



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Estomatología

Unidad Docente de Medico-Quirúrgica

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UN NUEVO
COLUTORIO DE INHIBIR LA FORMACIÓN DE
CÁLCULO DENTAL SUPRAGINGIVAL**

TESIS DOCTORAL

Carla Fons Badal

2014

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UN
NUEVO COLUTORIO DE INHIBIR LA
FORMACIÓN DE CÁLCULO DENTAL
SUPRAGINGIVAL**

Memoria de investigación que presenta:

Carla Fons Badal

Para optar al Grado de Doctor en Odontología por la Universidad de
Valencia.

Director:

Prof. Dr. Francisco Alpiste Illueca



Universidad de Valencia

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Estomatología (Unidad Docente de Medico-Quirúrgica)

Valencia, 2014



Don Francisco Alpiste Illueca, profesor doctor contratado del Departamento de Estomatología de la Faculta de Medicina y Odontología de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UN NUEVO COLUTORIO DE INHIBIR LA FORMACIÓN DE CÁLCULO DENTAL SUPRAGINGIVAL”, de la que es autora Dña. Carla Fons Badal, ha sido realizada en este departamento bajo mi dirección y supervisión, reuniendo en su opinión todos los requisitos para ser presentada y defendida para la obtención del Grado de Doctor en Odontología por esta Universidad.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Valencia a 2 del mes de Abril de 2014

Fdo. Francisco alpiste Illueca



AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. Francisco Alpiste Illueca, agradecerle su ayuda y paciencia a la hora de dirigirme este trabajo. Agradecerle también el tiempo y esfuerzo dedicados.

Al Prof. Dr. Antonio Fons Font, porque además de ser un padre ejemplar, es un docente admirable y he podido contar con sus valiosos consejos y aportaciones.

Al Prof. Dr. Francisco Gil Loscos agradecerle su inestimable ayuda para llevar a cabo la metodología científica de este trabajo.

Al Prof. Dr. Pedro Buitrago Vera por contribuir con su especial visión científica a mirar siempre las cosas desde otro punto.

Al Prof. Dr. Carlos Lobaig Rueda agradecerle su comprensión y paciencia por el tiempo que he tenido que dedicar a este trabajo.

A mis compañeros de máster: M^a Salud Martí Magraner, Andrés López Roldán, Antonio Broseta Lleó y Juan Puchades Rufino porque durante la consecución de este trabajo nos hemos apoyado y sobretodo hemos pasado grandes momentos.

A los profesores y compañeros de Periodoncia, por enseñarme con generosidad y contagiarme la pasión que todos muestran hacia la profesión.

A los profesores y compañeros de la Unidad Docente de Prostodoncia y Oclusión por acogermme desde el primer momento y contagiarme la ilusión investigadora que se respira en la unidad.

Agradecer a los laboratorios que han realizado los análisis de la muestra de esta tesis, tanto el análisis químico en el Hospital Universitario La Fe de Valencia, como el microbiológico en el laboratorio Laboral (Barcelona, España). En especial a la Dra. Vanessa Blanc.



A Javi, el amor de mi vida, porque con su alegría hace que todo lo que compartimos sea el momento más feliz. Por ser la persona que hace que escribir la tesis doctoral se convierta en uno de esos momentos.

A mi madre, por confiar en mi y sentirse siempre orgullosa incluso antes de que las cosas sucedan. Por ser siempre un ejemplo constante de esfuerzo y superación.

A Sol, por apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por darme siempre prioridad absoluta cuando le pido ayuda.

A mi hermano, porque a pesar de su corta edad me ha enseñado muchas cosas.

A mi tía Loli y a mi tío José Antonio porque me han transmitido entre muchos otros valores la importancia de realizar una tesis doctoral.

A mi familia, por cuidarme siempre.

A mis amigos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	5
1. El cálculo dental.....	7
2. Mecanismos de formación del cálculo.....	10
3. Factores relacionados con la formación del cálculo	13
3.1 Factores derivados de la retención de placa bacteriana	13
3.2 Factores derivados de la composición de la placa bacteriana.....	14
3.3 Factores derivados de la saliva	20
a. Mecanismos de secreción	21
b. Funciones de la saliva	22
c. Factores que influyen en la secreción salival	24
d. Influencia en la formación de cálculo	27
d.1. Composición de la saliva.....	27
d.2. Las variaciones en pH	31
d.3. La presencia de ciertos enzimas	33
3.4 Factores derivados de la dieta	35
4. Índices de medición del cálculo.....	36
5. Cálculo y enfermedad periodontal.....	39
6. Cálculo y asociación a factores externos	41
7. Productos anticálculo.....	42
7.1. Disolver o reblandecer la fracción inorgánica del cálculo.....	43
7.2 Alterar la matriz del cálculo o su anclaje a la superficie dental.....	44
7.3 Prevenir la formación de placa	45
7.4 Inhibir la mineralización de la placa bacteriana.....	48
8. Efectividad de los productos anticálculo	55
9. Justificación de nuestro trabajo	58
3. Hipótesis de trabajo	59
4. Objetivos	63
5. Material y método	67
1. Muestra	69
2. Diseño del estudio.....	70

3. Composición de los colutorios.....	74
4. Recogida de datos	75
4.1 Variable generales.....	76
4.2 Examen periodontal del 5° sextante	77
4.3 Determinación de los parámetros salivales.....	78
a. Flujo salival el reposo	78
b. Determinación del pH.....	79
4.4 Análisis de la placa bacteriana supragingival	80
4.5 Magnitud del cálculo formado	81
a. Índice de Volpe-Manhold	81
b. Peso y volumen de cálculo	82
4.6 Análisis de tejidos y registros fotográficos	83
4.7 Percepción por parte del paciente de los efectos del colutorio	84
5. Análisis externos.....	85
5.1 Análisis químico de las muestras de saliva.....	85
5.2 Análisis de las muestras de placa bacteriana	86
6. Metodología estadística	94
6. Resultados.....	97
1. Influencia del colutorio sobre los parámetros salivares.....	101
1.1 Flujo salival 1 minuto	103
1.2 pH.....	105
1.3 Urea.....	105
1.4 Ácido úrico.....	106
1.5 Calcio	106
1.6 Fósforo	107
1.7 Sodio	107
1.8 Potasio.....	108
1.9 Cloro	109
Resumen de los parámetros salivares	109
2. Análisis bacteriológico de la placa bacteriana supragingival	110
2.1 Prevalencia pcr (reacción en cadena de la polimerasa)	110
2.2 Carga (qpcr)	112
a. Eubacterium saburreum	113
b. Corynebacterium matruchotti	114

c. Veillonella párvula.....	114
d. Streptococcus sanguis	115
e. Streptococcus salivarius	115
f. Streptococcus mutans.....	115
g. Resumen de los parámetros bacteriológicos.....	115
3. Magnitud de cálculo formado	116
3.1 Índice de Volpe-Manhold	117
3.2 Peso	118
3.3 Volumen.....	119
Resumen parámetros de cálculo	120
4. Influencia de otros factores en la formación de cálculo	122
4.1 Troneras	123
4.2 Distemas.....	125
4.3 Apiñamiento.....	127
4.4 Tabaquismo.....	129
5. Influencia del colutorio sobre mucosas y dientes	131
6. Percepción por parte del paciente del colutorio	133
Reflexión sobre los resultados	135
7. Discusión.....	137
7.1 Discusión de la metodología.....	140
7.2 Discusión de los resultados.....	146
8. Conclusiones.....	167
9. Bibliografía.....	171
10. Anexos.....	189
Anexo 1	189
Anexo 2.....	193
Anexo 3.....	201
Anexo 4.....	205
Anexo 5.....	209
Anexo 6.....	213
Anexo 7.....	223

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cálculo dental lo podemos definir como la consecuencia de la mineralización de la placa bacteriana. Supone un problema para la salud oral ya que incrementa la acumulación de placa y toxinas bacterianas e impide su adecuada eliminación debido a la rugosidad de su superficie; por ello va a obstaculizar que el paciente consiga una higiene efectiva y va a facilitar la formación de nueva placa (*Roberts-Harry y Clerehugh, 2000*).

Las principales enfermedades periodontales como la gingivitis y la periodontitis se han relacionado con el acúmulo de cálculo dental. Si bien inicialmente se sostenía que el cálculo era la causa principal de la enfermedad periodontal, tras numerosos estudios se vió que era la placa bacteriana el factor determinante en el desarrollo de dichas enfermedades (*Mandel y Gaffar, 1986*).

El objetivo del tratamiento periodontal consiste en eliminar los depósitos de placa bacteriana y los factores locales que favorecen su retención. El cálculo dental es uno de estos factores locales retentivos y, por tanto, su remoción supone uno de los objetivos principales del tratamiento. Para mantener en el tiempo los resultados obtenidos gracias al tratamiento periodontal, es necesaria la colaboración por parte del paciente mediante una higiene bucodental adecuada y la asistencia regular a las visitas de terapia de soporte periodontal.

Conocemos que el proceso de formación del cálculo dental no es uniforme para toda la población, existiendo una gran variabilidad en su aparición según los individuos. Ante dicho problema se han comercializado numerosos productos anticálculo en diferentes presentaciones (colutorios, pasta dentífrica, chicles, etc.) pero clínicamente

no se ha demostrado su eficacia, sobre todo en pacientes que forman cálculo con rapidez y necesitan, por tanto, una elevada frecuencia de mantenimientos.

En el presente trabajo realizaremos una revisión de los conocimientos acerca del cálculo dental y de los productos que disponemos en el momento actual empleados para evitar o retrasar su aparición. Asimismo, estudiaremos un producto (en forma de colutorio) que ha sido propuesto con acción anticálculo, y el beneficio que este pueda aportar a pacientes que forman cálculo de forma rápida.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. EL CÁLCULO DENTAL

Según el glosario de términos periodontales de la Academia Americana de Periodoncia (AAP), el cálculo dental se define como una concrecencia dura que se forma sobre los dientes o prótesis dentales a través de la calcificación de la placa bacteriana.

El cálculo, según su localización, se puede dividir en supragingival y subgingival según se encuentren por encima o debajo del margen gingival libre (*Glosario AAP, 2001*) (**Figuras 1 y 2**), y sus características variarán dependiendo de su ubicación. Aunque ambos son consecuencia de la mineralización de la placa bacteriana, el cálculo subgingival viene siempre asociado a patología destructiva, mientras que el supragingival no (*Schroeder et al., 1961*).

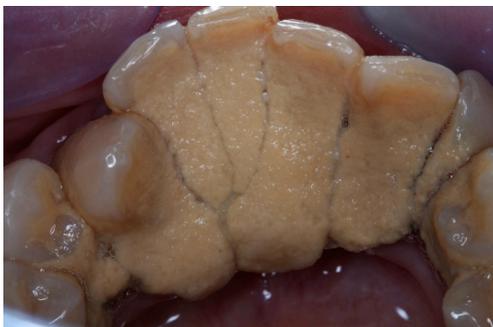


Figura 1. Cálculo supragingival



Figura 2. Cálculo subgingival

El cálculo **supragingival** tiene un color blanco amarillento, aunque puede presentar tinciones por tabaco, café, etc. Se forma por capas a través de la nucleación heterogénea y el crecimiento cristalino, (procedimientos de formación de cálculo que se explicarán posteriormente en el apartado 2), habiendo entre dichas capas gran heterogeneidad en su composición. Su contenido mineral supone un 37%, siendo predominante el fosfato octo-cálcico (cristales plaquetoides) que, sobretodo, se localiza en las capas externas,

mientras que en las internas predomina la hidroxiapatita (cristales arenosos o en varillas). También se puede apreciar bruxita, especialmente en el cálculo de reciente formación. Los microorganismos predominantes son los filamentosos (*Roberts-Harry y Clerehugh, 2000*).

En cuanto a su distribución, las zonas en las que se acumula el cálculo con más frecuencia corresponden a lingual de incisivos inferiores seguido de vestibular de molares superiores, lo cual coincide con la desembocadura de las glándulas submaxilares y la parótida a través de los conductos de Wharton y de Stenon respectivamente (*Davies et al., 1997*).

Dawes explica esta distribución irregular del cálculo mediante los cambios de pH que suceden en determinadas zonas de la cavidad oral. Debido al poco grosor de la placa en lingual de incisivos inferiores los ácidos formados se vierten fácilmente al exterior, donde la velocidad del recambio salival es más rápida. Esto promueve el aclaramiento del ácido de la placa, aporta urea y por tanto se eleva el pH de dicha placa. Estos factores hacen que cuando se ingiere un ácido, la curva de Stephan (describe los cambios de pH en la placa bacteriana en respuesta a estímulos) tenga una duración más corta y sea más plana, por tanto el pH de la placa lingual de incisivos inferiores tendrá un nivel crítico superior al de muchas otras regiones de la boca. Esto hace que el cálculo se deposite más fácilmente (*Dawes, 2006*).

El cálculo **subgingival** es de un color negro-amarronado y de aspecto rugoso. Su distribución se produce de forma aleatoria pudiendo adoptar diversas morfologías (saliente, finas láminas, espículas etc.). Se forma también a través de nucleación heterogénea y crecimiento cristalino; sin embargo su calcificación es más homogénea que en el supragingival. El contenido mineral es del 58% de media y el cristal

predominante es la widlokita en forma de pequeños cristales. Aparecen pocos microorganismos no calcificados: cocos, bacilos y pocos filamentosos (*Roberts-Harry y Clerehugh, 2000*).

Friskopp y Hammarström realizaron un análisis al microscopio de ambos tipos de cálculo para observar las diferencias, observando que el cálculo supragingival tenía la superficie más lisa y cristalina que el subgingival, en el que aparecían bandas agrupadas de varios tamaños. En cuanto a las bacterias, en el cálculo supragingival se encontraron bacterias filamentosas que formaban ángulo recto con su superficie, mientras que en el subgingival se observaron cocos, bacilos y bacterias filamentosas sobre la superficie (*Friskopp y Hammarström, 1980*).

En cuanto a la **composición química** del cálculo, es parecida a la del hueso, dentina o cemento radicular. Sin embargo, presenta una parte orgánica más irregular con microorganismos en su interior. En el cálculo supragingival destacan las sales inorgánicas como: 75% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 3% CaCO_3 , 4% $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, aunque también aparecen otros compuestos en pequeñas proporciones. El resto está compuesto por materia orgánica: proteínas y grasas (colesterol, ester de colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos), carbohidratos y agua. El contenido mineral del cálculo supragingival es menor que el del subgingival (*Glock y Murray, 1938*).

Mediante el espectroanálisis se ha observado que el cálculo está compuesto principalmente por calcio y fósforo y parece que la proporción es más alta cuanto más subgingivalmente se encuentra el mismo. En menor cantidad aparece magnesio, sodio, carbono, flúor, plomo y pequeñas concentraciones de metales, especialmente en el cálculo sobre prótesis y restauraciones metálicas. La concentración de carbono y manganeso es mayor en el cálculo supragingival, y la de calcio, magnesio y flúor

predomina en el cálculo subgingival, ya que la concentración de éstos últimos es mayor en el líquido crevicular que en la saliva (*Mandel y Gaffar, 1986; Little y Hazen, 1964*).

2. MECANISMOS DE FORMACIÓN DEL CÁLCULO

La formación de cálculo siempre está precedida por el depósito de placa bacteriana que actuará como matriz orgánica sobre la que se inicia la mineralización (*Mandel y Gaffar, 1986*). Los constituyentes inorgánicos del cálculo supragingival provienen de la saliva, y los del subgingival del fluido crevicular. Inicialmente, aparecen pequeños cristales en la matriz intermicrobiana en aposición cercana a las bacterias. Gradualmente, la matriz entre los microorganismos empieza a calcificarse y posteriormente son las bacterias las que se mineralizan. La primera evidencia de calcificación puede ocurrir a los pocos días de la acumulación de la placa (*Roberts-Harry y Clerehugh, 2000*). Muhlemann y Schoeder demostraron que la formación cristalina en la placa puede empezar a las 38 horas de haber realizado una profilaxis, y se puede observar cálculo bien calcificado en 12 días (*Muhlemann y Schoeder, 1964*).

La hipótesis más aceptada sobre el proceso de formación del cálculo indica que hay dos mecanismos: la nucleación (homogénea/heterogénea) y el crecimiento cristalino.

- Nucleación homogénea/heterogénea: la **nucleación homogénea** consiste en la formación de cristales debido a una gran concentración simultánea de iones afines que se agregan y precipitan de forma espontánea. Para que este proceso tenga lugar se necesita de una alta concentración iónica y gran aporte de energía, por lo que únicamente se va a poder dar este proceso en condiciones obtenidas *in vitro* en el laboratorio (*Sherman y Sobel, 1965*).

En la **nucleación heterogénea**, la agregación de iones se inicia por moléculas que los atraen (núcleos de calcificación). Así se aumenta localmente la concentración de iones hasta alcanzar la concentración necesaria y suficiente para que se produzca la agregación y formación de cristales. El acumulo de cristales formará pequeños núcleos calcificados que van a ir creciendo hasta unirse para formar una estructura calcificada macroscópica (*Sherman y Sobel, 1965*).

- **Crecimiento cristalino:** una vez se han formado los depósitos iniciales de cristales, éstos actuarán como nucleadores para los iones del medio oral. Por tanto los cristales ya formados irán aumentando de tamaño gracias a la precipitación progresiva de sales (*Sherman y Sobel, 1965*).

El ritmo de formación de cálculo tiene una gran **variabilidad individual**. Existen sujetos que a pesar de tener un buen control de placa acumulan cálculo con mucha rapidez. Esto supone que necesitan una frecuencia de visitas al odontólogo más elevada y resulta más difícil el control de las patologías periodontales.

En un estudio de Mandel se comparó la saliva de sujetos muy formadores (“heavy calculus formers”) y poco formadores de cálculo (“light calculus formers”). Dicha saliva se recogió mediante una modificación de la taza de Lashley (**Figuras 3 y 4**) y un colector de plástico preformado para cada individuo.



Figura 3. Taza Lashley



Figura 4. Taza Lashley

Se observó que la concentración de calcio de la saliva submaxilar era significativamente mayor en los muy formadores de cálculo que en los poco formadores, lo que podría ser la explicación para la gran cantidad de cálculo que se encuentra en la placa neoformada de lingual de incisivos inferiores en los sujetos muy formadores de cálculo. No encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al magnesio y el fósforo, pero sí apreciaron que los niveles de actividad de la lisozima submaxilar eran mayores en los poco formadores (*Mandel, 1974*).

En otro estudio, Slomiany analizó las diferencias en la composición de lípidos de la saliva parotídea en pacientes muy formadores de cálculo y poco formadores. Vio que los componentes que aparecían en mayor proporción en ambos grupos eran: ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol y gliceroglucolípidos. Sin embargo, en los muy formadores el nivel de ácidos grasos libres, de ésteres de colesterol y de gliceroglucolípidos estaba más elevado, una media del 60% más que en los poco formadores, en los que se observó mayor proporción de triglicéridos y colesterol libre (*Slomiany et al., 1981*).

3. FACTORES RELACIONADOS CON LA FORMACIÓN DE CÁLCULO

Se admite que hay una serie de factores que están relacionados con la formación de cálculo dental. Entre estos factores cabe destacar aquellos relacionados con el aumento de la retención de la placa bacteriana, factores relacionados con la composición de la saliva o del fluido crevicular, factores asociados a los microorganismos que componen la placa bacteriana y factores relacionados con la dieta. En los siguientes apartados se dará explicación a cada uno de ellos.

3.1. FACTORES DERIVADOS DEL AUMENTO DE RETENCIÓN DE PLACA BACTERIANA.

El cálculo dental es consecuencia de la mineralización de la placa bacteriana. Se han realizado estudios para analizar las repercusiones de una higiene inadecuada en la formación de cálculo. En un estudio a tres años realizado por Suomi, se comparó la cantidad de cálculo formado en dos grupos de individuos. Uno recibió instrucciones de higiene oral, se comprobó que los pacientes tenían un buen control de placa y se les realizaron profilaxis periódicas. Al otro grupo se les hizo únicamente una profilaxis inicial. A los tres años se vio que el segundo grupo tenía cuatro veces más cálculo subgingival que el primero, además de mayor inflamación y aumento de la pérdida de inserción. A la vista de los resultados concluyeron que era conveniente desarrollar programas basados en la mejora de higiene oral para un buen control de la enfermedad periodontal (*Suomi et al., 1971*).

Todos aquellos factores que faciliten el acúmulo de placa van a favorecer a su vez la formación de cálculo: coronas sobrecontorneadas, obturaciones desbordantes, superficies rugosas, apiñamiento dental, etc.

3.2 FACTORES DERIVADOS DE LA COMPOSICIÓN DE LA PLACA BACTERIANA

De la composición de la placa bacteriana, cabe destacar fundamentalmente la presencia de ciertas bacterias a las que se les ha atribuido un papel relevante en la formación del cálculo dental.

Para ver la relación entre las diferentes especies bacterianas y el cálculo dental son de gran relevancia los estudios de Sidaway. En 1978 estudió la calcificación in vitro de microorganismos presentes en el cálculo dental. Se cultivaron 35 microorganismos en un medio alcalino, cada día se recogía el material cementoide formado y lo observaban al microscopio (previa tinción de Von Kossa) para ver los depósitos calcificados. Durante un periodo de 7 a 17 días, de todos los microorganismos que se estudiaron, únicamente 16 produjeron depósitos calcificados. Los que mayor capacidad de producción de cálculo demostraron fueron los microorganismos gram-negativos (*Sidaway, 1978*). En esta tabla (**Tabla 1**) se relacionan los microorganismos estudiados con los días que tardaron en producir cálculo:

Días	Microorganismos
1	<i>Bastones Gram-negativo y B.matruchotii</i>
2	<i>E.corrodens, V.alcaescens, la sp. Campilobacter y E.saburreum</i>
3	<i>S.sanguis</i> (tipo I de Sherman)
4	<i>B.melaninogénicus, H.segnis, H.aphrophilus y A.naeslundii</i>
5	<i>Staph.epidermidis</i>
6	<i>N.pharingis y M.varians</i>
7	<i>S.salivarius</i>
9	Bastón catalasa positivo no identificado
14	<i>A.viscosus</i>

Tabla 1. Aparición de calcificaciones en los diferentes cultivos de microorganismos (Sidaway, 1978).

Posteriormente, en 1979, el mismo autor realizó un estudio en el que se comparó la capacidad de calcificación *in vitro* tanto de microorganismos vivos y como de microorganismos muertos. Volvieron a cultivar las mismas especies que en el estudio anterior vivas y muertas y las tiñeron nuevamente con la técnica de Von Kossa; de esta manera observaron la capacidad de calcificación. Para determinar el tipo de estructura cristalina que se formaba estudiaron el patrón de difracción con rayos X. Del total de los organismos estudiados dieron positivo para la capa de Von Kossa 23 de los muertos y 21 de los vivos y, por tanto, ambos fueron capaces de producir depósitos de cálculo. Sin embargo, los microorganismos muertos mantenían los niveles constantes de calcificación, mientras que la proporción de microorganismos calcificados vivos aumentaba poco a poco con el tiempo. Por tanto, para que se produzca la calcificación de la placa viva, ésta debe tener un espesor suficiente para que se produzca muerte de bacterias en profundidad y de esta forma mantener un nivel constante de calcificación. Gracias a la difracción con rayos X vieron que debido al tamaño cristalino no es posible que la calcificación se produzca en el interior de la bacteria, por ello se creyó que había

unas sustancias intermicrobianas que podrían inducir o inhibir la calcificación. Además, también se pudo apreciar en este estudio que los cristales formados en las bacterias vivas y muertas no eran iguales. En las vivas se observó principalmente hidroxiapatita, mientras que en la placa muerta se vio hidroxiapatita, fosfato octocálcico y brushita (Sidaway, 1979).

Previo al estudio de Sidaway, Ennever ya relacionó al *Bacterionema matruchotti* con la calcificación. El *B. matruchotti* forma depósitos intracelulares de fosfato cálcico, lo cual le confiere un patrón de refracción a los rayos X indistinguible de la apatita mineral ósea. Una porción de los fosfolípidos, un proteolípido, parece ser el responsable de que se inicie la calcificación en estos microorganismos. En este estudio se concluyó que, in Vitro, el nucleador de la calcificación ósea es un proteolípido y parece que in vivo el *B. matruchotti* puede actuar como un análogo microbiológico de la calcificación (Ennever et al., 1977).

Ennever, posteriormente, siguió relacionando el *B. matruchotti* con la calcificación del cálculo dental. Esta relación la estableció a partir de la observación de la similitud entre los componentes lipídicos de la nucleación del *B. matruchotti* y los proteolípidos, que son esenciales para la nucleación de la matriz calcificada del cálculo. Dichos proteolípidos forman un compuesto complejo de proteínas no polarizadas y predominantemente fosfolípidos. Las similitudes encontradas por Ennever fueron: la misma respuesta a la cromatografía de la columna de vidrio poroso con un disolvente ácido o neutral, el grado de hidrofobicidad de las proteínas y la poca frecuencia de fosfoinosítidos y cardiolipin. Frente a estas similitudes, también encontró algunas diferencias: la composición de los fosfolípidos y los aminoácidos. La conclusión frente a estos resultados fue que aunque el proteolípido nucleador de apatita y el nucleador del *B. matruchotti* tienen muchas similitudes, no son idénticos, pero en términos biológicos

de la nucleación de la apatita, las diferencias no son significativas (*Ennever et al., 1979*).

En el estudio de Friskopp de 1980, citado anteriormente, se analizaron mediante microscopía electrónica muestras de cálculo supra y subgingival. Además de las diferencias entre ambos tipos de cálculo explicadas anteriormente se pudo determinar la relación de ciertos microorganismos con el proceso de mineralización de la placa. Tanto a nivel supragingival como subgingival había una íntima relación entre los microorganismos filamentosos y la porción mineral del cálculo. Éstos se encontraban en mayor proporción en el cálculo supragingival, lo que coincide con niveles de formación de cálculo más elevados. Se vio que la calcificación comienza entre los microorganismos, y no dentro de ellos (*Friskopp y Hammarström, 1980*).

Howell, en 1980, realizó un estudio para analizar qué requisitos eran necesarios para la iniciación proteolípida de la calcificación. Para ello realizó la comparación del proteolípido de un microorganismo calcificable como es el *Bacterionema matruchotii*, con el proteolípido de un microorganismo no calcificable como es el *Actinomyces naeslundii*. El *A. Naeslundii* no fue capaz de formar apatita en condiciones de cultivo que sí soportaron la calcificación del *B. matruchotii*. Si se aíslan y analizan los proteolípidos, la porción proteolípida de *A. naeslundii* (ANN) difiere de la porción de *B. matruchotii* (BMN) en la concentración, la polaridad de la apoproteína, y la composición de fosfolípidos. Las medidas de peso seco de proteolípido y los datos de radioensayo demostraron que hay menos proteolípido disponible en *A. naeslundii*. Estos datos sugieren que el fallo en la calcificación en cultivo de *A. Naeslundii* puede ser tanto por la baja concentración de proteolípido como de sus características bioquímicas (*Howell y Boyan-Salyers, 1980*).

Vista la capacidad de calcificación de ciertos microorganismos se siguió investigando la capacidad de calcificación de otro tipo de bacterias. Moorer y cols. realizaron una investigación para averiguar si los estreptococos cariogénicos podían calcificarse. Se comparó la absorción de calcio para la calcificación del *Streptococcus mutans* C180-2, que había demostrado ser una cepa acidogénica y cariogénica; con la absorción de calcio y la calcificación de *Corynebacterium (Bacterionema) matruchotii*, conocido calcificador. Se cultivaron las bacterias en E-agar semi-sintético bien tamponado que contenía 1,4 mmol/L de calcio, 2 g/L de glucosa y pH inicial 7,4. Se produjo absorción de calcio por *C. matruchotii* (25 mmol Ca/kg de masa húmeda celular bacteriana), pero no por *S. mutans*. La masa de *S. mutans* creció con una concentración de calcio de 63 ± 11 mmol/kg en comparación con 145 ± 61 mmol / kg en *C. matruchotii*. Mediante la prueba de difracción de rayos X se confirmó la presencia de apatita cristalina en las masas de células bacterianas. La microscopía electrónica reveló cristales y depósitos mineralizados en ambos organismos. Se vieron calcificaciones en algunas células de *S. mutans*. También se analizó *Streptococcus sobrinus* 6715, y *S. mutans* y *S. Sobrinus* aislados. Se observaron grandes cantidades de calcio cuando se mantuvieron durante varias semanas en E-agar de pH inicial de 7,6. Estas observaciones parecen señalar a las bacterias acidogénicas como agentes de mineralización y, por tanto, los *S. mutans* puede estar involucrados en los eventos que desencadenan fuertes calcificaciones intracelulares y, posiblemente, la formación del cálculo dental (Moorer et al., 1993).

Habiendo determinado en numerosos estudios la capacidad de *Corynebacterium matruchotii* en la mineralización, Van Dijk y cols. estudiaron este microorganismo en profundidad. Es un habitante de la cavidad oral asociado con la formación del cálculo dental. In Vitro, su membrana proteolipídica se ha asociado con la capacidad de inducir

la formación de hidroxiapatita. Esta membrana proteolipídica se estudió a partir de la purificación con cloroformo. Consiguieron aislar y secuenciar la composición proteolipídica implicada en la formación del cálculo dental por precipitación de Ca^{2+} y, posiblemente, en el transporte de fosfato inorgánico, necesario para la formación de hidroxiapatita (Van Dijk et al., 1998).

Se ha seguido analizando la microflora en los pacientes con cálculo. Una de las líneas de investigación analiza si pacientes con tendencia a caries tienen un menor acúmulo de cálculo debido a la competencia bacteriana. Dahlén y colaboradores en 2010, publicaron un artículo sobre la microbiología en presencia de cálculo y caries en una muestra de pacientes de 13 años de edad sin patología periodontal. En este estudio se tomó una muestra microbiológica de placa bacteriana y de saliva para analizarlas mediante métodos de hibridación de DNA y comparar las bacterias presentes en ambos grupos de pacientes: formadores de caries y formadores de cálculo. Se observó que en el grupo de cálculo había significativamente más bacterias que en el de caries, encontrando en mayor proporción: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella negriscens* y *Prevotella tanneriae*. De forma esporádica se encontraron *Porphyromona gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Campyloacter rectus*. También hubo baja frecuencia de detección para *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*, aunque se encontraron en mayor proporción en el grupo de caries. *Prevotella nigrescens* y *Filifactor Alocis* son dos bacterias que se han relacionado clásicamente con la enfermedad periodontal, y sin embargo, se encontraron de forma más frecuente en el grupo de caries. En el estudio se concluye que no hay una correlación inversa entre la proporción de caries y de cálculo, ya que muchos pacientes tenían tanto caries como cálculo y compartían muchas de las bacterias. También apunta a que en esta muestra de pacientes no se ve una relación entre la magnitud de cálculo

formado y la composición de la placa bacteriana, sino que asocia el cálculo con un mayor nivel de bacterias en saliva y con una mala higiene (*Dahalén et al., 2010*).

Por tanto, tras el análisis bibliográfico del papel que desempeñan las bacterias en la formación del cálculo dental, se puede concluir que éstas tienen capacidad de calcificación, tanto vivas como muertas, destacando fundamentalmente al *B. matruchotii* como principal calcificador bacteriano, aunque no es la única bacteriana con dicha capacidad.

3.3 FACTORES DERIVADOS DE LA SALIVA

Se cree que la mineralización de la placa bacteriana es responsabilidad en gran parte de la saliva del paciente y de sus características.

La saliva es un líquido incoloro, insípido, inodoro, algo espumoso y muy acuoso, que proporciona un medio eficaz para la protección de todas las estructuras orales (*López-Jornet, 1998*). Es el conjunto de la secreción de las distintas glándulas salivales o también puede describirse como la combinación de secreciones salivales con leucocitos, células epiteliales, microorganismos, restos alimentarios, sangre y virus (*Dawes, 2008*).

En el ser humano las glándulas salivales se dividen según su tamaño en mayores (parótida, submaxilar y sublingual) y menores, y según la naturaleza de secreción en serosas y mixtas.

La parótida es la glándula de mayor tamaño, es lobulada y vierte su contenido a través del conducto de Stenon a nivel del primer o segundo molar superior.

La glándula submaxilar se encuentra en la celda submandibular y su conducto de excreción (Wharton) desemboca a los lados del frenillo de la lengua, en el vértice de un

pequeño tubérculo que se denomina ostium umbilical. En ocasiones al lado del conducto principal hay conductos secundarios de menor calibre.

La glándula sublingual se sitúa en el suelo de la boca, está formada por una aglomeración de glándulas y posee tantos conductos excretores como glándulas. El conducto más voluminoso es el de Bartholin que desemboca en la carúncula sublingual.

Las glándulas salivales menores están situadas bajo las membranas mucosas y sus conductos de excreción son cortos. Se distribuyen por toda la boca excepto en la encía y la parte anterior del paladar duro. Según su localización se denominan labiales, palatinas, bucales y glosopalatinas.

a. Mecanismos de secreción

La secreción glandular comprende dos actividades principales. La primera es la biosíntesis de proteínas y glucoproteínas en las células de los túbulos y el envío de éstas al lumen, lo que ocurre principalmente en las células acinares. La segunda es el transporte de agua y electrolitos a través de las células para llevarlos al lumen. En condiciones fisiológicas ambos procesos se producen de forma simultánea.

