el grupo control.

Una vez realizada la valoración citológica de todas las muestras se realizó el correspondiente estudio estadístico de los resultados, de forma global, por grupos de pacientes y por tomas enfrentadas (1ª toma versus 2ª toma, en el grupo control y en el grupo de estudio) así como la documentación microfotográfica digital de los resultados de mayor relevancia

4. Valoración de los frotis celulares

Todos los preparados citológicos fueron valorados morfológicamente por un mismo patólogo, haciéndose constar los siguientes parámetros en una hoja protocolizada de diagnóstico:

- Riqueza celular del frotis
- Adecuación y preservación de la muestra, haciendo constar si existen artefactos en el frotis que dificulten su valoración
- Proporción en el frotis de la presencia de células malpighianas superficiales, intermedias, parabasales y basales
- Maduración celular
- Presencia de atipias nucleares y su tipificación (leve/moderada/severa)
- Presencia de inclusiones virales o de cambios citomorfológicos indicativos de daño citopático viral (coilocitosis)

- Presencia de fenómenos de binucleación y de cariorexis
- Presencia morfológica óptica de micronucleos
- Presencia o no de componente inflamatorio y tipo de celularidad inflamatoria presente
- Presencia de flora microbiana y su identificación morfológica (cocos, bacilos, actinomyces, flora fúngica-esporas, hifas).

5. Metodologías opcionales a desarrollar en los casos que se considerara necesario para el estudio

- Estudio morfométrico: Valoración morfométrica automatizada sobre una población de 100 células por frotis de los siguientes parámetros: área y perímetro celular, área y perímetro nuclear, relación núcleo citoplasmática, factor de forma.

6. Método estadístico

Se utilizó el test t de Student paracomparación de valores continuos y cuantitativos entre los grupos si las muestras tenían una distribución homogénea, de lo contrario, se utilizó la prueba de Mann-Whitney U-test. El test de Wilcoxon se utilizó para contrastar la homogeneidad de los porcentajes en ambos grupos. El test de χ^2 de Pearson se realizó para comparar la asociación o independencia entre variables cualitativas. Por último, la proporción de cambios en las variables se analizó mediante la prueba de McNemar en muestras relacionadas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si $p < 0,05$.

El análisis bivalente engloba todos los contrastes estadísticos necesarios para comprobar las correlaciones entre parámetros.

- **Prueba de Mann-Whitney para dos muestras independientes:**

Se utiliza para contrastar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en dos muestras independientes. Por ejemplo, para analizar si el sangrado gingival difiere según el grupo al que pertenece el paciente.

- **Prueba de Wilcoxon:**

Se ha utilizado para contrastar la homogeneidad de distribuciones en dos muestras relacionadas. En concreto, para contrastar si el porcentaje de sangrado gingival difiere antes y después de la toma del colutorio.

- **Prueba de χ^2 de Pearson:**

Se ha utilizado como prueba de asociación o dependencia entre dos variables categóricas siempre que la frecuencia esperada de las celdas en la tabla de contingencia es superior a 5 casos. En caso contrario, y, sólo para variables dicotómicas, se usara la prueba exacta de Fisher. Por ejemplo, se ha utilizado para contrastar la dependencia entre la maduración celular, y el grupo al que pertenece un paciente.

- **Test de McNemar para muestras relacionadas:**

Determina si la tasa de respuesta inicial (antes de la toma del colutorio) es igual a la tasa de respuesta final (después de la toma). Esta prueba es útil para detectar cambios en las respuestas causadas por la intervención experimental en los diseños de tipo antes-después. Lo que contrasta McNemar es si la proporción de cambios en un sentido es distinta de la proporción de cambios en el otro. Por ejemplo, para contrastar si la proporción de pacientes que han tenido una maduración celular correcta tras el colutorio es distinta de la proporción de los que la han perdido.

El nivel de significatividad empleado en todos los análisis bivariante ha sido el 5% ($\alpha = 0.05$). El p-valor es, suponiendo que no hay diferencias entre grupos, la probabilidad de que los resultados obtenidos puedan ser debido al azar. Cuanto menor es p-valor, menor será la probabilidad de que los resultados obtenidos se deban al azar. Y mayor evidencia habrá en contra de la hipótesis nula (inexistencia de diferencias).

Cualquier p-valor menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa. Por el contrario, un p-valor mayor o igual a 0.05 indica ausencia de relación.

En cuanto a la potencia del contraste, ésta se mide por la probabilidad de rechazar H_0 (hipótesis nula) cuando sea falsa, es decir, representa la probabilidad de observar en la muestra una determinada diferencia o efecto, si existe en la población. Suelen ser aceptables potencias entre el 80%-90%, es decir, que la probabilidad de no detectar un efecto o diferencia, cuando éstos existen, está entre el 10% y el 20%.

En este estudio:

- La potencia asociada a las pruebas de comparación de distribuciones **entre grupos de pacientes** (con la prueba χ^2 de Pearson) es alta, aproximadamente del 90%, con el tamaño muestral actual (60 pacientes) si las diferencias a detectar son como mínimo del 20%. Por tanto, si las diferencias existentes entre las proporciones en ambos grupos son inferiores al 20% es posible que no sean detectadas por los test.
- La potencia asociada a las pruebas de comparación de distribuciones **dentro de cada grupo de pacientes** (con la prueba de McNemar) es moderada-baja con el tamaño muestral actual (30 pacientes) ya que para que tres veces más cambios en un sentido que en el otro sea una diferencia significativa la potencia solo alcanza el 50%. Para alcanzar una potencia del 90% con este ratio (3) se tendría que aumentar la muestra a 60-65 pacientes dentro de cada grupo. O bien, manteniendo la muestra, con una potencia del 90%, el ratio entre la proporción de cambios en ambos sentidos que se detectará será, como mínimo, de 7.

7. ANEXO 1

IMPRESO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS SUJETOS A INCLUIR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION

ESTUDIO DE LA MUCOSA ORAL EN PACIENTES QUE EMPLEAN COLUTORIOS

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Prof. Dr. D. José Vicente Bagán Sebastián

OBJETIVOS:

Realizar un estudio de casos y control para valorar los posibles cambios generados en la cavidad oral como resultado del empleo de un colutorio: Listerine®

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Se le va a realizar un estudio completo de la boca valorando el estado de la mucosa oral (si existen zonas de infección o inflamación.), sus dientes y sus encías.

Se tomaran muestras mediante un raspado suave con cepillo de dos zonas de la boca: lengua y mucosa bucal.

Se realizará un enjuague con suero estéril durante tres minutos que se recogerá en un recipiente.

Se le administrará un enjuague gratuito que utilizará diariamente como método complementario al cepillado oral.

Se le realizará revisiones a los 30 días (1 mes), 90 días (3 meses) y 180 días (6 meses) realizándole el mismo procedimiento de exploración clínica, raspado y el enjuague.

Si Ud. esta de acuerdo, libremente firme el consentimiento de participación en este estudio que para este fin se ha añadido al final de este impreso.

RIESGOS Y BENEFICIOS

No existen riesgos asociados.

Con su participación en este estudio, usted va a ayudar a conocer si la utilización diaria de colutorios produce cambios en su mucosa oral y si estos cambios están relacionados con el contenido alcohólico de los mismos.

Esta información podrá ser aprovechada en su propia salud.

PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria y no recibirá remuneración alguna.

Como paciente, el rechazo a participar no supondrá ninguna penalización o ni afectará en modo alguno a la calidad de la asistencia sanitaria que reciba.

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información obtenida será confidencial, los datos recogidos se introducirán, por el Equipo investigador, en una base de datos para realizar el análisis estadístico pero su nombre no aparecerá en ningún documento del estudio, sólo se le asignará un número. En concreto, las muestras se identificarán con un número y se agruparan por patologías afines. En ningún caso se le identificará en las publicaciones que puedan realizarse con los resultados del estudio. Sin embargo, esta información podrá ser revisada por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Universidad de Valencia este Hospital así como por organismos gubernamentales competentes.

El procedimiento de destrucción de las muestras será el mismo que se utiliza habitualmente con el resto de las muestras del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. Puede ejercer su derecho de acceso y rectificación de sus datos. También, si así lo desea, puede ser informado de los resultados del estudio

El estudio se realizará asegurando el cumplimiento de normas éticas y legales vigentes (Declaración de Helsinki).

Si tiene alguna duda o no entiende este texto consulte antes de firmar el documento con la Dra. Cristina Marzal Gamarra con nº de teléfono 652191971/ 963864787 que es el médico responsable de esta investigación y le puede preguntar cualquier duda o problema que tenga relacionado con este estudio o consulte con sus familiares y, finalmente, si está de acuerdo firme este consentimiento. Se le entregará una copia.

CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE SUJETO DE ESTUDIO

ESTUDIO DE LA MUCOSA ORAL EN PACIENTES QUE EMPLEAN COLUTORIOS

Yo,.....

He leído la hoja de información anterior.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con la Dra. Cristina Marzal Gamarra y para la explicación del estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

Cuando quiera.

Sin tener que dar explicaciones.

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Doy mi consentimiento para que este material aparezca en informes y artículos de revista de publicaciones médicas.

Entiendo que:

Mi nombre no será publicado.

El material no será utilizado para publicidad o embalaje.

El material no será utilizado fuera de contexto.

Firmado.....

Fecha.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL REPRESENTANTE LEGAL.

ESTUDIO DE LA MUCOSA ORAL EN PACIENTES QUE EMPLEAN COLUTORIOS

Yo,

en calidad de:

de:

He leído la hoja de información anterior.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con la Dra. Cristina Marzal Gamarra y para la explicación del estudio.

Comprendo que la participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarme del estudio:

Cuando quiera.

Sin tener que dar explicaciones.

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Comprendo que este material aparezca en informes y artículos de revista de publicaciones médicas.

Entiendo que:

Mi nombre no será publicado.

El material no será utilizado para publicidad o embalaje.

El material no será utilizado fuera de contexto

**En mi presencia se ha dado a
.....
toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de
acuerdo en participar.**

**Y presto mi conformidad con que.....
..... participe en el estudio.**

Firmado..... Fecha.....

8. ANEXO 2

PROCOLO ESTUDIO DE LA MUCOSA ORAL EN PACIENTES QUE EMPLEAN COLUTORIOS

Nombre: _____

Nº Historia: _____ Teléfono: _____

Edad: _____ Fecha: _____ Sexo 1) varón 2) mujer: _____

2.- Hábitos:

A.- Higiene:

1. Excelente 2. Buena 3. Mala Cepillado/día: _____

Pasta dentífrica utilizada: _____ Enjuague utilizado: _____

Seda dental y/o cepillos interproximales: _____

3.- Antecedentes médicos de riesgo:

-Cardiopatías (HTA, angina, infarto, ictus)

-Enfermedades digestivas

-Enfermedades renales

-Enfermedades hepáticas

-Enfermedades infecciosas

-Inmunodeficiencias y/o inmunosupresión

-Alergias

-Otros

4.- Medicaciones:

Nombre	Dosis	Duración

5.- Exploración de la cavidad oral (no TEMPORALES)

*Lesiones intraorales o radiográficas:

Tipo (diagnóstico):

Localización y tamaño:

Tiempo de evolución

* Prótesis fija/removible: _____ *Otros hallazgos: _____

6.- Índice CAO

A.- Índice CAO: C: ____ A: ____ O: ____

17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37

(Corona se considera obturado y si hubiese C y O en mismo diente se apunta como CARIADO)

B. – Índice Sangrado:

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

Resultado %: _____

C.-Índice Placa:

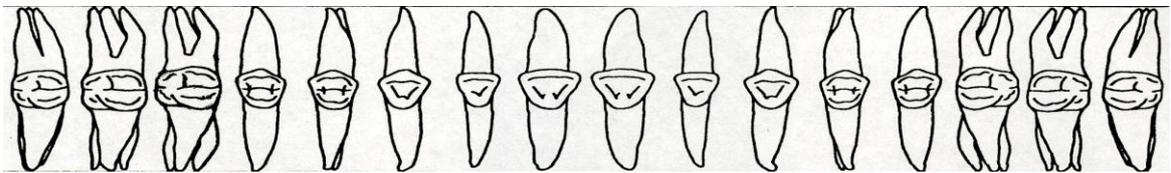
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

D.-Periodontograma:

MAXILAR

PALAT. VESTIB.

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

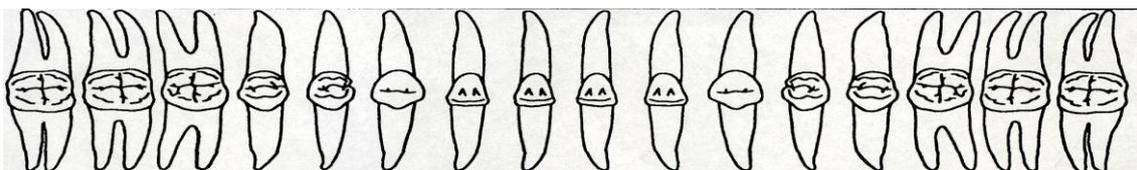


--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

MANDÍBULA

VESTIB. LINGUAL

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--



--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Examinador:

6.- Toma de muestras mediante raspado (Citología exfoliativa):

Nº Registro Lengua:

Nº Registro Mucosa bucal:

7.- Enjuague con suero estéril (3 minutos):

8.- Revisiones:

30 días (1 mes):

90 días (3 meses):

180 días (6 meses):

RESULTADOS

1. Análisis por citología

1.1. Análisis dentro de cada grupo

1.2. Análisis entre grupos

1.3. Resumen general por citología

2. Análisis por paciente

2.1. Análisis dentro de cada grupo

2.2. Análisis entre grupos

2.3. Resumen general por citología

3. Anexo

1. Análisis por citología

Se dispone de 180 medidas de cada una de las variables citológicas antes y después de la toma del colutorio. Dado que existen dos grupos, y las medidas son en tres puntos distintos, se tiene un total de 30 pacientes por cada grupo y punto de medida.

El primero de los subapartados contiene el análisis dentro de cada grupo, es decir la comparación entre las medidas antes y después de la toma del colutorio para cada parámetro. Y el segundo subapartado contiene el análisis entre grupos, es decir, la comparativa entre el grupo control y el grupo caso antes y después de la toma del colutorio correspondiente para comprobar la influencia del Listerine.