El sistema nervioso autónomo regula las glándulas salivales mediante la estimulación simpática y parasimpática. La estimulación simpática produce un aumento de la secreción de baja intensidad, mientras que la estimulación parasimpática produce un aumento rápido del flujo y volumen de saliva. La estimulación de ambos sistemas provocará un aumento en la concentración tanto de los componentes orgánicos como de los inorgánicos. La regulación de la secreción salival se cree que es exclusivamente nerviosa, aunque algunas hormonas pueden actuar en su regulación como por ejemplo la

aldosterona, las hormonas de la corteza suprarrenal, tiroides, y diferentes mediadores químicos o enzimas como la calicreína (*López-Jornet, 1998*).

Parece que la secreción continua de saliva en reposo se relaciona con liberación constante de acetilcolina. Por el contrario, se estima que la saliva estimulada es consecuencia de dos tipos de reflejos: el reflejo salival incondicionado, que se produce a través de un estímulo masticatorio gustativo, dolor oral, irritación oral, faríngea o gástrica; y el reflejo salival condicionado, que se desencadena por estímulos de los órganos de los sentidos de la vista, el olfato o el oído.

Cuando se produce un estímulo sensitivo, éste va a alcanzar los centros salivatorios a través de las vías aferentes constituidas fundamentalmente por fibras de la cuerda del tímpano, ramas faríngeas de los nervios glosofaríngeo y vago, y fibras sensitivas de la segunda y la tercera rama del trigémino. Una vez allí, para que llegue el estímulo a las glándulas, parten las vías eferentes de los centros salivatorios (las fibras secretoras de la cuerda del tímpano, procedentes del núcleo salival superior) con destino a las glándulas submaxilar y sublingual, y la rama timpánica del nervio glosofaríngeo (con fibras procedentes del núcleo salival inferior) con destino la parótida.

b. Funciones de la saliva

La saliva proporciona un medio eficaz para la protección de las estructuras de la cavidad oral mediante diversas funciones (*López-Jornet, 1998; Llana-Puy et al., 2006*):

- **Lubrificación y humificación:** en el caso de que disminuya el flujo salival se produce impactación y retención de alimentos, dificultando la ingesta de los mismos. Este efecto de lubricación y humificación está asociado a la presencia de mucina.

- Mantenimiento del equilibrio ecológico entre las diferentes especies bacterianas que habitan la cavidad oral. Este balance de los microorganismos orales que ejerce la saliva se debe a la presencia de algunas proteínas, las cuales son constituyentes esenciales de la película adquirida, favorecen la agregación bacteriana y son fuente de nutrientes para algunas bacterias. Las proteínas más importantes implicadas en el mantenimiento de los ecosistemas orales son: las proteínas ricas en prolina, lisocima, lactoferrina, peroxidasas, aglutininas, e histidina, así como la Ig A secretora, la IgG y la IgM.
- Mantenimiento de la integridad de la mucosa: mediante mucinas, electrolitos y agua.
- Acción antimicrobiana: interfiere en la adherencia bacteriana y tiene acción bacterioestática. Este efecto se debe a la presencia de lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasas, mucinas, cistinas, histatinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas ricas en prolina e IgA.
- Limpieza: produce un arrastre mecánico y lavado, eliminando así restos de alimentos, células descamadas, bacterias, hongos, virus, etc.
- Integridad dental: neutraliza la acidez de la placa, ayuda al aclaramiento de los azúcares y difunde iones como calcio, fósforo, magnesio o flúor que contribuyen a la maduración posteruptiva del diente.
- Digestiva: va a embeber el alimento y facilitar su digestión ya que gracias a la amilasa se digiere el almidón.
- Capacidad tampón y remineralización: amortigua cualquier cambio significativo de pH gracias, fundamentalmente, a los tampones fosfato y

bicarbonato, y al calcio, estaterina, proteínas aniónicas ricas en prolina y fluoruros.

- **Gusto:** va a diluir los componentes sólidos, excitar a las células gustativas y lavar las papilas para que puedan volver a ser estimuladas.
- **Diluyente y atemperadora:** la saliva aumenta bruscamente cuando penetran sustancias ácidas para diluirlas y mantener así el pH. También enfría los alimentos calientes y calienta los fríos.
- **Excretora:** elimina urea, ácido úrico y ciertas hormonas y virus.
- **Acción sobre la coagulación:** gracias a la lisozima y al calcio se activan la coagulación de la sangre aunque participan de una manera muy discreta.
- **Indicador de enfermedades:** la saliva puede servir como ayuda al diagnóstico de ciertas patologías a nivel oral. Podemos identificar la presencia de ciertos patógenos característicos de algunas enfermedades e infecciones, como por ejemplo en el caso de la enfermedad periodontal, o en la candidiasis.
- **Fonación:** gracias al agua y a la mucina de la saliva que lubrican tanto la cavidad oral como la garganta, facilitando la fonación.

c. Factores que influyen en la secreción salival.

La saliva contiene un 99% de agua y un 1% de sustancias orgánicas e inorgánicas. Se puede medir en reposo o estimulada. La saliva en reposo se define como aquella que se produce espontáneamente, en ausencia de estímulos salivales exógenos o farmacológicos. Por el contrario, la saliva estimulada es aquella que se obtiene después

de haber sometido al sujeto a un estímulo y, por tanto, habrá una variación tanto en la cantidad como en la composición respecto a la saliva en reposo.

Se estima que la cantidad de saliva secretada por el hombre, según autores, varía entre 600 ml y 1-1,5 litros/día, siendo en mililitros por minuto 0,25-0,35 ó 0,3 a 0,4 aproximadamente (*Dawes, 2008; Nauntofte et al., 2003*). El volumen de secreción varía tanto debido a que hay numerosos factores que pueden influir en la secreción:

- Variaciones de secreción según la procedencia glandular: la contribución de cada glándula al volumen de secreción no es constante y difiere según sea en reposo o en estimulación. La tasa salival en reposo es más estable que la estimulada (*López-Jornet, 1998*).
- Variaciones según el tipo de técnica de recolección: según el método de colección los resultados serán distintos (*López-Jornet, 1998*).
- Posición del cuerpo: para emplear, por ejemplo, la técnica de drenaje se mantiene siempre al paciente sentado con la cabeza inclinada hacia delante. De lo contrario, si estuviese tumbado o semitumbado podría tragar saliva, desvirtuando el resultado (*López-Jornet, 1998; Dawes, 2008*).
- Variaciones según factores biológicos:

Existen una serie de factores intrínsecos de cada persona y otros ligados a hábitos o incluso ambientes que van a hacer que el volumen de saliva segregada varíe. Por ejemplo, el tamaño glandular. Hay autores que correlacionan un mayor tamaño de la glándula con un aumento de secreción y otros que ven diferencias de secreción entre la glándula derecha y la izquierda (*López-Jornet, 1998*).

- Variaciones según edad y sexo:

También en cuando a la edad y el sexo. Se ha apreciado una disminución salival con el envejecimiento y en cuanto al sexo, la saliva en reposo parece que es menor en mujeres pero conforme avanza la edad se igualan ambos sexos. No se sabe si está directamente relacionado con el sexo o tiene más que ver con el peso y el tamaño corporal. Además, la composición de la saliva varía en una misma persona a lo largo del día. La mayor cantidad de secreción se produce durante las comidas y la menor durante el sueño (*López-Jornet, 1998*).

- Variaciones por factores externos:

Si se valoran factores externos como los ambientales, las temperaturas más elevadas parecen disminuir el flujo salival. En cuanto a hábitos, la hiperhidratación causa un aumento de la saliva en reposo pero no en la estimulada, y la pérdida de un 8% del agua corporal supone una disminución del flujo salival. También van a influir en la tasa de secreción salival la masticación, dieta, tabaco, horas dormidas, número de dientes, etc. Por otra parte, situaciones como el estado emocional van a influir en la secreción salival. Por ejemplo la ansiedad y el estrés producen una disminución del flujo. Otra situación, como es el sobrepeso corporal, aunque no está totalmente demostrado, podría repercutir en el tamaño y peso de las glándulas. Entre las causas principales de esta disminución el flujo salival se encuentran: tratamientos con fármacos (especialmente su combinación), síndrome de Sjögren e irradiados de cabeza y cuello (*López-Jornet, 1998; Dawes, 2008*).

Por tanto, hay muchos factores que van a influir en el volumen de saliva segregado. Finalmente decir que un flujo salival menor a 0,1 ml/min se considera hiposalivación (Dawes, 2008).

d. Influencia en la formación de cálculo

Varios factores salivares se han relacionado con la formación de cálculo dental:

- Composición de la saliva.
- Variaciones en pH de la saliva.
- Presencia de ciertos enzimas salivares.

Estas influencias serán analizadas con mayor profundidad en los apartados d.1, d.2 y d.3 de la memoria.

d.1. Composición de la saliva:

La saliva es una solución acuosa con más de un 99% de agua y con componentes orgánicos e inorgánicos.

Componentes orgánicos:

Entre los componentes orgánicos encontramos: proteínas, glicoproteínas, amilasa, peroxidada salival, lisozima, lipasas, lactoferrina, inmunoglobulinas salivales, lípidos e hidratos de carbono. Todos ellos desempeñan funciones de gran importancia analizadas anteriormente en el apartado “Funciones de la saliva” (3.2/b), entre dichas funciones habíamos destacado las bactericidas y bacterioestáticas.

Respecto al papel que pueden jugar estos componentes orgánicos en la formación de cálculo, en un trabajo de Osuji se valoró, mediante técnicas de electroforesis y

cromatografía, la presencia de ácido hialurónico, condroitín sulfato y heparán sulfato en el cálculo supra y subgingival. Se identificaron los tres glucosaminglicanos, aunque el ácido hialurónico y el heparán sulfato se encontraban en mayor concentración en la fase orgánica. Se sugirió que el condroitín sulfato tenía un papel en la mineralización del cálculo dental a través de la fijación del calcio, mientras que la función de los otros dos elementos no se conocía. Estos elementos no se encontraron ni en saliva ni en placa, presentándose como constituyentes de la encía humana (*Osuji y Rowles, 1972*).

Si se analizan otros componentes como la Osteopontina y Calprotectina (glicoproteínas), encontramos que la calprotectina es una proteína de unión al calcio producida por leucocitos, macrófagos y células epiteliales. Sus niveles aumentan durante las infecciones y en áreas inflamadas. La osteopontina es una glicoproteína fosforilada que tiene capacidad de unirse al calcio. Hay muchos componentes orgánicos que intervienen en la mineralización de la placa. Kido y cols. en 1995 observaron que la osteopontina estaba presente en el cálculo dental. Posteriormente, en 1997, mediante análisis inmunohistoquímico se estudió la presencia de calprotectina. Se concluyó que ésta se asociaba con acción antibacteriana y tenía capacidad de unión al cálculo durante su formación, por tanto, puede ser nucleador de la calcificación (*Kido et al., 1997*).

En un estudio de Slomiany se analizaron los componentes lipídicos de la saliva parotídea mediante cromatografía y se vio que los grandes formadores contenían un 60% más de peso lipídico que los poco formadores. Aunque se determinan el tipo de lípidos presentes en saliva parotídea de grandes y poco formadores de cálculo, no se desvela cuál es el papel de cada uno de ellos en el proceso de calcificación (*Slomiany y Slomiany, 1981*).

Hodge y Leung, en un trabajo sobre la formación de cálculo, apuntaron que la mucina es una de las encargadas de unir el cálculo al diente (*Hodge y Wah Leung, 1950*).

Componentes inorgánicos

En la saliva encontramos una serie de componentes inorgánicos predominantes: calcio, sodio, potasio, magnesio, cloruro, sulfato y tiocianato. En menor concentración se encuentran: fluoruro, yoduro, bromuro, hierro, estaño, nitrito; y en ocasiones: zinc, plomo, cobre y cromo.

Estos componentes inorgánicos desempeñan gran número de funciones, como son la remineralización, la defensa del huésped, la actividad enzimática y el sistema tampón bicarbonato y fosfato.

Hidaka y cols. analizaron *in vitro* el papel del ácido silícico, silicio y minerales arcillosos en la transformación de fosfato cálcico amorfo en hidroxiapatita. Las muestras se analizaron al microscopio para ver la presencia de cristales de silicio. Se vio que todos los compuestos de silicio estudiados tenían capacidad acelerante de la formación de hidroxiapatita a un determinado rango de concentración: ác.silícico (0,01-0,1mM), gel de silicio (0,05-1,5 mg/ml) y minerales arcillosos (0,4-10 mg/ml). A mayores concentraciones se llegó a inhibir la precipitación de fosfatos de calcio. Sin embargo, los resultados obtenidos con la microscopía no fueron concluyentes, por ello se indicó que las zonas del cálculo ricas en silicio podían tener un papel regulador de la calcificación del cálculo *in vivo* (*Hidaka et al., 1993*).

En la **Tabla 2** se muestra la composición de la saliva mixta, presentando las concentraciones de algunos de sus componentes, tanto orgánicos como inorgánicos (Almerich, 2008).

Componentes de la saliva	Saliva en reposo (mg/100ml)	
	Media	Rango
Constituyentes Orgánicos		
Proteínas	220	140-640
Proteasa (Watanabe 82)	actividad en unidades/ml fue de 0,73±0,66 a pH 8,5 y de 0,45±0,52 a pH 4,5.	
Amilasa	38	
Lisozima	22	
Lactoferrina	5,3±5,6 mg/l	
Lactoperoxidasa		
Mucinas		
Albúmina	39±13 µgr ml ⁻¹	
IgA	19	
IgG	1	
IgM	0,2	
Glucosa	1	
Citrato	1	
Amoniaco		
Urea	20	12-70
Acido Úrico	1,5	0,5-3
Creatinina	0,1	0,005-0,2
Colesterol	8	2,5-50
AMPc	7	
Constituyentes Inorgánicos		
Sodio	15	0-20
Potasio	80	60-100
Calcio	5,8	2,2-11,3
Fosfato	16,8	6,1-71
Cloruro	50	100
Bicarbonatos	en parótida 6mg/100ml y submaxilar 13 mg/100ml	
Fluoruro (ppm)	0,02	0,015-0,045

Tabla 2. Composición cuantitativa de la saliva en reposo (Adaptado de Almerich 1998).

d.2. Las variaciones en pH:

El pH salival se ha relacionado con la velocidad de formación de cálculo. En condiciones fisiológicas, éste varía entre 6,5 y 7. Cuando el pH es ácido, el dióxido de carbono acuoso y gaseoso están equilibrados con el bicarbonato, mientras que cuando el pH es alcalino el NH_3 coexiste con el NH_4^+ . Por tanto, se genera un medio ideal para la precipitación de fosfatos de calcio y, por tanto, para la mineralización de la placa bacteriana.

No existe un consenso respecto a cómo se produce la alcalinización del pH que favorece la precipitación de cálculo, por ello se han considerado dos hipótesis para explicar dicha alcalinización del medio:

1. Pérdida de dióxido de carbono: Según la teoría de Burchard, la anhidrasa carbónica salival produce una alcalinización del medio oral, ya que induce una pérdida de dióxido de carbono, favoreciendo, de este modo, la precipitación de sales de calcio de la saliva, muy saturada de iones minerales (*Burchard, 1895*).

2. Actividad de la ureasa: La ureasa, secretada por bacterias de la cavidad oral, hidroliza la urea salival produciendo amoníaco y aminas, haciendo que el pH de la placa sea alcalino, lo cual favorece la precipitación de las sales minerales de saliva y líquido crevicular (*Wong et al., 2002*). La urea puede secretarse en la saliva normal a concentraciones entre 5-10 mmol/L y en el fluido crevicular hasta de 60 mmol/L. Se ha visto que la ureasa es responsable de la hidrólisis de la urea de las bacterias (*Sissons et al., 1995*). Esta urea puede producir diversos efectos:

- Efecto del metabolismo de la urea en el pH de la placa: el amoniaco producido por la ureolisis contribuye a incrementar el pH de la placa, que es un factor esencial para la formación del cálculo. En un estudio de Sissons se vio que, en una boca artificial, cuando aumentaba la concentración de urea aumentaba el pH a diferencia de cuando los niveles de urea se mantenían a concentraciones más bajas. Cuando la urea se aplica inicialmente a la placa bacteriana, ésta produce amoniaco a través de la ureasa y se acumula amoniaco en su superficie. En este punto, el gradiente de pH pasa de bajo a alto en la superficie de la placa. Durante los siguientes minutos el amoniaco se difunde y llega hasta la mitad de la capa de placa, incrementando el pH. Esto promueve la formación de calculo ya que incrementa el grado de saturación de fosfato cálcico en el fluido de la placa (*Sissons et al., 1994 y 1998*).
- Efecto de la cantidad de flujo salival en la respuesta pH ureodependiente en la placa: en la cavidad oral, la urea disponible para la placa bacteriana viene de la saliva y de factores extraorales como chicles o dentífricos. Un alto nivel de fluido salival significa que habrá más urea disponible. Esto puede explicar de forma parcial la especificidad de la distribución de calculo en la dentición. (*Sissons et al., 1994*).
- Responsabilidad bacteriana en la ureolisis de la placa: según Frostell, ninguna de las especies conocidas para la ureolisis bacteriana contribuye significativamente en la ureolisis de la placa. Sin embargo, Sissons en una boca artificial observó que la placa bacteriana mostraba reacciones ureolíticas más fuertes en presencia de cocos gram positivos y estreptococos. Por tanto se sospecha que tienen un papel inductor en la

urolisis: *S. salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Enterobacterias* y *Haemophilus sp* (Frostell, 1960; Sissons et al., 1998).

d.3. La presencia de ciertos enzimas

Proteasas salivales

Se ha analizado la correlación entre las proteasas salivales y el índice de cálculo supra y subgingival. En un trabajo de Watanabe y cols. se estudió, en 80 sujetos, la actividad de la proteasa. Se valoró la salud periodontal mediante la profundidad de sondaje y el índice P-M-A [índice creado por Schour y Massler en 1947 que se fundamenta en el concepto de la extensión de la inflamación para indicar la severidad de la enfermedad periodontal: se obtiene determinando la presencia o ausencia de la inflamación en la papila (P), la encía marginal (M) y áreas de la encía adherida (A)]; el cálculo supragingival mediante el índice de Green y Vermillion; y el cálculo subgingival mediante una modificación del índice de higiene oral. Se recogieron muestras de saliva y se trataron mediante centrifugado, determinando así la actividad de la proteasa en la saliva completa, el sedimento y el sobrenadante.

Las conclusiones a las que se llegaron fueron que hay una correlación positiva entre los índices estudiados y la proteasa salival. El cálculo subgingival se relacionó positivamente con la presencia de bolsas y con la actividad de proteasas (cathepsina D) a pH 8.5, y el cálculo subgingival con la proteasa sobrenadante a pH 4.5. Por lo tanto se vio que hay diversos tipos de proteasas, pero no se sabe cuáles de ellas exactamente son las que se relacionan con la formación del cálculo (Watanabe et al., 1982).

Actividad de Lisozima

Mandel en 1974 estudió la actividad de la lisozima, entre otros componentes bioquímicos, en sujetos muy formadores de cálculo y poco formadores. Vio que en grandes formadores la actividad de la lisozima estaba disminuida. Una menor actividad puede desencadenar un aumento en la formación de cálculo debido a que la mineralización de la placa bacteriana inicialmente es interbacteriana, y posteriormente se mineraliza la pared celular de la bacteria y su interior. La lisozima desestructura la pared bacteriana alterando así el proceso de calcificación que se da sobre ésta. Por tanto, sin la desestructuración producida por la lisozima, la formación del cálculo no encuentra obstáculos en este campo y aumenta significativamente (*Mandel, 1974*).

Actividad de Fosfatasa Ácida y Alcalina

Se ha visto que, en grandes formadores de cálculo, la fosfatasa ácida se ve disminuida. Dicha disminución en el estudio de Mandel de 1974 no fue estadísticamente significativa (*Mandel, 1974*).

Posteriormente Lo Sorto y cols. observaron actividad de la fosfatasa ácida y alcalina en muestras de placa y cálculo tanto supra como subgingival de pacientes grandes formadores de cálculo mediante técnicas citohistoquímicas. Se vio que ambas fosfatasas tenían localización intra y extra-microbiana. No se observaron diferencias entre las muestras supra y subgingivales de placa y cálculo. Los resultados no fueron concluyentes respecto al papel que desempeñan dichas fosfatasas en la formación de cálculo. (*Lo Sorto et al., 1992*).

3.4 FACTORES DERIVADOS DE LA ALIMENTACIÓN

Se ha intentado relacionar la alimentación con la formación de cálculo, pero resulta difícil, ya que son muchos los parámetros que influyen en la formación de éste y es difícil aislarlos.

En estudios con animales, Shanon y cols. realizaron un estudio en ratas en las que controlaron estrictamente la dieta, probando 11 dietas distintas: maicena, leche seca sin grasa, hígado en polvo, harina, aceite de semilla de algodón, sacarosa en polvo, y ciertos minerales. Se observó que las dietas con alto contenido en maicena y leche fueron las que mayores puntuaciones de cálculo obtuvieron (*Shanon et al., 1970*). Pero, en este estudio, las ratas no tienen ningún control de placa, por lo que puede que la influencia de los alimentos no sólo esté marcada por la composición de éstos sino por su consistencia y capacidad para remover placa bacteriana durante la masticación.

Hidaka y Oishi, en 2007, realizaron un estudio para valorar los efectos de los componentes de los alimentos sobre la formación *in vitro* de precipitados de fosfato cálcico. Estudiaron los efectos en la precipitación de fosfato de calcio de los componentes de alimentos como: almidón, harina de soja, harina de pescado, aceite de colza y aceite de coco. Se observó que, en el caso del almidón, su adición no tuvo efecto sobre la tasa de precipitación del fosfato de calcio amorfo pero aumentó, tanto la tasa de transformación de este fosfato de calcio amorfo en hidroxiapatita como el tiempo para el inicio de transformación. La amilopectina (componente insoluble de almidón) fue eficaz para aumentar la tasa de transformación de hidroxiapatita, pero la amilosa (componente soluble de almidón) no lo era. El aceite de colza aumentó toda la reacción de precipitación con fosfato de calcio, sin embargo el aceite de coco no lo hizo. Hubo alimentos ricos en proteínas, tales como harina de soja y harina de pescado, que

disminuyeron la tasa de transformación de fosfato de calcio amorfo a hidroxiapatita y aumentó el tiempo de inducción, mientras que no tuvo efecto sobre la tasa de precipitación de fosfato de calcio amorfo. Por tanto, a la vista de estos resultados *in Vitro*, parece que los hidratos de carbono y aceite aumentan la calcificación oral, mientras que los alimentos ricos en proteínas tienden a disminuirlo (*Hidaka y Oishi, 2007*).

4. ÍNDICES DE MEDICIÓN DEL CÁLCULO

La medición del cálculo dental es un parámetro que se ha tratado de valorar objetivamente en la literatura a lo largo de los años. Este interés viene suscitado por la importancia que tiene el cálculo dental en ciertas patologías orales y por el desarrollo de una serie de productos creados para evitar su formación. Para ello se han propuesto índices de medición desarrollados por diversos autores (Greene y Vermillion, Ramfjord, Volpe y Manhold, Mühlemann y Villa, Ennever Sturzenberger y Radike, etc.) para poder estudiar el desarrollo del cálculo dental, su inhibición y su epidemiología.

Ennever y cols. en 1961 desarrollaron un índice para medir el cálculo sobre las superficies linguales de los cuatro incisivos inferiores en ensayos clínicos cortos (*Ennever et al., 1961*).

Posteriormente Volpe, Manhold y Hazen elaboraron, en 1962, un método para estudiar el desarrollo del cálculo en largos periodos de tiempo en los seis dientes anteroinferiores. Para ello hacían mediciones en tres planos constantes utilizando la sonda periodontal: la bisectriz del centro de la superficie lingual, la medida diagonal a través del ángulo mesio-incisal del diente hasta el área de mayor altura del cálculo y la

medida diagonal a través del ángulo disto-incisal del diente hasta el área de mayor altura de cálculo, como se aprecia en la **figura 5**. Así obtenían 18 medidas en cada sujeto, las cuales se sumaban para obtener el valor final de índice (*Volpe et al., 1962*).

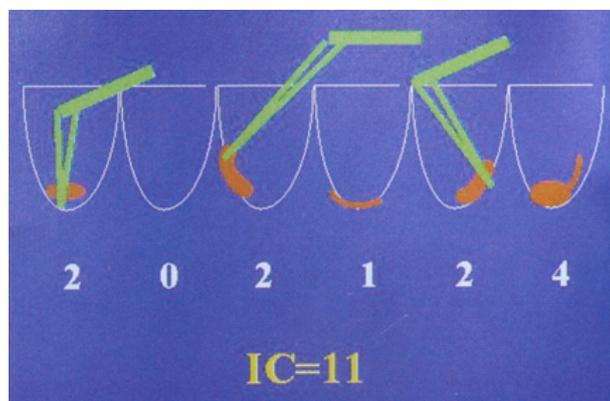


Figura 5. Índice de Volpe-Manhold.

Baumhammers y cols. estudiaron la relación entre el índice de Volpe-Manhold y el peso del cálculo supragingival mediante el índice de correlación de Pearson. Pesaron el cálculo desecado y valoraron dicho índice en 38 sujetos. Observaron que había una correlación entre ambos (*Baumhammers et al., 1973*).

Marks también estudió la reproducibilidad de dicho índice. Once examinadores registraron varios índices, entre ellos el de Volpe-Manhold, en 29 sujetos. Concluyeron que aunque su reproducibilidad es menor que la del índice gingival y de sangrado, sí tiene validez para realizar los estudios (*Marks et al., 1993*).

En 1967, Mühlemann y Villa describieron el índice de cálculo en la línea marginal. Este índice tiene en cuenta el cálculo formado sobre la superficie lingual a lo largo del margen gingival de los cuatro incisivos inferiores. Se traza un eje imaginario vertical que divide el diente en dos partes: mesial y distal. En cada una de las zonas se mide el porcentaje de cálculo formado sobre la superficie del esmalte, empleando

habitualmente: 0%, 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100%. El valor del índice se obtiene sumando los porcentajes y dividiéndolos por el número de dientes (*Mühlemann y Villa, 1967*).

El índice de depósito de cálculo sobre la superficie (CSI) de Ennever, Sturzenberger y Radike evalúa la formación del mismo sobre las cuatro superficies de los incisivos mandibulares dando valor 0 cuando hay ausencia de cálculo y 1 cuando está presente. Conroy y Sturzenberger matizaron la valoración del cálculo dando valores de 0 a 3 para dar una idea más real de la severidad del depósito de cálculo (como se aprecia en la **tabla 3**). Esta modificación se llamó índice de severidad de depósito de cálculo sobre la superficie (CSSI) (*Conroy y Sturzenberger, 1968*).

<p>CSSI</p> <p>0 = no cálculo.</p> <p>1 = presencia de cálculo pero no excediendo 0,5mm en anchura y/o espesor.</p> <p>2 = presencia de cálculo sin exceder 1mm en anchura y /o espesor.</p> <p>3 = presencia de cálculo excediendo 1mm en anchura y /o espesor.</p>

Tabla 3. Índice severidad de deposición de cálculo (*Conroy y Sturzenberger, 1968*).

Pese a la existencia de numerosos índices, el uso de éstos es relativamente escaso, ya que en la mayoría de estudios revisados se emplea el índice de Volpe-Manhold (*Fure et al., 1998; Segreto et al., 1991; Gaengler et al., 1993; Marks et al., 1993; etc.*).

5. CÁLCULO Y ENFERMEDAD PERIODONTAL

La importancia del cálculo en la enfermedad periodontal radica en que la presencia de dicho cálculo resulta un entorno ideal para la adhesión bacteriana. Además va a tener un papel pasivo facilitando y perpetuando el acumulo de placa bacteriana y sus toxinas sobre la superficie del diente.

A pesar de la influencia de cálculo en las enfermedades periodontales, se ha visto que es más fuerte la relación entre gingivitis y placa que entre gingivitis y cálculo. En un estudio de Gaare y cols. se comparó el efecto del cepillado en la salud gingival de pacientes con cálculo supra y subgingival frente a pacientes sin cálculo (se les había realizado una profilaxis previa). Aunque la mejoría fue mayor en los sujetos sin cálculo, aquellos que sí tenían sarro también obtuvieron un notablemente incremento de su salud gingival. Por tanto, el cepillado es muy importante ya que tras el control de placa bacteriana hay una mejora de la salud a pesar de la presencia de cálculo (*Gaare et al., 1990*).

Se ha comprobado una fuerte relación entre el sangrado al sondaje y la presencia de cálculo subgingival; donde éste está presente, la reabsorción ósea producida es mayor. Por tanto, su eliminación resulta imprescindible para el tratamiento de la enfermedad periodontal (*Dong et al., 1994; Patters et al., 1982*).

Entre los problemas periodontales que causa el cálculo se encuentra la pérdida de inserción periodontal. Anerud y cols. realizaron un estudio en el que relacionaron las superficies dentales con cálculo y la pérdida de inserción. Se comparó a una población que trabajaba en las plantaciones de té en Sri Lanka con un sector de la población de Noruega en cuanto a la cantidad de cálculo y progresión de la enfermedad periodontal.

Al primer grupo se le hizo un seguimiento desde 1970 hasta 1985 (durante este periodo no se les realizó ningún procedimiento de eliminación de cálculo) y al segundo de 1969 a 1988 (se eliminó el cálculo a intervalos regulares). Se observó que en la población de Sri Lanka los dientes con cálculo tenían mayor pérdida del nivel de inserción que los que estaban libres de él y la cantidad de cálculo aumentaba conforme avanzaba la edad. En la población noruega la cantidad de cálculo no aumentó desde la adolescencia hasta los cuarenta años, el 70% de las superficies estaban libres de cálculo y el poco cálculo subgingival que tenían no influía en la pérdida de inserción (*Anerud et al., 1991*).

Griffiths estudió también la pérdida de inserción intentando relacionarla con variables clínicas en una población de militares jóvenes durante un periodo de observación de 3 años. Se les hizo un examen oral al inicio del estudio, a los 12 meses y a los 30 meses en el que se registró: pérdida de inserción, profundidad de sondaje, sangrado al sondaje, color gingival y presencia de cálculo supra y subgingival. Las zonas que no presentaban sangrado, ni placa, ni cálculo eran aquellas en las que no se producía pérdida de inserción. Sus conclusiones fueron que tanto el sangrado gingival como el cálculo supra y subgingival eran las variables que estaban más relacionadas con la periodontitis de temprana aparición (*Griffiths et al., 2001*).

Asimismo se ha relacionado la cantidad de cálculo subgingival con la severidad de la enfermedad, conforme aumenta la severidad aumentan los depósitos de cálculo subgingival. En el estudio de Martínez-Canut de 1999 queda reflejado que los pacientes con periodontitis rápidamente progresiva (actual periodontitis agresiva según la clasificación de la Academia Americana de Periodoncia de 1999) muestran más superficies con cálculo subgingival que los que tienen periodontitis inicial del adulto (periodontitis crónica según la clasificación de la AAP de 1999), pero menos que los que tienen periodontitis del adulto moderada o severa (*Martínez-Canut et al., 1999*).

Puesto que el problema que supone el cálculo no es tanto su presencia como el acúmulo de placa bacteriana sobre su superficie se ha estudiado la asociación entre cálculo, enfermedad periodontal activa y bacterias. Sidaway estudió la presencia de ciertas bacterias en las bolsas periodontales y observó que el *Actinomyces Naeslundii*, *Actinomyces Viscosus*, *Veillonella Alcalescens* y *Streptococcus Sanguis* estaban presentes en mayor proporción sobre el cálculo subgingival (Sidaway, 1978).

Se han estudiado los microorganismos que colonizan el interior de la bolsa periodontal y parece que, en bolsas con poco o nulo cálculo, predominan cocos y *Agregatibacter Actinomycetemcomitans*. Sin embargo en bolsas con abundante cálculo predominan espiroquetas, bastones anaerobios de pigmentación negra, bastones móviles y otros microorganismos móviles (Socransky et al., 1988; Brown et al., 1991).

6. CÁLCULO Y ASOCIACIÓN A FACTORES EXTERNOS

En cuanto a la relación entre el cálculo, la enfermedad periodontal y el tabaco los estudios resultan contradictorios. En un estudio de Martínez-Canut se apreció una relación inversa entre el tabaco y la cantidad de cálculo subgingival. Se vio menos presencia de cálculo en los fumadores que en los no fumadores. Además se observó relación entre la cantidad de tabaco consumida y el porcentaje de cálculo: los grandes fumadores (>20 cigarrillos/día) tenían menos superficies con cálculo que los fumadores más moderados (≤ 20 cigarrillos/día) (Martínez-Canut et al., 1999).

Estos resultados se contraponen a los obtenidos en estudios previos en los que se observó que los fumadores presentaban mayor cantidad de cálculo que los no fumadores (*Feldman et al., 1983; Linden y Mullally, 1994*). En el estudio de Linden coincide también que los fumadores tenían una peor higiene y empleaban menos los dispositivos de higiene interproximal que los no fumadores. Independientemente de la cantidad de cálculo todos los estudios coinciden que la progresión de la enfermedad periodontal es peor en los pacientes fumadores.

También se ha estudiado si la edad y el sexo pueden influir en la presencia de cálculo. Dong realizó un estudio en el que no encontró relación entre el cálculo, la edad y el sexo (*Dong y cols, 1994*).