1.1. Análisis dentro de cada grupo

En este apartado se ha comparado la medida de antes con la de después de la toma del colutorio (en ambos grupos por separado) en cada variable citológica. Además se ha realizado este contraste en cada uno de los puntos de medida (M. Yugal, Enjuague, y Lengua).

En las siguientes tablas figuran los p-valores asociados a cada contraste efectuado para cada uno de los grupos en consideración. Junto al valor numérico del p-valor figura, entre paréntesis, el test aplicado:

<i>Grupo / Medida</i>	<i>VARIABLES a comparar antes y después de la toma del colutorio</i>	<i>Valor del estadístico de contraste</i>	<i>p-valor</i>
Caso / M. Yugal	Riqueza celular	-1,536 (Z)	0,125 (Wilcoxon)
Caso / M. Yugal	Maduración	**	0,688 (McNemar)
Caso / M. Yugal	ATIPIA	**	- (McNemar)*
Caso / M. Yugal	Flora bacteriana	**	0,250 (McNemar)
Caso / M. Yugal	Binucleación	**	1,000 (McNemar)
Caso / M. Yugal	Carriorexix	**	- (McNemar)*
Caso / M. Yugal	Mc micronúcleo	**	1,000 (McNemar)
Caso / M. Yugal	Inflamación	**	- (McNemar)*
Caso / M. Yugal	Células superficiales	-0,826 (Z)	0,409 (Wilcoxon)
Caso / M. Yugal	Células intermedias	-0,635 (Z)	0,525 (Wilcoxon)
Caso / M. Yugal	Células parabasales	-0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Caso / M. Yugal	Células basales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Caso / Enjuague	Riqueza celular	-0,450 (Z)	0,653 (Wilcoxon)
Caso / Enjuague	Maduración	**	0,625 (McNemar)

Caso / Enjuague	ATIPIA	**	- (McNemar)*
Caso / Enjuague	Flora bacteriana	**	0,344 (McNemar)
Caso / Enjuague	Binucleación	**	1,000 (McNemar)
Caso / Enjuague	Carriorexix	**	- (McNemar)*
Caso / Enjuague	Mc micronúcleo	**	1,000 (McNemar)
Caso / Enjuague	Inflamación	**	0,146 (McNemar)
Caso / Enjuague	Células superficiales	-1,058 (Z)	0,290 (Wilcoxon)
Caso / Enjuague	Células intermedias	-0,521 (Z)	0,602 (Wilcoxon)
Caso / Enjuague	Células parabasales	-1,000 (Z)	0,317 (Wilcoxon)
Caso / Enjuague	Células basales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Caso / Lengua	Riqueza celular	-1,784 (Z)	0,074 (Wilcoxon)
Caso / Lengua	Maduración	**	1,000 (McNemar)
Caso / Lengua	ATIPIA	**	- (McNemar)*
Caso / Lengua	Flora bacteriana	**	0,219 (McNemar)
Caso / Lengua	Binucleación	**	- (McNemar)*
Caso / Lengua	Carriorexix	**	- (McNemar)*
Caso / Lengua	Mc micronúcleo	**	1,000 (McNemar)
Caso / Lengua	Inflamación	**	1,000 (McNemar)
Caso / Lengua	Células superficiales	-0,036 (Z)	0,972 (Wilcoxon)
Caso / Lengua	Células intermedias	-1,603 (Z)	0,109 (Wilcoxon)
Caso / Lengua	Células parabasales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Caso / Lengua	Células basales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Control / M. Yugal	Riqueza celular	-0,839 (Z)	0,401 (Wilcoxon)
Control / M. Yugal	Maduración	**	1,000 (McNemar)
Control / M. Yugal	ATIPIA	**	- (McNemar)*
Control / M. Yugal	Flora bacteriana	**	1,000 (McNemar)
Control / M. Yugal	Binucleación	**	- (McNemar)*
Control / M. Yugal	Carriorexix	**	- (McNemar)*
Control / M. Yugal	Mc micronúcleo	**	0,727 (McNemar)
Control / M. Yugal	Inflamación	**	- (McNemar)*
Control / M. Yugal	Células superficiales	-0,067 (Z)	0,947 (Wilcoxon)
Control / M. Yugal	Células intermedias	-0,599 (Z)	0,549 (Wilcoxon)
Control / M. Yugal	Células parabasales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Control / M. Yugal	Células basales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Control / Enjuague	Riqueza celular	-1,401 (Z)	0,161 (Wilcoxon)
Control / Enjuague	Maduración	**	0,500 (McNemar)
Control / Enjuague	ATIPIA	**	- (McNemar)*
Control / Enjuague	Flora bacteriana	**	1,000 (McNemar)
Control / Enjuague	Binucleación	**	- (McNemar)*
Control / Enjuague	Carriorexix	**	- (McNemar)*
Control / Enjuague	Mc micronúcleo	**	1,000 (McNemar)
Control / Enjuague	Inflamación	**	0,774 (McNemar)
Control / Enjuague	Células superficiales	-0,570 (Z)	0,569 (Wilcoxon)
Control / Enjuague	Células intermedias	-0,675 (Z)	0,500 (Wilcoxon)
Control / Enjuague	Células parabasales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Control / Enjuague	Células basales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Control / Lengua	Riqueza celular	-0,354 (Z)	0,723 (Wilcoxon)
Control / Lengua	Maduración	**	1,000 (McNemar)
Control / Lengua	ATIPIA	**	- (McNemar)*
Control / Lengua	Flora bacteriana	**	0,227 (McNemar)
Control / Lengua	Binucleación	**	- (McNemar)*
Control / Lengua	Carriorexix	**	- (McNemar)*
Control / Lengua	Mc micronúcleo	**	1,000 (McNemar)
Control / Lengua	Inflamación	**	0,500 (McNemar)
Control / Lengua	Células superficiales	-0,714 (Z)	0,475 (Wilcoxon)
Control / Lengua	Células intermedias	-0,082 (Z)	0,935 (Wilcoxon)

Control / Lengua	Células parabasales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Control / Lengua	Células basales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)

(*) De un subconjunto de las comparaciones no se ha podido realizar el análisis, las razones son:

- No hay pacientes con ATIPIA.
- No hay pacientes con Carriorexix.
- Dentro del grupo Caso / M. Yugal y Control / M. Yugal no hay pacientes con inflamación
- Dentro del grupo Caso / Lengua, y en los tres de Control no hay pacientes con binucleación

(**) Cuando la frecuencia esperada $(b+c)/2$ –pares en los que se produce cambio de ausencia a presencia y viceversa- es pequeña, la aproximación de la distribución del estadístico de prueba a la Chi-cuadrado no es buena y, en tal caso, el SPSS no calcula el estadístico anterior, sino que realiza la prueba binomial y calcula una probabilidad. El contraste se plantea en este caso de la siguiente forma: supongamos que $c < b$; en este caso la hipótesis nula es que c es un valor de una variable X con distribución binomial de parámetros $n=b+c$ y $p=0,5$. Esto ocurrirá para todos los análisis dentro de cada grupo de pacientes donde el tamaño muestral es de 30.

La conclusión es que no hay inflamación para la medida M. Yugal (ni antes ni después de la toma).

No existen diferencias significativas en ninguna de las variables entre antes y después de la toma del enjuague, ya sea Listerine® o placebo. Por tanto se considera que **en ninguna de las medidas citológicas se produce un cambio sustancial después de la toma del colutorio.**

1.2. Análisis entre grupos

En este apartado se ha comparado, en cada punto de medida, las variables citológicas entre grupos, teniendo en cuenta que cada variable citológica se compara antes y después entre cada grupo.

El objetivo es saber si los pacientes de ambos grupos partían de las mismas condiciones iniciales, por un lado, y comprobar si el Listerine® produce un efecto distinto al placebo en las citologías.

En la siguiente tabla figuran los p-valores asociados a cada contraste efectuado para cada uno de los puntos de medida:

Punto de medida	VARIABLES a comparar entre grupos	Momento	Valor del estadístico de contraste	p-valor
M. Yugal	Riqueza celular	Antes de la toma	379 (U)	0,263 (M-W)
M. Yugal	Maduración	Antes de la toma	***	0,706 (Fisher)
M. Yugal	ATIPIA	Antes de la toma		- (X ²)*
M. Yugal	Flora bacteriana	Antes de la toma	0,471 (X ²)	0,519 (X ²)
M. Yugal	Binucleación	Antes de la toma		- (X ²)*
M. Yugal	Carriorexix	Antes de la toma		- (X ²)*
M. Yugal	Mc micronúcleo	Antes de la toma	0,000 (X ²)	1,000 (X ²)
M. Yugal	Inflamación	Antes de la toma		- (X ²)*
M. Yugal	Células superficiales	Antes de la toma	445,5 (U)	0,943 (M-W)
M. Yugal	Células intermedias	Antes de la toma	394,5 (U)	0,379 (M-W)
M. Yugal	Células parabasales	Antes de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
M. Yugal	Células basales	Antes de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
M. Yugal	Riqueza celular	Después de la toma	358 (U)	0,152 (M-W)
M. Yugal	Maduración	Después de la toma	***	1,000 (Fisher)
M. Yugal	ATIPIA	Después de la toma		- (X ²)*
M. Yugal	Flora bacteriana	Después de la toma	***	0,080 (Fisher)
M. Yugal	Binucleación	Después de la toma		1,000 (Fisher)
M. Yugal	Carriorexix	Después de la toma		- (X ²)*
M. Yugal	Mc micronúcleo	Después de la toma	0,089 (X ²)	0,766 (X ²)
M. Yugal	Inflamación	Después de la toma		- (X ²)*
M. Yugal	Células superficiales	Después de la toma	382 (U)	0,280 (M-W)
M. Yugal	Células intermedias	Después de la toma	412 (U)	0,546 (M-W)
M. Yugal	Células parabasales	Después de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
M. Yugal	Células basales	Después de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
Enjuague	Riqueza celular	Antes de la toma	408 (U)	0,423 (M-W)
Enjuague	Maduración	Antes de la toma	***	0,237 (Fisher)
Enjuague	ATIPIA	Antes de la toma		- (X ²)*
Enjuague	Flora bacteriana	Antes de la toma	0,060 (X ²)	0,807 (X ²)
Enjuague	Binucleación	Antes de la toma		- (X ²)*
Enjuague	Carriorexix	Antes de la toma		- (X ²)*
Enjuague	Mc micronúcleo	Antes de la toma	0,000 (X ²)	1,000 (X ²)
Enjuague	Inflamación	Antes de la toma	0,693 (X ²)	0,405 (X ²)
Enjuague	Células superficiales	Antes de la toma	397,5 (U)	0,412 (M-W)
Enjuague	Células intermedias	Antes de la toma	427,5 (U)	0,726 (M-W)
Enjuague	Células parabasales	Antes de la toma	435 (U)	0,317 (M-W)
Enjuague	Células basales	Antes de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
Enjuague	Riqueza celular	Después de la toma	439,5 (U)	0,852 (M-W)
Enjuague	Maduración	Después de la toma	***	1,000 (Fisher)
Enjuague	ATIPIA	Después de la toma		- (X ²)*
Enjuague	Flora bacteriana	Después de la toma	1,623 (X ²)	0,203 (X ²)
Enjuague	Binucleación	Después de la toma	***	1,000 (Fisher)
Enjuague	Carriorexix	Después de la toma		- (X ²)*

Enjuague	Mc micronúcleo	Después de la toma	***	1,000 (Fisher)
Enjuague	Inflamación	Después de la toma	***	1,000 (Fisher)
Enjuague	Células superficiales	Después de la toma	396,5 (U)	0,377 (M-W)
Enjuague	Células intermedias	Después de la toma	426,5 (U)	0,698 (M-W)
Enjuague	Células parabasales	Después de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
Enjuague	Células basales	Después de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
Lengua	Riqueza celular	Antes de la toma	437 (U)	0,833 (M-W)
Lengua	Maduración	Antes de la toma	***	1,000 (Fisher)
Lengua	ATIPIA	Antes de la toma		- (X ²)*
Lengua	Flora bacteriana	Antes de la toma	***	0,026 (Fisher)
Lengua	Binucleación	Antes de la toma		- (X ²)*
Lengua	Carriorexix	Antes de la toma		- (X ²)*
Lengua	Mc micronúcleo	Antes de la toma	0,000 (X ²)	1,000 (X ²)
Lengua	Inflamación	Antes de la toma	***	0,492 (Fisher)
Lengua	Células superficiales	Antes de la toma	402 (U)	0,428 (M-W)
Lengua	Células intermedias	Antes de la toma	402 (U)	0,428 (M-W)
Lengua	Células parabasales	Antes de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
Lengua	Células basales	Antes de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
Lengua	Riqueza celular	Después de la toma	343,3 (U)	0,080 (M-W)
Lengua	Maduración	Después de la toma	***	0,424 (Fisher)
Lengua	ATIPIA	Después de la toma		- (X ²)*
Lengua	Flora bacteriana	Después de la toma	5,079 (X²)	0,024 (X²)
Lengua	Binucleación	Después de la toma		- (X ²)*
Lengua	Carriorexix	Después de la toma		- (X ²)*
Lengua	Mc micronúcleo	Después de la toma	0,000 (X ²)	1,000 (X ²)
Lengua	Inflamación	Después de la toma	***	1,000 (Fisher)
Lengua	Células superficiales	Después de la toma	363,5 (U)	0,163 (M-W)
Lengua	Células intermedias	Después de la toma	446,5 (U)	0,955 (M-W)
Lengua	Células parabasales	Después de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)
Lengua	Células basales	Después de la toma	450 (U)	1,000 (M-W)

(*) De un subconjunto de las comparaciones no se ha podido realizar el análisis, las razones son:

- No hay pacientes con ATIPIA.
- No hay pacientes con Carriorexix.
- No hay pacientes con Binucleación antes de la toma del enjuague. Tampoco después del enjuague para la medida de la Lengua.
- No hay inflamación para la medida M. Yugal (ni antes ni después de la toma).

(***) El test estadístico exacto de Fisher no calcula estadísticos sino que evalúa la probabilidad asociada a cada una de las tablas 2 x 2 que se pueden formar manteniendo los mismos totales de filas y columnas que los de la tabla observada.

1.3. Resumen general en citología

En general, no se han detectado variaciones significativas en las citologías tras la toma de ambos colutorios. Por tanto, ni el Listerine® ni el placebo tienen efecto sobre los factores citológicos.

		GRUPO			
		Grupo Listerine			
		TOMA CELULAR			
		Lengua			
		Flora Bacteriana después			
		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Flora Bacteriana antes	No	24	80,0%	5	16,7%
	Sí	1	3,3%	0	,0%

2. Análisis por paciente

En este apartado se toman en consideración las variables relacionadas con los pacientes, junto con unas variables citológicas que actúan a modo de resumen de lo observado en las tres medidas efectuadas (M. Yugal, Enjuague, y Lengua). Es decir, se muestran las mismas variables del apartado anterior con una modificación: para las variables dicotómicas (Sí/No) figura Sí si en alguno de los puntos de medida se ha obtenido un Sí, y para las variables cuantitativas se ha tomado la media de los tres puntos de medida.

Al igual que en el apartado 3.1 se realizará primero un análisis dentro de cada grupo y después uno entre grupos. La base de datos contiene medidas de 60 individuos, 30 dentro de cada grupo.

2.1. Análisis dentro de cada grupo

En este apartado se ha comparado la medida de antes con la de después de la toma del colutorio (en ambos grupos por separado) en cada variable propia del paciente junto con cada variable resumen de las tres medidas citológicas.

En las siguientes tablas figuran los p-valores asociados a cada contraste efectuado para cada uno de los grupos en consideración. Junto al valor numérico del p-valor figura, entre paréntesis, el test aplicado:

<i>Grupo</i>	<i>VARIABLES a comparar antes y después de la toma del colutorio</i>	<i>Valor del estadístico de contraste</i>	<i>p-valor</i>
Caso	CAO	-1,890 (Z)	0,059 (Wilcoxon)
Caso	Perdida de inserción	-3,319 (Z)	0,001 (Wilcoxon)
Caso	Sangrado	-3,042 (Z)	0,002 (Wilcoxon)
Caso	I. Placa	-2,963 (Z)	0,003 (Wilcoxon)
Caso	Profundidad de la bolsa	-3,281 (Z)	0,001 (Wilcoxon)
Caso	Recesión	-1,000 (Z)	0,317 (Wilcoxon)
Caso	Maduración		- (McNemar)*
Caso	ATIPIA		- (McNemar)*
Caso	Flora bacteriana	**	0,289 (McNemar)
Caso	Binucleación	**	1,000 (McNemar)
Caso	Carriorexix		- (McNemar)*
Caso	Mc micronúcleo	**	0,500 (McNemar)
Caso	Inflamación	**	0,092 (McNemar)
Caso	Células superficiales	-1,186 (Z)	0,236 (Wilcoxon)
Caso	Células intermedias	-1,545 (Z)	0,122 (Wilcoxon)
Caso	Células parabasales	-1,000 (Z)	0,317 (Wilcoxon)
Caso	Células basales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Control	CAO	-1,000 (Z)	0,317 (Wilcoxon)
Control	Perdida de inserción	-2,797 (Z)	0,005 (Wilcoxon)
Control	Sangrado	-2,486 (Z)	0,013 (Wilcoxon)
Control	I. Placa	-3,388 (Z)	0,001 (Wilcoxon)
Control	Profundidad de la bolsa	-2,756 (Z)	0,006 (Wilcoxon)
Control	Recesión	-1,000 (Z)	0,317 (Wilcoxon)
Control	Maduración	**	1,000 (McNemar)
Control	ATIPIA		- (McNemar)*

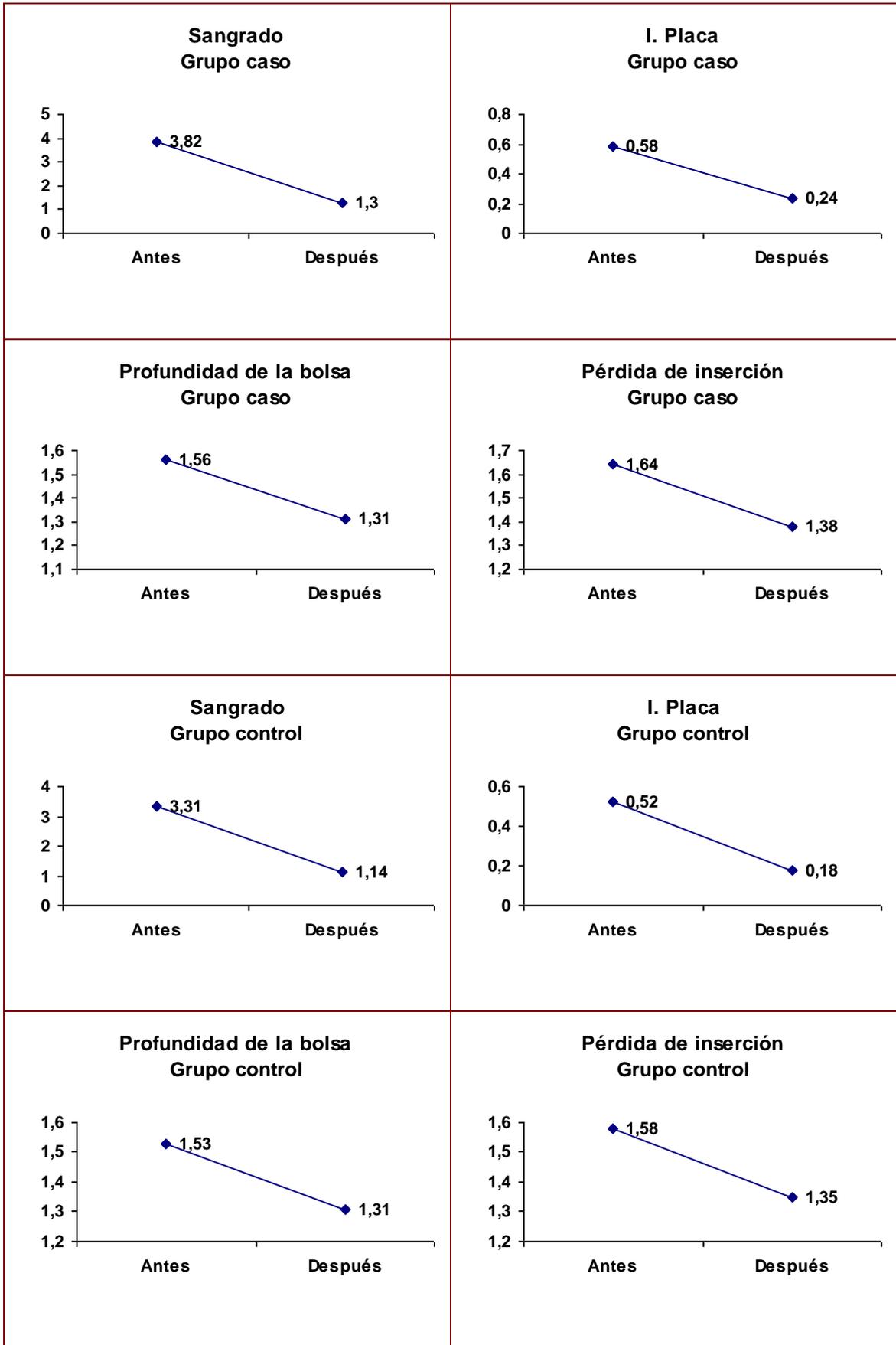
Control	Flora bacteriana	**	1,000 (McNemar)
Control	Binucleación		- (McNemar)*
Control	Carriorexix		- (McNemar)*
Control	Mc micronúcleo	**	1,000 (McNemar)
Control	Inflamación	**	0,774 (McNemar)
Control	Células superficiales	-0,244 (Z)	0,807 (Wilcoxon)
Control	Células intermedias	-0,137 (Z)	0,891 (Wilcoxon)
Control	Células parabasales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)
Control	Células basales	0,000 (Z)	1,000 (Wilcoxon)

(*) De un subconjunto de las comparaciones no se ha podido realizar el análisis, las razones son:

- En el grupo Caso todos los pacientes tienen Maduración.
- No hay pacientes con ATIPIA.
- No hay pacientes con Carriorexix.
- No hay pacientes con Binucleación en el grupo Control.

(**) Cuando la frecuencia esperada $(b+c)/2$ –pares en los que se produce cambio de ausencia a presencia y viceversa- es pequeña la aproximación de la distribución del estadístico de prueba a la chi-cuadrado no es buena y, en tal caso, el SPSS no calcula el estadístico anterior, sino que realiza la prueba binomial y calcula una probabilidad. El contraste se plantea en este caso de la siguiente forma: supongamos que $c < b$; en este caso la hipótesis nula es que c es un valor de una variable X con distribución binomial de parámetros $n=b+c$ y $p=0,5$. Esto ocurrirá para todos los análisis dentro de cada grupo de pacientes donde el tamaño muestral es de 30.

Existen diferencias significativas en las variables **Pérdida de inserción, Sangrado, I. Placa, y Profundidad de la bolsa** en ambos grupos de pacientes. En los siguientes gráficos se aprecian dichas diferencias:



Se observa como en cada parámetro, para ambos grupos, **el valor desciende después de la toma del enjuague.**

2.2. Análisis entre grupos

En este apartado se han comparado las variables de cada paciente junto a las resumen citológicas entre grupos, teniendo en cuenta que cada variable se compara antes y después entre cada grupo.

En la siguiente tabla figuran los p-valores asociados a cada contraste efectuado para cada uno de los puntos de medida:

<i>Variables</i>	<i>Momento</i>	<i>Valor del estadístico de contraste</i>	<i>p-valor</i>
CAO	Antes de la toma del colutorio	437 (U)	0,847 (M-W)
Perdida de inserción	Antes de la toma del colutorio	429,5 (U)	0,762 (M-W)
Sangrado	Antes de la toma del colutorio	391 (U)	0,376 (M-W)
I. Placa	Antes de la toma del colutorio	411,5 (U)	0,569 (M-W)
Profundidad de la bolsa	Antes de la toma del colutorio	436,5 (U)	0,842 (M-W)
Recesión	Antes de la toma del colutorio	382 (U)	0,223 (M-W)
Maduración	Antes de la toma del colutorio		- (X ²)*
ATIPIA	Antes de la toma del colutorio		- (X ²)*
Flora bacteriana	Antes de la toma del colutorio	0,111 (X ²)	0,739 (X ²)
Binucleación	Antes de la toma del colutorio		- (X ²)*
Carriorexix	Antes de la toma del colutorio		- (X ²)*
Mc micronúcleo	Antes de la toma del colutorio	***	1,000 (Fisher)
Inflamación	Antes de la toma del colutorio	0,693 (X ²)	0,405 (X ²)
Células superficiales	Antes de la toma del colutorio	417,5 (U)	0,627 (M-W)
Células intermedias	Antes de la toma del colutorio	367 (U)	0,215 (M-W)
Células parabasales	Antes de la toma del colutorio	435 (U)	0,317 (M-W)
Células basales	Antes de la toma del colutorio	450 (U)	1,000 (M-W)
CAO	Después de la toma del colutorio	438,5 (U)	0,865 (M-W)
Perdida de inserción	Después de la toma del colutorio	378,5 (U)	0,290 (M-W)
Sangrado	Después de la toma del colutorio	415 (U)	0,559 (M-W)
I. Placa	Después de la toma del colutorio	394,5 (U)	0,530 (M-W)
Profundidad de la bolsa	Después de la toma del colutorio	394,5 (U)	0,412 (M-W)
Recesión	Después de la toma del colutorio	379,5(U)	0,207 (M-W)

Maduración	Después de la toma del colutorio	***	1,000 (Fisher)
ATIPIA	Después de la toma del colutorio		- (X^2)*
Flora bacteriana	Después de la toma del colutorio	1,491 (X^2)	0,222 (X^2)
Binucleación	Después de la toma del colutorio	***	1,000 (Fisher)
Carriorexix	Después de la toma del colutorio		- (X^2)*
Mc micronúcleo	Después de la toma del colutorio	***	1,000 (Fisher)
Inflamación	Después de la toma del colutorio	0,268 (X^2)	0,605 (X^2)
Células superficiales	Después de la toma del colutorio	375 (U)	0,262 (M-W)
Células intermedias	Después de la toma del colutorio	424 (U)	0,697 (M-W)
Células parabasales	Después de la toma del colutorio	450 (U)	1,000 (M-W)
Células basales	Después de la toma del colutorio	450 (U)	1,000 (M-W)

(*) De un subconjunto de las comparaciones no se ha podido realizar el análisis, las razones son:

- No hay pacientes con ATIPIA.
- No hay pacientes con Carriorexix.
- No hay pacientes con Binucleación antes de la toma del enjuague.
- Todos los pacientes tienen Maduración antes de la toma del enjuague.

(***) El test estadístico exacto de Fisher no calcula estadísticos sino que evalúa la probabilidad asociada a cada una de las tablas 2 x 2 que se pueden formar manteniendo los mismos totales de filas y columnas que los de la tabla observada.

No existen diferencias significativas entre grupos para ninguna de las variables consideradas.

2.3. Resumen general en pacientes

Se han hallado diferencias significativas, dentro de cada grupo de pacientes, en las variables **Pérdida de inserción, Sangrado, I. Placa, y Profundidad de la bolsa** en ambos grupos de pacientes. En cambio, entre grupos, no se han encontrado diferencias significativas para ninguna de las variables consideradas.