Por tanto, se puede concluir que el cálculo dental es un factor coadyuvante en la enfermedad periodontal ya que retiene placa bacteriana y dificulta su remoción, siendo la placa bacteriana el factor principal en la inflamación gingival. Se ha demostrado la importancia de la presencia de cálculo subgingival en la progresión de la enfermedad periodontal pero todavía no se ha dilucidado cual es su verdadero papel.

7. PRODUCTOS ANTICÁLCULO

Albucasis (936-1013 d.C.) ya observó la relación entre el cálculo y la enfermedad dental. Dijo que el cálculo corroía las encías y hacía que hubiera supuración alrededor del diente. Explicó la necesidad de eliminar esos depósitos e incluso diseñó instrumentos para ello. Por tanto, la necesidad de eliminar el cálculo y evitar que se vuelva a depositar lleva siglos suscitando interés.

Para eliminar el cálculo contamos con métodos mecánicos como los aparatos de ultrasonidos o las curetas. Para prevenir su nueva formación es imprescindible un buen control de placa mediante el empleo del cepillo dental, la seda y los cepillos interproximales. Pero en muchas ocasiones estos dispositivos de higiene no son suficientes para controlar su formación, por ello surge la necesidad de encontrar algún producto que pueda evitar de nuevo su acumulación.

Se ha empleado un amplio abanico de agentes químicos en diferentes presentaciones (pastas dentífricas, colutorios chicles...) con el fin de controlar la formación del cálculo dental, basados en distintos mecanismos de acción (*Fairbrother et al., 2000*):

1. Disolver o reblandecer la fracción inorgánica del cálculo.
2. Alterar la matriz del cálculo o su anclaje a la superficie dental.
3. Prevenir la formación de placa bacteriana.
4. Inhibir la mineralización de la placa bacteriana.

A continuación, vamos a analizar cada uno de estos mecanismos de acción destacando los agentes químicos relacionados con ellos.

7.1 Disolver o reblandecer la fracción inorgánica del cálculo.

Se han empleado diferentes agentes para intentar reblandecer los depósitos de cálculo maduro (*Fairbrother et al., 2000*). Se emplearon los **ácidos** pero se vio que disolvían más la estructura dental que el cálculo y que resultaban cáusticos para los tejidos blandos. También se utilizaron productos **alcalinos** pero no fueron eficaces. Otros productos que se investigaron fueron los **agentes quelantes**, que ya se habían empleado para disolver cálculos renales. Kerr y Field, mediante un estudio en el que se

empleaba un colutorio con sodio hexametáfosfato vieron que se disolvía el cálculo supragingival de dientes extraídos usándolo durante 10-15 días, pero también disolvía las restauraciones con silicato (*Kerr y Field, 1944*). Estos mismos autores hicieron un estudio *in vivo* de 6 semanas y vieron que sí prevenía la formación de cálculo. Sin embargo, en otros estudios no se consiguió disolver el cálculo, simplemente reblandecerlo. Por tanto seguía necesitándose un tiempo adicional para la eliminación del cálculo mediante el raspado, por ello dejó de emplearse (*Jabro y Latta, 1992*).

7.2 Alterar la matriz del cálculo o su anclaje a la superficie dental

Con este fin se han utilizado **enzimas** intentando romper la matriz de la placa o debilitar la unión diente-cálculo. Entre las diferentes enzimas, la más empleada es la **mucínasa**. La teoría se basa en que las mucinas unen el cálculo al diente. Se hizo un estudio empleando un dentífrico con mucinasas y se vio que la formación de cálculo disminuía y que éste era más fácil de eliminar ya que la mucínasa producía la lisis de las mucinas que unen el cálculo a la superficie dental (*Stewart, 1952*). Draus y cols. comprobaron el efecto anticálculo de numerosos enzimas *in vitro*, concluyendo que cuanto más proteolítica es una enzima y menor es la actividad amilasa, más efectiva resulta en inhibir la formación de cálculo (*Draus et al., 1963*).

En la misma línea de investigación nos encontramos con el páncreas deshidratado o **Viokase** (tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasa, amilasa, lipasa y nucleasa). Se vio que tenía acción proteolítica. Se estudió como agente antiplaca en forma de chicles y se vio que reducía la placa si se masticaba 5 veces al día pero que su sabor no era agradable y producía ardor de boca en la mitad de los sujetos. En combinación con lactosa en forma de polvos aplicados durante 10-15 minutos antes del cepillado produjo

una reducción del cálculo del 60% y de la inflamación gingival del 70% (*Allen y Courtney, 1972*).

Se ha utilizado **agua imantada** en irrigadores con objeto de alterar la carga superficial del diente para, de este modo, alterar la adhesión de las sales de calcio y placa bacteriana a su superficie. En diversos estudios se apreció que, si tras el cepillado se empleaba agua imantada, se reducía la formación de cálculo; sin embargo la cantidad de placa bacteriana seguía siendo igual y no disminuía el índice gingival (*Johnson et al., 1998; Watt et al., 1993*).

También se ha empleado **ricinoleato de sodio al 4%**. Su mecanismo de acción consiste en dificultar la adhesión de los microorganismos a la superficie dental. Para comprobar el efecto de este compuesto se realizó un estudio en el que los pacientes se enjuagaban con un colutorio con ricinoleato de sodio 5 veces al día durante 5 días, además de una aplicación local sobre los incisivos inferiores. Los resultados mostraron una alta disminución de microorganismos y de cálculo, pero tenía un sabor muy desagradable y necesitaba aplicarse con mucha frecuencia a altas concentraciones (*Dossenbach y Muhlemann, 1961*). El tiempo de estudio de este colutorio fue de 5 días, por tanto resulta insuficiente para valorar la formación de cálculo.

7.3 Prevenir la formación de placa

Para prevenir la formación de placa y, por tanto, la del cálculo, se ha estudiado el uso de **agentes antimicrobianos**:

- Cloruro de cetilpiridino: es un antimicrobiano catiónico que inhibe la formación de placa bacteriana. Normalmente su forma de presentación es en

colutorios debido a su mínima compatibilidad con el excipiente de los dentífricos. Tras el uso de un colutorio de cloruro de cetilpiridinio 3 veces al día durante 2 minutos se observó que los resultados en el test (contenía cloruro de cetilpiridino) y en el control (no lo contenía) no eran estadísticamente significativos (*Muller et al., 1973*).

- Clorhexidina: es una bisguanida, un agente antimicrobiano que presentaron Davies y cols. en 1954 y está aceptado por la ADA. Entre sus características fundamentales destacan la sustantividad y la especificidad. Es capaz de reducir de forma notable la cantidad de placa bacteriana y mejora el índice de sangrado e inflamación gingival (*Löe y Schiott, 1970; Hamp y Löe, 1973; Tepe et al., 1983*). Los mecanismos a través de los cuales va a ejercer su efecto antiplaca son: impidiendo la formación de la película adquirida mediante el bloqueo de las mucinas, inhibiendo la adhesión de los microorganismos a la película adquirida; destruyendo la placa ya formada y, por último, es germicida a concentraciones elevadas (*Riboo-García, 1994*). La clorhexidina es activa ante bacterias gram positivas y negativas, hongos y levaduras (*Brecx et al., 1992*). Se puede emplear a diferentes concentraciones, pero va a tener una serie de efectos adversos: tinciones de dientes, de restauraciones estéticas y lengua, inflamación de la parótida, sabor amargo o metálico; además se han sugerido resistencias cuando se aplica largos periodos de tiempo. Otro de sus efectos secundarios es que tras su empleo aumentan los depósitos de cálculo supragingival (*Löe et al., 1976; Langy et al., 1982*). Esto último puede ser debido a que las bacterias muertas y no viables hacen que disminuya localmente en la saliva el nivel de pirofosfatasas y mineralice la pared bacteriana (*Pellat y Grand, 1986*). Por

tanto, aunque se pensó que debido su capacidad de reducir la placa bacteriana podía ser también eficaz como agente anticálculo, se ha visto que su efecto final es el contrario.

- Nidamicina: es un antibiótico macrólido, bacterioestático y bactericida. Empleado como colutorio, tanto al 0,01 como al 0,005 durante 12 semanas se vio que era efectivo en la reducción de placa y de cálculo. Pero aunque los resultados como producto anticálculo fueron positivos se produjo resistencia cruzada con otros antibacterianos (*Rokita et al., 1975*).
- Triclosán: es un agente antibacteriano de amplio espectro no iónico con efecto antiplaca y anticaries. Tiene una correcta sustentividad y actúa induciendo un cambio en la composición de la placa supragingival (*Lindhe et al., 1993*). En combinación con citrato de zinc parece potenciar su actividad y puede inhibir la formación de cálculo (*Saxton y Van der Ouderaa, 1989*). En un estudio realizado recientemente por Kumar y cols. se compararon tres colutorios, entre ellos uno con triclosán, para evaluar su influencia en cuanto a niveles de placa y sarro entre otros parámetros. Los colutorios estudiados eran: un primero con clorhexidina, un segundo de triclosán con fluoruro de sodio y un tercero de clorhexidina con triclosán, fluoruro de sodio y cloruro de zinc. El período experimental fue de 21 días. Hubo diferencias significativas ($P=0,046$) en cuanto a la prevención de gingivitis y formación de placa bacteriana en los dos grupos de el colutorio que llevaban clorhexidina. En cuanto al acúmulo de cálculo supragingival también se observaron diferencias significativas ($P=0,03$): en el grupo en el que sólo se dio clorhexidina hubo casi el doble de cálculo que en el de triclosán.

Comparando los dos grupos de triclosán los resultados fueron mejores para el triclosán con fluoruro de sodio, aunque los pacientes siguieron produciendo cálculo (*Kumar et al., 2013*).

7.4 Inhibir la mineralización de la placa.

Para inhibir la calcificación de forma efectiva es necesario interferir en el crecimiento de los cristales, que ocurre normalmente en tres fases: acceso de la red de iones a la interfase solución-cristal, adsorción de la red cristalina a la interfase y unión a la red de crecimiento cristalino. De modo que las sustancias que puedan interferir en estos lugares de alta energía, podrán alterar la formación de depósitos calcificados (*Hanke, 1940*).

Los inhibidores, dependiendo del tipo y concentración, pueden actuar de diferentes maneras: cambiando la morfología cristalina, estabilizando fases tempranas del crecimiento cristalino, inhibiendo el crecimiento cristalino, uniendo al cristal de crecimiento una estructura más soluble y formando complejos hidrosolubles.

Se han empleado **metales pesados** para inhibir la formación de la placa bacteriana y del cálculo dental. Se ha visto que inhiben el crecimiento de la placa mediante la modificación de sus propiedades adhesivas y cohesivas (*Aickin y Dean, 1976*). También van a inhibir la mineralización ya que previenen la inserción de iones, siendo un antagonista competitivo del Ca y P y, como consecuencia, el crecimiento de cristales se enlentece (*Thomas, 1982*). El problema fundamental de este tipo de compuestos son las tinciones y su mal sabor.

La **vitamina C** es un inhibidor efectivo *in Vitro* de la cristalización del fosfato cálcico. Se elaboró una teoría para explicar este fenómeno basada en que el sabor de la vitamina C produce un aumento del fluido saliva y gracias a este aumento se reducen los niveles de cálculo. Para confirmar esta teoría se comparó el efecto de un análogo de la vitamina C, la quinina, pero entre éstas hubo una diferencia del 70% en cuanto a la inhibición de cálculo a pesar de tener un sabor similar. Por tanto, se concluyó que el sabor que estimulaba el flujo salival no era la causa de la disminución de cálculo (*Gilmore et al., 1968*). Hacen falta más investigaciones para esclarecer el mecanismo de acción de la vitamina C.

Los **pirofosfatos** han sido de los primeros agentes y de los más usados para controlar la formación de cálculo. Al parecer previenen la calcificación, interrumpiendo la conversión del fosfato cálcico amorfo en hidroxihapatita, por tanto actúan inhibiendo el crecimiento de ésta (*Fleisch et al., 1968*). Se ha observado que la concentración de pirofosfatos es más baja en la saliva parotídea de los grandes formadores de cálculo que en la de los poco formadores (*Volgel y Amdur, 1967*). Además la concentración de pirofosfatos en la placa bacteriana de los sujetos con baja formación de cálculo es mayor que en los grandes formadores (*Edgar y Hekins, 1972*).

En un estudio de 2011 sobre la concentración de ortofosfato, pirofosfatos y pirofosfatasa, se apreciaron diferencias según el tipo de paciente. Dividiendo la muestra en grupos de pacientes según la magnitud del cálculo formado se observó que aquellos que formaban más sarro tenían mayor concentración de ortofosfato y pirofosfatasa y menor concentración de pirofosfatos. Sin embargo, los que formaban menos cálculo tenían menos ortofosfato y pirofosfatasa y más concentración de pirofosfatos. Por tanto, estos compuestos tienen mucha importancia en la formación de cálculo y un producto con pirofosfatos debería disminuir la cantidad de sarro formado (*Pradeep et al., 2011*).

Los inhibidores de la cristalización, como los pirofosfatos, se unen al núcleo del cristal o las caras de los cristales interrumpiendo su desarrollo. La absorción de estos componentes a las caras del cristal también inhibe la disolución de los cristales. Desde 1930 se sabe que cantidades de ciertas moléculas, como los polifosfatos, actúan como suavizadores del agua por inhibir la cristalización de las sales de calcio, como el carbonato cálcico. Hasta 1960 no se experimentó con estos productos *in vivo*, y se vio que los pirofosfatos que estaban presentes en el suero, en la orina, y otros fluidos biológicos, podían prevenir la calcificación uniéndose a la hidroxiapatita (*Grases et al., 2009*).

El pirofosfato es una molécula soluble inorgánica (*Stookey et al., 1989*) que inhibe el crecimiento cristalino uniéndose a la superficie del cristal. La hidroxiapatita necesita unirse al ión fosfato para que se produzca el crecimiento cristalino. El pirofosfato impide dicho crecimiento mediante la unión a la hidroxiapatita en el lugar donde debería unirse el ión fosfato.

Su efectividad se ha comprobado en diversos estudios. Se ha visto que es capaz de inhibir el crecimiento cristalino incorporándolo a una pasta dentífrica (*Mallat et al., 1985; Zacherl et al., 1985*). El problema que presentan los pirofosfatos es que una vez absorbidos por el diente o el cálculo pueden verse desactivados por hidrólisis mediante la actividad enzimática (fosfatasa) o a la degradación acuosa (*Grases et al., 2009*). Debido a esta susceptibilidad a la degradación por bacterias orales, fosfatasas y pirofosfatasas se les añaden **copolímeros** (*Jin y Yip, 2002*). Dichos copolímeros, que inhiben la acción de la fosfatasa y pirofosfatas, eliminan el calcio libre del medio y aumentan la sustantividad. El **Gantrez** (copolímero) también se ha empleado para inhibir a la fosfatasa alcalina (*White, 1997*).

En la década de los 80 comenzaron a emplearse los pirofosfatos y, hasta la fecha, éstos han sido objeto de estudio debido a su capacidad como inhibidor de la formación de cálculo. En 1988, Singh realizó un estudio en el que comparó un colutorio con pirofosfatos y copolímero con un placebo, y obtuvo una reducción del 37,69% del cálculo supragingival comparando el test con el placebo (*Singh et al., 1988*). Al año siguiente, Singh y cols. compararon un colutorio con pirofosfatos y copolímero con otros dos colutorios: uno era sin copolímero y el otro era un placebo. Obtuvieron una reducción de los depósitos de cálculo supragingivales de un 31,7% en pirofosfato/copolímero. Sin embargo, no obtuvieron diferencias comparando los otros dos colutorios (*Singh et al., 1989*).

Hasta la fecha la reducción del cálculo supragingival mediante pirofosfatos sigue siendo un tema de interés. Llana y cols. en 1999 realizaron un estudio para comprobar la eficacia anticálculo de un dentífrico con pirofosfatos. Usado 2 veces al día durante 3 meses consiguieron una reducción estadísticamente significativa del cálculo supragingival, pasando de un índice de Volpe-Manhold de 12,39 a 9,41 (*Llana et al., 2009*).

En cuanto a los efectos que puede producir este producto sobre las mucosas y tejidos duros, en un estudio de DeLattre apareció un caso que mostró irritación de los tejidos blandos ante una pasta con pirofosfatos (*Delattre, 1999*). En el resto de la bibliografía consultada no se describen lesiones tras el uso de pastas dentífricas o colutorios con pirofosfatos (*Singh et al., 1989; Mann et al., 1990; Chikte et al., 1992; Mandel, 1992; Llana et al., 1999; etc.*).

Fitato: es una molécula (mioinositol hexakisfosfato) capaz de inhibir la cristalización de la bruxita y la hidroxiapatita y prevenir, por tanto, la formación del

cálculo dental. En un trabajo de Cole y Bowen de 1975 se estudió el fitato sódico y su efecto sobre la placa bacteriana en monos. Se les administró fitato sódico al 1% y al 3% durante cuatro semanas y se comparó la placa bacteriana entre los monos que recibían fitato y los que no. Se observaron cambios mínimos en la composición física, química y microbiológica en la placa. El lactobacillus disminuyó significativamente en presencia de fitato al 1% al igual que la población de estreptococos (Cole y Bowen, 1975). Grases y cols. realizaron un estudio en el que observaron una modificación en la composición del cálculo tras el uso de un colutorio con fitato. Tras 3 semanas empleando un colutorio formado por fitato unido al zinc se produjo una disminución estadísticamente significativa en el calcio total, el magnesio y el fósforo, moléculas que se han relacionado directamente con la formación de cálculo, en comparación con los períodos de placebo y de control (Grases et al., 2008).

Urea: se ha visto, en los estudios *in vitro* que con un 30% de urea en la saliva se disminuye la dispersión del calcio y se reblandece el cálculo. El efecto anticálculo de la urea se atribuye a su habilidad para disolver el material mucoproteínico en el que las sales de calcio se depositan y/o aumentar la solubilidad de las sales de calcio en la saliva (Belting y Gordon, 1966^a). *In vivo*, se ha visto que en pacientes muy formadores de cálculo la concentración de urea es mayor en la saliva submaxilar que en los poco formadores. Esta urea se transforma en amoníaco por la actividad de la ureasa y hace que el pH de la saliva y de la placa aumente, provocando la precipitación de las sales de fosfato cálcico y aumentando, por tanto, los depósitos de cálculo. Se estudió la posibilidad de inhibir la ureasa mediante el ácido acetohidroxámico (AHA) (Mandel y Thompson, 1967).

Miscelánea de agentes químicos:

Se han utilizado multitud de agentes químicos con el objetivo de prevenir la deposición de cálculo cubriendo al diente con un adhesivo que altere la unión del cálculo al diente. Se estudiaron las **siliconas** y se vio que no prevenían la formación de cálculo artificial sobre el diente. La **lactona** era más efectiva pero producía la desmineralización del diente. Este efecto podía inhibirse añadiendo siliconas (*Draus y cols, 1963*).

Se han estudiado también las **resinas** aplicadas sobre el diente formando una película con carga iónica para evitar la formación de cálculo en su superficie. Hoffman aplicó una **membrana de poliestireno sulfonado** con iones cargados negativamente. Teóricamente los iones cargados negativamente repelían la positividad de los iones de calcio, reduciendo por tanto su mineralización. Sin embargo, no consiguió modificar la formación de cálculo (*Hoffman et al., 1963*). Posteriormente se publicó un estudio de Schaffer y cols. en el que se cubría el diente con una película de **poliestireno amónico** que redujo significativamente la formación de depósitos de cálculo. El problema residía en que el efecto duraba únicamente una semana porque la resina se degradaba (*Schaffer et al., 1964*).

Muller y cols. observaron que una **mezcla de sales** que contenían ácido ascórbico, percarbonato sódico y sulfato de cobre conseguían disminuir el nivel de cálculo. Para comprobarlo hicieron que 10 estudiantes se enjuagaran con la disolución de una tableta con la mezcla de sales en 20ml de agua, comprobando una reducción significativa del cálculo formado (*Muller, 1973*).

Se han estudiado los efectos de **hierbas de la medicina tradicional china** (Kampo). Hidaka observó que la mezcla de estas hierbas podía inhibir la precipitación de fosfato

cálcico. Realizó un estudio en el que se concluyó que 9 de los 23 medicamentos estudiados podían emplearse como inhibidores de la formación de cálculo y sus mecanismos de acción parecían estar relacionados con la inhibición del crecimiento del cristal de hidroxiapatita mediante el secuestro del calcio de las soluciones. Se comprobó que las dosis en las que se administraban no tenían capacidad quelante y por tanto no afectaban al cemento ni al esmalte dental (*Hidaka et al., 1993*). Otro estudio en la misma línea de investigación se centró en el **Ruibarbo** y sus fracciones *in vitro*. La solución de ruibarbo inhibía la formación de fosfato cálcico amorfo y la tasa de transformación de hidroxiapatita. Se observó que el ruibarbo tiene efecto anticálculo pero también un gran poder quelante, lo que resulta perjudicial para el esmalte y cemento dental, ya que inhibe su remineralización (*Hidaka et al., 1996*).

Productos con efecto anticálculo sin mecanismo de acción conocido.

El **lactato de calcio** se ha empleado por su efecto anticaries, pero se ha visto que como efecto colateral también disminuye la formación de cálculo. Se comprobó en un estudio de Schaeken y cols que había reducciones en la producción de cálculo del 45% en 3 meses, sin embargo había mayor cantidad de placa. Por tanto se sospechó que actuaba sobre la secreción y actividad de las fosfoproteínas salivales (*Schaeken y Van der Hoeven, 1993*).

Existen numerosos productos anticálculo pero en los estudios clínicos con los que contamos en la actualidad no se ha demostrado la superioridad de un producto frente al resto debido a la disparidad en los resultados obtenidos.

8. EFECTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS ANTICÁLCULO

Se han realizado numerosos estudios sobre gran cantidad de productos para evitar la formación del cálculo dental, pero resulta necesario saber cual es su efectividad y que productos son los más indicados.

En un principio, con los productos anticálcuulo, se buscaba eliminar los depósitos del mismo. Para ello se emplearon mucinasas, quelantes o antimicrobianos. El problema que presentaban estos agentes era que producían efectos adversos, como daños en el esmalte en el caso de los quelantes, o el desarrollo de resistencia frente a los antibióticos en el caso de los antimicrobianos. Por ello se desarrolló una estrategia anticálcuulo que lo que buscaba era inhibir el crecimiento cristalino y prevenir el desarrollo de la placa mineralizada (*Jin y Yip, 2002*). Con este nuevo concepto tomaron fuerza productos como el triclosán, pirofosfatos, fitato o citrato de zinc entre otros.

En cuanto a los pirofosfatos encontramos que, en los estudios realizados, los resultados muestran que se reduce la cantidad de cálculo formado y su empleo es seguro. Mallatt y cols. realizaron un estudio longitudinal a doble ciego en 265 sujetos para ver la eficacia y los efectos sobre los tejidos blandos que producía un dentífrico que contenía pirofosfatos solubles al 3,3%. Tras dos meses de utilización se vio que en el grupo test se producía una reducción del cálculo del 26% respecto al placebo (floruro sódico) y fue bien tolerado por los tejidos blandos (*Mallatt et al., 1985*).

En otro estudio de Zacherl y cols. los resultados para los pirofosfatos también fueron positivos. Se comparó un dentífrico test que contenía una combinación de pirofosfatos solubles: 3,4% de pirofosfato tetrasódico, 1,37% de pirofosfato de dihidrogeno disódico

y 0,243% de fluoruro sódico con un placebo (fluoruro sódico). Se les realizó una profilaxis previa al inicio del estudio. A los 6 meses el grupo test tuvo significativamente menos cálculo que el control, hubo una reducción del nuevo cálculo formado del 32% (*Zacherl et al., 1985*).

Gaengler analizó la capacidad anticálculo de un gel dentífrico con pirofosfatos utilizado durante tres meses mediante el índice de Volpe-Manhold, índice marginal lineal de cálculo y SEM. Para analizar la cantidad de cálculo al microscopio se realizó primero una impresión de la zona lingual de los dientes anteroinferiores con cálculo y posteriormente sin cálculo. Los modelos obtenidos se cubrieron con una película de oro y se observaron al microscopio. Se empleó una puntuación de 0 a 3, en la que 0 significaba ausencia de cálculo y 3 que cubría hasta el borde marginal. Se vio que había una reducción significativa de la formación de cálculo en comparación con un placebo y mediante el SEM se comprobó que esta reducción era objetiva (*Gaengler et al., 1993*).

Debido a la capacidad de los pirofosfatos para evitar, en parte, la formación de cálculo, Mellber y cols. realizaron otro estudio en el que analizaron si podía producirse la remineralización del esmalte en presencia de pirofosfatos. Para ello emplearon un dentífrico 1100 ppm de flúor combinado con Gantrez (copolímero empleado para evitar la degradación de los pirofosfatos) al 1,5% y otro combinado con pirofosfatos al 1,3% en 15 sujetos durante dos semanas. Los resultados demostraron que los pirofosfatos al 1,3% y el Gantrez al 1,5% no interferían en la remineralización (*Mellberg et al., 1991*).

Santos y cols. realizaron un estudio en el cual hicieron un seguimiento del cálculo formado en la zona de incisivos inferiores, comparando el baseline con un dentífrico placebo y un dentífrico test a base de pirofosfatos. Estos dentífricos se emplearon de forma tópica sin cepillar la zona, y el periodo observacional fue de 14 días. Se midió el

cálculo mediante el índice de Volpe-Manhold. El grupo en el que se emplearon pirofosfatos tenía significativamente menos cálculo, entre el 16-30 % menos, que el grupo de dentífrico de control. Hay que tener en cuenta que el periodo observacional es relativamente corto (*Santos et al., 1999*).

En un artículo de revisión de Netuveli y Sheiham sobre dentífricos anticálculo se revisaron 31 artículos. Se concluyó que aquellos dentífricos que contenían pirofosfatos y copolímero PVM/MA eran los más efectivos a concentraciones de 1,3% y 1,5% respectivamente (*Netuveli y Sheiham, 2004*).

Por tanto, en todos los estudios revisados sobre pirofosfatos, el efecto de los mismos reduce la cantidad de cálculo formado en los sujetos estudio, pero no llega a erradicar el problema, ya que éstos siguen formando cálculo aunque en menor cantidad.

Respecto al fitato, Grases y cols. realizaron un estudio aleatorio a doble ciego con un colutorio de triclosán que contenía fitato. Los sujetos debían emplear una cantidad de 20 mililitros de colutorio durante un minuto, dos veces al día y por un periodo de tres meses. Los resultados mostraron que el colutorio era adecuado para reducir la cristalización de la placa. Se vieron diferencias estadísticamente significativas en el descenso total de calcio, magnesio y fósforo, siendo mayor en el test que en el control y demostrando así la eficacia del fitato. Hubo una reducción del 70% del cálculo formado empleando el fitato unido al zinc (*Grases et al., 2008*).

En la última revisión sobre el cálculo publicada en 2011, Jepsen y cols. analizan, entre otros aspectos, cómo prevenir la formación del mismo. Las estrategias que se han seguido incluyen: solubilizar el cálculo o su matriz orgánica, inhibir la adhesión de placa bacteriana e inhibir la formación y mineralización del cálculo. De estas estrategias, las más utilizadas hoy en día por su seguridad y eficacia son las que inhiben

la cristalización y el crecimiento cristalino del sarro, pero no son capaces de disolver los depósitos de cálculo ya formados. Como los inhibidores de la cristalización se degradan en la cavidad oral, es necesario utilizarlos a altas concentraciones en forma de dentífricos, colutorios o chicles, y pueden reducir la cantidad y la calidad del cálculo. Entre los agentes anticálculo que se revisan en este artículo encontramos: triclosán como agente antimicrobiano, pirofosfatos para inhibir el crecimiento cristalino uniéndose a la superficie del cristal, fitato para inhibir la formación de hidroxiapatita y burshita e iones de zinc que inhiben el crecimiento cristalino uniéndose a la superficie del fosfato cálcico sólido. En todos los estudios sobre estos productos se consigue reducir el porcentaje de sarro formado, pero en ninguno se logra erradicarlo. Además, todos ellos vienen enfocados en evitar la formación de cálculo supragingival, pero no se ha desarrollado un producto que inhiba la formación de cálculo subgingival, ya que habría que aplicarlo en el interior de la bolsa periodontal. El artículo concluye diciendo que los resultados presentados hasta la fecha son limitados y sugiere la que se continúe investigando en este campo (*Jepsen et al., 2011*).

9. JUSTIFICACIÓN DE NUESTRO TRABAJO

En este estado de las cosas, en el servicio de Periodoncia de la Unidad Docente de Medico-Quirúrgica de la Facultad de Medicina y Odontología de Valencia hemos iniciado un trabajo de investigación que pretende estudiar la eficacia de un colutorio a base de pirofosfatos diseñado por la empresa DENTAID (Barcelona, España) para intentar inhibir la formación de cálculo en un grupo de pacientes catalogados como “rápidos formadores de cálculo”. Para ello hemos empleado una metodología apoyada en la literatura, introduciendo algunos aspectos novedosos para intentar aportar un mayor peso científico a nuestro trabajo.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestra hipótesis parte de la observación clínica de que hay numerosos pacientes que forman rápidamente gran cantidad de cálculo dental, especialmente cálculo supragingival en la cara lingual de los incisivos inferiores. Esto conlleva una elevada frecuencia de mantenimientos para poder cuidar correctamente la salud gingival de los mismos

La hipótesis de trabajo contempla que el uso de un colutorio con una nueva formulación, realizado por DENTAID (Barcelona, España) a base de pirofosfatos es capaz de inhibir la formación de cálculo dental supragingival en pacientes que, a pesar de tener un buen control de placa bacteriana, son formadores rápidos de sarro.

La hipótesis nula sería que la utilización de un colutorio con una nueva formulación a base de pirofosfatos no modifica la cantidad de sarro acumulado por los pacientes que son rápidos formadores de cálculo durante el periodo observacional.

4. OBJETIVOS

Este trabajo pretende estudiar la magnitud de cálculo formado tras el empleo de un colutorio antisarro a base de pirofosfatos para analizar así su eficacia y los efectos sobre diversos aspectos de la cavidad oral.

Los objetivos concretos que nos planteamos son:

1. Observar diversos aspectos salivares (volumen, pH y composición química de la saliva) para determinar si se produce modificación de éstos tras el empleo de los colutorios y analizar si hay relación entre su modificación y la magnitud de cálculo formado.
2. Valorar el efecto del colutorio sobre microorganismos de la placa bacteriana asociados a la formación de cálculo dental (*Eubacterium Saburreum*, *Corynebacterium matruchotti*, *Veillonella párvula*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans*) y en el caso de modificarse, establecer una relación entre dicha modificación y la cantidad de cálculo formado.
3. Cuantificar la magnitud de cálculo formado en el 5º sextante mediante parámetros de control (índice de Volpe-Manhold, peso y volumen) para valora la eficacia del colutorio test.
4. Analizar las repercusiones que pueden tener parámetros del 5º sextante sobre la eficacia anticálculo del colutorio (apiñamiento, troneras y diastemas).
5. Estudiar los posibles efectos del colutorio sobre la mucosa y tejidos duros.
6. Valorar la percepción personal de los pacientes en cuanto a efectos sobre dientes y mucosas, sabor y eficacia del colutorio.

5. MATERIAL Y MÉTODO

1. MUESTRA

Se seleccionaron, de una clínica privada dedicada exclusivamente a periodoncia, a 40 pacientes con enfermedad periodontal tratada y controlada que tenían un historial demostrado de rápida formación de cálculo. Se define al paciente formador rápido de cálculo como aquél que, a pesar de tener un buen control de placa, necesita frecuentes visitas de mantenimiento debido a la rapidez con la que forma cálculo supragingival.

Los criterios de inclusión fueron:

- Paciente periodontal con tratamiento periodontal activo completado y en fase de mantenimiento al menos 2 años antes del inicio del estudio.
- Demostrado historial de formación de cálculo y necesidad de visitas de mantenimiento cada 3 meses como máximo.
- Que, al menos en el 5º sextante, el nivel de inserción clínica debía mantenerse estable y la profundidad de sondaje resultaba ser igual o menor a 3 mm.
- Los individuos debían estar dispuestos a cumplir con el protocolo de forma estricta.

En cuanto a los criterios de exclusión que se siguieron fueron los siguientes:

- Ausencia de alguno de los dientes de 5º sextante.
- Alteraciones sistémicas que pudieran modificar el flujo o la composición salivar (síndrome de Sjögren, irradiados de cabeza y cuello), o que tuvieran repercusión sobre los tejidos periodontales (leucemia, pénfigo, penfigoide, liquen plano, etc).

- Mal control de placa (Índice de placa de Silness y Løe >1 en los dientes test).
- Toma de alguna medicación (antibiótico, antiinflamatorio, antidepresivo) o uso de colutorio (antiséptico o antisarro) en los tres meses anteriores al inicio del estudio.
- Presencia de factores locales que tuvieran influencia en la retención de placa bacteriana, como obturaciones, aparatología ortodóncica, ferulización temporal o definitiva, prótesis fija o removible.

Durante el estudio, aquellos pacientes que comenzaron a ingerir antiinflamatorios y/o antibióticos, que presentaron cualquier tipo de reacción a nivel de mucosas o tejidos duros o que no cumplieron de forma estricta las normas del protocolo de investigación; fueron excluidos del estudio.

El protocolo de este estudio ha sido valorado y aceptado por el Comité Ético de la Universidad de Valencia (*Anexo 1*). Todos los pacientes firmaron el consentimiento para participar en este estudio (*Anexo 2*).

2. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Este estudio es un ensayo clínico aleatorizado, cruzado y a doble ciego. Todos los individuos utilizaron un colutorio B (pirofosfatos) que contiene una nueva formulación obtenida por la empresa Dentaïd (Barcelona, España) a base de pirofosfatos y un colutorio A (placebo) con las mismas propiedades organolépticas, para que ni investigador ni individuo pudieran diferenciarlos. Por tanto, todos los pacientes emplearon ambos colutorios a lo largo del estudio, siendo en un momento determinado el test y en otro el placebo. El motivo de utilizar a los mismos sujetos como test y como

control fue el de intentar aprovechar el tamaño muestral al máximo, ya que encontrar una muestra de pacientes que formaran mucho sarro pese a tener una buena higiene no resultó sencillo. Se realizó un detartraje inicial y, posteriormente, cada colutorio se empleó durante tres meses. Entre ambas tomas se realizó a modo de aclaramiento: tartrectomía y pulido, asimismo los pacientes estuvieron 24 horas sin utilizar ningún colutorio. El orden de utilización de los colutorios se hizo también de forma aleatoria.

Para asegurar el cumplimiento del protocolo de administración del producto por parte de cada individuo, se le entregó una cantidad total de colutorio calculada previamente para distribuirla diariamente y se les pidió que devolvieran el sobrante al finalizar el periodo de la toma. Durante el estudio, todos los pacientes utilizaron el mismo cepillo de dientes (Vitis® suave, DENTAID) y la misma pasta dentífrica (Vitis® encías, DENTAID).

A lo largo del protocolo se realizaron tres sesiones de observación y registro de variables (**Tabla 4**). A cada paciente se le dio una hoja informativa del estudio en la que se explicaba en que consistía y cómo debía utilizar los colutorios y se le hizo firmar un consentimiento informado (*Anexo 2*). La secuencia de visitas que se siguió fue:

1ª Sesión clínica/Examen 1 (día 0):

- Se registraron los datos generales de los pacientes:
 - Edad.
 - Sexo.
 - Consumo de tabaco.
 - Tipo de patología periodontal.
 - Presencia o no de apiñamiento, troneras y diastemas.
- Se tomó una muestra de saliva para medir:
 - el volumen en reposo

- el pH
- la composición bioquímica
- Se recogió una muestra de placa bacteriana con el fin de identificar la presencia de microorganismos asociados a la formación de cálculo dental.
 - *Eubacterium Saburreum.*
 - *Corynebacterium matruchotti.*
 - *Veillonella párvula.*
 - *Streptococcus salivarius.*
 - *Streptococcus sanguis.*
 - *Streptococcus mutans.*
- Se le realizó la terapia de soporte periodontal (ultrasonidos, raspado selectivo y pulido de las superficies con cepillo de profilaxis y pasta grano fino Detartrine®), teniendo en cuenta que el cálculo del 5° sextante primero se cuantificó mediante el índice de Volpe-Manhold y posteriormente se recolectó para pesarlo y medir su volumen.
- Se registró cualquier anomalía en mucosa y dientes.
- Al paciente se le dio el colutorio que le fue asignado de forma aleatoria y las instrucciones de cómo debía utilizarlo durante los tres próximos meses: enjuagarse con 10 ml de colutorio 2 veces al día durante 1 minuto (controlarlo con reloj) después de cepillarse los dientes y de realizar su limpieza interproximal (*Anexo 3*).

2ª Sesión clínica/Examen 2 (a los 3 meses): en esta sesión se tomó de nuevo una muestra de saliva (para medir el volumen en reposo, el pH y la composición bioquímica), se recogió una muestra de placa bacteriana y un registro del cálculo formado en el 5° sextante mediante el índice de Volpe-Manhold, el peso y el volumen.

Cualquier modificación en las mucosas o tejidos duros se anotó y se registró fotográficamente. El paciente relleno un cuestionario con preguntas sobre su satisfacción con el colutorio en cuanto a molestias, efectos sobre dientes y mucosas, sabor y eficacia (*Anexo 4*). De nuevo se realizó la terapia periodontal de soporte. En este momento se cambio el colutorio por otro (asignado aleatoriamente) que el paciente debía usar los próximos 3 meses y se recogió el sobrante del primer colutorio.

3ª Sesión clínica/Examen 3 (a los 6 meses): se realizaron los mismos procedimientos que en la 2ª sesión y se recogió el sobrante del colutorio. En este momento finalizó el estudio.

Todas estas observaciones, realizadas en las tres sesiones clínicas de estudio, serán detalladas en profundidad en el capítulo de Recogida de Datos de este mismo apartado de Material y Método.

EXAMEN 1	EXAMEN 2	EXAMEN 3
Inicio estudio	A los 3 meses	A los 6 meses
<ul style="list-style-type: none"> • Registro datos generales • Examen periodontal • Muestra de saliva • Muestra de placa bacteriana • Índice de Volpe-Manhold, peso y volumen del cálculo • Examen mucosas y dientes • Terapia soporte periodontal (TSP), instrucciones de higiene oral (IHO) y motivación • Entrega del colutorio test o placebo (aleatorio) 	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra de saliva • Muestra de placa bacteriana • Índice de Volpe-Manhold, peso y volumen del cálculo • Examen mucosas y dientes • TSP, IHO y motivación • Cuestionario • Cambio tipo colutorio • Recogida colutorio sobrante • Aclaramiento (24 horas) 	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra de saliva • Muestra de placa bacteriana • Índice de Volpe-Manhold, peso y volumen del cálculo • Examen mucosas y dientes • TSP, IHO y motivación • Cuestionario • Recogida colutorio sobrante

Tabla 4. Sesiones del estudio

3. COMPOSICIÓN DE LOS COLUTORIOS

Colutorio Test anticálculo (Colutorio B)

El colutorio test suministrado por Dentaïd (Barcelona, España) tenía los principios activos citados a continuación:

- Tetrasodio pirofosfato decahidrato 0,85%
- Sodio Hexameta Fosfato 0,50%

- Sodio Tripoli Fosfato 0,50%
- Sodio Fluoruro 0,05% (226 ppm de iones F)

Además tenía una serie de excipientes empleados particularmente para el mejor efecto antisarro del preparado.

Colutorio Placebo (Colutorio A)

El colutorio placebo fue administrado también por Dentaaid (Barcelona, España) para que tuviera la misma composición que colutorio test pero sin los principios activos. Por tanto las propiedades organolépticas eran muy similares. De esta forma el paciente no podía identificar cual era el test y cual el placebo.

4. RECOGIDA DE DATOS

Todos los datos se registraron en una ficha confeccionada para cada paciente (**Figura 6**) para lo cual se empleaban unos minutos en el registro de variables generales y 30 minutos en el resto de toma de datos específicos del estudio. En ella se tomaban, en primer lugar, registros generales como edad, sexo, consumo de tabaco, etc. También contenía un pequeño periodontograma del 5º sextante para poder reevaluar la salud periodontal. A continuación se anotaba si el paciente presentaba o no troneras, diastemas y apiñamiento. Por último, había un apartado destinado a cada examen (inicio, a los 3 meses y a los 6 meses) en el que se anotaban todos los datos del estudio.

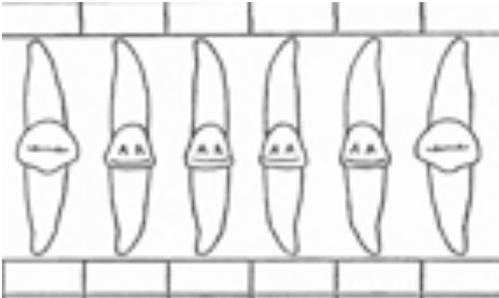
FICHA PACIENTE	
Nombre	Sexo
Edad	Hábito tabáquico (cig/día)
Diagnóstico periodontal	Enfermedades sistémicas
Medicación	
	
	Profundidad de sondaje/ Recesión/ Movilidad
	Diastemas
	Apiñamiento
Toneras)
EXAMEN 1 (Fecha:) Colutorio:
Flujo salival en reposo:	
pH	
Índice Volpe-Manhold	
Peso del cálculo	
Volumen del cálculo	
Exploración mucosas	
EXAMEN 2 (Fecha:) Colutorio:
Flujo salival en reposo:	
pH	
Índice Volpe-Manhold	
Peso del cálculo	
Volumen del cálculo	
Exploración mucosas	
EXAMEN 3 (Fecha:) Colutorio:
Flujo salival en reposo:	
pH	
Índice Volpe-Manhold	
Peso del cálculo	
Volumen del cálculo	
Exploración mucosas	

Figura 6. Ficha empleada para anotar datos de los pacientes. (Anexo 5)

4.1 Variables generales:

- Nombre.
- Edad (en años).
- Sexo.
- Hábito tabáquico (cigarrillos/día).
- Diagnóstico periodontal.
- Enfermedades sistémicas.
- Medicación.

4.2 Examen periodontal del 5° sextante

Se realizó un examen del 5° sextante para valorar la estabilidad periodontal previa al comienzo del estudio con objeto de asegurarnos de que los pacientes podían incluirse en él. En dicho examen determinábamos:

- Profundidad de sondaje: mediante una sonda Williams (**Figura 7**) se registraron seis puntos por diente (disto-vestibular, medio-vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, medio-lingual y mesio-lingual).



Figura 7. Sonda de Williams

- Grado de recesión: se midió la distancia desde la línea amelocementaria hasta el margen gingival. Se registraron seis puntos por diente (disto-vestibular, medio-vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, medio-lingual y mesio-lingual).
- Presencia de movilidad (Grados de Miller):
 - I.- Menos de 1mm en sentido vestíbulo-lingual.
 - II.- Entre 1 y 2mm en sentido vestíbulo-lingual sin intruirse.
 - III.- Más de 2mm en sentido vestíbulo-lingual y/o se intruye.

- Existencia o no de troneras abiertas, diastemas y apiñamiento: se registró de forma dicotómica.

4.3 Determinación de los parámetros salivales

a. Flujo salival en reposo

La tasa de flujo salivar en reposo es más estable que la tasa de flujo en estimulación. Por ello, en este estudio, se decidió realizar la recogida de muestras de saliva mediante la técnica de drenaje, la cual consiste en dejar que la saliva caiga espontáneamente de la boca del paciente a un tubo graduado, al que se le ha fijado un embudo, durante un tiempo determinado. Se hizo durante 10 minutos para poder realizar todas las mediciones pertinentes. Previamente, al paciente se le dieron una serie de instrucciones: las dos horas antes de la prueba no debía ingerir comida, ni masticar chicle, ni cepillarse los dientes, ni fumar al menos 10 minutos antes. Se realizó en un ambiente tranquilo para evitar estímulos externos y a primera hora de la mañana para minimizar la variabilidad. El sujeto estaba sentado, con los ojos abiertos y la cabeza ligeramente inclinada hacia delante evitando realizar movimientos orofaciales. Por último se calculó la cantidad de saliva producida en mililitros por minuto (*López-Jornet, 1998*).

Para tomar las muestras se emplearon embudos de plástico estériles que se introdujeron en la boca de tubos de ensayo calibrados (**Figuras 8, 9 y 10**).



Figuras 8, 9 y 10. Tubo ensayo, embudo, cronómetro.

Una vez pasados los 10 minutos de recogida de saliva se anotó el volumen recogido y con una pipeta se rellenaron dos tubos Eppendorf para el análisis químico. Éstos se introdujeron en el congelador a una temperatura de 0 °C a -4°C, y posteriormente se congelaron a -80° para una mejor conservación hasta el momento del análisis. Cada tubo Eppendorf se marcó con el nombre del paciente y número de examen al que pertenecía. Posteriormente se llevaron al hospital La Fe de Valencia, donde fueron procesadas (el procedimiento por el cual se analizaron se explicará en el apartado 5.A de este capítulo).

b. Determinación del pH

Con el resto de saliva se determinó el pH mediante un pH-metro digital de la casa PCE Group (Albacete, España) (**Figura 11**), con una resolución de 0,01 pH y una precisión de $\pm 0,02$ pH. El rango de medición de pH es de 0 a 14. Para medir el pH se introdujo el electrodo en el líquido, en este caso la saliva, y se midió de forma automática. La medición del pH se realizó inmediatamente tras la recogida para que la pérdida de dióxido de carbono no modificara su valor (*Whalton, 2002*).

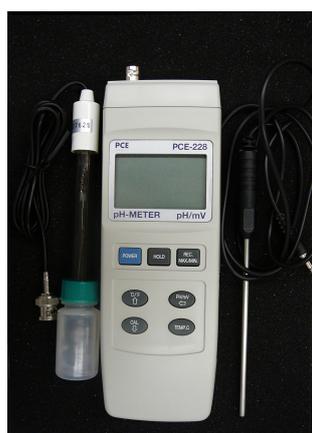


Figura 11. pH-metro digital de la casa PCE group[®] (Albacete, España)

4.4 Análisis de la placa bacteriana supragingival.

Toma de muestras

Se recogió una muestra de placa bacteriana del 5º sextante. Se necesitaba que dicha muestra fuese de placa madura ya que, según los estudios de Sidaway, algunos de los microorganismos implicados en la calcificación aparecen a partir del tercer día de acúmulo de placa. Para ello se le indicó a los pacientes que no debían cepillarse el 5º sextante durante 4 días antes de la toma. Este punto resultó de vital importancia explicárselo correctamente al paciente, ya que uno de los criterios de inclusión era que debían tener un correcto cepillado.

La placa se recogió, en los tres exámenes realizados, en la cara lingual y vestibular de los dientes test mediante una cureta estéril y se depositó en un tubo eppendorf con una solución de conservación (medio de transporte RTF -reduced transport fluid- prerreducido) para analizarla posteriormente.

Todas las muestras se enviaron por correo al laboratorio Laboral (Barcelona, España) donde se realizaron los análisis pertinentes (se explicarán con detalle en el apartado 5.B de este capítulo) para determinar la presencia y proporción de: *Eubacterium Saburreum*, *Corynebacterium matruchotti*, *Veillonella párvula*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans*. Estos microorganismos, según los estudios, son las especies calcificadoras que predominan en el cálculo supragingival (Sidaway, 1978, 1979; Moorer et al., 1993).

4.5 Magnitud del cálculo formado

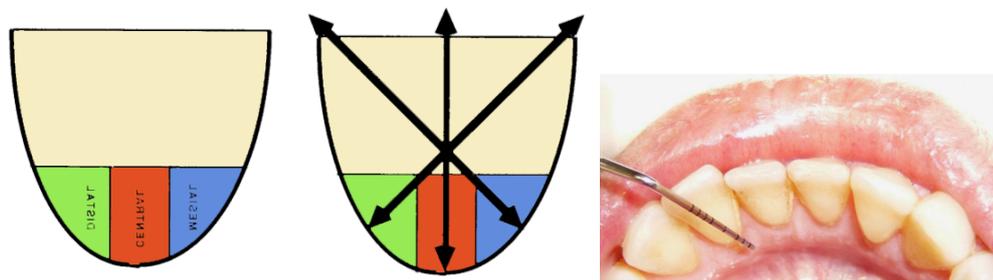
Para valorar el cálculo formado en el 5º sextante se empleó:

- El índice de Volpe-Manhold.
- Peso, volumen y densidad del cálculo.

a. Índice de Volpe-Manhold

Este índice se usa para medir el cálculo supragingival. Mediante una sonda periodontal Williams se miden en milímetros, en la cara lingual de los seis dientes anteroinferiores, los siguientes planos (**Figuras 12, 13 y 14**):

- Bisectriz del centro de la superficie.
- Diagonal desde el ángulo mesio-incisal o mesio-oclusal de los dientes hasta el área de mayor altura del cálculo.
- Diagonal desde el ángulo disto-incisal o disto-oclusal hasta el área de mayor altura del cálculo.



Figuras 12,13 y 14. Medición del índice de Volpe-Manhold.

De este modo se obtienen tres medidas por cada diente que, posteriormente, se suman para obtener un valor numérico que será el índice de Volpe-Mahold.

b. Peso y volumen de cálculo

Para proceder a estas determinaciones, primero se irrigó con agua el 5º sextante con el fin de eliminar de forma grosera la placa bacteriana. A continuación se aisló la zona mediante rollitos de algodón y se empleó un ultrasonidos SONICflex® de KaVo para desprender el sarro de la superficie dental del 5º sextante. Éste se recolectó mediante aspiración continua con un aspirador recuperador de hueso Onmia® de la casa Proclinic (Barcelona, España). Se comprobó, con una cureta, que no quedara cálculo sobre el diente. Una vez finalizada la recogida, se aspiraba agua con objeto de eliminar la saliva del filtro y evitar, así, que su viscosidad dificultara la recogida de cálculo del aspirador y para limpiar el cálculo de restos de saliva, sangre y placa bacteriana. Por último se depositó el cálculo durante un minuto en un papel secante para separarlo del agua. Todo este procedimiento fue realizado empleando lupas Orasoptic® de 2,8 aumentos de Inibsa (Barcelona, España). Para medir el peso se utilizó una balanza de análisis de PCE Group® (Albacete, España) (**Figura 15**) con un rango de pesado de 10 mg a 100g y una capacidad de lectura de 0,1mg.



Figura 15. Balanza de análisis de PCE Group®.

Para medir el volumen, se empleó un picnómetro de la casa Afora (Barcelona, España) (**Figura16**) y se pesó en la balanza de análisis. En primer lugar se pesó el

picnómetro lleno de agua sin el sarro para obtener su peso. A continuación se vertió el sarro en el picnómetro y se volvió a pesar. Mediante la resta de ambas pesadas se obtuvo el peso de agua destilada desplazada por el sarro, y mediante la fórmula: $\text{densidad} = \text{masa} / \text{volumen}$ y sabiendo que el agua destilada tiene una densidad de 1 mg/cc, se obtuvo el volumen del cálculo.



Figura 16. Picnómetro.

Toda esta metodología aplicada al peso y volumen se había desarrollado en un estudio piloto. El resumen de este trabajo con el informe estadístico aparece en el *Anexo 6*.

4.6 Análisis de tejidos y registros fotográficos

Al tratarse de un estudio sobre un colutorio con una nueva formulación nos planteamos como necesario el efectuar un examen riguroso de mucosas y tejidos duros con el fin de comprobar que no se produjera ningún efecto adverso sobre dichos tejidos. Para ello el paciente debía realizar un cuestionario acerca de los cambios que hubiera observado en su cavidad oral y, posteriormente, se le realizaba una inspección visual detallada de tejidos duros y blandos para comprobar que no se hubiera producido ninguna lesión. Ante cualquier cambio observado se debían tomar registros fotográficos

mediante una cámara reflex digital Canon Eos 400D® con un macro Canon® de 100 mm y flash anular Sigma® y hacer un seguimiento semanal de las lesiones.

También queríamos reflejar las lesiones localizándolas en un esquema de la cavidad oral y describirlas, según consenso con la Unidad de Medicina Oral de la Facultad de Odontología de Valencia (**Figura 17**).

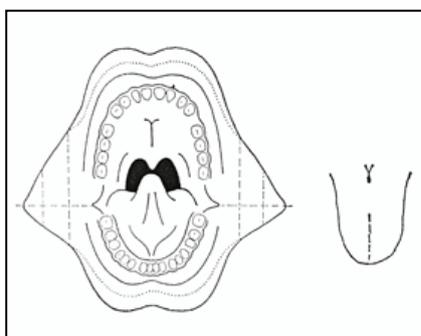


Figura 17. Esquema facilitado por la unidad de Medicina Oral de la Facultad de Odontología de Valencia.

4.7 Percepción por parte del paciente de los efectos del colutorio

Cada paciente rellenó un cuestionario con preguntas acerca de su percepción del colutorio en cuanto a:

- Molestias: picor, escozor, ardor o irritación.
- Efectos sobre dientes y mucosas: si habían notado alguna lesión en las mismas o tinciones en los dientes.
- Sabor: si les agradaba o no el sabor del colutorio.
- Eficacia: si habían percibido menor formación de cálculo durante el empleo del colutorio.

En la misma hoja había un apartado de “valoración del odontólogo”, por si el investigador consideraba pertinente hacer alguna anotación (*Anexo 4*).

5. ANÁLISIS EXTERNOS

5.1 Análisis químico de las muestras de saliva

Las muestras de saliva recogidas y congeladas en tubos Eppendorf se enviaron al hospital La Fe de Valencia, donde fueron sometidas a un análisis químico. En dicho análisis se determinó el contenido en urea, ácido úrico, calcio, fosfato, sodio, potasio y cloro que había en saliva recolectada.

Para procesar las muestras en el laboratorio se emplearon dos autoanalizadores:

- MODULAR ANALYTICS SWA, HITACHI 917[®], Roche (Basilea, Suiza): autoanalizador de química clínica (**Figura 18**), automático, de flujo continuo para la determinación cuantitativa de constituyentes en suero, plasma u otros líquidos biológicos humanos por el método Test color enzimático.
- BNII[®] de la casa Dade Behring (SIEMENS, Berlín, Alemania): autoanalizador automático de flujo continuo para la determinación cuantitativa de constituyentes en suero u otros líquidos biológicos humanos.



Figura 18. Autoanalizador Hitachi 917 de Roche®(Basilea, Suiza).

Los constituyentes inorgánicos se determinaron mediante reacciones colorimétricas, a excepción del sodio, el potasio y el cloro, para los cuales se empleó la técnica de electrodo ión selectivo, ya que es más rápida y sensible que las colorimétricas para estos componentes.

5.2 Análisis de las muestras de placa bacteriana

Todas las muestras de placa bacteriana, depositadas en tubos Eppendorf previamente marcados mediante una identificación para cada paciente y número de examen clínico, se enviaron al laboratorio Laboral (Barcelona, España). Allí se les realizaba un complejo proceso para detectar y cuantificar las especies objeto de estudio. Para ello se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), haciendo el análisis de PCR tanto cualitativo como cuantitativo, proceso que se describirá con detalle posteriormente.

Previa realización de la PCR fue necesario realizar una serie de procedimientos: obtención de cultivos plactónicos y extracción de DNA, para los cuales se emplearon una serie de medios de cultivo y cepas bacterianas con unas condiciones de crecimiento concretas. A continuación se explicarán dichos procedimientos previos a la PCR.

Los **medios de cultivo** que se emplearon para poder obtener los cultivos plactónicos y realizar la extracción de DNA fueron los siguientes:

- Agar BHI con extracto de levadura: Bacto Brain Heart Infusion (BD), 2% Extracto de Levadura (Oxoid).
- Agar sangre con hemina-menadiona: Blood Agar Base No. 2 (Oxoid), suplementado con hemina (5 mg/l), menadiona (1 mg/l) y 5% sangre de caballo desfibrinada (Oxoid).
- Agar sangre anaeróbico: agar soja tríptica (40 g/l), agar (5 g/l), extracto de levadura (5 g/l), L-Cisteína (0,4 g/l), 5% de sangre de caballo desfibrinada (Oxoid), hemina (5 mg/l) y Vitamina K1 (10 mg/ml).
- Medio líquido sangre anaeróbico: misma preparación que el anterior pero usando caldo de soja tríptica en vez de agar de soja tríptica y sin añadir agar.
- Medio líquido BHI con hemina-menadiona: 37 g/l BHI, 2,5 g/l mucina, 1 g/l extracto de levadura, 2 g/l bicarbonato sódico, 0,1 g/l L-Cysteine, 5 mg/l hemina, 1 mg/l menadiona, 0,25% ácido glutámico y 23,5 mM NaOH, pH ajustado a 7,5.
- PBS (phosphate-buffered saline).

Fue necesario emplear una serie de **cepas bacterianas** que se muestran en la **Tabla 5**, así como determinar las **condiciones de crecimiento** de las mismas. El crecimiento en anaerobiosis se realizó en el interior de una cámara de anaerobiosis capaz de mantener la temperatura estable y con una atmósfera constante de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂. La microaerofilia se consiguió en un incubador de CO₂ seco. El crecimiento aeróbico se hizo en un incubador estándar.

Microorganismo	Atmósfera/T ^a	Medio sólido	Medio líquido
<i>Corynebacterium matruchotii</i> DSM20635	Aerobiosis/37°C	Agar BHI con extracto de levadura. Incubación: 48 – 72h.	BHI líquido con hemina y menadiona. Incubación: 48h.
<i>Eubacterium saburreum</i> DSM3986	Anaerobiosis/37°C	Agar BHI con extracto de levadura. Incubación de 36 – 48h.	BHI líquido con hemina y menadiona. Incubación de 72 – 96h.
<i>Streptococcus sanguis</i> NCTC10904	Anaerobiosis/37°C	Agar sangre modificado. Incubación: 24 h.	BHI líquido con hemina y menadiona. Incubación: 18 h.

Tabla 5. *Cepas bacterianas usadas en este estudio.*

Con el fin de optimizar las diferentes técnicas que utilizaron *a posteriori* para el estudio cualitativo y cuantitativo de las muestras orales, se prepararon **cultivos planctónicos** para cada una de las especies objeto de estudio. Cada especie fue crecida en una placa de Petri con el medio correspondiente hasta observar colonias aisladas. Una colonia fue recogida y añadida a un tubo falcon con 20 ml del medio que conviniera, según la especie, y se incubó hasta alcanzar la mitad de su fase de crecimiento exponencial (medios, condiciones y tiempos especificados en Tabla 5). En ese momento se anotó la densidad óptica a 520 nm, se tomó una muestra para el conteo de las unidades formadoras de colonias (CFU). Cinco mililitros de dicho cultivo se centrifugaron a 8.000 g durante 10 minutos. Se descartó totalmente el líquido

sobrenadante y se congeló el precipitado celular a -80°C hasta el momento de su extracción.

Para realizar los experimentos de PCR cuantitativa fue necesario, además, hacer un banco de diluciones 1:100 en PBS siguiendo el el esquema de la **Figura 19**.

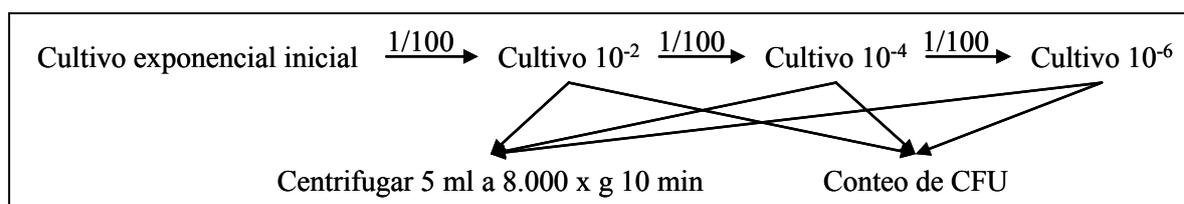


Figura 19. Esquema de diluciones

Una vez centrifugadas las 3 diluciones del cultivo, se descartó el sobrenadante y los pellets se congelaron a -80°C .

Como último paso antes de la PCR se realizó la **extracción de DNA**, tanto de muestras orales como de cultivos plactónicos. Utilizando el kit *QIAamp DNA Mini Kit* de Qiagen siguiendo las especificaciones del fabricante para purificación a partir de *Buccal Swabs*.

Una vez realizados todos los procedimientos descritos se pasó a la **realización de la PCR**, la prueba necesaria para saber el tipo y cantidad de bacterias que tenían las muestras que habíamos obtenido.

Análisis cualitativo de las muestras por PCR

La presencia o ausencia de cada una de las especies problema fue determinada mediante el uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada caso (Tabla 6). Antes de analizar las muestras se optimizaron las condiciones de la reacción de PCR (**Tabla 6**), usando para ello DNA extraído de cultivos planctónicos en fase exponencial. Nótese que los cultivos 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} no se utilizarían en este punto si no solamente para la técnica de qPCR.

Oligonucleótidos	Secuencia (5' →3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Fuente
<i>C. matruchoitii</i>		550	60	Este estudio
Cm 16S Up	GTGGTGACGGTACCTTTGTT			
Cm 16S Down	TACGTATCTCTACAACCGTCTG			
<i>E. corrodens</i>		688	56,5	(2)
Ec Up	CTAATACCGCATACGTCCTAAG			
Ec Down	CTACTAAGCAATCAAGTTGCC			
<i>E. saburreum</i>		435	60	Este estudio
Es 16S Up	AGATAAACTCTTCGGTGCCGCA			
Es 16S Down	AACCTCGCGGTCTTGCTTAC			
<i>S. sanguis</i>		572	56,5	Este estudio
San murA Up	AACTGAGGCAGAACTGTCTC			
San murA Down	CGGACCACATTGTCATGGT			

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos para la detección cualitativa de cada especie problema.

Para llevar a cabo las reacciones se utilizó el kit *Expand High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics). Para la mezcla de reacción se siguieron las especificaciones del fabricante, utilizando una concentración final de 0,5 μ M para cada oligonucleótido y 0,8 mM de dNTPs (Thermo Scientific). La reacción se llevó a cabo en un termociclador T3000 (Biometra). Los amplicones fueron posteriormente visualizados

mediante electroforesis de DNA utilizando geles de agarosa al porcentaje adecuado según el tamaño del fragmento amplificado. Estos geles fueron corridos en cubetas de electroforesis y visualizados en un sistema transiluminador gracias al uso de bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Análisis cuantitativo de las muestras por qPCR

Para determinar el número de células de cada especie presentes en cada muestra se utilizó el método de PCR cuantitativa (qPCR). Para ello se usó el kit *LightCycler 480 Probes Master* (Roche Diagnostics). El fundamento de este método en particular es el uso de un par de oligonucleótidos específicos para cada especie, más una sonda también específica marcada con el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' y con un quencher o inhibidor de fluorescencia como tetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3'. El método se basa en ciclos consecutivos de amplificación, donde los oligonucleótidos reconocen específicamente su diana en una región del DNA y permiten la amplificación de dicha región. A su vez, la sonda está unida en la zona central de la región, de modo que se encuentra en el camino de la polimerasa, que con su actividad exonucleasa 5' → 3' degrada la sonda, liberando a FAM y produciendo un aumento de la fluorescencia. Esta fluorescencia es leída por el aparato termociclador, en este caso el *LightCycler 480 II* (Roche Diagnostics).

La reacción se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante. Los oligonucleótidos y las sondas, la concentración final de los mismos en la reacción y las condiciones de temperatura utilizados se detallan en la **Tabla 7**.

Oligonucleótidos ^a	Secuencia (5' →3')	Tamaño (pb)	[] final (μM)	Tm (°C)	Fuente
<i>C. matruchotii</i>		87		59	Este estudio
Cm realT F	GATTGTGCACGCCATGTTGG		0,8		
Cm realT R	TCACTGTGAGCCTAGCTGCT		0,8		
Cm realT S ^b	TGGAATCGCATCCCAAGGAAGAA		0,2		
<i>E. saburreum</i>		69		59	Este estudio
Es IGR F	TCCACACCTATCTTGACGCC		0,5		
Es IGR R	AGAGTGAGCCGCATACACCA		0,5		
Es IGR S ^b	TTCACCACTTTTAAGCAGGGAGTAC		0,2		
<i>S. salivarius</i>		72		58	Este estudio
Sal tnpA F	GGCAAAGGTCTATTACCAACT		0,8		
Sal tnpA R	TGGCTTCTCTAGCATGACGA		0,8		
Sal tnpA S ^c	TGCTGCTC		0,2		
<i>S. sanguis</i>		75		56	(5)
San gtfP F	CAAAATTGTTGCAAATCCAAAGG		0,9		
San gtfP R	GCTATCGCTCCCTGTCTTTGA		0,9		
San gtfP S ^b	AAAGAAAGATCGCTTGCCAGAACCGG		0,2		
<i>V. parvula</i>		60			Este estudio
Vp 16S F	GAAAGCCACGGCTAACTACG		0,8		
Vp 16S R	GACAACGCTTGCCACCTAC		0,8		
Vp 16S S ^c	CAGCAGCC		0,2		

^a F, oligonucleótido directo; R, oligonucleótido reverso; S, sonda marcada con FAM.

^b Sonda con el quencher TAMRA proporcionada por Applied Biosystems.

^c Sonda diseñada y obtenida gracias a la herramienta on-line *Universal ProbelLibrary Assay Design Center* de Roche Applied Science.

^d Sonda tipo MGB con quencher no-fluorescente de Applied Biosystems.

Tabla 7. Oligonucleótidos y sondas utilizados para la detección cuantitativa de cada especie.

Para cada especie analizada, el **plan de trabajo** fue el siguiente:

1. Se realizaron PCRs convencionales ensayando varias concentraciones del par de oligonucleótidos en un rango de entre 0,2 y 0,9 μM , eligiendo las que producían mayor amplificación.
2. Se verificó que los oligonucleótidos fueran específicos para esa especie preparando reacciones de PCR, utilizando como molde DNA de las otras especies y comprobando que no había amplificación.
3. A partir del DNA extraído del cultivo planctónico exponencial se hizo un banco de diluciones en agua Milli-Q para cubrir el rango de 10^{-1} a 10^{-9} . El tubo sin dilución contenía la cantidad de DNA correspondiente a las CFU del cultivo previamente determinadas (véase *Obtención cultivos planctónicos*). Así, si el tubo sin dilución correspondía a 10^9 CFU, la dilución 10^{-1} serían 10^8 CFU, la dilución 10^{-2} 10^7 CFU, etc.
4. Dicho banco de diluciones se utilizó para construir una recta patrón (standard curve) (Figura 1A). Para ello se realizó un ensayo de qPCR, en donde se hicieron 3 réplicas de cada dilución más 2 reacciones de control negativo (Milli-Q en vez de DNA). Las reacciones se hicieron en el termociclador *LightCycler 480 II* y mediante el software *Light cycler*® 480 Version 1.5 se calculó el *crossing point* (Cp) para cada reacción.
5. El mismo *software* nos permitió calcular las medias y sus desviaciones estándar para cada dilución ensayada por triplicado. Con estos datos se construyó una recta patrón que correlacionó los Cps con el logaritmo de las CFU (Figura 1B).