Entonces, como los valores de estas características se pueden considerar iguales en ambos grupos, tanto antes como después de la toma del colutorio, se concluye que la reducción de los valores tras la toma del colutorio es independiente de si es Listerine o placebo, es decir, **el Listerine no tiene un efecto distinto al de un placebo.**

3. ANEXO

Tablas del análisis por pacientes:

T1.- CAO antes y después del uso del colutorio

	Grupo Caso	Grupo Control	
CAO antes	N	30	30
	Media	8,97	10,07
	Desviación típica	4,83	7,18
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	19,00	28,00
	Mediana	9,00	8,00
CAO después	N	30	30
	Media	9,13	10,10
	Desviación típica	4,90	7,17
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	19,00	28,00
	Mediana	9,00	8,00

T2.- % de sangrado antes y después del uso del colutorio

	Grupo Caso	Grupo Control	
Sangrado antes	N	30	30
	Media	3,82	3,31
	Desviación típica	4,44	4,58
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	18,54	14,58
	Mediana	2,00	1,72
Sangrado después	N	30	30
	Media	1,30	1,14
	Desviación típica	1,98	2,23
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	7,50	8,33
	Mediana	,00	,00

T3.- I.Placa antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso	Grupo Control
I. Placa antes	N	30	30
	Media	,58	,52
	Desviación típica	,47	,46
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	1,57	1,45
	Mediana	,53	,33
I. Placa después	N	29	30
	Media	,24	,18
	Desviación típica	,34	,25
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	1,57	,85
	Mediana	,17	,08

T4.- Profundidad de la bolsa antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso	Grupo Control
Profundidad de la bolsa antes	N	30	30
	Media	1,56	1,53
	Desviación típica	,36	,32
	Mínimo	1,13	1,05
	Máximo	2,36	2,79
	Mediana	1,45	1,47
Profundidad de la bolsa después	N	30	30
	Media	1,31	1,31
	Desviación típica	,21	,32
	Mínimo	1,04	1,01
	Máximo	1,95	2,25
	Mediana	1,29	1,23

T5.- Recesión antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso	Grupo Control
Recesión antes	N	30	30
	Media	,08	,04
	Desviación típica	,18	,08
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	,75	,28
	Mediana	,00	,00
Recesión después	N	30	30
	Media	,08	,04
	Desviación típica	,18	,08
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	,75	,28
	Mediana	,00	,00

T6.- Pérdida de inserción antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso	Grupo Control
Pérdida de inserción antes	N	30	30
	Media	1,64	1,58
	Desviación típica	,38	,33
	Mínimo	1,13	1,05
	Máximo	2,50	2,79
	Mediana	1,59	1,48
Pérdida de inserción después	N	30	30
	Media	1,38	1,35
	Desviación típica	,23	,31
	Mínimo	1,04	1,02
	Máximo	1,95	2,25
	Mediana	1,37	1,29

T7.- Maduración antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%
Maduración antes	Total	30	100,0%	30	100,0%
	Sí	30	100,0%	30	100,0%
Maduración después	Total	30	100,0%	30	100,0%
	Sí	30	100,0%	29	96,7%
	No	0	,0%	1	3,3%

En las tablas con la extensión *bis*, los porcentajes de las cuatro celdas para cada grupo suman 100 y lo que muestran son los cambios en la presencia o ausencia de la característica tras la toma del colutorio. Por ejemplo, en la T7bis, todos los pacientes del grupo caso tenían maduración antes de la toma y la han mantenido después, mientras que en el grupo control, sólo 1 paciente ha perdido la maduración tras la toma del placebo.

T7bis.- Maduración antes y después del uso del colutorio

		Grupo Listerine				Grupo placebo			
		Maduración después				Maduración después			
		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Maduración antes	No	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	30	100,0%	1	3,3%	29	96,7%

T8.- ATIPIA antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%
ATIPIA antes	Total	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%
ATIPIA después	Total	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%

T8bis.- ATIPIA antes y después del uso del colutorio

		Grupo Listerine				Grupo placebo			
		ATIPIA después				ATIPIA después			
		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
ATIPIA antes	No	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

T9.- Binucleación antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%
Binucleación antes	Total	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%
Binucleación después	Total	30	100,0%	30	100,0%
	No	29	96,7%	30	100,0%
	Sí	1	3,3%	0	,0%

T9bis.- Binucleación antes y después del uso del colutorio

		Grupo Listerine				Grupo placebo			
		Binucleación después				Binucleación después			
		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Binucleación antes	No	29	96,7%	1	3,3%	30	100,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

T10.- Carriorexix antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%
Carriorexix antes	Total	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%
Carriorexix después	Total	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%

T10bis.- Carriorexix antes y después del uso del colutorio

		Grupo Listerine				Grupo placebo			
		Carriorexix después				Carriorexix después			
		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Carriorexix antes	No	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

T11.- Micronúcleo antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%
Micronúcleo antes	Total	30	100,0%	30	100,0%
	Sí	30	100,0%	29	96,7%
	No	0	,0%	1	3,3%
Micronúcleo después	Total	30	100,0%	30	100,0%
	Sí	28	93,3%	29	96,7%
	No	2	6,7%	1	3,3%

T11bis.- Micronúcleo antes y después del uso del colutorio

		Grupo Listerine				Grupo placebo			
		Micronúcleo después				Micronúcleo después			
		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Micronúcleo antes	No	0	,0%	0	,0%	0	,0%	1	3,3%
	Sí	2	6,7%	28	93,3%	1	3,3%	28	93,3%

T12.- Inflamación antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%
Inflamación antes	Total	30	100,0%	30	100,0%
	Sí	22	73,3%	19	63,3%
	No	8	26,7%	11	36,7%
Inflamación después	Total	30	100,0%	30	100,0%
	Sí	15	50,0%	17	56,7%
	No	15	50,0%	13	43,3%

T12bis.- Inflamación antes y después del uso del colutorio

	Grupo Listerine				Grupo placebo				
	Inflamación después				Inflamación después				
	No		Sí		No		Sí		
	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	
Inflamación antes	No	5	16,7%	3	10,0%	6	20,0%	5	16,7%
	Sí	10	33,3%	12	40,0%	7	23,3%	12	40,0%

T13.- Células superficiales antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso	Grupo Control
% Células superficiales antes	N	30	30
	Media	47,00	48,56
	Desviación típica	12,45	11,03
	Mínimo	16,67	20,00
	Máximo	63,33	60,00
	Mediana	53,33	53,33
% Células superficiales después	N	30	30
	Media	50,33	45,56
	Desviación típica	9,88	15,27
	Mínimo	16,67	,00
	Máximo	60,00	60,00
	Mediana	53,33	50,00

T14.- Células intermedias antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso	Grupo Control
% Células intermedias antes	N	30	30
	Media	39,56	43,00
	Desviación típica	9,54	9,72
	Mínimo	13,33	13,33
	Máximo	56,67	60,00
	Mediana	43,33	43,33
% Células intermedias después	N	30	30
	Media	43,00	42,22
	Desviación típica	9,64	14,63
	Mínimo	16,67	,00
	Máximo	63,33	70,00
	Mediana	43,33	43,33

T15.- Células parabasales antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso	Grupo Control
% Células parabasales antes	N	30	30
	Media	,11	,00
	Desviación típica	,61	,00
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	3,33	,00
	Mediana	,00	,00
% Células parabasales después	N	30	30
	Media	,00	,00
	Desviación típica	,00	,00
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	,00	,00
	Mediana	,00	,00

T16.- Células basales antes y después del uso del colutorio

		Grupo Caso	Grupo Control
% Células basales antes	N	30	30
	Media	,00	,00
	Desviación típica	,00	,00
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	,00	,00
	Mediana	,00	,00
% Células basales después	N	30	30
	Media	,00	,00
	Desviación típica	,00	,00
	Mínimo	,00	,00
	Máximo	,00	,00
	Mediana	,00	,00

Tablas del análisis por citología:

T17.- Riqueza celular antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Riqueza celular antes	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	0	5	16,7%	3	10,0%	3	10,0%	1	3,3%	4	13,3%	4	13,3%
	1	6	20,0%	14	46,7%	2	6,7%	0	,0%	13	43,3%	12	40,0%
	2	15	50,0%	11	36,7%	4	13,3%	6	20,0%	13	43,3%	14	46,7%
	3	4	13,3%	2	6,7%	21	70,0%	23	76,7%	0	,0%	0	,0%
Riqueza celular después	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	0	3	10,0%	4	13,3%	1	3,3%	2	6,7%	2	6,7%	5	16,7%
	1	7	23,3%	8	26,7%	2	6,7%	3	10,0%	9	30,0%	12	40,0%
	2	10	33,3%	15	50,0%	7	23,3%	5	16,7%	18	60,0%	13	43,3%
	3	10	33,3%	3	10,0%	20	66,7%	20	66,7%	1	3,3%	0	,0%

T18.- Maduración antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Maduración antes	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	5	16,7%	3	10,0%	3	10,0%	0	,0%	4	13,3%	4	13,3%
	Sí	25	83,3%	27	90,0%	27	90,0%	30	100,0%	26	86,7%	26	86,7%
Maduración después	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	29	100,0%	30	100,0%
	No	3	10,0%	4	13,3%	1	3,3%	2	6,7%	2	6,9%	5	16,7%
	Sí	27	90,0%	26	86,7%	29	96,7%	28	93,3%	27	93,1%	25	83,3%

T18bis.- Maduración antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Maduración después				Maduración después				Maduración después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Maduración antes	No	1	3,3%	4	13,3%	0	,0%	3	10,0%	1	3,4%	2	6,9%
	Sí	2	6,7%	23	76,7%	1	3,3%	26	86,7%	1	3,4%	25	86,2%

GRUPO = Grupo Listerine

T18bis.- Maduración antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Maduración después				Maduración después				Maduración después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Maduración antes	No	0	,0%	3	10,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	4	13,3%
	Sí	4	13,3%	23	76,7%	2	6,7%	28	93,3%	5	16,7%	21	70,0%

GRUPO = Grupo placebo

T19.- ATIPIA antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
		ATIPIA antes	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
No	30		100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
ATIPIA después	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%

T19bis.- ATIPIA antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		ATIPIA después				ATIPIA después				ATIPIA después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
ATIPIA antes	No	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

GRUPO = Grupo Listerine

T19bis.- ATIPIA antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		ATIPIA después				ATIPIA después				ATIPIA después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
ATIPIA antes	No	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

GRUPO = Grupo placebo

T20.- Binucleación antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Binucleación antes	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	29	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	29	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
Binucleación después	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	29	96,7%	30	100,0%	29	96,7%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	Sí	1	3,3%	0	,0%	1	3,3%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

T20bis.- Binucleación antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Binucleación después				Binucleación después				Binucleación después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Binucleación antes	No	29	96,7%	1	3,3%	29	96,7%	1	3,3%	30	100,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

GRUPO = Grupo Listerine

T20bis.- Binucleación antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Binucleación después				Binucleación después				Binucleación después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Binucleación antes	No	30	100,0%	0	,0%	29	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

GRUPO = Grupo placebo

T21.- Carriorexis antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Carriorexis antes	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
Carriorexis después	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%

T21bis.- Carriorexis antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Carriorexis después				Carriorexis después				Carriorexis después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Carriorexis antes	No	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

GRUPO = Grupo Listerine

T21bis.- Carriorexis antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Carriorexis después				Carriorexis después				Carriorexis después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Carriorexis antes	No	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

GRUPO = Grupo placebo

T22.- Mc micronúcleo antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
		Total	No	Sí	Total	No	Sí	Total	No	Sí	Total	No	Sí
Micronúcleo antes	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	6	20,0%	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%	9	30,0%	9	30,0%
	Sí	24	80,0%	24	80,0%	27	90,0%	27	90,0%	21	70,0%	21	70,0%
Micronúcleo después	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	7	23,3%	8	26,7%	3	10,0%	3	10,0%	8	26,7%	8	26,7%
	Sí	23	76,7%	22	73,3%	27	90,0%	27	90,0%	22	73,3%	22	73,3%

T22bis.- Mc micronúcleo antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Micronúcleo después				Micronúcleo después				Micronúcleo después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Micronúcleo antes	No	3	10,0%	3	10,0%	1	3,3%	2	6,7%	4	13,3%	5	16,7%
	Sí	4	13,3%	20	66,7%	2	6,7%	25	83,3%	4	13,3%	17	56,7%

GRUPO = Grupo Listerine

T22bis.- Mc micronúcleo antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Micronúcleo después				Micronúcleo después				Micronúcleo después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Micronúcleo antes	No	3	10,0%	3	10,0%	1	3,3%	2	6,7%	2	6,7%	7	23,3%
	Sí	5	16,7%	19	63,3%	2	6,7%	25	83,3%	6	20,0%	15	50,0%

GRUPO = Grupo placebo

T23.- Inflamación antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control		Grupo Caso		Grupo Control	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Inflamación antes	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%	8	26,7%	11	36,7%	30	100,0%	28	93,3%
	Sí	0	,0%	0	,0%	22	73,3%	19	63,3%	0	,0%	2	6,7%
Inflamación después	Total	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%	30	100,0%
	No	30	100,0%	30	100,0%	14	46,7%	13	43,3%	29	96,7%	30	100,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	16	53,3%	17	56,7%	1	3,3%	0	,0%

T23bis.- Inflamación antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Inflamación después				Inflamación después				Inflamación después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Inflamación antes	No	30	100,0%	0	,0%	5	16,7%	3	10,0%	29	96,7%	1	3,3%
	Sí	0	,0%	0	,0%	9	30,0%	13	43,3%	0	,0%	0	,0%

GRUPO = Grupo Listerine

T23bis.- Inflamación antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR											
		M. Yugal				Enjuague				Lengua			
		Inflamación después				Inflamación después				Inflamación después			
		No		Sí		No		Sí		No		Sí	
		Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %	Count	Subtable N %
Inflamación antes	No	30	100,0%	0	,0%	6	20,0%	5	16,7%	28	93,3%	0	,0%
	Sí	0	,0%	0	,0%	7	23,3%	12	40,0%	2	6,7%	0	,0%

GRUPO = Grupo placebo

T24.- Células superficiales antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR					
		M. Yugal		Enjuague		Lengua	
		Grupo Caso	Grupo Control	Grupo Caso	Grupo Control	Grupo Caso	Grupo Control
% Células superficiales antes	N	30	30	30	30	30	30
	Media	45,67	46,67	45,33	50,33	50,00	48,67
	Desviación típica	21,61	19,18	16,76	8,90	20,68	20,30
	Mínimo	,00	,00	,00	30,00	,00	,00
	Máximo	60,00	60,00	60,00	60,00	70,00	70,00
	Mediana	50,00	55,00	50,00	50,00	60,00	60,00
% Células superficiales después	N	30	30	30	30	30	30
	Media	49,33	45,33	50,00	47,33	51,67	44,00
	Desviación típica	18,18	20,13	11,74	13,88	15,99	22,38
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Máximo	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	70,00
	Mediana	60,00	50,00	50,00	50,00	60,00	50,00