6. Finalmente, la cuantificación de cada una de las especies en cada muestra se realizó por triplicado. Las CFU de cada especie se estimaron mediante la interpolación de los Cps obtenidos en cada reacción en la recta patrón realizada previamente para cada especie. Se analizaron sólo las muestras que habían sido positivas en los experimentos de PCR cualitativa.

6. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Se dispone de una muestra total de 37 sujetos sobre los que valorar la eficacia de un colutorio en la inhibición del cálculo dental. Los mismos individuos constituyen el grupo control al serles administrado un placebo. El diseño del estudio se corresponde con un ensayo aleatorizado, cruzado y doble ciego.

Realizamos un **análisis descriptivo** que nos proporciona los estadísticos más relevantes para cada uno de los parámetros y diferencias entre los dos colutorios (placebo A y test B): media, desviación estándar, mínimo, máximo y mediana (para continuos) y frecuencias absolutas y relativas (para no continuos).

La normalidad de las medidas continuas se contrastó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, decidiéndose un enfoque paramétrico o no paramétrico de las pruebas en base a los resultados.

Asimismo, realizamos un **análisis inferencial** que tiene por objeto determinar si existen diferencias significativas en los parámetros respuesta debidas al tipo de colutorio utilizado.

- Se ha estimado un Modelo Lineal General de medidas repetidas para las variables respuesta de distribución normal. El diseño es mixto (split-plot) y

contempla la inclusión de dos factores intra-sujetos o de medidas repetidas: el tiempo con 2 niveles: T1-basal y T2-final, el colutorio A o B y un factor entre-sujetos: el orden de uso del colutorio.

El modelo evaluará los efectos principales y la interacción de los distintos factores (la efectividad del colutorio B se medirá a partir del resultado de la interacción entre los intra-sujetos) a partir del test F para la traza de Pillais.

Para las comparaciones múltiples (post-hoc) se utiliza el test de Bonferroni, generalmente para evaluar los cambios de un parámetro tras la toma de cada uno de los colutorios.

- Para otros indicadores no continuos o sin ajuste a la normal, la influencia de los colutorios se valora mediante test de McNemar (para cambios en proporciones) o test de Wilcoxon para muestras apareadas (para cambios en las distribuciones).

El nivel de significatividad empleado en los análisis ha sido el 5% ($\alpha=0.05$)¹.

Con la intención de establecer la capacidad de nuestro estudio para detectar diferencias de acuerdo al tamaño muestral empleado y las pruebas utilizadas para el contraste estadístico, para una prueba t apareada, con un nivel de significatividad del 5% y considerando un tamaño del efecto a detectar de 0,5, vemos que la potencia alcanzada es 0,84 para detectar diferencias inducidas por los colutorios. Esto implica que para detectar las diferencias entre colutorios nuestro tamaño muestral es suficiente. Sin embargo, para la comparación de otros parámetros como apiñamiento, troneras, diastemas y tabaco, en los que el tamaño muestral se reduce, la muestra resulta

¹Cualquier p-valor menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa. Por contra, un p-valor mayor o igual a 0.05 indica ausencia de relación.

insuficiente. De esta manera podremos ver tendencias, pero no resultados estadísticamente significativos para dichos resultados.

6. RESULTADOS

De la muestra de 40 sujetos que comenzaron el estudio, finalmente quedaron 37. Hubo abandono de 3 pacientes, el primero debido a problemas de salud, el segundo a traslado de domicilio y del tercero por falta de colaboración, con lo que dejó de cumplir los criterios de inclusión. Pese a la disminución de la muestra en 3 sujetos, la potencia del estudio fue de 0,84. Es una potencia alta, ya que la cuantificación de este parámetro se valora de 0 a 1, siendo 1 el valor más alto. Por tanto, 0,84 es una potencia alta.

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en la presente memoria hemos decidido establecer una secuencia de seis apartados en los que iremos analizando los diferentes datos.

En primer lugar, observaremos diversos aspectos salivales con el objetivo de analizar si se produjeron modificaciones de los mismos tras el empleo de los colutorios y comprobar si hay relación entre su modificación y la magnitud de cálculo formado.

En segundo lugar, valoraremos si la presencia de ciertos microorganismos de la placa bacteriana (*Eubacterium Saburreum*, *Corynebacterium matruchotti*, *Veillonella párvula*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans*) se ve modificado tras la toma de los colutorios, y en el caso de modificarse, si puede relacionarse dicha modificación con un aumento o disminución de la formación de cálculo.

A continuación, estudiaremos los parámetros mediante los cuales se cuantificó la magnitud de cálculo formado tras el colutorio test y tras el colutorio placebo, para así analizar si el colutorio test resulta eficaz en la inhibición del sarro.

En cuarto lugar se analizará la importancia que pueden tener ciertas características del paciente en la formación de cálculo como la presencia de apiñamiento, troneras, diastemas y el hábito tabáquico.

También estudiaremos la influencia sobre las mucosas y dientes de los colutorios mediante una exploración clínica.

Por último, se abordará el aspecto de como fue la percepción por parte de los pacientes de ambos colutorios en cuanto a si apreciaron alguna de las siguientes molestias: picor, escozor, ardor o irritación; si les gustó el sabor; si observaron alguna tinción tras su empleo y si subjetivamente les pareció que formaron menos cálculo.

1. INFLUENCIA DEL COLUTORIO SOBRE LOS PARÁMETROS SALIVARES

Quisiéramos recordar, en este apartado, el significado que tienen los parámetros salivales en la producción del cálculo y, por tanto, la importancia de analizarlos. Distintos autores han visto una correlación entre el flujo salival y la formación de cálculo. Las zonas donde mayor cantidad de cálculo supragingival se sitúan en lingual de incisivos inferiores y vestibular de molares superiores, coincidiendo con la salida del conducto Wharton en el que desemboca la saliva producida por la glándula submaxilar y el conducto de Stenon perteneciente a la glándula parótida. Por ello se asocian zonas con mayor flujo salival a un mayor acúmulo de cálculo.

Respecto al pH, en diversas publicaciones se relaciona un pH básico con la mayor deposición de cálculo ya que cuando el pH aumenta va a proporcionar un medio ideal para la precipitación de fosfatos de calcio.

También se ha relacionado la composición iónica de la saliva con la mayor formación de cálculo, señalando como responsable principal al ión calcio.

Viendo la repercusión a nivel de la bibliografía estudiada que tienen dichos parámetros, decidimos analizarlos para ver si había diferencias entre una muestra inicial tomada previa utilización de ambos colutorios, una muestra tras tres meses de empleo del placebo y otra tras tres meses de empleo del test; y si estas diferencias se podían relacionar con la magnitud de cálculo formado. En la **tabla 8** podemos ver un resumen de todos los datos, presentando en las tablas T6 a T14 del *Anexo 7* toda la información descriptiva.

	BASAL	FINAL			Diferencia	
	Media \pm de	COLUTORIO	Media \pm de	p-valor ¹	Media \pm de	p-valor ²
FLUJO SALIVAR (ml/min)	0,51 \pm 0,32	PLACEBO	0,61 \pm 0,35	0,026*	0,09 \pm 0,25	0,186
		TEST	0,68 \pm 0,38	0,002**	0,16 \pm 0,30	
PH	6,8 \pm 0,6	PLACEBO	7,0 \pm 0,4	0,128	0,2 \pm 0,6	0,128
		TEST	7,1 \pm 0,5	0,007**	0,3 \pm 0,5	
UREA (mg/dl)	45,8 \pm 16,4	PLACEBO	32,0 \pm 5,8	<0,001** *	-13,8 \pm 16,8	0,109
		TEST	35,4 \pm 9,8	0,003**	-10,4 \pm 19,4	
ÁCIDO ÚRICO (mg/dl)	3,5 \pm 2,0	PLACEBO	2,5 \pm 0,8	0,008**	1,0 \pm 2,1	0,440
		TEST	2,7 \pm 1,2	0,002**	0,8 \pm 1,5	
CALCIO (meq/l)	1,8 \pm 0,6	PLACEBO	2,2 \pm 1,1	0,089	0,4 \pm 1,3	0,081
		TEST	2,5 \pm 1,6	0,015*	0,7 \pm 1,7	
FÓSFORO (meq/l)	20,6 \pm 8,5	PLACEBO	10,2 \pm 1,1	<0,001** *	-10,4 \pm 8,4	0,976
		TEST	10,2 \pm 0,7	<0,001** *	-10,4 \pm 8,6	
SODIO (meq/l)	9,6 \pm 4,9	PLACEBO	9,3 \pm 1,1	0,753	-0,3 \pm 4,9	0,324
		TEST	9,0 \pm 1,3	0,530	-0,6 \pm 5,2	
POTASIO (meq/l)	31,4 \pm 6,7	PLACEBO	30,5 \pm 1,4	0,449	-0,9 \pm 7,0	0,254
		TEST	30,8 \pm 1,8	0,673	-0,5 \pm 7,1	
CLORO (meq/l)	18,5 \pm 7,8	PLACEBO	19,5 \pm 2,2	0,480	1,0 \pm 8,2	0,387
		TEST	19,9 \pm 1,7	0,324	1,4 \pm 8,3	

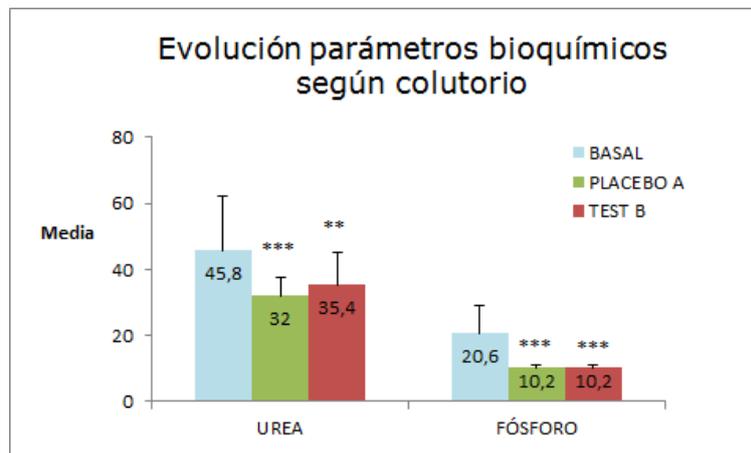
1. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. 2. Test F para la traza de Pillais

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

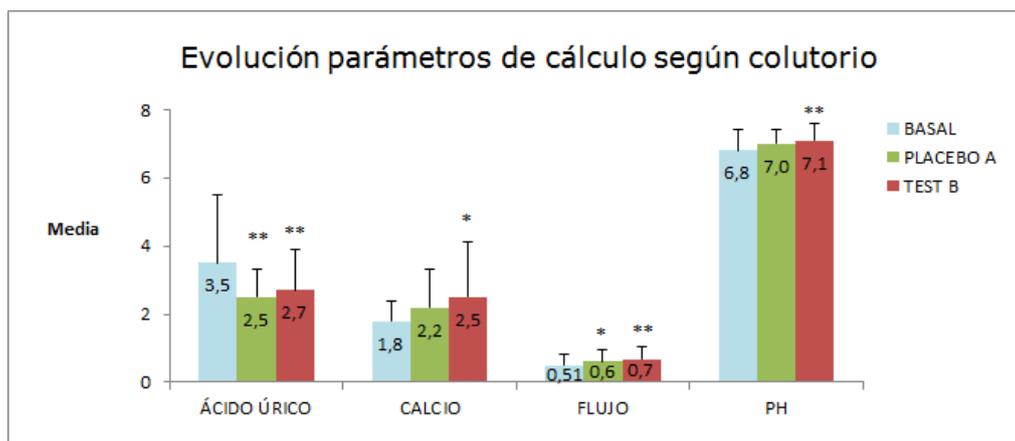
Tabla 8. Parámetros salivales: Resultados obtenidos del MLG de medidas repetidas con factores intra-sujetos tiempo y colutorio e inter-sujetos el orden de la toma del colutorio.

En las **gráficas 1 y 2** presentamos la evolución de los parámetros salivales en el examen basal y según el colutorio empleado. Para la urea, el fósforo y el ácido úrico en el examen basal se aprecian unos valores mayores, que disminuyen con la toma de colutorios, sin embargo para el calcio ocurre lo contrario, los valores se incrementan

desde el examen basal al placebo y también del placebo al test. Lo mismo ocurre respecto al flujo salival y al pH. No aparecen representados el sodio, el potasio y el cloro ya que, como veremos a continuación, no hubo cambios significativos en dichos parámetros tras la toma de colutorios.



Gráfica 1



Gráfica 2

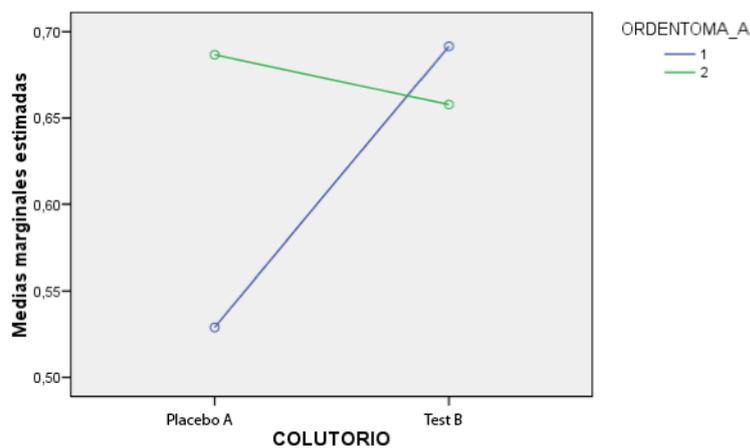
1.1 FLUJO SALIVAL 1 MINUTO

Se ha medido el flujo salival en cada paciente en tres ocasiones: se recogió una primera muestra al inicio, sin que el paciente hubiera empleado colutorio alguno, otra tras el placebo y otra tras el test. El empleo de un colutorio previo a otro se realizó de forma aleatoria. Respecto al tiempo transcurrido entre la toma de colutorio y la muestra

de saliva fue mínimo, ya que los sujetos del estudio debían enjuagarse durante 1 minuto después del cepillado de la mañana, y la muestra de saliva se realizaba también a primera hora de la mañana para minimizar la variabilidad.

Este parámetro ha aumentado significativamente tras la toma de ambos colutorios (colutorio placebo A $p=0,026$ y colutorio test B $p=0,002$). Aunque el incremento ha sido de mayor cuantía tras el colutorio test B, no puede hablarse de diferencias significativas en ambas variaciones ($p=0,186$). Por tanto, el flujo salival ha aumentado tras ambos colutorios pero sin diferencias significativas entre ellos.

Respecto a la influencia del orden de productos, ha de estudiarse la situación, pues se sugiere una marcada diferencia ($p=0,062$). Concretamente, si se ha tomado en primer lugar el placebo A, el aumento es de mayor impacto tras aplicarse el test B. Esta situación se representa en la **gráfica 3**.



Gráfica3

1.2 PH

El pH se ha relacionado con la formación de cálculo, asociando un pH básico con una mayor deposición de cálculo, ya que cuando el pH aumenta va a proporcionar un medio ideal para la precipitación de fosfatos de calcio.

En nuestro estudio, se ha registrado el pH en los tres exámenes que se les han realizado a los pacientes: un registro al inicio del estudio, sin que el paciente hubiera empleado ningún colutorio, otro tras el uso colutorio placebo A y otro tras el test B, siendo los valores obtenidos 6,8, 7,0 y 7,1 respectivamente.

El aumento de PH obtenido con el test B es significativo ($p=0,007$), resultado que no se produce tras la toma del placebo ($p=0,128$). No obstante, los cambios cuantificados no difieren lo suficiente como para hablar de un efecto contundente ($p=0,128$). El orden de toma de colutorios no implica cambios relevantes en los resultados como ha sucedido con otros parámetros ($p=0,383$).

1.3 UREA

Todos los parámetros químicos se analizaron en tres ocasiones, al igual que el flujo salival y el pH: al inicio del estudio, tras el placebo A y tras el test B. Los valores obtenidos para la urea fueron: 45,8 mg/dl en el inicio, 32,0 mg/dl con el placebo A y 35,4 mg/dl con el placebo B.

Tras la toma del colutorio test hay una disminución significativa de la urea ($p=0,003$); pero también se percibe tras la toma del colutorio placebo ($p<0,001$). Además las diferencias son de la misma magnitud en un caso y otro ($p=0,109$), por lo

que la disminución producida en la urea es comparable con ambos productos. Tampoco hay diferencias derivadas del orden en que se toman los productos ($p=0,305$).

1.4 ÁCIDO ÚRICO

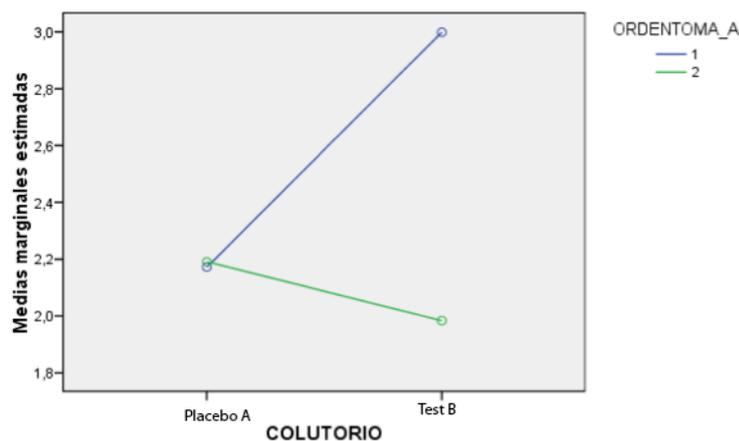
Los valores obtenidos para el ácido úrico fueron: 3,5 mg/dl en la toma inicial, 2,5 mg/dl tras el placebo A y 2,7 mg/dl tras el test B. Al analizar estos datos, los resultados son idénticos a los mencionados para la urea: hay una disminución significativa tras test ($p=0,002$); pero también tras placebo ($p=0,008$). La diferencia es de la misma proporción en uno y otro caso ($p=0,440$). No hay diferencias según el orden en que se toman los productos ($p=0,470$).

1.5 CALCIO

En cuanto al calcio, se obtuvieron valores de 1,8 meq/l al inicio del estudio, 2,2 meq/l tras el placebo A y 2,5 meq/l tras el test B. El colutorio test B aumenta significativamente el nivel de calcio ($p=0,015$). El placebo A también lo hace; aunque no con una intensidad tan fuerte ($p=0,089$).

Aunque los incrementos no se diferencian significativamente, sí permiten hablar de un mayor impacto del colutorio test B ($p=0,081$).

En este caso, sí se advierte cierta influencia del orden de toma de los colutorios ($p=0,005$). Cuando el placebo A se administra primero, es mucho más alta la elevación del calcio conseguida con el test B respecto al placebo A, como puede apreciarse en la **gráfica 4**.



Gráfica 4

1.6 FÓSFORO

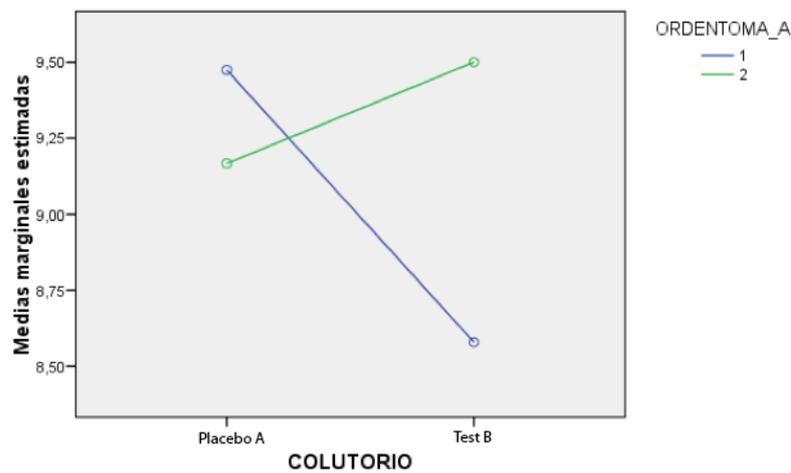
Los valores de fósforo obtenidos fueron 20,6 meq/l al inicio, 10,2 meq/l tras el placebo A y 10,2 meq/l tras el test B. Los resultados indican que se ha producido una disminución notable del fósforo con el test B ($p < 0,001$); pero también con el placebo A ($p < 0,001$). Ambas disminuciones son de una dimensión parecida ($p = 0,976$).

No hay diferencias en función de que se tome primero A ó B ($p = 0,770$).

1.7 SODIO

El sodio tuvo unos valores de 9,6 meq/l en el inicio del estudio, 9,3 meq/l tras el placebo A y 9,0 meq/l tras el test B. No hay variación en el nivel de sodio tras el placebo A ($p = 0,753$), ni tras el test B ($p = 0,530$). Es, por ahora, el único parámetro que no alteran los colutorios.

Sin embargo, se detecta una cierta importancia del orden. Cuando el placebo A se toma en primer lugar, el valor final de sodio con placebo A es mayor que con test B ($p=0,028$). Si el orden es el contrario, la tendencia también; pero menos acusada. Esto puede apreciarse en la **gráfica 5**.



Gráfica 5

1.8 POTASIO

Los valores de potasio obtenidos fueron 31,4 meq/l al inicio, 30,5 meq/l tras el placebo A y 30,8 meq/l tras el test B. Por tanto este es otro parámetro que se ha mostrado estable tras la toma de ambos colutorios ($p=0,449$ y $p=0,673$, para placebo A y test B respectivamente).

No hay influencia detectable del orden de aplicación ($p=0,413$).

1.9 CLORO

El cloro tuvo valores de 18,5 meq/l al inicio, 19,5 meq/l tras el placebo A y 19,9 meq/l tras el test B. No hay cambios en el nivel de cloro tras la toma del placebo A ($p=0,480$), ni tras la del test B ($p=0,324$).

Tampoco existe influencia del orden de toma ($p=0,880$).

Resumen de los parámetros salivares

Los dos colutorios exhiben un patrón muy similar en cuanto a sus alteraciones en la composición salivar.

En parámetros como el sodio, cloro o potasio, la influencia es nula por parte de los dos colutorios. Los niveles permanecen estables a lo largo del estudio.

En otros como la urea, el ácido úrico y el fósforo, existe una evidente alteración; pero semejante con ambos colutorios que tienden a disminuir los valores en saliva.

Finalmente, el calcio, el flujo salivar y el PH tienden a incrementarse más con el colutorio test B; pero no puede hablarse de una reacción definitivamente distinta a la ejercida por el placebo A.

En algunos parámetros como calcio y flujo, tomar en segundo lugar el test-B intensifica las diferencias en los valores finales respecto al placebo. Para el sodio, en cambio, la tendencia es opuesta.

2. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE LA PLACA BACTERIANA SUPRAGINGIVAL

Para analizar los parámetros que podían tener relación con la formación de cálculo, consideramos que era relevante analizar la composición bacteriana de la placa supragingival, ya que el tipo de bacterias presentes en dicha placa se ha relacionado en la bibliografía estudiada con la calcificación y formación de depósitos de cálculo.

Como se explica en el material y método, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa, para saber la presencia o no de las bacteria estudio; y también cuantitativa (qPCR), para conocer la carga bacteriana. A continuación se explicarán los resultados obtenidos en ambos análisis.

2.1 Prevalencia PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Las **tabla 9** se presenta un resumen de la prevalencia bacteriana y de las pruebas de muestras relacionadas. Para ampliar dicha información, en las tablas T19 a T34 del *Anexo 7* aparece toda la información descriptiva referida a las variables de bacterias (prevalencia, carga, logaritmo de la carga y desviación estándar de las serie de réplicas obtenidas en el laboratorio por paciente).

	BASAL	FINAL			Diferencia	
	% positivos	COLUTORIO	% positivos	p-valor ¹	% negativizaron / positivizaron	p-valor ²
E. SABORREUM	100%	PLACEBO	100%	1,000	0% / ---	0,816
		TEST	97,3%	1,000	2,7% / ---	
C. MATRUCHOTTI	100%	PLACEBO	100%	1,000	0% / ---	0,157
		TEST	94,6%	1,000	5,4% / ---	
V. PARVULA	100%	PLACEBO	100%	1,000	0% / ---	1,000
		TEST	100%	1,000	0% / ---	
S. SANGUIS	100%	PLACEBO	100%	1,000	0% / ---	1,000
		TEST	100%	1,000	0% / ---	
S. SALIVARIUS	27%	PLACEBO	32,4%	0,754	10,8% / 16,2%	0,206
		TEST	43,2%	0,070	2,7% / 18,9%	
S. MUTANS	10,8%	PLACEBO	16,2%	0,625	2,7% / 8,1%	0,414
		TEST	21,6%	0,219	2,7% / 13,5%	

1. Test de McNemar para evaluar si hay cambios en la prevalencia inicial-final. 2. Test de Wilcoxon para evaluar si la evolución experimentada (negativización, estabilización, positivización) es similar con ambos colutorios.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Tabla 9. Parámetros bacteriológicos: Prevalencia. Resultados obtenidos en las pruebas de muestras relacionadas.

Como se observa, en ninguna de las bacterias se produce un cambio significativo de la prevalencia (positividad) tras la toma del placebo ni tras la toma del test-B.

La única tendencia, mínimamente remarcable, se refiere al aumento que se registra en la *S. Salivarius* tras la aplicación del colutorio test-B (p=0,070). Inicialmente el 27% de los pacientes la presenta positiva y tras el uso del colutorio test B la proporción se eleva al 43,2%.

2.2 Carga (qPCR)

Se realiza el análisis de la carga bacteriana detectada por la qPCR para las bacterias mencionadas en la tabla 9. Este análisis se realiza exclusivamente sobre aquellos pacientes que presentan PCR positiva y qPCR por encima del límite de detección. La información que nos puede aportar este análisis es independiente; pero complementaria al anterior:

- Aunque una bacteria se presente con una prevalencia similar con uno y otro colutorio ¿es la carga absoluta también homogénea tras la toma de ambos?
- Podría darse el caso, asimismo, de que las prevalencias fueran significativamente distintas; pero las cargas medias o distribuciones de valores de carga parecidos.

En la **tabla 10** se pueden apreciar los resultados obtenidos de la PCR cuantitativa. Para que los datos resultaran más sencillos para el análisis y la representación gráfica, se ha transformado la carga CFU (unidades formadoras de colonias) mediante logaritmo decimal. De esta manera los números son más manejables. Además, la transformación logarítmica favorece la normalización de las variables originales, la estabilización de su varianza y la aplicación de test de tipo paramétrico para un tamaño muestral suficiente .

	BASAL	FINAL			Diferencia	
	Media \pm de	COLUTORIO	Media \pm de	p-valor ¹	Media \pm de	p-valor ²
EUBACTERIUM	5,10 \pm 1,07	PLACEBO	5,18 \pm 0,99	0,621	-0,06 \pm 1,09	0,304
		TEST	5,29 \pm 1,11	0,515	0,14 \pm 0,83	
C. MATRUCHOTTI	6,34 \pm 0,79	PLACEBO	6,46 \pm 1,08	0,205	0,12 \pm 0,97	0,780
		TEST	6,56 \pm 0,86	0,275	0,14 \pm 0,77	
V.PARVULA	7,00 \pm 0,59	PLACEBO	6,95 \pm 0,69	0,488	-0,05 \pm 0,51	0,680
		TEST	6,99 \pm 0,67	0,912	-0,01 \pm 0,63	
S. SANGUIS	8,67 \pm 0,60	PLACEBO	8,67 \pm 0,66	0,973	0,00 \pm 0,69	0,853
		TEST	8,65 \pm 0,61	0,801	0,03 \pm 0,64	
S.SALIVARIUS	6,04 \pm 1,13	PLACEBO	6,06 \pm 1,20	1,000 ⁽³⁾	0,17 \pm 2,29	0,655 ⁽³⁾
		TEST	6,21 \pm 0,78	0,866 ⁽³⁾	0,05 \pm 1,20	
S. MUTANS	4,25 \pm 0,70	PLACEBO	4,32 \pm 0,54	0,655 ⁽³⁾	-0,08 \pm 0,44	0,614 ⁽³⁾
		TEST	4,64 \pm 0,91	0,655 ⁽³⁾	0,05 \pm 1,54	

1. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. 2. Test F para la traza de Pillais. (3). Test de Wilcoxon
*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Tabla 10. Parámetros bacteriológicos: Transformada logarítmica de la carga CFU. Resultados obtenidos del MLG de medidas repetidas con factores intra-sujetos tiempo y colutorio e inter-sujetos el orden de la toma del colutorio para las bacterias Eubacterium, Matruchotti, V.parvula y S.sanguis. Resultados del test de Wilcoxon para S.salivarius y S.mutans. Base: Pacientes por encima del nivel de detección de la qPCR.

Los datos que aparecen en la tabla anterior (Tabla 10), se explican a continuación, centrándonos en cada una de las especies individualmente.

a. EUBACTERIUM SABURREUM

Sin cambios importantes tras tomar placebo A (p=0,621) o test B (p=0,515).

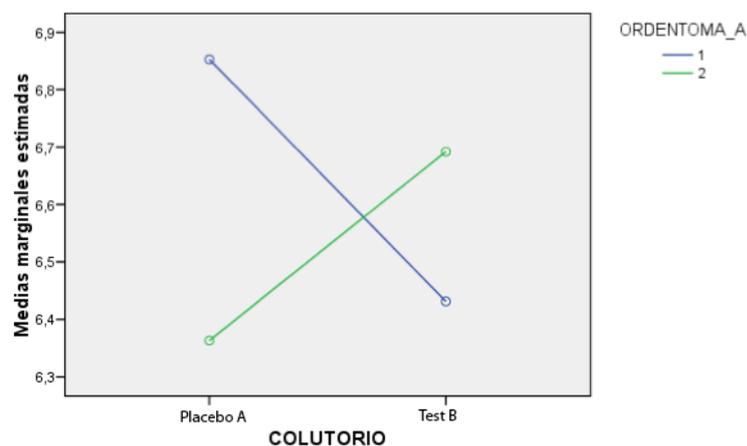
Tampoco influye el orden en que se aplicaron los fármacos (p=0,876).

b. CORYNEBACTERIUM MATRUCHOTTI

También sin cambios tras placebo A ($p=0,205$) y tras test B ($p=0,275$).

En este caso, sí se observan ciertas diferencias según se aplique primero un colutorio u otro ($p=0,030$). Concretamente, si se aplica primero el placebo A es más probable que la carga tras placebo supere a la carga tras test B. Pero si se aplica primero el test B, la situación es la opuesta.

En resumen, el colutorio que se administra primero se asocia a un mayor nivel final de carga de esta bacteria, como se aprecia en la **gráfica 6**.



Gráfica 6

c. VEILLONELLA PÁRVULA

También sin cambios tras placebo A ($p=0,488$) y tras test B ($p=0,912$).

No existen discrepancias debidas al orden de administración ($p=0,343$).

d. STREPTOCOCCUS SANGUIS

También sin cambios tras placebo A ($p=0,973$) y tras test B ($p=0,801$).

No hay influencia del orden de toma ($p=0,171$).

e. STREPTOCOCCUS SALIVARIUS

La prueba de Wilcoxon no ha detectado, en este caso, diferencias en las distribuciones de carga bacteriana.

f. STREPTOCOCCUS MUTANS

El resultado es similar al de la *S.salivarius*: ausencia de diferencias significativas.

Resumen de los parámetros bacteriológicos

En términos de prevalencia y de carga absoluta, los colutorios no parecen inducir variaciones relevantes en las especies bacterianas estudiadas.

3. MAGNITUD DE CÁLCULO FORMADO

En este apartado se estudia el efecto de los colutorios sobre la formación del cálculo. Tanto en la **tabla 11** como en la **gráfica 7** podemos ver un resumen de los resultados obtenidos, pero para una mayor aproximación, las tablas T15 a T18 del *Anexo 7* presentan toda la información descriptiva referida a las variables de cálculo (índice de Volpe-Manhold, peso, y volumen).

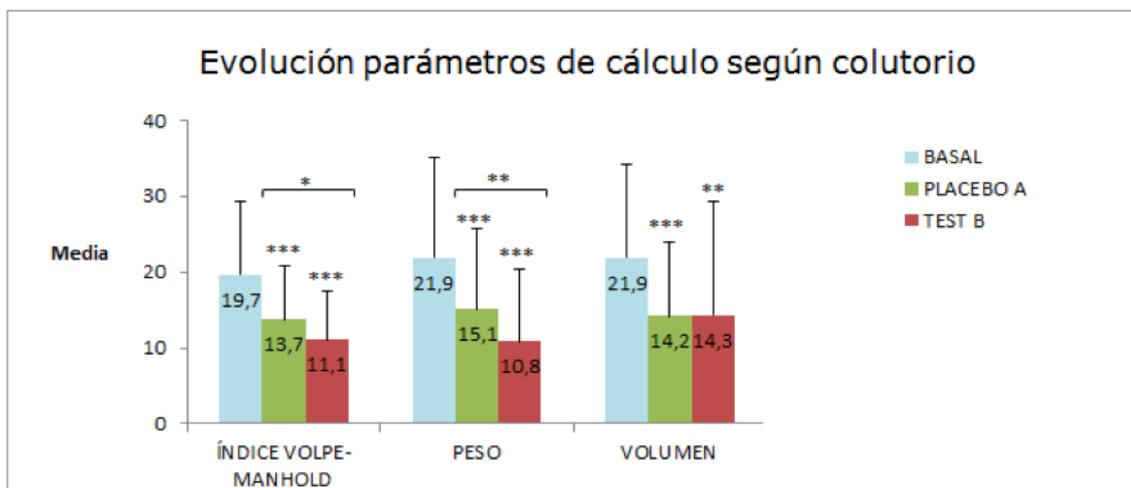
Se aplicó, para cada variable de cálculo, un Modelo Lineal General para valorar conjuntamente el efecto de cada colutorio, las diferencias entre ambos y el efecto del orden en que se toma el colutorio.

	BASAL	FINAL			Diferencia	
	Media ± de	COLUTORIO	Media ± de	p-valor ¹	FINAL - BASAL	
					Media ± de	p-valor ²
ÍNDICE VOLPE-MANHOLD	19,7 ± 9,6	PLACEBO	13,7 ± 7,1	<0,001***	-5,9 ± 4,9	0,012*
		TEST	11,0 ± 6,5	<0,001***	-8,6 ± 6,9	
PESO (mg)	21,9 ± 13,2	PLACEBO	15,1 ± 10,7	<0,001***	-6,8 ± 9,2	0,004**
		TEST	10,8 ± 9,6	<0,001***	-11,1 ± 10,3	
VOLUMEN (mm ³)	21,9 ± 12,3	PLACEBO	14,2 ± 9,7	<0,001***	-7,7 ± 10,4	0,989
		TEST	14,3 ± 14,9	0,009**	-7,5 ± 17,5	

1. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. 2. Test F para la traza de Pillais

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Tabla 11. Parámetros de cálculo: Resultados obtenidos del MLG de medidas repetidas con factores intra-sujetos tiempo y colutorio e inter-sujetos el orden de la toma del colutorio.



Gráfica 7. Representación gráfica de los parámetros de cálculo.

3.1 ÍNDICE DE VOLPE-MANHOLD

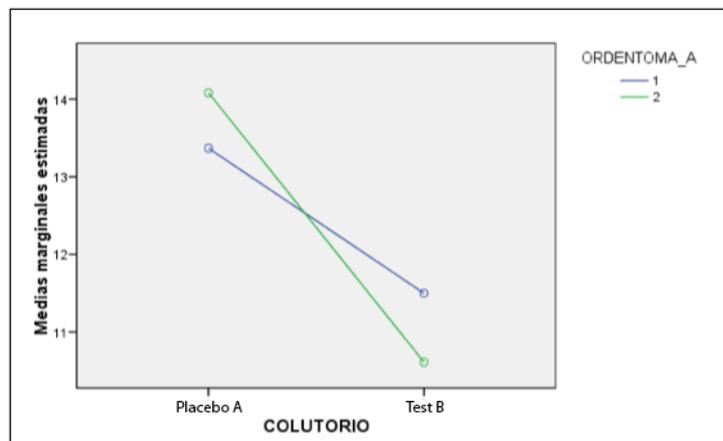
La media del índice en el momento basal fue de $19,70 \pm 9,62$, descendiendo a $13,7 \pm 7,1$ unidades tras el placebo A y a $11,0 \pm 6,5$ unidades tras la toma del colutorio test B

La disminución alcanzada con el test B es estadísticamente significativa ($p < 0,001$); pero también la alcanzada con el colutorio placebo A ($p < 0,001$). Por tanto, no hay evidencia definitiva de que la reducción se deba a un efecto beneficioso y exclusivo del colutorio test.

Sin embargo, la magnitud de la disminución no es igual con ambos productos: Con el test B la reducción es significativamente más amplia que con el placebo A ($p = 0,012$).

El orden en que se toma el colutorio no altera, en general, estas conclusiones ($p = 0,431$), aunque hay un detalle interesante: cuando se ha empezado tomando el

colutorio test B (línea verde en el gráfico siguiente), la ventaja del test B (colutorio n° 2 en el gráfico) sobre el placebo A (n° 1) se intensifica (**Gráfica 8**).



Gráfica 8

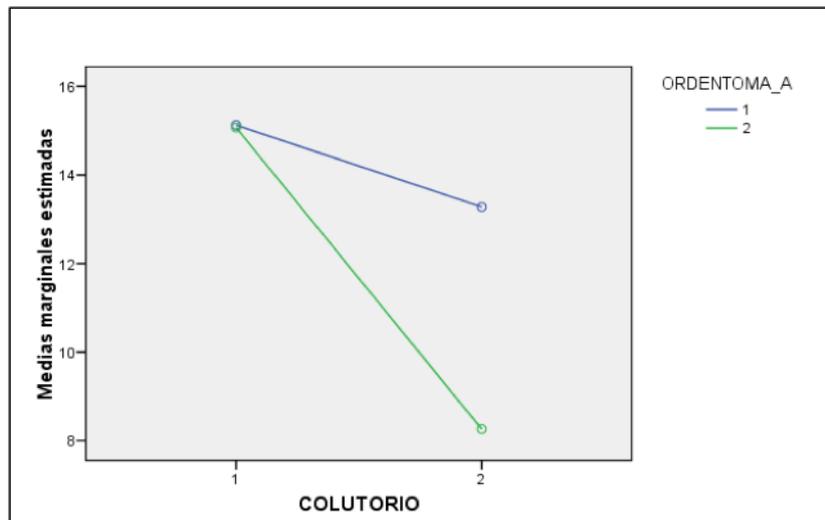
3.2 PESO

Las conclusiones respecto al peso son análogas a las del índice anterior en lo que respecta a la disminución registrada. La media del peso en el momento basal fue de $21,9 \pm 13,2$ mg descendiendo a $15,1 \pm 10,7$ mg tras el placebo A y a $10,8 \pm 9,6$ mg tras la toma del colutorio test B. Es estadísticamente significativa con test B ($p < 0,001$) y con el placebo A ($p < 0,001$), si bien el impacto conseguido con el colutorio test B es de mayor relevancia ($p = 0,004$).

De nuevo el orden en que se aplican los colutorios no alcanza la significatividad estadística ($p = 0,089$), si bien sugiere una fuerte tendencia.

La clave está en que tomando el colutorio test B en primer lugar, la ventaja de los resultados conseguidos frente al placebo A es significativamente mayor ($p = 0,002$, test Bonferroni). Si se toma el test B en segundo lugar, los valores de peso final conseguidos

con uno y otro producto son similares ($p=0,357$, Bonferroni), como se aprecia en la **gráfica 9**.

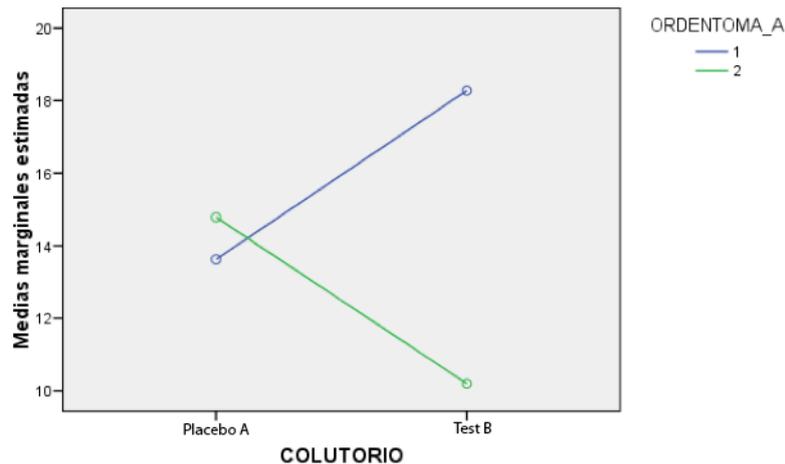


Gráfica 9

3.3 VOLUMEN

La media del volumen en el momento basal fue de $21,9 \pm 12,3 \text{ mm}^3$, descendiendo a $14,2 \pm 9,7 \text{ mm}^3$ tras el placebo A y a $14,3 \pm 14,9 \text{ mm}^3$ tras la toma del colutorio test B. La reducción media de volumen es significativa, tanto si se toma el colutorio test B ($p=0,009$), como si se toma el placebo A ($p<0,001$). En este parámetro, sin embargo, ambas disminuciones tienen que ser aceptadas como significativamente iguales ($p=0,989$). Por tanto, no hay evidencias de que el colutorio test B produzca un efecto claramente protector.

También el orden en que se tomaron está induciendo a pensar en un efecto adicional ($p=0,064$). La **gráfica 10** ilustra esta situación.



Gráfica 10

Si se toma primero el colutorio test B, éste consigue a nivel descriptivo ($p=0,195$, Bonferroni) un mejor resultado que el colutorio placebo A. Sin embargo, si el orden es el contrario, A parece funcionar mejor que B ($p=0,177$, Bonferroni).

Resumen parámetros de cálculo

Los 3 parámetros de dimensión del cálculo siempre han disminuido significativamente con el colutorio test B desde la medida basal a la final. Sin embargo, esto no es suficiente para garantizar que la disminución es exclusivamente debida al colutorio; ya que Volpe-Manhold, peso y volumen también disminuyeron con el placebo A.

En los dos primeros parámetros (Volpe-Manhold y peso) ha quedado demostrado que la reducción conseguida con el colutorio test B es de mayor magnitud que con el placebo A.

En el volumen, ambos colutorios se han comportado igual.

Es importante destacar que el orden en que se toman los colutorios está influyendo en los resultados. Así, por ejemplo, cuando se toma primero el test-B, la ventaja respecto al efecto de placebo-A se intensifica. Ello podría interpretarse como una mayor motivación de los pacientes en la primera fase del estudio.

4. INFLUENCIA DE OTROS FACTORES EN LA FORMACIÓN DE CÁLCULO

Existen una serie de factores que se han relacionado con una mayor retención de placa bacteriana y, por tanto, con una mayor formación de cálculo, como son el apiñamiento, los retenedores ortodóncicos, las prótesis fijas, etc. Puesto que se excluyó del estudio a todos aquellos sujetos que presentaban una característica externa que provocara mayor retención de placa bacteriana se ha analizado únicamente la influencia del apiñamiento en la formación de cálculo.

También se trató de ver la influencia que podían tener otras características que presentaban los pacientes como la presencia de troneras abiertas y diastemas en la formación de sarro.

En cuanto a la influencia del hábito tabáquico, hay opiniones contradictorias en la bibliografía. Por tanto, quisimos ver la influencia del tabaco en este tipo de pacientes elegidos para la muestra: muy formadores de sarro.

Al inicio del estudio se registraron todas las características que se quería analizar para compararlas posteriormente con la cantidad de cálculo formado. En este apartado se valora el efecto de esta serie de aspectos en la evolución del cálculo. Las tablas T3 y T5 de *Anexo 7* resumen toda la información descriptiva al respecto.

Se han replicado los modelos MLG (Modelo Lineal General, explicado en el apartado de metodología estadística) considerando como factores inter-sujetos las troneras, diastemas, apiñamiento y tabaquismo de forma sucesiva. Por tanto, el papel de la variable 'orden de toma' se ha sustituido ahora por cada uno de estos aspectos.

Aunque la muestra dividida en dos grupos conduce a tamaños bastante limitados, el fuerte ajuste a las condiciones de aplicación del análisis permite realizar los análisis, con dos notas importantes:

- Para los diastemas (sólo 6 casos), los resultados deben interpretarse descriptivamente (sin atender a p-valores)
- Para el tabaquismo, sólo se ha diferenciado en los modelos MLG entre condición de fumador y no fumador; ya que los fumadores son sólo 15 individuos. No obstante, las tablas de la serie 'F' presentan la descriptiva según intensidad de tabaco, por si se desea consultar alguna cifra en particular.

A continuación, se va a desglosar el análisis de cada una de las características nombradas.

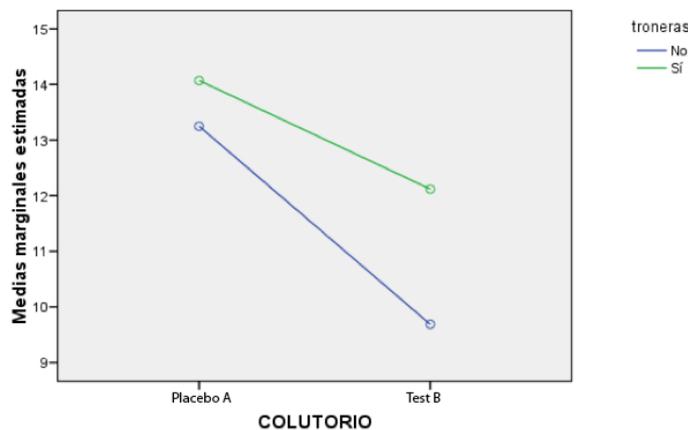
4.1 TRONERAS

Del total de pacientes que formaban la muestra del estudio, 21 pacientes tenían troneras abiertas y 16 no. Se ha relacionado esta característica con el índice de Volpe-Manhold, peso y volumen para ver si había una relación en cuanto a la formación de sarro (**Tabla 12**). Inicialmente los tres parámetros estaban más elevados en presencia de troneras. Para un mayor detalle pueden consultarse las tablas T15B, T16B y T17B del *Anexo 7*.

	VALORES MEDIOS SEGÚN TRONERAS					
	TOTAL		TRONERAS CERRADAS		TRONERAS ABIERTAS	
ÍNDICE DE VOLPE-MANHOLD	INICIO	19,70	INICIO	18,43	INICIO	20,67
	PLACEBO A	13,72	PLACEBO A	13,25	PLACEBO A	14,07
	TEST B	11,07	TEST B	9,69	TEST B	12,12
PESO	INICIO	21,90	INICIO	20,43	INICIO	23,02
	PLACEBO A	15,10	PLACEBO A	8,24	PLACEBO A	15,85
	TEST B	10,84	TEST B	11,43	TEST B	12,81
VOLUMEN	INICIO	21,86	INICIO	19,37	INICIO	23,76
	PLACEBO A	14,19	PLACEBO A	13,56	PLACEBO A	14,67
	TEST B	14,35	TEST B	9,89	TEST B	17,75

Tabla 12. Valores medios según troneras.

Respecto al índice de **Volpe-Manhold**, se ha detectado que, en presencia de troneras, la ventaja del colutorio test B sobre el placebo A se amortigua ($p=0,153$, test de Bonferroni), es decir, no se aprecia una disminución de cálculo tan superior como cuando no hay troneras abiertas. Por tanto, cuando no hay troneras sigue manifestándose significativamente ($p=0,026$) un mayor efecto del colutorio test. La **gráfica 11** ilustra esta situación.



Gráfica 11

Se puede interpretar que, con el colutorio placebo el valor final del índice V-M es parecido tanto si se tienen como si no se tienen troneras. Pero con el colutorio test, su efecto beneficioso se incrementaría cuando no hay troneras. En cualquier caso, hablamos de valores finales. El resultado asociado al efecto interacción “tiempo x colutorio x troneras” ($p=0,433$, test F) sugiere que la evolución es comparable tanto si se tienen troneras como si no. Es decir, las diferencias en los valores finales están moderadamente afectadas por el hecho de que inicialmente el grupo de troneras presenta un V-M algo mayor.

Respecto al **peso**, los resultados son idénticos a los mencionados para el índice V-M. Es decir, cuando se toma placebo A no influye presentar o no troneras ($p=0,127$, Bonferroni). Sin embargo, cuando se toma el test B, los resultados finales apuntan a un peso significativamente ($p=0,012$, Bonferroni) más bajo cuando no hay troneras. En términos globales de evolución, no puede hablarse de diferencias relevantes ($p=0,342$, test F).

En cuanto al **volumen**, no hay diferencias significativas en los valores finales de los dos colutorios, tanto dentro del grupo de las troneras como dentro del grupo no troneras. Tampoco la evolución general puede considerarse distinta ($p=0,186$, F).

4.2 DISTEMAS

Del total de pacientes que formaban la muestra del estudio, 6 pacientes presentaban diastemas y 31 no. Se ha relacionado una perspectiva puramente descriptiva, por el escaso número muestral, para ver si hay una relación en cuanto a la formación de sarro. La media de los datos aparece en la **tabla 13**, pero para un mayor detalle pueden consultarse las tablas T15C, T16C y T17C del *Anexo 7*.

	VALORES MEDIOS SEGÚN DIASTEMAS					
	TOTAL		SIN DIASTEMAS		CON DIASTEMAS	
	INICIO		INICIO		INICIO	
ÍNDICE DE VOLPE-MANHOLD	INICIO	19,70	INICIO	19,95	INICIO	18,42
	PLACEBO A	13,72	PLACEBO A	14,42	PLACEBO A	10,08
	TEST B	11,07	TEST B	11,39	TEST B	9,42
PESO	INICIO	21,90	INICIO	21,65	INICIO	23,22
	PLACEBO A	15,10	PLACEBO A	15,71	PLACEBO A	11,93
	TEST B	10,84	TEST B	11,43	TEST B	7,78
VOLUMEN	INICIO	21,86	INICIO	20,95	INICIO	26,58
	PLACEBO A	14,19	PLACEBO A	15,15	PLACEBO A	9,91
	TEST B	14,35	TEST B	15,29	TEST B	9,50

Tabla 13. Valores medios según diastemas.

En la tabla 13 se observa que, en el grupo de 6 sujetos con diastemas, la reducción de **índice Volpe-Manhold** conseguida con el colutorio test B es similar a la conseguida con placebo A. Sin embargo, ya sabemos que en general (con o sin diastemas) B funciona mejor que A.

En cuanto al **peso**, la presencia de diastemas no parece tener una influencia tan clara (Tabla 13). Los sujetos con diastemas tiene en general un menor peso de cálculo tras el placebo A y tras el test B comparado tanto con el inicio, siendo los resultados estadísticamente no concluyentes debido al bajo peso muestral al subdividir la muestra.

Para el **volumen** (Tabla 13), en presencia de diastemas se baja lo mismo con uno y otro colutorio. También en ausencia de los mismos. No obstante, cualquiera de los dos colutorios consigue una reducción notablemente más intensa en los sujetos con diastemas.

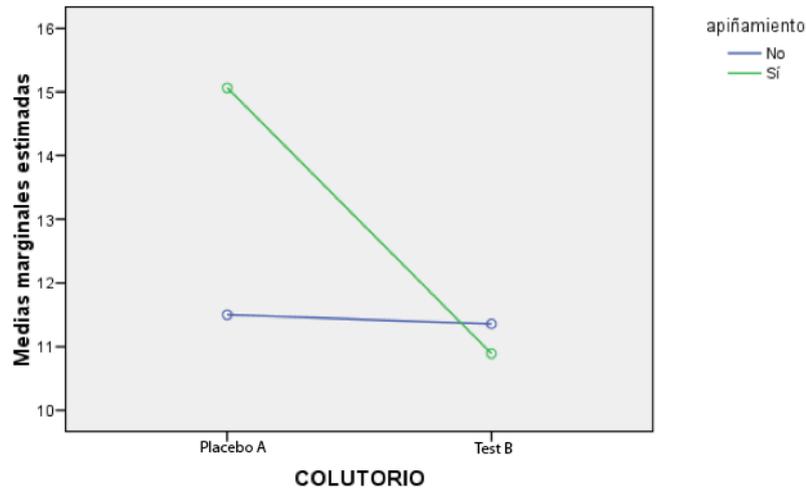
4.3 APIÑAMIENTO

Del total de pacientes que formaban la muestra del estudio, 23 pacientes presentaban apiñamiento y 14 no. Se ha relacionado esta característica con el índice de Volpe-Manhold, peso y volumen para ver si había una relación en cuanto a la formación de sarro (**Tabla 14**). Inicialmente, tanto el índice de V-M como el peso estaban más elevados en pacientes con apiñamiento. El volumen era muy similar. Para un mayor detalle pueden consultarse las tablas T15D, T16D y T17D del *Anexo 7*.

	VALORES MEDIOS SEGÚN APIÑAMIENTO					
	TOTAL		TRONERAS CERRADAS		TRONERAS ABIERTAS	
ÍNDICE DE VOLPE-MANHOLD	INICIO	19,70	INICIO	18,4	INICIO	20,65
	PLACEBO A	13,72	PLACEBO A	11,50	PLACEBO A	15,07
	TEST B	11,07	TEST B	11,36	TEST B	10,89
PESO	INICIO	21,90	INICIO	21,07	INICIO	22,40
	PLACEBO A	15,10	PLACEBO A	12,89	PLACEBO A	16,44
	TEST B	10,84	TEST B	10,21	TEST B	11,22
VOLUMEN	INICIO	21,86	INICIO	21,94	INICIO	21,81
	PLACEBO A	14,19	PLACEBO A	11,81	PLACEBO A	15,64
	TEST B	14,35	TEST B	12,56	TEST B	15,44

Tabla 14.. Valores medios según apiñamiento.

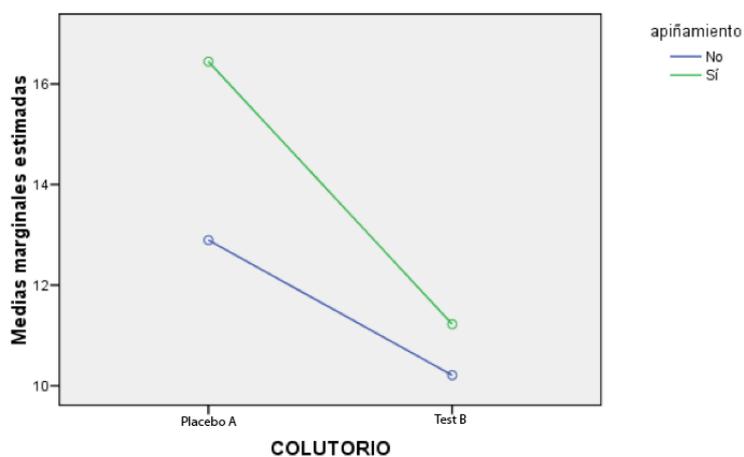
Respecto al índice de **Volpe-Manhold**, el apiñamiento presenta una influencia destacable ($p=0,048$, test F). Sabemos que, globalmente, la reducción de índice obtenida con test es superior a la de placebo. Ahora se puede concluir que este hecho es aplicable especialmente al grupo de pacientes con apiñamiento ($p=0,002$, Bonferroni). Entre los que no presentan apiñamiento, las diferencias finales del índice entre colutorios son escasas ($p=0,928$, Bonferroni). La **gráfica 12** permite una visualización muy intuitiva de lo que está pasando tras las tomas.



Gráfica 12

Dicho de otra forma, con el colutorio test se consiguen resultados similares tanto si hay apiñamiento, como si no lo hay. Con el placebo, no se llega a estos resultados si existe apiñamiento.

Para el **peso**, la tendencia es parecida; aunque no se manifiesta de forma tan marcada. Puede aceptarse que el efecto del apiñamiento es similar en la evolución de peso conseguida con los colutorios ($p=0,407$). No obstante, en pacientes con apiñamiento los beneficios del colutorio test B respecto al placebo A se muestran más claramente ($p=0,008$) que en pacientes sin apiñamiento ($p=0,267$) (**Gráfica 13**).



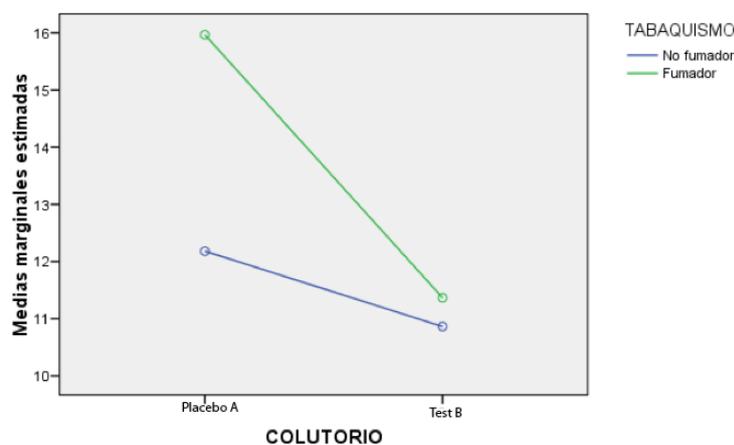
Gráfica 13

El apiñamiento no genera ninguna diferencia destacable sobre el volumen ($p=0,858$, test F). Los resultados conseguidos con uno y otro colutorio son comparables.

4.4 TABAQUISMO

Del total de pacientes que formaban la muestra del estudio, 22 no eran fumadores y 15 sí. Se ha relacionado, del mismo modo que anteriormente con el índice de Volpe-Manhold, peso y volumen para ver si había una relación en cuanto a la formación de sarro. Este dato se analizó tomándolo como un dato dicotómico: el paciente era fumador o no lo era. Si se desea una información más detallada en cuanto al número de cigarrillos/día que consumía cada paciente se puede obtener el dato de la tabla de la serie "F" descriptiva que se presenta en el *Anexo 7*.

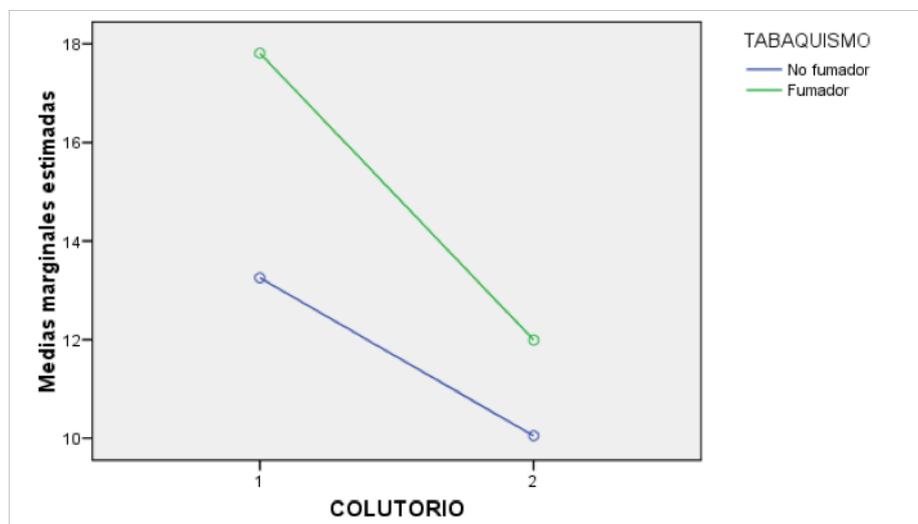
Respecto al índice de **Volpe-Manhold**, el hábito de fumar presenta una influencia reseñable, aunque a nivel global no se alcanza la significancia estadística ($p=0,109$, test F). En la **gráfica 14** de estado en el tiempo final, se observa que el índice V-M se ha reducido más con colutorio B respecto a A especialmente entre los fumadores ($p=0,005$, Bonferroni). Entre los no fumadores, las cifras finales del índice son comparables ($p=0,306$, Bonferroni).



Gráfica 14

La tabla 15 del apéndice permite concluir a título meramente descriptivo que las diferencias se maximizan en el grupo de los fumadores ‘moderados’ (menos de 10 cigarrillos/día).

Respecto al **peso**, los resultados son parecidos, aunque el impacto del tabaco no es tan potente. No se alcanza la significatividad general ($p=0,387$, test F), si bien entre los fumadores la ventaja del test B al control se intensifica ($p=0,016$, Bonferroni) si se compara a los no fumadores ($p=0,1$, Bonferroni), lo cual se representa en la **gráfica 15**.



Gráfica 15

Por la **tabla 15**, en la que podemos observar la media del peso de cálculo, podría sugerirse que el grupo de los fumadores moderados (<10 cig/día) es el más sensible al efecto del colutorio test B, en el sentido de que es ahí donde la ventaja de este fármaco es máxima respecto a la del colutorio placebo A.

	TABACO			
	TOTAL	NO FUMADOR	FUMADOR HASTA 10 CIG/DÍA	FUMADOR MÁS 10 CIG/DÍA
INICIAL	21,90	20,06	22,00	26,88
PLACEBO A	15,10	13,25	17,60	17,99
TEST B	10,84	10,05	9,41	14,25

Tabla 15

De nuevo, **el volumen** se muestra como los parámetros menos sensibles a la influencia del tabaco ($p=0,520$ y $p=0,304$ respectivamente, test F).

5. INFLUENCIA DEL COLUTORIO SOBRE MUCOSAS Y DIENTES

En el material y método se describe que, cualquier tipo de lesión que apareciera en las visitas sucesivas que se realizaron, debía anotarse y describirse en una hoja preparada específicamente con este fin. También debía realizarse un registro fotográfico con el fin de objetivar y realizar un seguimiento de la sesión hallada.

Hubo pacientes que refirieron haber tenido alguna lesión tipo afta en los meses de uso del colutorio, pero en el momento de la exploración clínica en la visita rutinaria no se observó ninguna anomalía. En las fotografías realizadas a los pacientes en las distintas exploraciones no se observan diferencias.

Por tanto, las lesiones no pudieron registrarse ni relacionarse de forma directa con el colutorio, ya que no aparecieron al inicio del uso del mismo, sino a lo largo de los 3

meses, y los pacientes que refirieron dichas aftas comentaron que de forma ocasional también solían tener aftas sin la toma de colutorios.

Del mismo modo, los pacientes en los que se produjeron tinciones fueron las mismas que esos pacientes solían tener debido al tabaco. No se vieron incrementadas ni reducidas por el uso de los colutorios.

Por tanto, el colutorio no tuvo repercusiones sobre los tejidos duros ni las mucosas.

En los cuestionarios realizados se recogen una serie de percepciones que se resumen en la **tabla 16**. Si se requiere una información descriptiva más detallada se puede encontrar en las tablas T38 a T40 del *Anexo 7*.

	FINAL		
	COLUTORIO	% que refieren	p-valor ¹
	TEST	0,0%	
LESIÓN	PLACEBO	2,7%	0,375
	TEST	10,8%	
TINCIÓN	PLACEBO	5,4%	1,000
	TEST	0,0%	

1. Test de McNemar

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Tabla 16. *Parámetros de percepción: Frecuencia de reacciones. Resultados obtenidos en las pruebas de muestras relacionadas.*

Como se observa, muy pocos pacientes refirieron algún síntoma desagradable, no obstante:

- Cuatro pacientes refirieron lesión tras la toma del colutorio test B.
Uno solo (y diferente) tras el colutorio placebo A.

- Las frecuencias de afirmativos en la batería anterior son equiparables en ambos colutorios (todos los test de McNemar proporcionan p-valores por encima de 0,05)

6. PERCEPCIÓN POR PARTE DEL PACIENTE DEL COLUTORIO

Durante el estudio se facilitó a los pacientes un cuestionario sobre el confort que habían tenido respecto al colutorio, preguntándoles si habían notado picor, escozor, ardor e irritación; si habían notado alguna lesión en las mucosas o tinciones en los dientes, si les gustaba el sabor del colutorio y si habían percibido menor formación de cálculo.

En cuanto al **picor**, ningún paciente notó picor tras el colutorio placebo, y únicamente uno apuntó tras el colutorio test cierto picor si estaba más de un minuto enjuagándose.

Respecto al **escozor**, ningún paciente lo notó tras el colutorio placebo, y tras el colutorio test dos pacientes tuvieron algo de escozor en ciertas ocasiones.

Al preguntar por el **ardor**, tras el colutorio placebo dos pacientes dijeron habían notado algo de ardor frente a un paciente que lo dijo tras el colutorio test.

Ningún paciente notó **irritación** de las mucosas, salvo uno que percibió irritación en la lengua tras ambos colutorios.

En cuanto al sabor hubo disparidad de opiniones. La mayoría de los pacientes percibieron el sabor de los colutorios como agradable. A algunos pacientes no les agradó el sabor, a otros les fue indiferente y estas opiniones fueron prácticamente en la misma proporción para ambos colutorios.

La **tabla 17** resume las molestias que describieron los pacientes en los cuestionarios realizados. Si se requiere una información descriptiva más detallada se puede encontrar en las tablas T35 a T37 y T41 del *Anexo 7*.

	FINAL		
	COLUTORIO	% que refieren	p-valor ¹
PICOR	PLACEBO	0,0%	1,000
	TEST	2,7%	
ESCOZOR	PLACEBO	0,0%	1,000
	TEST	5,4%	
ARDOR	PLACEBO	5,4%	1,000
	TEST	2,7%	
IRRITACIÓN	PLACEBO	2,7%	1,000
	TEST	0,0%	
SABOR AGRADABLE	PLACEBO	83,8%	1,000
	TEST	86,5%	

1. Test de McNemar

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

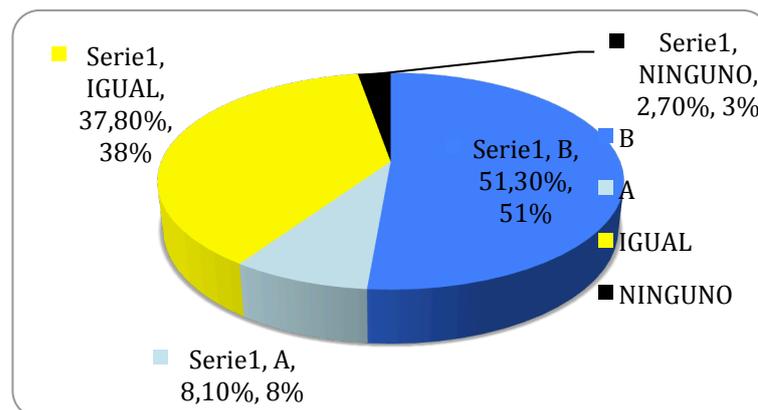
Tabla 17. *Parámetros de percepción: Frecuencia de reacciones. Resultados obtenidos en las pruebas de muestras relacionadas.*

Como se observa, muy pocos pacientes refirieron algún síntoma desagradable, no obstante, hubo seis pacientes a los que les resultó poco agradable el sabor del colutorio placebo A y a 5 de ellos tampoco les gustó el sabor del colutorio test B. Las frecuencias de afirmativos en la batería anterior son equiparables en ambos colutorios (todos los test de McNemar proporcionan p-valores por encima de 0,05).