T25.- Células intermedias antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR					
		M. Yugal		Enjuague		Lengua	
		Grupo Caso	Grupo Control	Grupo Caso	Grupo Control	Grupo Caso	Grupo Control
% Células intermedias antes	N	30	30	30	30	30	30
	Media	37,67	43,33	44,33	47,67	36,67	38,00
	Desviación típica	18,13	18,26	16,54	12,51	15,61	16,27
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Máximo	60,00	80,00	60,00	70,00	60,00	60,00
	Mediana	40,00	40,00	50,00	50,00	40,00	40,00
% Células intermedias después	N	30	30	30	30	30	30
	Media	40,67	41,33	46,67	46,00	41,67	39,33
	Desviación típica	15,52	18,71	11,24	13,54	13,67	20,50
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Máximo	60,00	80,00	60,00	60,00	70,00	80,00
	Mediana	40,00	40,00	50,00	50,00	40,00	40,00

T26.- Células parabasales antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR					
		M. Yugal		Enjuague		Lengua	
		Grupo Caso	Grupo Control	Grupo Caso	Grupo Control	Grupo Caso	Grupo Control
% Células parabasales antes	N	30	30	30	30	30	30
	Media	,00	,00	,33	,00	,00	,00
	Desviación típica	,00	,00	1,83	,00	,00	,00
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Máximo	,00	,00	10,00	,00	,00	,00
	Mediana	,00	,00	,00	,00	,00	,00
% Células parabasales después	N	30	30	30	30	30	30
	Media	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Desviación típica	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Máximo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Mediana	,00	,00	,00	,00	,00	,00

T27.- Células basales antes y después del uso del colutorio

		TOMA CELULAR					
		M. Yugal		Enjuague		Lengua	
		Grupo Caso	Grupo Control	Grupo Caso	Grupo Control	Grupo Caso	Grupo Control
% Células basales antes	N	30	30	30	30	30	30
	Media	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Desviación típica	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Máximo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Mediana	,00	,00	,00	,00	,00	,00
% Células basales después	N	30	30	30	30	30	30
	Media	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Desviación típica	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Máximo	,00	,00	,00	,00	,00	,00
	Mediana	,00	,00	,00	,00	,00	,00

DISCUSIÓN

Los colutorios se utilizan para el tratamiento de una amplia gama de condiciones orales, entre las cuales se incluyen el tratamiento de la halitosis, la gingivitis y periodontitis con el fin de inhibir o reducir la placa bacteriana y como profilaxis tras la cirugía periodontal. También se ha empleado como tratamiento sintomático de las úlceras aftosas, como terapia para las infecciones por *Cándida* y para el alivio del dolor causado por procesos inflamatorios orales (14, 126).

El etanol se usa como disolvente de los agentes activos en muchos colutorios disponibles en el mercado con concentraciones que van del 6% al 26,9% (14).

Las ventajas que incluye el etanol son sus propiedades antisépticas, sus propiedades de conservante activo, su bajo coste y su facilidad de producción.

El consumo de alcohol ha sido reconocido como uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo cáncer oral (127). El consumo excesivo de alcohol que contienen las bebidas alcohólicas también se asocia con un mayor riesgo de desarrollar otros cánceres de cabeza y el cuello, como cáncer de faringe y laringe, (128, 129) así como otras enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardíacas, enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, enfermedad hepática, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes mellitus y enfermedad ósea (129).

A pesar de la relación concreta entre el consumo crónico de alcohol y el cáncer oral, el papel exacto del alcohol en la patogénesis de la enfermedad no se conoce completamente, y por tanto deben considerarse los siguientes puntos:

1. No todos los pacientes con cáncer oral consumen alcohol.
2. No todas las personas que ingieren bebidas alcohólicas de forma habitual desarrollan cáncer oral.

Además, el tabaquismo y el consumo de alcohol son factores de riesgo sinérgicos para la carcinogénesis oral. Esto hace que sea difícil evaluar los efectos de estos factores por separado, ya que aproximadamente el 75% de todos los cánceres orales surgen de la asociación del consumo de alcohol y el tabaco (29, 127, 130).

Esto coincidió con un estudio de casos y controles que se llevó a cabo en el oeste de Nueva York cuyos resultados confirman los hallazgos anteriores sobre que el tabaquismo y el consumo de alcohol confieren un riesgo sustancial de padecer cáncer oral. Los resultados también confirman que la mala higiene bucal aumenta el riesgo de cáncer oral, aunque este efecto es mucho menor que el del tabaquismo y el consumo de alcohol (131).

También surgen dificultades en establecer una correcta medición de la ingesta de alcohol, por lo que es difícil de evaluar completamente el papel del alcohol en el desarrollo de cáncer oral.

El posible efecto nocivo de los colutorios que contienen alcohol surge del hecho de que muchos de éstos contienen altas concentraciones de etanol y de que se mantienen en contacto directo con la mucosa oral (3).

El alcohol aplicado de forma tópica tiene un ligero efecto cáustico y astringente y por tanto destruye los tejidos en la cavidad oral.

Entre los efectos adversos descritos en la literatura se incluyen sensación de ardor bucal, sequedad de las mucosas y alteraciones en la dureza de los materiales de restauración. Sin embargo, hay opiniones encontradas en la literatura respecto a la relación, si las hubiere, entre el uso de enjuagues bucales que contienen alcohol y el cáncer oral.

También se han descrito alteraciones locales como desprendimiento del epitelio, ulceraciones en la mucosa, gingivitis, petequias y dolor oral (3); se han observado en personas que han usado colutorios con 25% o más de alcohol (18) y aparición de lesiones blancas asociadas al uso prolongado de colutorios con alcohol en mucosa oral humana y en animales de experimentación (17).

Pham y cols. (132), informaron la aparición de lesiones maculares eritematosas bien delimitadas localizadas en el centro del paladar duro en dos pacientes que usaban frecuentemente Listerine Pocket Paks - Cool Mint. En ambos casos tras su supresión las lesiones desaparecieron.

Algunos estudios parecen confirmar que el etanol por sí solo aumenta el riesgo de cáncer oral. Sin embargo, como el etanol por sí mismo no es cancerígeno, los mecanismos exactos de carcinogénesis oral asociada con etanol siguen siendo mal entendidos.

-Reis y cols. (133) evaluaron diferentes parámetros citológicos en células exfoliadas del borde lateral de la lengua y de la mucosa yugal en pacientes consumidores de etanol no fumadores de Salvador/BA-Brasil:

- La frecuencia de micronúcleos (MN): que son biomarcadores de efecto utilizados para evaluar el daño genético de poblaciones expuestas, ya sea de células epiteliales o de linfocitos. Son núcleos pequeños que se ubican al lado del núcleo celular que indican algún tipo de aberración cromosómica que pudo producirse como efecto de la exposición a agentes ambientales (134).

- La proporción anormal núcleo/citoplasma.

- Núcleos picnóticos: donde este se observa encogido y en altos niveles es una respuesta de lesión o daño celular.

- Células con núcleo en cariorresis o desintegración nuclear: donde la membrana nuclear desaparece y la cromatina se observa condensada en grupos.

-Células con núcleos en cariólisis o disolución nuclear: donde la membrana nuclear se conserva y la cromatina está en disolución (135).

El grupo de etanol consistía en 36 personas alcohólicos no fumadores seleccionados entre los pacientes que asistían al centro de desintoxicación de Ana Nery Hospital psiquiátrico (Salvador/BA-Brasil), cuyo Comité de ética había aprobado el estudio. El grupo de control estaba integrado por 18 personas abstemios de alcohol y tabaco, también seleccionados en Salvador/BA-Brasil de grupos religiosos.

El presente estudio indica que la exposición crónica al etanol puede estar asociada con cambios citológicos en la mucosa oral, incluso en ausencia de hábito tabáquico. En relación a las células exfoliadas del borde lateral de la lengua, hubo un importante aumento en la frecuencia media de cada anomalía en el grupo de etanol en comparación con el grupo control, tales como aumento del tamaño nuclear, atrofia epitelial, cambios displásicos con queratosis y aumento en el número de figuras mitóticas, sin la presencia de alteraciones clínicas. En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables entre antes y después de la toma del colutorio, ya sea Listerine® o placebo. Por tanto se consideró que en ninguna de las medidas citológicas se produce un cambio sustancial después de la toma del colutorio.

Estos cambios no indican una acción carcinógena, sino que pueden entenderse como una inducción al proceso de queratinización con el propósito de proteger mucosa no queratinizada de posibles lesiones causadas por el etanol, como son el borde lateral de la lengua y la mucosa yugal ya que son mas permeables que los tejidos queratinizados como el paladar o la encía (133).

Esta misma autora evaluó la frecuencia de micronúcleos en células exfoliadas de la lengua y mucosa yugal en 40 individuos consumidores de etanol (consumo semanal medio 2.555 ml durante una media de 25,5 años) no fumadores y 20 pacientes ni fumadores ni bebedores y que clínicamente no presentaban alteraciones tales como ulceraciones u otras lesiones. La recogida de las células fue realizada mediante cytobrush. Se observó una mayor frecuencia de células micronucleadas y de micronúcleos en el borde lateral de la lengua comparado con el grupo control; sin embargo la mucosa yugal mostró resultados menos expresivos (133).

Otros trabajos han demostrado que el propio alcohol presenta una baja capacidad para modificar el epitelio, pero si se asocia al consumo de tabaco, entonces el nivel de agresión a la mucosa bucal es mayor que por separado, de lo cual se desprende un efecto sinérgico entre estas sustancias (29, 30, 42, 126, 136). Algunas razones que explicarían esta conducta pudiera ser la forma en que el alcohol actúa sobre la membrana celular, con un efecto local directo al

modificar la permeabilidad de la membrana y a través de los pasos enzimáticos finales de su metabolismo como el acetaldehído.

En su trabajo con la permeabilidad membranosa de las células de la mucosa bucal en cerdos, utilizando concentraciones diferentes de alcohol, Du y cols. (137) observaron que concentraciones de alcohol entre 25 y 30% aumentan la penetración de nitrosaminas (138). Sin embargo, otros autores opinan que la acción del alcohol dirigida a incrementar la permeabilidad celular se debe probablemente a alteraciones moleculares en la membrana celular y no a una acción directa sobre la bicapa lipídica (139).

La asociación entre el alcohol que contiene los enjuagues bucales y el desarrollo del cáncer oral ha sido un tema de estudio científico desde finales de 1970. Dado que el consumo excesivo de alcohol es un factor de riesgo conocido para el desarrollo del cáncer oral, los investigadores analizaron la posibilidad de que el uso de enjuagues bucales que contuvieran alcohol también podía actuar como factor de riesgo.

Weaver, en 1979 llevó a cabo un estudio formado por 200 pacientes con cáncer oral y 50 controles. Identificó 11 que no eran fumadores ni consumían alcohol y habían desarrollado cáncer en la cavidad oral. Diez, nueve mujeres, de estos once habían usado colutorios al menos dos veces al día durante más de veinte años. Solo dos de ellos diluían el enjuague alguna vez y en la mayoría de los colutorios empleados el porcentaje de alcohol era del 27%. Los autores concluyeron que los resultados del estudio no eran estadísticamente significativos (33, 140).

Blot, en 1983 realizó un estudio de 206 mujeres con cáncer oral y faríngeo y 352 controles, y concluyó que existía un aumento del riesgo en aquellas que empleaban colutorios y no eran fumadoras, pero no de forma significativa. En este estudio no se informó sobre el porcentaje de alcohol que contenían los colutorios, ni la razón por la cual se empleaban (34).

En el año 1983, Wynder estudió 571 pacientes, hombres y mujeres con cáncer oral y faríngeo y 568 controles y concluyó que el uso diario de colutorios aumentaba el riesgo moderadamente en mujeres pero no en hombres. Debido a la ausencia de una relación dosis-respuesta y a la posibilidad de confusión por el consumo de tabaco y alcohol, causas por las que se empleaba el colutorio, no fue posible atribuir significación causal a la asociación entre el uso de un enjuague bucal diario y el cáncer oral en las mujeres. Tampoco se obtuvo información sobre el contenido en alcohol de los colutorios (35).

Mashberg estudió el uso de colutorios y su asociación con el cáncer oral y faríngeo en una muestra de hombres fumadores y bebedores. La proporción de casos (95 hombres) y controles (913 hombres) que empleaban colutorios con frecuencia era similar y concluyó que no existía

evidencia de que los enjuagues bucales fueran un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer oral y faríngeo (36).

Young y cols. (141) en 1986 en un estudio de 317 casos con cáncer orofaríngeo y 306 controles con cáncer de cabeza y cuello (no relacionado con el consumo de tabaco). Concluyeron que el uso de colutorios no conllevaba un riesgo de cáncer de la cavidad oral, orofaringe e hipofaringe. No se obtuvo información sobre el contenido en alcohol de los colutorios. Aunque los resultados del estudio fueron claramente negativos, se plantea el problema del diseño del estudio y de la interpretación de los resultados.

El estudio realizado en 1989 por Kabat (37) y colaboradores fue una investigación compuesta por 125 casos y 107 controles. Era un seguimiento al estudio de Wynder en 1983 (35) restringido a las mujeres. Los autores no encontraron asociación entre el uso de colutorios y el cáncer orofaríngeo, pero no había información disponible sobre el contenido de alcohol de los productos utilizados. Este estudio proporcionó un hallazgo importante para la interpretación de todos los estudios sobre el uso de colutorios y el cáncer orofaríngeo. Existían asociaciones moderadamente fuerte entre las mujeres que usaron el enjuague bucal para disimular olores de alientos, de tabaco o de alcohol. Sin embargo, esta asociación no era tan fuerte entre las mujeres que utilizaban el enjuague bucal para ocultar los olores de comida o por otros motivos. Los resultados del estudio de Wynder en 1983 y de este estudio de Kabat indican que los resultados positivos en general son potencialmente confundidos y, que el control de las razones para el uso de colutorios es importante.

En 1997 Morse (40) y colaboradores realizaron un estudio de 127 casos y 127 controles sobre la displasia epitelial oral. Como ya se sabe, los pacientes con displasia epitelial presentan un riesgo aumentado de padecer cáncer orofaríngeo, y en estudios anteriores a esta investigación, se ha demostrado que tanto el tabaco como el alcohol son factores de riesgo importantes para la displasia oral (142, 143).

En el informe de 1997 de Morse (40) y colaboradores, los autores examinaron ocho variables que describen el uso de colutorios y el contenido alcohólico de los productos utilizados. Los resultados generales fueron negativos, como lo fueron los de las ocho variables. De hecho, como Mashberg (36) y colaboradores habían encontrado, el riesgo relativo varía inversamente con el porcentaje de alcohol en el enjuague utilizado. Los resultados no cambiaron después de que los autores controlaron el consumo de tabaco y alcohol. Por tanto los resultados de este estudio, no muestran ninguna relación entre el uso de enjuagues bucales y la displasia epitelial oral.