Observaciones de los pacientes respecto a los colutorios

En el cuestionario que rellenaron los pacientes había un apartado de observaciones. En él que se les pedía que indicaran si les había parecido que los colutorios eran eficaces.

De este análisis subjetivo (la tabla T42 del Apéndice presenta toda la información descriptiva) sobre la eficacia del colutorio se traduce, como se puede observar en la **gráfica 16**, que el 51,3% de los pacientes percibieron como eficaz solamente el colutorio test B y el 8,1% solamente el colutorio placebo A. Sin embargo, hubo un 37,8% de la muestra que encontraban ambos colutorios con una eficacia similar.



Gráfica 16

REFLEXIÓN SOBRE LOS RESULTADOS

Como resumen de este apartado, podemos concluir que en la composición química de la saliva, tanto colutorio test B como placebo A parecen modificar ciertos parámetros de su composición, destacando la disminución de la urea, ácido úrico y fósforo tras la toma de ambos colutorios. También se aprecia que el calcio tiende a incrementarse tras la utilización del colutorio test B. Respecto al flujo salival y el pH, aumentan tras el uso el colutorio test B, lo cual parece contrario a la bibliografía

analizada en la introducción. En la discusión se intentará esclarecer esta aparente controversia.

En cuanto al análisis bacteriano solamente se observan tendencias en cuanto a disminución bacteriana tras el empleo de los colutorios, pero ni en términos de prevalencia ni de carga absoluta los resultados son significativos.

El colutorio test B parece tener influencia en la magnitud del calculo formado, reflejándose de forma significativa en una disminución del índice de V-M y del peso. Destacando que el orden de la toma de colutorios influye en los resultados.

Tras analizar si el apiñamiento, las troneras, los diastema y el tabaco podían influir de forma negativa en el acúmulo del cálculo los resultados no han sido concluyentes debido al bajo tamaño muestral obtenido tras dividir la muestra. A pesar de ello se aprecia una tendencia a mayor acúmulo de sarro en pacientes con apiñamiento, troneras, ausencia de diastemas y en fumadores.

Por último, no se encontraron alteraciones en mucosas y dientes y hubo una buena tolerancia de los colutorio por parte de los pacientes. Fue percibido como mas eficaz el colutorio test B en la mayoría de los sujetos del estudio.

7. DISCUSIÓN

El cálculo dental supone un problema para la salud oral ya que permite la acumulación de placa y toxinas bacterianas e impide su adecuada eliminación debido a la rugosidad de su superficie. Habitualmente, la magnitud de cálculo formado se relaciona en gran medida con la higiene del paciente, pero existen muchos otros factores que pueden influir, como la composición de la saliva, el pH o la composición bacteriana. En la práctica clínica nos encontramos con pacientes que, a pesar de tener un buen control de placa, son formadores rápidos de cálculo y, por tanto, necesitan una frecuencia de detartrajes o mantenimientos periodontales muy superiores a la media (*Roberts-Harry y Clerehugh, 2000*). Se han desarrollado numerosos productos anticálculo en diversos formatos: pastas, colutorios, chicles, etc. pero no han conseguido solventar el problema (*Jepsen y cols, 2011*). Son numerosos los estudios publicados que indican que los pirofosfatos son efectivos en la disminución del cálculo formado (*Mallatt et al., 1985; Zacherl et al., 1985; Gaengler et al., 1993; Netuveli y Sheiham, 2004; Llana et al., 2009; Farrel et al., 2009*). Sin embargo, en aquellos pacientes que forman cálculo con rapidez estos productos no son suficientemente eficaces. Estos pacientes continúan necesitando una elevada frecuencia de visitas al odontólogo, especialmente los pacientes con enfermedad periodontal, para mantener una adecuada salud oral. En la última revisión sobre el cálculo publicada en 2011 se concluye que los productos comercializados consiguen reducir el porcentaje de sarro formado, pero en ninguno se logra erradicarlo (*Jepsen et al., 2011*). Por tanto, los estudios presentados hasta la fecha son limitados en cuanto a sus resultados, lo que da pie a que continúen las investigaciones en este campo de la odontología. El presente trabajo se ha realizado para intentar aportar una mejoría a este tipo de pacientes muy formadores de cálculo mediante un colutorio a base de pirofosfatos.

7.1 DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA

La muestra consta de 37 pacientes seleccionados de una clínica privada dedicada exclusivamente a periodoncia que presentaban un historial demostrado de rápida formación de cálculo a pesar de tener un buen control de placa. El motivo de seleccionar a formadores rápidos es que son los pacientes en los que mayor problema causa la formación de cálculo, ya que necesitan mantenimientos cada tres meses. Además, gracias a la frecuencia con la que forman el cálculo, estudiar el colutorio en estos pacientes hace que el trabajo se pueda realizar en un periodo de tiempo menor.

Para definir lo que es un **rápido formador de cálculo**, Blank y cols publicaron un artículo en el que observaban la evolución del cálculo en pacientes rápidos formadores. Para ello evaluaron la formación de cálculo en 203 pacientes presuntos formadores rápidos de cálculo mediante el índice de Volpe-Manhold (VMI). Analizaron dos periodos: desde la última profilaxis hasta el inicio del estudio y desde el inicio hasta 8 semanas después. Los sujetos debían tener un VMI en el primer periodo de 7 o superior para ser incluidos en el mismo. Se anotó la fecha de la última profilaxis. La puntuación basal media fue VMI 24,07 en el primer periodo. Las puntuaciones se relacionaron directamente con la fecha de la última profilaxis, siendo más altas cuando hacía más de 2 años que se había realizado (33.67) y menor en los sujetos cuya última profilaxis se había hecho hacía menos de 6 meses (15.12). A las 8 semanas, la puntuación media de VMI fue 9,96. Las puntuaciones de VMI en este momento fueron inversamente proporcionales ($P = <0,05$) a la fecha de la última profilaxis antes del inicio del estudio, siendo la puntuación más baja en sujetos cuya última profilaxis hacía más de 2 años (9,07) y mayor en los sujetos con la última profilaxis hacía menos de 6 meses (13,07). De este estudio se extraen una serie de conclusiones. La primera, es que los pacientes

rápidos formadores de cálculo son idóneos para hacer estudios con productos anticálculo por la rapidez de formación; en 8 semanas pueden tener un VMI superior a 7, habiendo mucha variabilidad interindividual. En segundo lugar, para valorar si un paciente es formador rápido de sarro es necesario ver su evolución; no puede clasificarse en este grupo únicamente porque en un momento concreto tenga mucho cálculo, ya que éste puede ser consecuencia de años de acúmulo sin realizar una profilaxis y no de la rapidez con la que se forma. También se ha observado una mayor formación en hombres y en afroamericanos, y por último se apunta a la necesidad de más investigaciones sobre el tema (*Blank et al., 1994*). En nuestro estudio, todos los pacientes llevaban años en mantenimiento periodontal, en observación por tanto, y habían demostrado ser pacientes formadores rápidos de cálculo.

El **tamaño de la muestra**, 37 pacientes, resulta suficiente para realizar un análisis estadístico en el que los datos sean significativos. La **potencia** alcanzada fue de 0,84 para detectar las diferencias inducidas por los colutorios. Sin embargo, el tamaño no ha podido ser mayor debido a la dificultad que conlleva encontrar pacientes que a pesar de tener un buen control de placa formen mucho cálculo, ya que suele ir ligada la higiene a la magnitud de sarro formado. La confluencia de un buen control de placa y gran cantidad de cálculo no es habitual. En los estudios encontrados sobre este tema, la muestra suele ser más amplia porque o bien toman una muestra de rápidos formadores sin controlar que en nivel de higiene sea el correcto (*Blank et al., 1994*), o bien porque la muestra seleccionada no contempla rápidos formadores, sino todo tipo de pacientes (*Mallat et al., 1985; Llana et al., 2009; etc*).

Para medir la **magnitud de cálculo** que formaban los pacientes, se realizó una búsqueda bibliográfica extensa sobre los diferentes métodos empleados para su cuantificación. Existen numerosos índices que miden el sarro: índice de Volpe-

Manhold, índice de cálculo en línea marginal, índice de depósitos de cálculo sobre la superficie, etc. Pero, de todos ellos, el que aparece de forma más frecuente en estudios sobre productos anticálculo es el de Volpe-Manhold (*Mallat et al., 1985; Fure et al., 1998; Segreto et al., 1991; Gaengler et al., 1993; Marks et al., 1993; Llana et al., 2009; etc.*). Debido a que dicho índice fue descrito en 1962 y no hay estudios actuales que comprueben su veracidad, se decidió hacer un estudio piloto previo a este trabajo en el que se comparaba con el peso y volumen de cálculo. Para ello se desarrolló una metodología de recogida, pesado y volumetría del sarro que se empleó posteriormente en este trabajo, tal y como se describe en el material y método. En este estudio piloto presentado en la XLIV reunión de la SEPA en Gerona 2010, se llegó a la conclusión de que había una correlación entre el índice de Volpe-Manhold y el peso y volumen de cálculo estadísticamente significativa. Cuanto mayor era el valor numérico que daba el índice mayor era el peso y el volumen de cálculo. Por tanto se decidió emplear este índice como referencia en la medición del cálculo de esta tesis.

Pese a que la comprobación de la veracidad del índice de Volpe-Manhold resultó satisfactoria, se decidió incluir en la metodología el peso y el volumen del cálculo para darle una fiabilidad mayor a los datos obtenidos.

Analizando la **metodología de recogida del cálculo**, la problemática que presenta es la precisión y sensibilidad del proceso. Cualquier pequeña cantidad de cálculo que se pierda puede variar de forma significativa el resultado final, tanto el peso como el volumen. Para separar el cálculo de la superficie dental se optó por el uso de un aparato de ultrasonidos. Se prefirió el uso del ultrasonidos frente al empleo de cureta porque con la cureta salían despedidas, de forma inevitable, pequeñas partículas de cálculo y corríamos el riesgo de extraer también cemento radicular. La recogida de éste se hizo mediante un aspirador de hueso y resultó relativamente sencilla ya que, de forma fácil,

se separaba el sarro del agua del ultrasonidos y la saliva aspirada. La dificultad proviene de la precisión en la recogida del cálculo, ya que operador y ayudante de aspiración deben estar muy coordinados para que no se pierda ninguna partícula de sarro.

Esta metodología aporta algunas novedades a la metodología que clásicamente se ha venido utilizando, en la que únicamente se medían los resultados con índices. En este trabajo se ha pretendido complementar el resultado del índice de Volpe-Manhold con el peso y el volumen de cálculo. Hubo que diseñar una metodología nueva, ya que no encontramos en la revisión bibliográfica ningún artículo en el que se describiera un procedimiento similar al que nosotros pretendíamos hacer. Para validar el método nos servimos también del estudio piloto presentado en la XLIV reunión de la SEPA en Gerona 2010.

Por otro lado, fue necesaria aparatología de mucha precisión para **pesar el cálculo y medir su volumen**. Aunque los pacientes eran grandes formadores de cálculo, el peso reducido requiere una balanza de análisis que mida miligramos.

En la bibliografía revisada no encontramos artículos que empleen una metodología similar a la nuestra con la que comparar. Hay un estudio de Grases y cols de 2009 en el que la metodología sí se asemeja, aunque los objetivos que busca son distintos a los nuestros. En este estudio se emplea como producto anticálculo un colutorio con triclosán que contiene fitato. Es un estudio aleatorizado, cruzado y a doble ciego. En este estudio se evaluó la eficacia mediante la cuantificación de la cantidad de calcio presente, fósforo y magnesio en los residuos de cálculo obtenidos de la limpieza dental (*Grases et al., 2009*). De este estudio pretendemos destacar su metodología. Para recoger el cálculo realizaron un procedimiento muy similar al nuestro: desprendieron el cálculo de la superficie dental mediante la realización de un detrartraje y fueron

aspirando los fragmentos de cálculo mediante un aspirador de hueso, en este caso de Mozo-Grau (Valladolid, España). El destino de los fragmentos recopilados fue distinto, en este estudio de Grases se guardaron en un recipiente estéril para llevarlos a analizar al laboratorio y en el nuestro se pesaron y se midió su volumen. Siempre lo realizó el mismo investigador, al igual que nosotros, para que no hubiese sesgo. Salvo este artículo, no hemos encontrado ningún otro que haga referencia a una metodología similar a la nuestra.

La **medición de cálculo** se ha centrado en los seis dientes anteroinferiores porque se trata de la zona de la cavidad oral donde mayor cantidad de cálculo supragingival se deposita (*Davies et al., 1997; Dawes, 2006*) y la bibliografía revisada sobre los estudios de productos anticálculo centra su campo de trabajo en esta zona de la cavidad oral (*Mallatt et al., 1985; Gaengler et al., 1993*). Otro motivo es que el índice de Vople-Manhold únicamente mide el cálculo de los seis dientes anteroinferiores y era el índice que queríamos emplear ya que es el que refieren la mayoría de los estudios sobre este tema.

En cuanto al **tiempo de toma del colutorio**, en la mayoría de estudios, el tiempo transcurrido entre el inicio del estudio y la recogida de datos suele ser menor al que nosotros hemos considerado necesario, entre tres semanas y dos meses varían la mayoría de artículos revisados (*Mallat et al., 1985; Mellberg et al., 1991; Grases et al., 2009; Gaengler, 1993; Farrel, 2009; Llana, 2009*). Sin embargo, otros estudios, al igual que el nuestro, fijan el tiempo de la toma en tres meses (*Chikte et al., 1992; Schaeken y Van der Hoeven, 1993; Llana et al., 2009*). El motivo por el que se decidió que la toma del colutorio debía ser de tres meses es por que es el tiempo máximo que transcurre entre las terapias de soporte periodontal. De este modo, se puede comprobar si el

colutorio resulta realmente efectivo y permite a los pacientes acudir a sus mantenimientos intervalos mayores de tiempo.

7.2 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Si analizamos los efectos de los colutorios en cuanto al **análisis salival** de nuestra muestra de pacientes, los dos colutorios mostraron un patrón similar. En el flujo salivar y el pH hubo una tendencia al incremento con ambos colutorios, aunque más con el colutorio test B. Con los componentes químicos hubo también influencia de los colutorios, aunque los efectos fueron distintos según el componente analizado. Estos resultados requieren un análisis exhaustivo ya que, algunos son contrarios a lo esperado según la revisión de la bibliografía.

Comenzando por el aumento del **flujo salival por minuto** pasó a ser $0,51 \pm 0,32$ ml/min al inicio a $0,61 \pm 0,35$ ml/min tras el placebo A y $0,68 \pm 0,38$ ml/min tras el test B. Si revisamos la bibliografía, las tasas de flujo salival fisiológico varían según el artículo revisado. Billings apunta a un flujo salival no estimulado de 0,05 ml/min y estimulado de 0,5 ml/min (*Billings, 1993*). Sin embargo otros autores dan una media más alta, que se asemeja más a nuestros resultados, aunque sigue siendo inferior: Nauntofte y cols. dan una media de saliva no estimulada entre 0,25-0,35 ml/min y estimulada de 1,5 ml/min (*Nauntofte et al., 2003*). En todos los estudios apuntan a una alta variabilidad interindividual, aunque citan unas tasas inferiores a la nuestra al inicio del estudio, es decir, sin la influencia de ningún colutorio. Tras el empleo de colutorio, aumenta en cierta medida el flujo salivar, pero los valores no se acercan a los obtenidos cuando se estimula la saliva.

Por tanto, aunque estamos encontrándonos con un aumento estadísticamente significativo de la saliva, dicho aumento no puede considerarse como saliva estimulada. La teoría que explicaría dicho aumento sería la estimulación de las glándulas salivales

por parte de los colutorios a nivel de la cavidad oral, ya que éstos colutorios no tienen un efecto sistémico. El aumento de saliva fue significativo estadísticamente, pero no tan notable clínicamente ya que, ni paciente ni investigador percibieron dicho aumento. Por tanto, la explicación más plausible parece la de que al enjuagarse con un colutorio, éste estimuló en cierta medida un aumento del flujo de saliva, aunque sin acercarse a valores de saliva estimulada.

En las instrucciones de uso del colutorio se indicaba a los pacientes que debían enjuagarse 2 veces al día durante 1 minuto con 10 ml de colutorio después de haber cepillado sus dientes. Lo hacían por la mañana y por la noche. El motivo de indicar dos veces fue, tanto por recomendación de la casa comercial, como por la sencillez de cumplimiento, ya que si añadíamos una tercera vez era muy probable que el enjuague del mediodía lo omitieran con frecuencia ya que muchos de los pacientes no iba a casa a mediodía. La recogida de la muestra de saliva no se realizaba inmediatamente después de haber realizado el enjuague, pero puede que éste tenga una alta sustentividad (no se ha estudiado todavía porque es un colutorio que aún está en fase experimental) que provoque una pequeña estimulación salivar que se haya visto reflejada en los resultados del estudio.

Si nos centramos en los valores obtenidos de **pH**, se observa que el aumento de pH obtenido tras la toma del colutorio test B es significativo respecto al inicio del estudio ($p=0,007$), resultado que no se produce tras la toma del placebo A ($p=0,128$). Los valores medios de pH fueron al inicio de 6,8, tras el placebo A de 7 y tras el test B de 7,1. Si revisamos la bibliografía, uno de los mecanismos anticálculo que se han propuesto a lo largo de la historia ha sido la disolución del mismo mediante ácidos, que pretendían reblandecer los depósitos de cálculo maduro. Se emplearon, por tanto, ácidos para disolver el sarro pero se observó que, como efecto secundario, también disolvían la

estructura dental y resultaban cáusticos para los tejidos blandos (Fairbrother *et al.*, 2000). A este dato, debemos añadir que teóricamente, cuando el pH aumenta, va a proporcionar un medio ideal para la precipitación de fosfatos de calcio y, por tanto, para la mineralización de la placa bacteriana. En este trabajo se ha producido el aumento de pH de 6,8 a 7,1 de media. Lo cual resulta estadísticamente significativo, pero probablemente no es clínicamente significativo, ya que este aumento de pH no se ha visto reflejado en un aumento de la cantidad de cálculo, sino todo lo contrario.

Este aumento de pH probablemente sea debido al aumento del flujo salivar que se ha producido. Dawes y Kubieniec, en 2004, quisieron determinar el efecto de la goma de mascar en la tasa de flujo salival y composición. Para ello, recogieron tanto la saliva no estimulada como la estimulada mediante chicles a lo largo de dos horas. Cuando sólo se recogió la saliva no estimulada, no hubo ningún cambio significativo en la tasa de flujo salival. Con la saliva estimulada mediante chicles se observó que la velocidad de flujo aumentó inicialmente y, a continuación, después de 35-40 minutos, se redujo. El pH de la saliva estimulada mediante chicles fue significativamente mayor que el de la saliva no estimulada. Hubo cambios en la composición salivar debido al aumento de velocidad de su flujo provocado por el chicle (reflejados en el apartado que analiza la composición química de la saliva a través del artículos de Dawes de 1974). Por tanto, queda patente la relación que existe entre el aumento del flujo salival y un aumento de pH. Cuando aumenta el flujo salivar el pH se vuelve más básico. En este estudio de Dawes, el pH alcalino en saliva no estimulada varía entre 6,71-6,90. En nuestro estudio el valor medio es de $6,8 \pm 0,6$, por tanto está dentro del rango de normalidad que presenta dicho estudio. Tras estimular la saliva, el pH aumenta a 7,35 con un chicle de menta, por tanto, el valor final es superior a nuestros valores tras el colutorio placebo A ($7,0 \pm 0,4$) y tras el test B ($7,1 \pm 0,5$). Esto vuelve a apoyar la teoría de que aunque flujo salival en

nuestro estudio aumentó, no lo hizo con valores de saliva estimulada y, por tanto, el resto de los componentes salivales, aunque se han visto incrementados, este aumento no ha alcanzado niveles de saliva estimulada (*Dawes et al., 2004*).

Se han publicado numerosos estudios que también reflejan la relación, directamente proporcional, que existe entre el flujo salivar y el pH. Sobre todo son estudios que analizan el cambio de pH que se produce tras estimular la saliva con chicles para evitar la caída del pH que se produce tras la exposición a la sacarosa de la placa, controlando así el ambiente ácido que favorece la producción de caries (*Dawes, 1974; 1992; Macpherson y Dawes, 1993*).

En todo momento estamos hablando del pH en saliva, que ha sido uno de los objetivos de nuestro estudio, pero existe otra línea de investigación que analiza el pH de la placa bacteriana y su papel en la formación de cálculo. Primero un estudio de Sissons y cols en 1998 comenzó a relacionar los cambios en el pH de la placa bacteriana con procesos de mineralización en la superficie dental. Realizaron un estudio cuyo objetivo era examinar los factores que controlan potencialmente el pH en reposo de la placa bacteriana (definido como el pH no afectado por las comidas) y las biopelículas de *Streptococcus mutans* en condiciones estándar; y examinar también el efecto de suministrar urea a concentraciones encontradas intraoralmente. Se cultivó la placa bacteriana en una “boca artificial” con un suministro continuo de un medio que incluía 0,25% de mucina y un suministro periódico de sacarosa. Se concluyó que el pH en reposo de la placa es el resultado del equilibrio entre la generación de sustancias ácidas y básicas, que a su vez depende tanto de la composición bacteriana de la placa como del suministro de sustratos y tampones, y del aclaramiento de metabolitos en el fluido oral. In vivo, el pH en reposo variará según la zona por los cambios en el flujo salivar. La urea suministrada continuamente por la saliva y por el fluido crevicular puede elevar el

pH en reposo de la placa bacteriana, lo cual sería significativo para la reducción de la caries dental (*Sissons et al., 1998*).

El mismo grupo de investigadores amplió su investigación para ver la relación del pH con la mineralización de la placa bacteriana. Wong y cols. realizaron un estudio cuyos objetivos fueron: desarrollar y caracterizar un procedimiento basado en el aumento de pH ureolíticos, para depositar fosfato de calcio en biofilms de la placa bacteriana y probar la importancia del rango de pH. Se cultivaron biofilms en una 'boca artificial' con un suministro continuo de fluido oral estimulado (mucina medio basal – BMM- con 146 mmol/l de sacarosa) que aplicaron periódicamente durante 6 min cada 8h. Después de crecimiento de la placa inicial, las biopelículas fueron expuestas periódicamente durante un máximo de 16 días (durante 6 minutos) a una solución de urea monofluorofosfato de fosfato de calcio (CPMU) que contenía 20 mmol/l de CaCl₂, 12 mmol/l de NaH₂PO₄, 5 mmol/l monofluorofosfato y 500 mmol/l de urea (pH 5,0). La hidrólisis de la placa de la urea en CPMU provocó que el pH subiera entre 8,2 y 8,8, haciendo que se depositaran fosfatos de calcio fluorados y carbonatados, y posiblemente algo de carbonato cálcico en la placa. La deposición de calcio, fosfato y fluoruro fue rápida durante aproximadamente 4 días y luego fue disminuyendo. Después de 10 días de tratamiento en condiciones estándar (BMM que contiene 1 mmol/l de urea y arginina 1 mmol/l), las concentraciones de calcio y fosfato en placa se incrementaron hasta 50-veces y 10 veces a aproximadamente mmol 2-4 y 1-2 / g de proteínas en placa, respectivamente. El contenido de calcio, fosfato y fluoruro aumentó de forma constante. La deposición de fosfato de calcio era proporcional al pH de la placa en reposo. La suplementación de BMM con 20% de suero humano inhibió la deposición. Estos resultados apoyan la hipótesis de que un pH alcalino en la placa es crítico para la mineralización de ésta y de que la deposición mineral está modulada por el suero. Estos

factores pueden ser importantes para controlar la formación de cálculo (*Wong et al., 2002*).

Por tanto, aunque en nuestro estudio no se observa una relación entre el aumento del pH salivar y el aumento de la deposición de cálculo, sino todo lo contrario, parece a razón de los artículos estudiados, que está más relacionado el pH de la placa bacteriana con la mineralización que el pH de la saliva. No influye tanto el pH de ésta como el aporte de ciertos componentes que pueden intervenir en la mineralización. El ligero aumento de pH observado en nuestro estudio puede deberse al ligero aumento a su vez del flujo salivar.

Respecto a los **componentes salivales**, se obtuvieron resultados bastante diversos. En el sodio, cloro y potasio, la influencia fue nula por parte de los dos colutorios. En otros como la urea, el ácido úrico y el fósforo, sí existe una variación, aunque semejante con ambos colutorios: que tienden a disminuir los valores en saliva. El calcio aumenta significativamente tras el colutorio test B ($p=0,015$) aunque también lo hace tras el placebo A, pero no con una intensidad tan fuerte ($p=0,089$).

En primer lugar hemos revisado si los datos obtenidos, tanto al inicio como después del empleo de colutorios entraban dentro del rango de normalidad fisiológico, comparándolos con la tabla de “Composición cuantitativa de la saliva en reposo” ya citada en la introducción (*Almerich, 1998*). La **urea** al inicio fue de $45,8 \pm 16,4$ mg/dl, tras el colutorio placebo de $32,0 \pm 5,8$ mg/dl y tras el test de $35,4 \pm 9,8$ mg/dl. Según los datos estudiados, el rango en el que podemos encontrar la urea en saliva en reposo varía entre 12 y 70 mg/dl, siendo 20 mg/dl la media. Por tanto los valores entran dentro del rango de normalidad, siendo sin embargo superiores a la media.

El **ácido úrico**, al inicio fue de $3,5 \pm 2,0$ mg/dl, tras el colutorio placebo A de $2,5 \pm 0,8$ mg/dl y tras el test B de $2,7 \pm 1,2$ mg/dl. Según los datos estudiados, el rango en el que podemos encontrar el ácido úrico en saliva en reposo varía entre 0,5 y 3 mg/dl, siendo 1,5 mg/dl la media. Por tanto los valores entran dentro del rango de normalidad tras el empleo de colutorios, aunque al inicio era superior al rango marcado.

El **calcio** al inicio fue de $1,8 \pm 0,6$ meq/l, tras el colutorio placebo A de $2,2 \pm 1,1$ meq/l y tras el test B de $2,5 \pm 1,6$ meq/l. Según los datos estudiados, el rango en el que podemos encontrar el calcio en saliva en reposo varía entre 2,2 y 11,3 meq/l, siendo 5,8 meq/l la media. Por tanto los valores tras la toma de colutorios entran dentro del rango de normalidad, aunque al inicio era inferior al rango marcado.

El **fósforo** al inicio fue de $20,6 \pm 8,5$ meq/l, tras el colutorio placebo de $10,2 \pm 1,1$ meq/l y tras el test de $10,2 \pm 0,7$ meq/l. Según los datos estudiados, el rango en el que podemos encontrar el fósforo en saliva en reposo varía entre 6,1 y 71 meq/l, siendo 16,8 meq/l la media. Por tanto los valores entran dentro del rango de normalidad, estando tras la toma de colutorios por debajo de la media.

El **sodio** al inicio fue de $9,6 \pm 4,9$ meq/l, tras el colutorio placebo de $9,3 \pm 1,1$ meq/l y tras el test de $9,0 \pm 1,3$ meq/l. Según los datos estudiados, el rango en el que podemos encontrar el sodio en saliva en reposo varía entre 0 y 20 meq/l, siendo 15 meq/l la media. Por tanto los valores entran dentro del rango de normalidad, estando todos por debajo de la media.

El **potasio** al inicio fue de $31,4 \pm 6,7$ meq/l, tras el colutorio placebo de $30,5 \pm 1,4$ meq/l y tras el test de $30,8 \pm 1,8$ meq/l. Para analizar los valores de potasio hemos consultado el libro Fisiopatología de las Glándulas salivales de Bagán y Jiménez. En el capítulo 4 se hace referencia a los componentes de la saliva, y la concentración media

de potasio que aparece es de 21 meq/l, siendo el rango de normalidad de 13 a 40 meq/l. Por tanto, los datos obtenidos en nuestro estudio entran dentro de la media.

El **cloro** al inicio fue de $18,5 \pm 7,8$ meq/l, tras el colutorio placebo de $19,5 \pm 2,2$ meq/l y tras el test de $19,9 \pm 1,7$ meq/l. Según los datos estudiados, el rango en el que podemos encontrar el cloro en saliva en reposo varía entre 0 y 100 meq/l, siendo 50 meq/l la media. Por tanto los valores entran dentro del rango de normalidad, estando todos por debajo de la media.

Resulta interesante hacer mención a un estudio que se está realizando de forma paralela a éste, también en la Universidad de Valencia. En él se realiza una comparación entre pacientes muy formadores de cálculo y pacientes poco formadores de cálculo para ver las diferencias que hay entre unos y otros. Se ha estudiado el flujo salival, pH, bioquímica salival, y bacterias entre otros. Cuando comparamos los valores de urea, ácido úrico, fósforo, sodio y cloro de este estudio con los obtenidos en el nuestro se aprecian ciertas similitudes que resultan interesantes de señalar. Comenzando por la Urea, al inicio partimos de un valor de 45,8 mg/dl de media, que desciende tras la toma de colutorios a 32,0 mg/dl tras el placebo y 35,4 mg/dl tras el test. Estos valores obtenidos tras la toma de colutorios se parecen a los valores que resultan del análisis de los formadores lentos de cálculo (31,29 mg/dl). Algo similar sucede con el ácido úrico, al inicio había una media de 3,5 mg/dl, que desciende tras la toma de colutorios a 2,5 mg/dl tras el placebo A y 2,7 mg/dl tras el test B. Tras la toma de colutorios, los valores descienden a unos valores comparables a los de formadores lentos (2,74 mg/dl). Para el fósforo volvemos a encontrarnos con la misma situación, en nuestro estudio había un valor medio al inicio de 20,6 meq/l tras el placebo A 10,2 meq/l y tras el test B 10,2 meq/l. En los formadores lentos, el valor medio fue de 10,32 meq/l. En cuanto a los valores de sodio, ya no encontramos tanta similitud, simplemente una tendencia

descendente de los valores en ambos estudios. Al inicio partimos de 9,6 meq/l y tras el empleo de colutorios 9,3 meq/l y 9 meq/l en placebo A y test B respectivamente. En formadores lentos la media era de 8,97 meq/l, por tanto era más baja, aunque los valores tras colutorios tienden a acercarse al de poco formadores, sobretodo el test. Y para el cloro se vuelven a repetir las situaciones anteriores, partimos de 18,5 meq/l de media, que desciende a 19,5 meq/l en placebo y 19,9 meq/l en test, siendo la media en formadores lentos de 19,59 meq/l. Los valores iniciales de nuestro estudio coinciden con los valores iniciales de el estudio citado porque la muestra de pacientes es muy similar. Por tanto, estas semejanzas nos hacen pensar que tras el empleo los colutorios, sobretodo del test, puede que se produzca una modificación local del ambiente en la cavidad oral. Esto nos hace reflexionar sobre la alta sustantividad que puede presentar dicho colutorio (*Proyecto de Tesis Ramón*).

En un estudio de Mandel ya se comparó la saliva de sujetos muy formadores de cálculo y poco formadores de cálculo. Para ello, como ya se explica en la introducción, recogieron muestras de saliva, analizando: flujo salival por glándula, concentración de calcio y magnesio, concentración de fósforo, actividad de la lisozima, actividad de la fosfatasa ácida y composición proteica salival en cinco pares de muestras (5 de formadores y 5 de no formadores). Se observó que la concentración de calcio de la saliva submaxilar era significativamente mayor en los muy formadores de cálculo que en los poco formadores. Esto podría ser la explicación para la gran cantidad de calcio que se encuentra en la placa neoformada de lingual de incisivos inferiores en los sujetos muy formadores de cálculo. Por tanto se consideró que podía ser un factor importante en la formación del cálculo supragingival. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al magnesio y el fósforo. Los niveles de actividad de la lisozima submaxilar eran mayores en los poco formadores, pero no los

de la fosfatasa ácida. El flujo salival estimulado no difirió entre ambos grupos (*Mandel, 1974*). En este estudio se le da mucha importancia a la concentración de cálculo presente en la saliva y lo considera determinante para la formación de cálculo. En nuestro estudio no hemos obtenido datos concluyentes respecto al calcio, ya que tras la toma de colutorios ha aumentado y sin embargo ha disminuido la formación de cálculo. Este hecho probablemente sea debido a que la acción de los pirofosfatos es suficientemente fuerte como para que, en presencia de un aumento en la concentración de cálculo, no se produzca un aumento de la calcificación. En cuanto al fósforo, que es el segundo parámetro que tenemos en común con este estudio, no podemos compararlo porque nos da el valor como un porcentaje y nosotros estamos utilizando las unidades de mg/mol.