Winn en 1991, en un estudio de casos y controles sugirió que el uso regular, y la edad de inicio de uso de colutorios con alto contenido alcohólico (25% o más) contribuía al riesgo de cáncer oral (39). En este estudio, sin embargo, el efecto de los colutorios se observaba solo en los grupos que bebían y/o fumaban, mientras que no aparecían resultados positivos en aquellos casos que ni bebían ni fumaban. El mismo autor, en 2001 sobre 342 casos con cáncer oral y 521 controles en Puerto Rico mostró que una cuarta parte de los casos con cáncer oral en hombres y la mitad en mujeres no eran atribuibles al abuso del tabaco ni al consumo de alcohol; por ello se consideraron otros factores de riesgo potenciales como el uso de colutorios, enfermedades e infecciones de la cavidad oral, lesiones producidas por prótesis, higiene oral deficiente, mal estado de salud dental, insuficiencias alimentarias, niveles bajos de carotenoides, así como la posible asociación del virus del papiloma humano (38).

Guha y cols. (41) indicaron en un estudio sobre 924 casos y 928 controles en Europa y 2.286 casos y 1.824 controles, que la enfermedad periodontal (como indicador de malas condiciones orales y pérdidas dentarias) y el uso diario de colutorios son causas independientes del cáncer de cabeza y cuello y de esófago.

Marques y cols. (42) en un estudio sobre 309 casos (198 pacientes con carcinoma oral de células escamosas y 111 con cáncer de faringe) y 468 controles, concluyeron que el sangrado gingival, la ausencia de atención dental y el uso diario de colutorios se asociaban con el cáncer oral independientemente del consumo de tabaco y alcohol.

Uno de los meta-análisis más recientes sobre la relación entre el alcohol que contiene los enjuagues bucales y el cáncer oral realizado por La Vecchia (43) llegó a la conclusión de que la asociación entre colutorios con alcohol y el cáncer oral no podía sostenerse por la evidencia científica.

-Otras revisiones de Elmore y Horowitz (44) y Cole y cols. (128) también llegaron a la conclusión de que la evidencia epidemiológica disponible no hizo admisible un vínculo entre el alcohol que contienen los enjuagues bucales y el cáncer oral.

Sin embargo, hay varios estudios que no concuerdan con estas conclusiones. Un artículo de revisión por McCullough y Farah en 2008, (45) llegaron a la conclusión de que hay suficiente evidencia para aceptar la proposición de que el desarrollo de cáncer oral, se ve aumentado o contribuido a por el uso de alcohol que contienen los colutorios. Ellos recomiendan que el uso de enjuagues bucales que contienen alcohol deba limitarse a situaciones terapéuticas por un período limitado y controlado de tiempo.

Dos estudios multicéntricos de casos y controles llevados a cabo en 2007 en Europa Central y América del Sur también hallaron que el uso diario de colutorios dos veces al día aumentaba

significativamente el riesgo de cáncer oral entre fumadores y ex fumadores y bebedores, así como entre los abstemios de alcohol (41).

Lachnmeier (46) encontró que el contenido en saliva de acetaldehído tras el empleo de enjuagues bucales se encontraba por encima de los niveles endógenos, y correspondían a concentraciones normales encontradas tras el consumo de bebidas alcohólicas.

Poggi y cols. (47) también desaconsejan el uso de enjuagues bucales que contienen alcohol debido al desequilibrio metabólico enzimático presente en la boca humana durante la oxidación del alcohol, lo que conduce a la acumulación de acetaldehído, el cual es tóxico e irritante para la mucosa oral.

Con estos resultados no queda claro si el uso de colutorios per se o factores relacionados con su uso intervienen en la asociación con el cáncer oral (3).

En una revisión de la American Dental Association en Marzo de 2009 (144) se encontró que las investigaciones tendrían que cumplir con ciertos criterios antes de que la comunidad científica aceptara una relación causal entre el alcohol que contienen los enjuagues bucales y el cáncer oral. Estos se definen por criterios de causalidad de Bradford Hill:

- Fuerza, que se define por el tamaño de la asociación.
- Relación temporal, es decir, el uso del enjuague bucal debe preceder a la aparición de cáncer oral.
- Relación dosis-respuesta, es decir, los enjuagues bucales con más alcohol o cuando se utiliza con mayor frecuencia se asocian con una mayor incidencia de cáncer oral.
- Consistencia, es decir, el efecto ha sido observado consistentemente en diversos estudios con diferentes poblaciones.
- Consideración de explicaciones alternativas, por ejemplo, las variables de confusión.
- Plausibilidad biológica, es decir, el evento se define por el mecanismo de acción del fármaco.

Ninguno de estos criterios se ha cumplido en los estudios publicados hasta la fecha. La fuerza de la asociación es débil, no se sabe si el uso de enjuague bucal precede al desarrollo de cáncer oral, los estudios no han encontrado una relación dosis-respuesta, los resultados entre los diferentes estudios y poblaciones de los estudios son inconsistentes, existen explicaciones alternativas y el mecanismo de acción no está definido.

Estos resultados contradictorios pueden ser explicados por deficiencias en el diseño del estudio. Por ejemplo, estos estudios:

-Se han basado en encuestas o entrevistas de los sujetos.

-No se ha documentado de forma adecuada la exposición a factores de riesgo conocidos, como el consumo de alcohol y de tabaco.

-Se carece de información sobre el inicio, duración, frecuencia y tipo de enjuague bucal utilizado.

Otra consideración importante es que los sujetos pueden recurrir al enjuague bucal para enmascarar el alcohol y el tabaco, los cuales son factores de riesgo para el desarrollo del cáncer oral. Los enjuagues también pueden utilizarse en respuesta a los síntomas y efectos secundarios del tratamiento del cáncer oral ya existente. Tales factores de confusión pueden explicar por qué algunos estudios encuentran una asociación entre el alcohol que contienen los enjuagues bucales y el cáncer oral.

En respuesta a estas deficiencias en los estudios mencionados:

1. Nuestro estudio fue llevado a cabo en la Unidad de Medicina Bucal del Departamento de Estomatología de la Universidad de Valencia, en el período comprendido entre el año 2009-2010. En todos los pacientes se valoró el estado de las mucosas orales, el estado dental, el grado de higiene oral y el estado periodontal al mes de iniciar el tratamiento del producto evaluado, a los tres y seis meses realizando el mismo procedimiento de exploración clínica.

2. No se incluyeron en el estudio personas con factores de riesgo para el desarrollo de algún proceso patológico; como personas fumadoras o exfumadoras en los últimos 5 años o bebedoras habituales de alcohol en exceso; así como aquellas que tuvieran lesiones en la mucosa oral en el momento del estudio o previamente.

3. El periodo del estudio fue de 6 meses para todos los pacientes. Las pautas recomendadas para el empleo del producto se dieron por escrito a cada uno de los pacientes incluidos en estudio. Se empleo un colutorio comercializado con el nombre de Listerine® (para el *grupo de estudio*) y un placebo (para *el grupo control*), cuya composición y concentración de alcohol eran conocidas.

Respecto al efecto de los colutorios sobre las variables dentales y periodontales, estudios epidemiológicos han revelado una correlación particularmente alta entre los niveles de placa supragingival y la gingivitis crónica, y la investigación clínica permitió comprobar que la placa es el principal factor etiológico de la inflamación gingival (145, 146).

Existen evidencias de que una mejora de la higiene bucal y la salud gingival está asociada a una reducción en la incidencia de enfermedad periodontal. Por lo tanto, el control de la placa supragingival es fundamental para la prevención y el manejo de las enfermedades periodontales.

El soporte principal del control de la placa supragingival ha sido la eliminación regular de la placa mediante métodos mecánicos. La limpieza mecánica regular de los dientes está orientada a mantener un nivel de placa que sea compatible cuantitativa y cualitativamente con la salud gingival, y no a liberar de bacterias la superficie dental. El uso de productos químicos como método auxiliar de la limpieza mecánica aparece como una forma de superar las deficiencias en los hábitos de higiene dental mecánica. A pesar de la naturaleza ideal de la pasta dentífrica como vehículo, la mayor parte de los agentes para el control químico de la placa fueron evaluados y luego formulados en colutorios. Éstos varían en cuanto a sus componentes, pero son menos complejos que las pastas dentífricas. Pueden ser simples soluciones acuosas, pero la necesidad de que los productos que adquiere el público sean estables y de gusto aceptable requiere a menudo el agregado de saporíferos, colorante y perseverantes. Por lo común se usa alcohol etílico tanto para estabilizar ciertos ingredientes activos como para mejorar la duración del producto (146). La eliminación diaria de la placa dental supragingival es un factor importante en la prevención de la caries, gingivitis y periodontitis. El control apropiado de la placa bacteriana se obtiene a través de la eliminación mecánica de la biopelícula a través del uso adecuado del cepillo e hilo dental. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el tiempo medio de cepillado de las superficies de los dientes es menor que la que se requiere para obtener una limpieza adecuada, (147, 148) y sólo el 2-10% de los pacientes usan el hilo dental con regularidad y eficacia.

Los estudios han demostrado la eficacia y la utilidad de los enjuagues bucales antisépticos que contienen ingredientes activos como la clorhexidina y los aceites esenciales para prevenir y controlar la formación de placa bacteriana y gingivitis, cuando se utiliza de forma complementaria a los procedimientos mecánicos (149-151).

Los colutorios de aceites esenciales se utilizan desde hace muchos años en la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal. La eficacia del enjuague bucal de aceites esenciales en el control la placa bacteriana se ha demostrado en numerosos ensayos clínicos, tanto de largo como de corto plazo. En estudios a corto plazo (152-155), se redujo significativamente la acumulación de placa. Sin embargo, cuando el éste enjuague se comparó con la formulación de clorhexidina, este último mostró un mejor efecto antiplaca (147). En contra a esto, estudios recientes (156, 157) han demostrado que el enjuague de aceites esenciales es tan eficaz como la clorhexidina inhibiendo la placa bacteriana. En una reciente revisión sistemática de la literatura, los autores concluyeron que aunque la clorhexidina tenga un mayor efecto sobre el control de la placa bacteriana, no existen diferencias en el control de la inflamación gingival (158). En estudios a largo plazo que variaron de 3 a 9 meses también se ha visto la eficacia de los

enjuagues de aceites esenciales empleado como suplemento a las medidas de higiene oral mecánicas cuando se comparo con un placebo (120, 159-162).

Los colutorios de aceites esenciales tradicionalmente contenían etanol en su composición. Recientemente se han incorporado al mercado Europeo los colutorios de aceites esenciales sin alcohol. Marchetti y cols. (147) en su estudio evalúan la eficacia de los colutorios de aceites esenciales sin alcohol respecto al enjuague bucal tradicional que contiene un 21.3% de etanol. Los resultados de su estudio mostraron que existía una diferencia modesta aunque estadísticamente significativa en cuanto a su eficacia en el control de la placa bacteriana de los colutorios de aceites esenciales con alcohol respecto a los colutorios sin alcohol.

Aunque existe una gran variedad de productos reconocidos como beneficiosos en la prevención de la formación de placa bacteriana y de la gingivitis, los que están aceptados como mas eficaces son aquellos que contienen digluconato de clorhexidina al 0.12% (9, 19, 145, 163-167). Sin embargo estos colutorios producen efectos indeseables como tinción en los dientes y en la lengua, alteraciones en el sabor y aumento en la formación de cálculo. Ha sido ampliamente utilizado durante años en Europa y en otros lugares en forma de enjuagues bucales (0,2%), barniz, gel dentífrico, y goma de mascar (6).

Wu y cols. (6) en su revisión describen la combinación de cuatro ingredientes activos, timol (0.064%), mentol (0.042%), eucaliptol (0.092%) y salicilato de metilo (0.060%) y como ingrediente inactivo alcohol en una concentración del 26.9% (Listerine®) como uno de los productos mas antiguos existentes en el mercado.

Gran parte de la evidencia sobre su seguridad se ha basado en más de 100 años de uso y por la baja incidencia de quejas por parte de los consumidores según lo informado por el fabricante. Los cuatro aceites esenciales han sido revisados de forma individual y han sido descritos como seguros por el Review Panel on over-the-counter Dentifrice and Dental Care Drug Products (FR 47 22829) y por the Flavor and Extract Manufacturer's Association de los Estados Unidos. Se considera seguro para uso tópico en las membranas mucosas de la cavidad oral y de la garganta en forma de enjuague, gárgaras o pulverización a concentraciones de 0,04 a 2,0% para el mentol, 0,025 a 0,1% para el eucaliptol, y hasta 0,4% para el salicilato de metilo. Los estudios toxicológicos han demostrado que los cuatro ingredientes, cuando se combinaban son seguros y no se afecta negativamente la actividad de cualquier ingrediente activo de forma individual.

Esto ha sido revisado y confirmado por numerosos estudios clínicos a largo plazo que demostraron que no se producía ningún cambio patológico o reacciones adversas en los usuarios (6, 159, 161). Estos datos coinciden con los de nuestro estudio, ya que en el grupo de estudio, (Listerine®), no se observó ningún cambio sustancial tras la toma del colutorio.

Se han realizado numerosos ensayos clínicos, aleatorizados a largo plazo (6 meses o más) para evaluar la eficacia antiplaca y antigingivitis de los colutorios Listerine®. La reducción de la placa bacteriana osciló entre 20 y el 34% y la reducción de la gingivitis entre el 28 y el 34% tras el cepillado dental seguido del uso del colutorio Listerine® (6, 168, 169). Tanto estadísticamente, como clínicamente la reducción en el índice de placa, índice gingival e índice de sangrado fue significativo en el grupo de Listerine® frente al grupo placebo (170, 171), datos que coinciden con los resultados de nuestro estudio, en el que se apreció una reducción significativa en los valores de índice de placa, índice de sangrado, pérdida de inserción y profundidad de bolsa. Además, tiene un potente efecto bactericida tanto para bacterias que se encuentran en saliva como para las de la placa dental, muchas de las cuales se destruyen y mueren a los 30 segundos de exposición a Listerine® (172). Su efecto bactericida ha quedado probado recientemente al realizar un recuento de bacterias vivas. Tras 24 horas de ausencia de higiene, se realizó enjuague de 30 segundos con Listerine® o con solución acuosa de control. Con Listerine® el 78,7% de las bacterias estaban muertas frente al 27,9% del grupo control (173).

- A fin de cumplir los requisitos de la FDA con respecto a las combinaciones de los ingredientes activos, el fabricante presentó datos que demostraban que cada uno de los cuatro aceites esenciales contribuía a la actividad antibacteriana y que la eliminación de cualquiera de los cuatro ingredientes activos daría lugar a una reducción estadísticamente significativa en la actividad bactericida frente a patógenos orales. Basándose en los datos presentados, el subcomité de la FDA llegó a la conclusión de que la combinación fija de aceites esenciales que contienen timol, mentol, eucaliptol y salicilato de metilo es seguro y efectivo como agente antigingivitis y antiplaca (173).

En un meta-análisis de estudios de larga duración (6 meses) sobre agentes antiplaca y antigingivitis en 2006, se evaluó en primer lugar el efecto antiplaca de tres ingredientes activos en los colutorios; de la clorhexidina, del cloruro de cetilpiridinio (CPC) y de los aceites esenciales.

Respecto a los estudios sobre la clorhexidina al 0.12%, todos mostraron resultados estadísticamente significativos en cuanto a efecto antiplaca. Sobre el cloruro de cetilpiridinio existía una gran heterogeneidad tanto en las concentraciones de CPC como en los resultados obtenidos mostrando algunos un efecto antiplaca (174-176) y otros no. Sobre los estudios que evaluaban los enjuagues bucales que contenían aceites esenciales, sólo una no mostró significación estadística; por tanto los resultados mostraron un claro efecto antiplaca de estos ingredientes activos. El efecto antigingivitis también fue demostrado con la clorhexidina al 0.12% y con los aceites esenciales (177).

De acuerdo con los resultados de esta revisión, hay una fuerte evidencia sobre el uso de agentes químicos sumado a los métodos mecánicos de cepillado y uso de hilo dental en adultos para controlar la placa y la gingivitis. Añadir un agente químico en la higiene dental diaria ayuda a reducir la inflamación gingival. El objetivo de estos agentes es reducir o prevenir la enfermedad periodontal, sin embargo, son necesarios más estudios que demuestren que el uso de estos agentes resulte en una menor prevalencia la gravedad de enfermedad periodontal (161, 178, 179).

Como resumen de nuestros hallazgos en la presente investigación y tras el análisis de las variables citológicas de los pacientes de nuestro estudio, no existían diferencias significativas en ninguna de estas entre antes y después de la toma del enjuague, ya sea Listerine® o placebo, lo que indica que en ninguna de las medidas citológicas se produce un cambio sustancial después de la toma del colutorio.

Sin embargo en el análisis de las variables gingivales y periodontales de los pacientes de estudio, se observó una reducción significativa en los valores pérdida de inserción, índice de sangrado, índice de placa y profundidad de la bolsa tras la toma del colutorio, tanto en el grupo de estudio (Listerine®), como en el grupo control (placebo); por tanto, como los valores de estas medidas se pueden considerar iguales en ambos grupos, se concluye que dicha reducción es independiente de si es Listerine® o placebo.

CONCLUSIONES

1- Al realizar el análisis de las posibles alteraciones citológicas en un grupo de pacientes que emplearon un colutorio con alcohol (Listerine®) tras seis meses de su empleo, no constatamos diferencias significativas entre el momento basal y al finalizar el estudio.

2- En nuestro estudio no constatamos cambios clínicos en la mucosa oral de los pacientes que utilizan el colutorio Listerine ®, comparado con el grupo que emplean un colutorio sin contenido alcohólico.

3- No existieron, en nuestros pacientes, diferencias entre la tasa de respuesta inicial (antes del empleo del colutorio) y la tasa de respuesta final (después del empleo del colutorio) en las variables citológicas analizadas, lo que nos permite concluir que, en nuestros pacientes, los colutorios con alcohol no produjeron alteraciones citológicas en las células epiteliales de la mucosa oral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez de Ferraris M^a. E, Campos Muñoz A, eds. *Histología y embriología bucodental*. 2^a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2002. p.113 – 129.
2. Chimenos-Küstner E, Font-Costa I, López-López J. Oral cancer risk and molecular markers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004;9:381-4; 377-80.
3. Carretero-Peláez M^a A, Esparza-Gómez GC, Figuero-Ruiz E, Cerero-Lapiedra R. Alcohol-containing mouthwashes and oral cáncer Critical analysis of literature. *Med Oral*. 2004;9:116-23.
4. Fine DH. Chemical agents to prevent and regulate plaque development. *Periodontol 2000*. 1995;8:87-107.
5. Manau Navarro C, Guasch Serra S, eds. En: Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Majem LL, eds. *Odontología Preventiva y Comunitaria*. Barcelona: Masson S.A.; 2004.p. 69-80.
6. Wu CD, Savitt ED. Evaluation of the safety and efficacy of over-the-counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. *Periodontol 2000*. 2002;28:91-105.
7. Bascones-Martínez A, Figuero-Ruiz E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004;9.
8. Papapanou PN, Lindhe J, eds. *Epidemiología de las enfermedades periodontales*. En: Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Periodontología clínica e Implantología Odontológica*, 4^a.ed. Buenos Aires: Médica Panamericana S.A.; 2005.p. 51-53.
9. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000*. 1997 ;15:55-62.
10. Moran JM. Home-use oral hygiene products: mouthrinses. *Periodontol 2000*. 2008;48:42-53.
11. Rösing CK, Loesche W. Halitosis: an overview of epidemiology, etiology and clinical management. *Braz Oral Res*. 2011;25:466-71.
12. Chadwick B, Addy M, Walker DM. Hexetidine mouthrinse in the management of minor aphthous ulceration and as an adjunct to oral hygiene. *Br Dent J*. 1991;171:83-7.
13. Ellepola AN, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis*. 2001;7:11-7.
14. Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use. A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;80:432-9.
15. Kuyama K, Yamamoto H. A study of effects of mouthwash on the human oral mucosae: with special references to sites, sex differences and smoking. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1997;39:202-10.
16. Sissons CH, Wong L, Cutress TW. Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaques. *Arch Oral Biol*. 1996;41:27-34.

17. Bernstein ML, Carlish R. The induction of hyperkeratotic white lesions in hamster cheek pouches with mouthwash. *Oral Surg* 1979;48:517-22.
18. Moghadam BKH, Gier R, Thurlow T. Extensive Oral Mucosal Ulcerations Caused by Misuse of a Commercial Mouthwash. *Cutis* 1999;64:131-4.
19. Leyes JL, García L, López G, Rodríguez I, García M, Gallas M. Efficacy of Chlorhexidine Mouthrinses With and Without Alcohol: A Clinical Study. *J Periodontol* 2002;73:317-21.
20. Løe H. Present day status and direction for future research on the etiology and prevention of periodontal disease. *J Periodontol.* 1969;40:678-82.
21. Westermeyer RR, Terpolilli RN. Cardiac asystole after mouthwash ingestion: a case report and review of the contents. *Mil Med.* 2001;166:833-5.
22. Shulman JD, Wells LM. Acute ethanol toxicity from ingesting mouthwash in children younger than 6-years of age. *Pediatr Dent.* 1997;19:404-8.
23. Hornfeldt CS. A report of acute ethanol poisoning in a child: mouthwash versus cologne, perfume and after-shave. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1992;30:115-21.
24. Kowitz GM, Lucatorto FM, Cherrick HM. Effects of mouthwashes on the oral soft tissues. *J Oral Med.* 1976;31:47-50.
25. Bernstein ML. Oral mucosal white lesions associated with excessive use of Listerine mouthwash. Report of two cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;46:781-5.
26. Fisher AA. Contact stomatitis, glossitis, and cheilitis. *Otolaryngol Clin North Am.* 1974;7:827-43.
27. Lim J, Goh CL, Lee CT. Perioral and mucosal oedema due to contact allergy to proflavine. *Contact Dermatitis.* 1991;25:195-6
28. Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:774-81.
29. Petti S, Scully C. Oral cancer: the association between nationbased alcohol-drinking profiles and oral cancer mortality. *Oral Oncol* 2005;41:828e34.
30. Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol.* 1998;34:441-7.
31. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48:3282-7.
32. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2004;108:741-9.

33. Weaver A, Fleming SM, Smith DB, Park A. Mouthwashes and oral cancer: carcinogen or coincidence?. *J Oral surgery*. 1979;37:250-3.
34. Blot WJ, Winn DM, Fraumeni JF Jr. Oral cancer and mouthwash. *J Natl Cancer Inst*. 1983;70:251-3.
35. Wynder EL, Kabat G, Rosenberg S, Levenstein M. Oral cancer and mouthwash use. *J Natl Cancer Inst*. 1983;70:255-60.
36. Mashberg A, Barsa P, Grossman ML. A study of the relationship between mouthwash use and oral and pharyngeal cancer. *J Am Dent Assoc*. 1985;110:731-4.
37. Kabat GC, Hebert JR, Wynder EL. Risk factors for oral cancer in women. *Cancer Res*. 1989;49:2803-6.
38. Winn DM, Diehl SR, Brown LM, Harty LC, Bravo-Otero E, Fraumeni JF Jr, et al. Mouthwash in the etiology of oral cancer in Puerto Rico. *Cancer Causes Control*. 2001;12:419-29.
39. Winn DM, Blot WJ, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1991;51:3044-7.
40. Morse DE, Katz RV, Pendrys DG, Holford TR, Krutchkoff DJ, Eisenberg E, et al. Mouthwash use and dentures in relation to oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol*. 1997;33:338-43.
41. Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2007;166:1159-73.
42. Marques LA, Eluf-Neto J, Figueiredo RA, Góis-Filho JF, Kowalski LP, Carvalho MB, et al. Oral health, hygiene practices and oral cancer. *Rev Saude Publica*. 2008;42:471-9.
43. La Vecchia C. Mouthwash and oral cancer risk: an update. *Oral Oncol* 2009;45:198e200.
44. Elmore JG, Horwitz RI. Oral cancer and mouthwash use: evaluation of the epidemiologic evidence. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:253e61.
45. McCullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Aust Dent J*. 2008;53:302-5.
46. Lachenmeier DW, Gumbel-Mako S, Sohnius EM, Keck-Wilhelm A, Kratz E, Mildau G. Salivary acetaldehyde increase due to alcohol-containing mouthwash use: a risk factor for oral cancer. *Int J Cancer*. 2009;125:730-5.
47. Poggi P, Rodriguez y Baena R, Rizzo S, Rota MT. Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 2003;74:623-9.
48. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 2009 ;15:388-99.

49. Figuero Ruiz E, Carretero Peláez MA, Cerero Lapiedra R, Esparza Gómez G, Moreno López LA. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. *Med Oral*. 2004;9:14-23.
50. Eriksson CJ. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25:15-32.
51. Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Väkeväinen S, Wang XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25:137-143.
52. Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncology* 2001;37:153-8.
53. Peter CJ. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol. *Alcoholism. Clinical and experimental Research* 2001; 25:15-32.
54. Contreras Vidaurre EG, Bagán Sebastián JV, Gavalda C, Torres Cifuentes EF. Retinoids: application in premalignant lesions and oral cancer. *Med Oral*. 2001;6:114-23.
55. Schwartz SM, Doody DR, Fitzgibbons ED, Ricks S, Porter PL, Chen C. Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10:1137-44.
56. Ogden GR, Wight AJ. Aetiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998;36:247-51.
57. Bagán Sebastián JV. Carcinoma oral de células escamosas. En: Bagán Sebastián JV, ed. *Medicina Bucal*. Valencia: Medicina Oral, S.L.; 2008.p. 153-55.
58. Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16 :e306-11.
59. Manau Navarro C, Guasch Serra S, eds. En: Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Majem LL, eds. *Odontología Preventiva y Comunitaria*. Barcelona:Masson S.A.; 2004.p. 69-80.
60. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol*. 2005;41:244-60.
61. Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol*. 2008;44:103-8.
62. Nieminen MT, Uittamo J, Salaspuro M, Rautemaa R. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non-*Candida albicans* yeasts in vitro. *Oral Oncol*. 2009;45:e245-8.
63. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91:622-35.

64. Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head Face Med.* 2010;6:14.
65. Shillitoe EJ. The role of viruses in squamous cell carcinoma of the oropharyngeal mucosa. *Oral Oncol.* 2009;45:351-5.
66. Bagan JV, Jiménez Y, Murillo J, Poveda R, Diaz JM, Gavaldá C, et al. Epstein- Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13:E110-3.
67. Nagao T, Ikeda N, Warnakulasuriya S, Fukano H, Yuasa H, Yano M, et al. Serum antioxidant micronutrients and the risk of oral leukoplakia among Japanese. *Oral Oncol.* 2000;36:466-70.
68. Kim J, Shin DM, El-Naggar A, Lee JS, Corrales C, Lippman SM, et al. Chromosome polysomy and histological characteristics in oral premalignant lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:319-25.
69. Dabelsteen E, Roed-Petersen B, Smith CJ, Pindborg JJ. The limitations of exfoliative cytology for the detection of epithelial atypia in oral leukoplakias. *Br J Cancer.* 1971;25:21-4.
70. Hayama FH, Motta AC, Silva Ade P, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10:115-22.
71. Diniz-Freitas M, García-García A, Crespo-Abelleira A, Martins- Carneiro JL, Gándara-Rey JM. Aplicaciones de la citología exfoliativa en el diagnóstico del cáncer oral. *Med Oral* 2004;9:355-61.
72. Acha A, Ruesga MT, Rodríguez MJ, Martínez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10:95-102.
73. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *An Sist Sanit Navar.* 2005;28:227-36.
74. Countryman PI, heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.* 1976; 41: 321-332.
75. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985; 147: 29-36
76. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res.* 1993; 285: 35-44.
77. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000; 455: 81-95.

78. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 1999; 428: 271-283.
79. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, et al. HUman MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen.* 2001; 37: 31-45.
80. Rosin MP. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat Res.* 1992;267:265-76.
81. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271:69-77.
82. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008;659:93-108.
83. Kirsch-volders M, Vanhauwaert A, De boeck M, Decordier I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat Res* 2002; 504: 137-148.
84. Stich HF, Dunn BP. DNA adducts, micronuclei and leukoplakias as intermediate endpoints in intervention trials. *IARC Sci Publ.* 1988:137-45.
85. Stich HF, Stich W, Rosin MP. The micronucleus test on exfoliated human cells. *Basic Life Sci.* 1985;34:337-42.
86. Stich HF, Rosin MP. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Lett.* 1984 ;22:241-53.
87. Migliore L, Guidotti P, Favre C, Nardi M, Sessa MR, Brunori E. Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutat Res.* 1991; 263: 243-248.
88. Yager JW, Sorsa M, Selvin S. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs. *IARC Sci Publ.* 1988; 89: 213-216.
89. Bolognesi C, Perrone E, Landini E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis.* 2002; 17: 391-397.
90. Maffei F, Angelini S, Forti GC, Lodi V, Violante FS, Mattioli S, et al. Micronuclei frequencies in hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: influence of smoking status and other factors. *Mutagenesis.* 2002; 17: 405-409.
91. Lucero L, Pastor S, Suárez S, Durbán R, Gómez C, Parrón T, et al. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccalepithelial cells. *Mutat Res.* 2000; 464: 255-262.

92. Siu WH, Mak E, Cao J, De luca-abbott SB, Richardson BJ, Lam PK. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environ Toxicol Chem.*2004; 23: 1317-1325.
93. Bukvic N, Gentile M, SUSca F, Fanelli M, Serio G, Buonadonna L, et al. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat Res.* 2001; 498: 159-167.
94. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011;728:88-97.
95. Landi S, Iazzolino E, Barale R. Are baseline frequencies of SCEs, CAs, and MN in human lymphocytes related to hematological values? *Mutat Res.* 2000; 469: 159-166.
96. Xue KX, Wang S, Ma GJ, Zhou P, Wu PQ, ZHANG RF, et al. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol- and teadrinking habits. *Int J Cancer.* 1992; 50: 702-705.
97. Lee BM, Lee SK, Kim HS. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, betacarotene and red ginseng). *Cancer Lett.* 1998; 132: 219-227.
98. Lee TK, Allison RR, O'brien KF, Khazanie PG, Johnke RM, Brown R, et al. Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. *Mutat Res.* 2004; 557: 75-84.
99. Li N, Sun Z, Han C, Chen J. The chemopreventive effects of tea on human oral precancerous mucosa lesions. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;220:218-24.
100. Barale R, Chelotti L, Davini T, Del ry S, Andreassi MG, Ballardini M, et al. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen.* 1998; 31: 228-242.
101. Au WW, Walker DM, Ward JB JR, Whorton E, Legator MS, Singh V. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutat Res.* 1991; 260: 137-144.
102. Nair U, Obe G, Nair J, Maru GB, Bhide SV, Pieper R, et al. Evaluation of frequency of micronucleated oral mucosa cells as a marker for genotoxic damage in chewers of betel quid with or without tobacco. *Mutat Res.* 1991;261:163-8.
103. Stich HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer.* 1983;31:305-8.
104. Tomanin R, Ballarin C, Nardini B, Mastrangelo G, Sarto F. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. *Mutagenesis.* 1991;6:123-6.

105. Ganguly BB. Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors: related to donor's age. *Mutat Res.* 1993; 295: 135-148.
106. Di giorgio C, De meo MP, Laget M, Guiraud H, Botta A, Dumenil G. The micronucleus assay in human lymphocytes: screening for interindividual variability and application to biomonitoring. *Carcinogenesis.* 1994; 15: 313-317.
107. Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res.* 2001; 491: 9-16.
108. Desai SS, Ghaisas SD, Jakhi SD, Bhide SV. Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. *Cancer Lett.* 1996;109:9-14.
109. Yildirim IH, Yesilada E, Yologlu S. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients. *Genetika.* 2006;42:705-10.
110. Bloching M, Hofmann A, Lautenschläger C, Berghaus A, Grummt T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncol.* 2000;36:550-5.
111. Burgaz S, Coskun E, Demircigil GC, Kocabas NA, Cetindag F, Sunter O, et al. Micronucleus frequencies in lymphocytes and buccal epithelial cells from patients having head and neck cancer and their first-degree relatives. *Mutagenesis.* 2011;26:351-6.
112. Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis.* 2007;22:371-9.
113. Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res.* 2008;638:37-47.
114. Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez AL, Muñoz-Magallanes T, et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res.* 2007;634:126-34.
115. Holland N, Hartz P, Golden D, Hubbard A, Wu YY, Bae J, et al. Cytogenetic damage in blood lymphocytes and exfoliated epithelial cells of children with inflammatory bowel disease. *Pediatr Res.* 2007;61:209-14.
116. Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, et al. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis.* 2011;26:239-45.

117. Fenech M, Holland N, Knasmueller S, Burgaz S, Bonassi S. Report on the buccal micronucleus assay workshop organized by the International Human Micronucleus (HUMN) project--Antalya, Turkey 2007. *Mutagenesis*. 2009;24:199-201.
118. Fenech M, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, et al. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells--a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. *Mutagenesis*. 2007 ;22:3-4. Epub 2006 Dec 9.
119. Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Chang WP, et al. HUman MicroNucleus project. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat Res*. 2003;534:45-64. Erratum in: *Mutat Res*. 2003;538:185-6.
120. Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;77:95-9.
121. Nersesyan A, Kundi M, Atefie K, Schulte-Hermann R, Knasmüller S. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1835-40.
122. Singh B, McKinney RV, Kolas S. Histochemistry of the keratohyalin granules in human oral leukoplakia. *J Oral Pathol*. 1975;4:59-66.
123. World Health Organization. WHO Oral Health- the CAPP Index. Significant Caries Index (selected countries) [citado 3 de jun. 2008]. Available: <http://www.whocollab.od.mah.se/index>.
124. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. ii. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964;22:121-35.
125. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta*. 1971;15:107-13.
126. Reidy J, McHugh E, Stassen LF. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon*. 2011;9:278-83.
127. Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol*. 2005;35:169-73.
128. Cole P, Rodu B, Mathisen A. Alcohol-containing mouthwash and oropharyngeal cancer: a review of the epidemiology. *J Am Dent Assoc*. 2003;134:1079e87.
129. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006;7:149-56.
130. Polesel J, Dal Maso L, Bagnardi V, Zucchetto A, Zambon A, Levi F, La Vecchia C, Franceschi S. Estimating dose-response relationship between ethanol and risk of cancer using regression spline models. *Int J Cancer*. 2005 May 1;114:836-41.

131. Marshall JR, Graham S, Haughey BP, Shedd D, O'Shea R, Brasure J, Wilkinson GS, West D. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1992;28B:9-15.
132. Pham CL, Wood AJ, Lambert MB, Carpenter W. Palatal erythema in patients using Listerine Cool Mint PocketPaks Oral Care Strips: case reports. *J Dent Child (Chic).* 2005;72:52-5.
133. Reis SR, do Espírito Santo AR, Andrade MG, Sadigursky M. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Braz Oral Res.* 2006;20:97-102.
134. Beliën JA, Copper MP, Braakhuis BJ, Snow GB, Baak JP. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis.* 1995;16:2395-400.
135. Castro R, Ramírez V, Cuenca P. Micronuclei and other nuclear abnormalities in the oral epithelium of female workers exposed to pesticides. *Rev Biol Trop.* 2004;52:611-21.
136. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:777-89.
137. Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med.* 2000;29:80-5.
138. Medeiros AC, Pizzamiglio E, Dobrinsky L, Amenabar JM, Lazzaron M, Dias HE. Alterations of the oral mucous membrane caused by the association between tobacco and the mouthwashes with an alcohol concentration of 26.9 %. *Rev Cubana Estomatol.* 2006; 43.
139. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis.* 2001;7:349-54.
140. Lemos CA Jr, Villoria GE. Reviewed evidence about the safety of the daily use of alcohol-based mouthrinses. *Braz Oral Res.* 2008;22:24-31.
141. Young TB, Ford CN, Brandenburg JH. An epidemiologic study of oral cancer in a statewide network. *Am J Otolaryngol.* 1986;7:200-8.
142. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer.* 1984;53:563-8.
143. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79:321-9.
144. American Dental Association. Science brief on alcohol-containing mouthrinses and oral cancer. March 2009.

145. Løe H, Theilade E, Jensen SB. experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965;36:177-87.
146. Lindhe J, Karring T, Lang NP eds. *Uso de antisépticos en la terapia periodontal.* 4^a ed. Addy M editor. En: *Periodontología clínica e Implantología Odontológica.* Editorial Medica panamericana. P:487-500.
147. Marchetti E, Mummolo S, Di Mattia J, Casalena F, Di Martino S, Mattei A, Marzo G. Efficacy of essential oil mouthwash with and without alcohol: a 3-day plaque accumulation model. *Trials.* 2011;12:262.
148. Beals D, Ngo T, Feng Y, Cook D, Grau DG, Weber DA. Development and laboratory evaluation of a new toothbrush with a novel brush head design. *Am J Dent.* 2000;13:5A-14A.
149. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Goldsmith D, Charles CH, Lisante TA, et al. Effect of an essential oil-containing antimicrobial mouthrinse on specific plaque bacteria in vivo. *J Clin Periodontol.* 2007;34:652-7.
150. 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;132:670-5.
151. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and anti-gingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2004;31:878-84.
152. Brex M, Netuschil L, Reichert B, Schreil G. Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. *J Clin Periodontol.* 1990;17:292-7.
153. Brex M, Brownstone E, MacDonald L, Gelskey S, Cheang M. Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses as supplements to regular tooth cleaning measures. *J Clin Periodontol.* 1992;19:202-7.
154. Moran J, Addy M, Newcombe R, Warren P. The comparative effects on plaque regrowth of phenolic chlorhexidine and anti-adhesive mouthrinses. *J Clin Periodontol.* 1995;22:929-34.
155. Moran J, Addy M, Kohut B, Hovliaras CA, Newcombe RG. Efficacy of mouthrinses in inhibiting the development of supragingival plaque over a 4-day period of no oral hygiene. *J Periodontol.* 1994;65:904-7.
156. Rosin M, Welk A, Kocher T, Majic-Todt A, Kramer A, Pitten FA. The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol.* 2002;29:392-9.
157. Riep BG, Bernimoulin JP, Barnett ML. Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse. *J Clin Periodontol.* 1999;26:164-8.

158. Van Leeuwen MP, Slot DE, Van der Weijden GA. Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *J Periodontol.* 2011;82:174-94.
159. DePaola LG, Overholser CD, Meiller TF, Minah GE, Niehaus C. Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol.* 1989;16:311-5.
160. Overholser CD, Meiller TF, DePaola LG, Minah GE, Niehaus C. Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1990;17:575-9.
161. Sharma N, Charles CH, Lynch MC, Qaqish J, McGuire JA, Galustians JG, et al. Adjunctive benefit of an essential oil-containing mouthrinse in reducing plaque and gingivitis in patients who brush and floss regularly: a six-month study. *J Am Dent Assoc.* 2004;135:496-504.
162. Gordon JM, Lamster IB, Seiger MC. Efficacy of Listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1985;12:697-704.
163. Renton-Harper P, Addy M, Moran J, Doherty FM, Newcombe RG. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. *J Periodontol.* 1996;67:486-9.
164. Eldridge KR, Finnie SF, Stephens JA, Mauad AM, Munoz CA, Kettering JD. Efficacy of an alcohol-free chlorhexidine mouthrinse as an antimicrobial agent. *J Prosthet Dent.* 1998;80:685-90.
165. Albandar JM, Gjermo P, Preus HR. Chlorhexidine use after two decades of over-the-counter availability. *J Periodontol.* 1994;65:109-12.
166. Addy M, Moran JM. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontol 2000.* 1997;15:52-4.
167. Lang NP, Brex MC. Chlorhexidine digluconate – an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res.* 1986; **21**(suppl 16): 74–89.
168. Fine JB, Harper DS, Gordon JM, Hovliaras CA, Charles CH. Short-term microbiological and clinical effects of subgingival irrigation with an antimicrobial mouthrinse. *J Periodontol.* 1994;65:30-6.
169. Fornell J, Sundin Y, Lindhe J. Effect of listerine on dental plaque and gingivitis. *Scand J Dent Res.* 1975;83:18-25.
170. Minah GE, DePaola LG, Overholser CD, Meiller TF, Niehaus C, Lamm RA, et al. Effects of 6 months use of an antiseptic mouthrinse on supragingival dental plaque microflora. *J Clin Periodontol.* 1989;16:347-52.
171. Walker CB. Microbiological effects of mouthrinses containing antimicrobials. *J Clin Periodontol.* 1988;15:499-505.

172. Kato T, Iijima H, Ishihara K, Kaneko T, Hirai K, Naito Y, et al. Antibacterial effects of Listerine on oral bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1990;31:301-7.
173. Pan P, Barnett ML, Coelho J, Brogdon C, Finnegan MB. Determination of the insitu bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol.* 2000;27:256-61. 14.
174. Allen DR, Davies R, Bradshaw B, Ellwood R, Simone AJ, Robinson R, et al. Efficacy of a mouthrinse containing 0.05 percent cetylpyridinium chloride for the control of plaque and gingivitis: a 6-month clinical study in adults. *Compend Contin Educ Dent.* 1998;19(supplement 2):20-6.
175. Stookey GK, Beiswanger B, Mau M, Isaacs RL, Witt JJ, Gibb R. A 6-month clinical study assessing the safety and efficacy of two cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Am J Dent* 2005;18(special number):24A-28A.
176. Mankodi S, Bauroth K, Witt JJ, Bsoul S, He T, Gibb R, et al. A 6-month clinical trial to study the effects of a cetylpyridinium chloride mouthrinse on gingivitis and plaque. *Am J Dent* 2005;18(special number):9A-14A.
177. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc.* 2006;137:1649-57.
178. Bauroth K, Charles CH, Mankodi SM, Simmons K, Zhao Q, Kumar LD. The efficacy of an essential oil antiseptic mouthrinse vs. dental floss in controlling interproximal gingivitis: a comparative study. *J Am Dent Assoc.* 2003;134:359-65.
179. Sharma NC, Charles CH, Qaqish JG, Galustians HJ, Zhao Q, Kumar LD. Comparative effectiveness of an essential oil mouthrinse and dental floss in controlling interproximal gingivitis and plaque. *Am J Dent.* 2002;15:351-5.