La modificación de los componentes salivares puede deberse al aumento del flujo salival. Dawes estudió los efectos del flujo salival en las concentraciones de proteínas y de los principales electrolitos en la saliva submandibular humana. Observó que conforme aumenta el ratio de fluido aumentó la concentración media de sodio y calcio; la concentración de potasio se mantuvo constante y disminuyó la concentración de magnesio y fosfato. El cloro al principio aumentó, pero conforme pasó el tiempo volvió a caer, y el bicarbonato también aumentó su concentración y aumentaba más cuanto más tiempo pasaba, justo al contrario que el cloruro. Comparando los valores obtenidos en este estudio con los nuestros, observamos que: la urea y el ácido úrico no los analiza. La media de sodio en saliva no estimulada obtenida en este estudio es de 2,6 meq/l, mientras que en el nuestro oscila entre 9,6 y 9 meq/l. Los valores en saliva estimulada fueron 22,3-54,8 meq/l, por tanto muy superiores. Nuestros valores no se asemejan a los obtenidos en este estudio. En el calcio en saliva no estimulada obtuvieron una media de 1,56 meq/l, que es similar a la cifra que hemos obtenido en la medida basal (1,8 meq/l).

Tras la toma de colutorios aumenta ligeramente (2,2 y 2,5 meq/l), pero no tanto como la saliva estimulada de este estudio, cuyos datos oscilan entre 1,66-2,13 meq/l. El potasio en este estudio se mantiene constante, alrededor de 14 meq/l, mientras que en nuestro estudio varía entre 30,5 y 31,4 meq/l cuando hablamos de las medias (*Dawes, 1974*).

Al revisar la bibliografía vemos que hay otra línea de investigación que le da mayor importancia a los componentes químicos de la placa bacteriana que a los de la saliva, al igual que ha sucedido anteriormente con el pH. En estos estudios publicados sólo se están analizando los componentes bioquímicos presentes en la placa bacteriana, quedando en un segundo plano los salivales. Volvemos a citar los estudios del grupo de Sissons en los que se observa que cuando aumentaba la concentración de urea en la placa bacteriana, aumentaba el pH debido al amoníaco producido por la ureolisis. Esto promueve la formación de cálculo ya que incrementa el grado de saturación de fosfato cálcico en el fluido de la placa. (*Sissons et al., 1994*).

En relación a la importancia que se le puede dar a los componentes salivares para predecir la formación de cálculo, Poff y cols. publicaron un artículo en el que se intentaba establecer una correlación entre la tasa de formación de sarro supragingival y el grado de sobresaturación de la saliva con respecto a la apatita, brushita y otros fosfatos de calcio (se analizaron también como en nuestro estudio Ca, P, Na, K). La tasa de formación de cálculo la realizaron midiendo el cálculo formado en las superficies linguales de los incisivos inferiores en 15 individuos durante 30 días. Se estudió tanto la saliva submandibular estimulada con ácido cítrico como la saliva total en reposo. La tasa de formación de cálculo varió ampliamente entre los 15 participantes, desde una puntuación de 0,5 y un máximo de 15. Se encontró una estrecha correlación ($r = 0,91$) entre el pH salival y el grado de sobresaturación, así como una correlación débil entre el calcio y la formación de cálculo. Pero, ni para la saliva no estimulada ni para la

estimulada se observó una relación significativa entre la sobresaturación de cualquiera de los fosfatos de calcio y la tasa de formación de sarro. Teniendo en cuenta la amplia gama de tasas de formación de cálculo obtenidas y de grados de sobresaturación, se concluyó que la relación entre ellos es poco probable, y el uso de un grado de saturación como una herramienta de diagnóstico parece poco fiable (Poff *et al.*, 1997). Por tanto, no en todos los estudios se establece una relación directa entre los componentes salivares y la formación de cálculo.

Pasando al **análisis microbiológico** de nuestro estudio, en términos de prevalencia y de carga absoluta, no se apreciaron cambios significativos, por lo que los colutorios no parecen inducir variaciones relevantes en las especies bacterianas estudiadas. Por tanto, la efectividad del colutorio no parece estar relacionada con una modificación de la flora, sino con interrupción de la calcificación por parte de los pirofosfatos. Por otro lado, estos resultados tienen su lógica, ya que el colutorio test que estamos empleando no es un antimicrobiano, sino que es un colutorio que se centra en la acción anticálculo de los pirofosfatos, basada en la prevención de la calcificación interrumpiendo la conversión del fosfato cálcico amorfo en hidroxihapatita (Fleisch *et al.*, 1968). Aunque sí se han apreciado ciertas variaciones en la carga bacteriana entre unas tomas y otras, los resultados no son concluyentes al respecto.

De las bacterias analizadas, había algunas que se habían relacionado directamente con la formación de cálculo como *C. matruchotti*, y *E. saburreum* (Sidaway, 1978), y otras que se han relacionado más con la producción de caries que con la formación de cálculo como el *S. mutans*. Analizando la prevalencia en PCR de dichas especies, nos encontramos con que hay una prevalencia de alrededor del 100% para las especies relacionadas con la formación de cálculo (*C. matruchotti*, *V. Párvula*, *S. Sangus* y *E. saburreum*), tanto al inicio como tras el colutorio placebo A, y sin embargo, tras el

colutorio test B la prevalencia disminuye a 94,6% para el *C. Matruchotti* y 97,3% para el *E. saburreum*. Por otro lado, encontramos que el *S. Mutans* tuvo una prevalencia mucho menor al inicio (10,8%), tras el placebo 16,2% y tras el test 21,6. Este cambio podría deberse a la competencia bacteriana. Cuando disminuye la proporción de *C. matruchotti*, y *E. saburreum*, aumenta la proporción de *S. Mutans*. Por tanto, se confirma nuevamente la relación establecida en numerosos estudios entre la formación de cálculo y ciertas especies bacterianas, especialmente el *C. Matruchotti* (Sidaway, 1978; Howell y Boyan-Salyers, 1980; Swain et al., 1989; Moorer et al., 1993).

Si analizamos la efectividad del colutorio en cuanto a la **formación de sarro**, en este estudio los valores totales tras el colutorio test son menores que tras el placebo y que tras la muestra inicial. Al realizar el análisis estadístico, los 3 **parámetros de dimensión del cálculo** siempre han disminuido significativamente con el colutorio test B desde la medida basal a la final.

Si nos centramos en el **índice de Volpe-Manhold**, la media del índice en el momento basal fue de $19,70 \pm 9,62$, siendo a $11,0 \pm 6,5$ tras la toma del colutorio test B y $13,7 \pm 7,1$ tras el placebo A. La disminución alcanzada con el test es estadísticamente significativa ($p < 0,001$); pero también la alcanzada con el colutorio placebo ($p < 0,001$). Hay muchos estudios que emplean este índice para valorar la efectividad del producto estudiado y que, por tanto, podemos comparar con nuestro estudio.

En un estudio de Mallat y cols. en 1985 se analiza la eficacia de un dentífrico con pirofosfatos solubles al 3,3% comparado con un placebo de fluoruro sódico en 265 voluntarios adultos. Tras dos meses de utilización y el abandono de 48 pacientes, se observa una reducción del índice de Volpe-Manhold para el colutorio test del 26% frente al placebo (test 4,74 y control: 6,40) y una buena tolerancia en tejidos blandos

(Mallat *et al.*, 1985). En este estudio podemos apreciar que la muestra es mucho más amplia que la nuestra y que los índices de Volpe-Manhold medios son mucho menores. Esto es debido a que la muestra de pacientes no está tan acotada como la nuestra, pacientes formadores rápidos con periodontitis tratada y controlada, por tanto el número puede ser más amplio ya que no se encuentran con la misma problemática que nosotros para localizar a un tipo de pacientes tan concreto. En cuanto a los valores medios de los índices, al no ser formadores rápidos de cálculo y ser menor el tiempo de estudio es lógico que los valores sean susceptiblemente más bajos.

Gaengler y cols. en 1993 realizaron un estudio a doble ciego en el que se empleaba un gel dentífrico test con pirofosfatos frente a un placebo en pacientes muy formadores; y midieron la magnitud de cálculo formado con el índice Volpe-Manhold, el índice del cálculo en la línea marginal y un índice de microscopía electrónica que ellos mismos proponen en el artículo analizando el cálculo formado mediante SEM (Scanning Electron Microscope). Tras tres meses de utilización, comparando los resultados apreciaron una disminución del cálculo del 25,5% del test frente al placebo. En este artículo no dan valores de índice Volpe-Manhold, sólo dan porcentajes de reducción de cálculo, así que no podemos comparar nuestros valores iniciales y finales de cálculo con los de este estudio, sólo el porcentaje de reducción. En nuestro estudio dicho porcentaje fue del 44,1%. Por tanto, en nuestro estudio los resultados respecto a la reducción de cálculo fueron más satisfactorios (Gaengler *et al.*, 1993).

En otro estudio de Llena y cols. en 2009, se compararon dos dentífricos, un primer dentífrico con 0.2% aldioxa y 1.9% sodio monofluorofosfato y un segundo dentífrico con 0.32% fluoruro sódico, 4.1% tetrapotasio pirofosfato, 2.0% PVM/MA (ácido methylvinylether/maleic) copolímero (Gantrez S), 1.0% provitamina B5, y 0.2% vitamina B3 durante tres meses, respectivamente, en 48 adultos. Los resultados fueron

una disminución estadísticamente significativa del índice de Volpe-Manhold, ya que al inicio era de 12,39, tras el primer dentífrico de 10,95 y tras el dentífrico con pirofosfatos de 9,41. No encontraron diferencias significativas respecto a disminución de cálculo distribuyendo los grupos en tabaco, sexo y técnica de cepillado. En este estudio se parte al inicio de valores de índice Volpe-Manhold menores que en el nuestro, sin embargo, en este estudio la magnitud de disminución es menor que en el nuestro si comparamos valores iniciales con valores finales (*Llena et al., 2009*).

Farrel y cols. en 2009 realizaron un ensayo clínico controlado aleatorizado, a tres meses, para comprobar la capacidad anticálculo del uso diario de un peróxido de hidrógeno al 6% / pirofosfato contenido en tiras blanqueadoras frente a un cepillado regular. Se realizó en pacientes formadores rápidos de cálculo. Todos los sujetos recibieron un dentífrico anticaries y un cepillo manual para el uso durante todo el estudio. En el grupo experimental, los sujetos debían aplicar la tira una vez al día durante cinco minutos en las superficies vestibulares y linguales de los dientes anteroinferiores. La eficacia se midió mediante el índice de Volpe-Manhold (IVM) antes de la profilaxis, a las 6 y 12 semanas de tratamiento. La media de cálculo al inicio según el índice de Volpe-Manhold fue de 16. En la semana 6, la acumulación de cálculo fue menor en el grupo de tira (IVM lingual de 12,0) que en el grupo de cepillado (IVM 17,0). También en la semana 12 la acumulación de cálculo fue menor en el grupo de tira (VMI lingual de 14,3) que en el grupo de cepillado (17,2). Concluyeron que el uso diario de tiras de peróxido de hidrógeno para blanquear podía reducir la formación de cálculo hasta en un 29% frente a un cepillado regular, sin efectos adversos significativos. Si comparamos la media de disminución, se aprecia que en nuestro estudio partíamos de una media inicial superior (IVM 19,7) y que tanto tras el colutorio

placebo A como tras el test B las medias fueron muy inferiores (IVM test 11,0 y placebo 13,7) (Farrel et al., 2009).

Por tanto, vemos que nuestro estudio se asemeja a otros estudios en cuanto a la efectividad del colutorio test, pero en general se aprecia que los valores de índice Volpe-Manhold son mayores. Esto pensamos que es debido a la selección de la muestra. En nuestro trabajo se seleccionó a pacientes formadores rápidos de cálculo, al igual que en el estudio de Farrell y cols, pero en los otros estudios seleccionados la muestra no distinguía la velocidad de formación de cálculo entre pacientes. Sin embargo, tanto en el caso del estudio de Farrel en el que podemos comparar medias, como en los otros estudios que podemos comparar porcentajes o simplemente magnitudes de disminución, apreciamos que nuestro colutorio anticálculo parece más eficaz en cuanto a la reducción del mismo.

Respecto a los valores de **peso y volumen** de cálculo, el peso se ha reducido significativamente tras la toma del colutorio test B respecto al inicio y al placebo A, sin embargo, para el volumen, ambos colutorios se han comportado igual, aunque sí han mejorado los resultados respecto al inicio. La explicación a que el peso y el volumen no se correlacionen es que la densidad del cálculo tras el colutorio test B probablemente fuera menor.

A la hora de comparar estos resultados con otros estudios, nos encontramos con la limitación de que en nuestra revisión no hemos encontrado artículos con una metodología similar a la nuestra. El estudio de Grases y cols. de 2009 (citado con anterioridad), sí recoge el cálculo de una forma similar a nuestro estudio. Pero el cálculo recogido no lo van a pesar, sino que lo analizan para ver su composición. Cuantifican la cantidad de calcio presente, fósforo y magnesio en los residuos de cálculo obtenidos de

la limpieza dental. Los sujetos se enjuagaban dos veces cada día, con 20 ml de la solución de ensayo (fitato) durante un minuto. Hubo una disminución estadísticamente significativa en el calcio, el magnesio, y fósforo total tras el período de fitato en comparación con el control y períodos de placebo, lo que demuestra la eficacia del tratamiento propuesto para reducir la formación del cálculo dental (*Grases et al., 2009*). Pero estos resultados no son comparables a los nuestros porque no están analizando lo mismo. La forma de cuantificar la eficacia en este estudio es mediante el análisis químico del cálculo, mientras que nosotros empleamos el índice de Volpe-Manhold, el peso y el volumen, y la bioquímica la realizamos de la saliva en lugar de realizársela al cálculo.

Volviendo a nuestro trabajo, cuando analizamos la **reducción de cálculo**, se puede apreciar que ha habido una disminución notable y estadísticamente significativa tras el empleo del colutorio test, pero también la ha habido tras el placebo, aunque no de la misma magnitud. Este hecho hace sospechar que la disminución de cálculo no es exclusivamente debida al colutorio, ya que índice de Volpe-Manhold, peso y volumen también disminuyeron con el placebo.

Es importante destacar que el orden en que se toman los colutorios influyó en los resultados: cuando se tomaba primero el test-B, la ventaja respecto al efecto de placebo-A se intensificaba. Esto puede deberse a la motivación inicial de los pacientes al participar en un estudio. Es el llamado efecto Hawthorne: hay una modificación de conducta de la muestra cuando se sabe observada. En este caso los pacientes llevaban un control de su higiene trimensual durante años para mantener estable su enfermedad periodontal y habían demostrado un historial de buena higiene (índice de placa menor o igual a 1). Pero pese a ello, viendo que el placebo también tuvo un efecto beneficioso en la disminución de cálculo, nos sugiere que el control de placa del paciente previa

realización del estudio, no es tan bueno como creíamos, por tanto, se podría mejorar la higiene de los pacientes y con ello disminuir la formación de cálculo como ha sucedido durante el uso el placebo. En los estudios revisados no hablan de la disminución observada con el placebo y el efecto que puede haber tenido la psicología del paciente en este hecho.

Debido a la reducción de cálculo tras el placebo se han revisando sus componentes, y observamos que tiene: Sodio Hexameta Fosfato 0,50%, Sodio Tripoli Fosfato 0,50% y Sodio Fluoruro 0,05% (226 ppm de iones F). En la revisión sobre productos que intervienen en la formación del cálculo hecha en la introducción no aparece que estos componentes puedan tener un efecto beneficioso. Jepsen en 2011 realiza una revisión sobre la remoción de cálculo y la prevención de su formación y destaca como productos anticálculo los pirofosfatos, bifosfonatos, sales de zinc, triclosán, pero no nombra ninguno de los componentes de nuestro placebo (*Jepsen et al., 2011*). Por tanto, se vuelve a la teoría de que la disminución tras el placebo viene determinada por la motivación de los pacientes en el cepillado al sentirse observados y estudiados.

También decidimos estudiar si ciertas variables influían el efecto de los colutorios. Se estudió la presencia de **apiñamiento, troneras y diastemas y el hábito tabáquico**. A la hora de realizar la estadística de estos datos nos encontramos con el problema de que al subdividir la muestra inicial disminuye mucho la potencia del estudio, siendo algunos valores no significativos por el bajo tamaño muestral y teniendo que analizarlos de forma descriptiva.

Analizando las **troneras**, la formación de cálculo tras el colutorio placebo es parecida tanto si el paciente tienen troneras como si no se tienen. Pero con el colutorio test, su efecto beneficioso se incrementó cuando no había troneras. En cualquier caso,

hablamos de valores finales. El resultado asociado al efecto interacción “tiempo x colutorio x troneras” sugiere que la evolución es comparable tanto si se tienen troneras como si no. Es decir, las diferencias en los valores finales están moderadamente afectadas por el hecho de que inicialmente el grupo de troneras presenta un V-M y peso algo mayor.

En cuanto a los **diastemas**, sólo hubo 6 pacientes que presentaran, por lo que sólo podemos obtener una perspectiva puramente descriptiva. Tanto para el peso como para el volumen, los dos colutorios consiguieron una reducción notablemente más intensa en los sujetos que presentaban diastemas.

Para el **apiñamiento** también se hicieron relaciones interesantes. Con el colutorio test se consiguieron resultados similares tanto si había apiñamiento, como si no lo había. Sin embargo con el placebo, no se llegaba a estos resultados si existía apiñamiento (sobretudo cuando lo que valoramos es el índice de Volpe-Mahold).

Por tanto, dogmas adquiridos mediante la observación clínica de años, como que el apiñamiento favorece la formación de cálculo, o que la presencia de troneras favorece también que se forme cálculo en ellas, parece que también encuentran sustento en los resultados de este estudio.

Para el **tabaco** tampoco se alcanzó una significatividad estadística entre el inicio y el colutorio test respecto al índice de Volpe-Manhol ($p=0,109$), al peso ($p=0,387$) y al volumen ($p=0,520$). Pero si analizamos la descriptiva, se aprecia una mayor efectividad del colutorio test el grupo de pacientes fumadores, pero no puede ser estadísticamente significativa debido al bajo tamaño muestral al subdividir la muestra.

En cuanto a la **influencia del colutorio sobre mucosas y dientes**, muy pocos pacientes refirieron algún síntoma desagradable, no obstante 4 pacientes apuntaron haber notado un afta tras la toma del colutorio test B y 1 tras el colutorio placebo A. En el momento de la inspección clínica no se observó ninguna lesión. Por tanto, las lesiones no pudieron registrarse ni relacionarse de forma directa con el colutorio, ya que no aparecieron al inicio del uso del mismo, sino a lo largo de los 3 meses, y los pacientes que refirieron dichas aftas comentaron que de forma ocasional también solían tener aftas sin la toma de colutorios.

Del mismo modo, los pacientes en los que se produjeron **tinciones** fueron las mismas que esos pacientes solían tener debido al tabaco. No se vieron incrementadas ni reducidas por el uso de los colutorios de forma objetiva en la inspección clínica.

Si valoramos la **percepción subjetiva por parte del paciente** de los colutorios, muy pocos pacientes refirieron algún síntoma desagradable, no obstante: 6 pacientes dijeron que el sabor del colutorio placebo les resultaba desagradable y 5 del test. La mitad de ellos negaron el sabor agradable de los dos colutorios, es decir, no se trata de 11 pacientes diferentes. De forma puntual algún paciente refirió picor o escozor, pero en general, la aceptación de los colutorios por parte de los pacientes fue buena, teniendo en cuenta la subjetividad en la que nos movemos en este apartado.

8. CONCLUSIONES

1. El colutorio test y el placebo modifican ciertos parámetros en la composición química de la saliva, destacando la disminución de la urea, ácido úrico y fósforo tras la toma de ambos colutorios. También se aprecia que el calcio tiende a incrementarse tras la utilización del colutorio test. Respecto al flujo salival y el pH, aumentan tras el uso el colutorio test.
2. En cuanto al análisis bacteriano solamente se observan tendencias en cuanto a disminución bacteriana tras el empleo de los colutorios, pero ni en términos de prevalencia ni de carga absoluta los resultados son significativos.
3. El colutorio test parece tener influencia en la magnitud del calculo formado, reflejándose de forma significativa en una disminución del índice de V-M y del peso.
4. Para el apiñamiento, las troneras, los diastema y el tabaco los resultados no han sido concluyentes debido al bajo tamaño muestral obtenido tras dividir la muestra. A pesar de ello se aprecia una tendencia a mayor acúmulo de sarro en pacientes con apiñamiento, troneras, ausencia de diastemas y en fumadores.
5. No se encontraron alteraciones en mucosas y dientes como efecto secundario al empleo de ambos colutorios.
6. Hubo una buena tolerancia de los colutorios por parte de los pacientes y fue percibido como mas eficaz el colutorio test.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aickin RM, Dean AC., (1979) "Action of stannous and stannic chlorides on bacteria" en *Experientia* 15;32(8):1040-1.
2. Allen D.L., Courtney R.M., (1972) "A clinical study of plaque reduction by Viokase" en *J Periodontol* 43(3):170-175.
3. Almerich JM., (1998) *Saliva y salud dental*. Promolibro. Valencia.
4. American Academy of Periodontology (2001). *Glossary of Periodontal Terms*. 4th Edition.
5. Anerud A, Løe H and Boysen H., (1991) "The natural history and clinical course of calculus formation in man" en *J Clin Periodontol* 18:160-170.
6. Bagan JV, Jiménez Y. (2010) *Fisiopatología de las glándulas salivales*. Medicina Oral S.L.
7. Baumhammers A, Cancro LP, Pader M, Justice JD, Bolton SM., (1973) "Correlation of dental calculus weights with Volpe Manhold Index scores". *J Periodontol* 44(2):78-80.
8. Blank LW, Rule JT, Colangelo GA, Copelan NS, Perlich MA., (1994) "The relationship between first presentation and subsequent observations in heavy calculus formers" *J Periodontol*. Aug;65(8):750-4.
9. Belting CM, Gordon DL., (1966) "In vivo effect of a urea containing dentifrice on dental calculus formation. II" en *J Periodontol*. Jan-Feb;37(1):26-33.
10. Billings RJ., (1993) "An epidemiologic perspective of saliva flow rates as indicators of susceptibility to oral disease" en *Crit Rev Oral Biol Med*. 4(3-4):351-6.

11. Blank LW., Rule JT, Colangelo GA, Copelan NS, Perlich MA., (1994) “The relationship between first presentation and subsequent observations in heavy calculus formers” en *J Periodontol.* Aug;65(8):750-4
12. Brex M, Brownstone E, McDonald L, Gelskey S, Cheang M., (1992) “Efficacy of Listerine, Meridol and clorhexidine mouthrinses as supplements to regular tooth cleaning measures” en *J Clin Periodontol*19(3):202-7.
13. Brown CM, Hancock EB, O'Leary TJ, Miller CH, Sheldrake MA., (1991) “A microbiological comparison of young adults based on relative amounts of subgingival calculus” en *J Periodontol.* Oct;62(10):591-7.
14. Burchard HH. (1995) “The origin of salivary calculus” en *Dent Cosmos* 37:821-832.
15. Chikte UM, Rudolph MJ, Reinach SG., (1992) ”Anti-calculus effects of dentifrice containing pyrophosphate compared with control” en *Clin Prev Dent.* Jul-Aug;14(4):29-33.
16. Cole M.F. y Bowen W.H., (1975) “Effect of sodium phytate on the chemical and microbial composition of dental plaque in the monkey” en *J Dent Res* 54(3):449-457.
17. Conroy CW, Sturzenberger OP., (1968) “The rate of calculus formation in adults” en *J Periodontol.* May;39(3):142-4.
18. Dahlén G, Konradsson K, Eriksson S, Teanpaisan R, Piwat S, Carlén A., (2010) “A microbiological study in relation to the presence of caries and calculus” en *Acta Odontol Scand.* Jul;68(4):199-206.
19. Davies RM, Ellwood RP, Volpe AR, Petrone ME., (1997) “Supragingival calculus and periodontal disease” en *Periodontol 2000.* Oct;15:74-83.
20. Dawes C., (1974) “The effects of flow rate and duration of stimulation on the

- concentrations of protein and the main electrolytes in human submandibular saliva” en *Arch Oral Biol*. Oct;19(10):887-95.
21. Dawes C, Macpherson LM., (1992) “Effects of nine different chewing-gums and lozenges on salivary flow rate and pH” en *Caries Res*. 26(3):176-82.
 22. Dawes C, Kubieniec K., (2004) “The effects of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition” en *Arch Oral Biol*. Aug;49(8):665-9.
 23. Dawes C., (2006) “Why does supragingival calculus form preferentially on the lingual surface of the 6 lower anterior teeth?” en *J Can Dent Assoc*. Dec;72(10):923-6.
 24. Dawes C., (2008) “Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues” en *J Am Dent Assoc*. May;139 Suppl:18S-24S.
 25. DeLattre VF., (1999) “Factors contributing to adverse soft tissue reactions due to the use of tartar control toothpastes: report of a case and literature review” en *J Periodontol*. 70(7):803-7.
 26. Dong YJ, Lee MMS, Pai L, Peng TK., (1994) ”Relatinship of gingival calculus and bleeding on probing in CPITN code 2 sextants” en *Community Dent Oral Epidemiol* 22:294-297.
 27. Dossenbach W.F., Muhlemann H.R., (1961) “The effect od pencilin and ricinoleate on early calculus formation” en *Helvetica Odontologica Acta*. 5,25-28.
 28. Draus F.J, Leung S.W, Miklos F., (1963) “Toward a chemical inhibitor of calculus” en *Dental progress*. 3, 79.-81.
 29. Edgar WM, Jenkins GN., (1972) “Inorganic pyrophosphate in human parotid saliva and dental plaque.” en *Arch Oral Biol* 17(1):219-23.

30. Ennerver J, Boyan-Salyers B y Riggan LJ., (1977) "Poteolipid and bone matrix calcification in Vitro" en *J Dent Res*; 56(8):967-970.
31. Ennerver J, Vogel JJ, Boyan-Salyers B y Riggan LJ., (1979) "Characterization of calculus matrix calcification nucleator" en *J Dent Res* 58(2):619-623.
32. Fairbrother KJ, Heasman PA., (2000) "Anticalculus agents" en *J Clin Periodontol* 27:285-301.
33. Farrell S, Barker ML, Gerlach RW, Putt MS, Milleman JL., (2009) "Prevention of lingual calculus formation with daily use of 6% H₂O₂/2% pyrophosphate whitening strips" en *J Clin Dent*. 20(3):75-8.
34. Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL., (1983) "Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes." en *J Periodontol*. Aug;54(8):481-7.
35. Fleisch H, Russell RG, Bisaz S, Casey PA, Mühlbauer RC., (1968) "The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution." en *Calcif Tissue Res*. Suppl:10-10a.
36. Friskopp J and Hammarström L., (1980) "A comparative, scanning electron microscopic study of supragingival and sungingival calculus" en *J Periodontol* 51(10):553-562.
37. Frostell G., (1960) "Studies on the amonia production and the ureolitic activity of dental plaque material" en *Acta Odontol Scand* 18;29-65.
38. Fure S, Lingström P, Birkhed D., (1998) "Effect of three months' frequent use of sugar-free chewing gum with and without urea on calculus formation." en *J Dent Res* Aug;77(8):1630-7.

-
39. Gaare D., Rolla G, Aryadi FJ and Van der Ouderaa F., (1990) "Improvement of gingival health by toothbrushing in individuals with large amounts of calculus" en *J Clin Periodontol* 17:38-41.
40. Gaengler P, Kurbad A y Weinert W., (1993) "Evaluation of anticalculus efficacy. A SEM method of evaluating the effectiveness of pyrophosphate dentifrice on calculus formation" en *J Clin Periodontol* 20:144-146.
41. Gilmore N.D., Turesky S. and Glickman I., (1968) "Taste as a factor in calculus inhibition by vitamin C analogue" en *J Periodontol* 39(5):284-285.
42. Glock GE, Murray MM., (1938) "Chemical investigation of salivary calculus" en *J Dent Res* 17:257-264.
43. Grases F, Perelló J, Sanchís P, Isern B, Prieto RM, Costa-Bauzá A, Santiago C, Ferragut ML, Frontera G., (2008) "Anticalculus effect of a triclosan mouthwash containing phytate: a double-blind, randomized, three-period crossover trial" en *J Periodont Res* 43.
44. Griffiths GS, Duffy S, Eaton KA, Gilthorpe MS, Johnson NW., (2001) "Prevalence and extent of lifetime cumulative attachment loss (LCAL) at different thresholds and associations with clinical variables: changes in a population of young male military recruits over 3 years" en *J Clin Periodontol*. Oct;28(10):961-9.
45. Hamp SE, Loe H., (1973) "Long term effect of chlorhexidine on developing gingivitis in the Beagle dog." en *J Periodontal Res* 8(2):63-70
46. Hanke M.T., (1940) "Studies in the local factors in dental caries. (1) Destruction of plaques and retardation of bacterial growth in the oral cavity" en *J Am Dent Assoc.* 27,1379-1393.

47. Hidaka S., Abe K., Takeuchi Y, Liu S-Y., (1993) „Inhibition of the formation of oral calcium phosphate precipitates: beneficial effects of Chinese traditional (Kampo) medicines” en *J Periodont Res* 28:27-34.
48. Hidaka S., Okamoto Y. and Abe K., (1993) “Possible regulatory roles of silicic acid, silica and clay minerals in the formation of calcium phosphate precipitates” en *Arch oral Biol* 38:405-413.
49. Hidaka S., Nishimura H, Nakajima K, Liu SY., (1996) ”Effects of a rhubarb (Rhei rhizoma) solution and its fractions on the formation of calcium phosphate precipitates” en *J Periodont Res* 31:408-413.
50. Hidaka S, Oishi A., (2007) “An in vitro study of the effect of some dietary components on calculus formation: regulation of calcium phosphate precipitation” *Oral Dis.* May;13(3):296-302.
51. Hodge H.C., Wah Leung S., (1950) “Calculus formation” en *J Periodontol* Oct;21(4):211-21.
52. Hoffman D.L., Stallard R.E., Schaffer E.M., (1963) “In vitro attempt to inhibit calculus formatio using an ion exchange resin” en *J Periodontol.* 34,344-347.
53. Howell RE, Boyan-Salyers B., (1980) “Comparison of calcification between *Bacterionema matruchotii* and *Actinomyces naeslundii*” en *J Dent Res.* Nov;59(11):1999-2005.
54. Jabro M.H., Latta M.A., (1992) “A clinical evaluation of the effects of a periodontal scaling gel” en *J Clinical Dentistry* 3,43-46.
55. Jepsen S, Deschner J, Braun A, Schwarz F, Eberhard J., (2011) “Calculus removal and the prevention of its formation” en *Periodontol* 2000 Feb;55(1):167-88.

-
56. Jin Y, Yip HK., (2002) “Supragingival calculus: formation and control” en *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*13(5):426-441.
57. Johnson K.E., Sanders J.J., Gellin R.G., Palesch Y.Y., (1998) “The effectiveness of a magnetized water oral irrigator (Hydro Floss) on plaque, calculus and gingival health” en *J Clin Periodontol* 25:316-321.
58. Kerr D.A., Field H., (1944) “Sodium hexametaphosphate as an aid in the treatment of periodontal disease” *J Dental Research* 23:313-316.
59. Kido J, Nishikawa S, Ishida H, Yamashita K, Kitamura S, Kohri K and Nagata T., (1997) “Identification of calprotectin, a calcium binding leukocyte protein, in human dental calculus matrix” en *J Periodont Res* 32:355-361.
60. Kumar S, Patel S, Tadakamadla J, Tibdewal H, Duraiswamy P, Kulkarni S., (2013) “Effectiveness of a mouthrinse containing active ingredients in addition to chlorhexidine and triclosan compared with chlorhexidine and triclosan rinses on plaque, gingivitis, supragingival calculus and extrinsic staining” en *Int J Dent Hyg.*11(1):35-40.
61. Lang NP, Hotz P, Graf H, Geering AH, Saxer UP, Sturzenberger OP, Meckel AH., (1982) “Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. A longitudinal clinical trial.” en *J Periodontal Res* 17(1):101-11.
62. Linden GJ, Mullally BH., (1994) “Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults.” en *J Periodontol.* Jul;65(7):718-23.
63. Lindhe J, Rosling B, Socransky SS, Volpe AR., (1993) “The effect of triclosan-containing dentifrice on established plaque and gingivitis” en *Journal of Clinical Periodontol* 20:327-334.
64. Little MF, Hazen SP., (1964) “Dental calculus composition (2):subgingival calculus, ash, calcium, phosphorous and sodium” en *J Dent Res.* 43:645-651.

-
65. Llana-Puy C., (2006) "The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis" en *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Aug;11(5):E449-55.
66. Llana C, Forner L, Vento C., (2009) "Anticalculus efficacy of a new dentifrice" en *Quintessence Int*. Jun;40(6):497-501.
67. Loe H., Rindom Schiött C., Glavind L., Karring T., (1976) "Two years of chlorhexidine in man" en *J Periodont Res* 11:135-144.
68. Loe H, Schiott CR., (1970) "The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man." en *J Periodontal Res* 5(2):79-83.
69. López-Jornet P. (1998) "Saliva y salud dental" en *Promolibro*.Valencia.
70. Lo Sorto S, Silvestrini G and Bonucci E., (1992) "Ultrastructural localization of alkaline and acid phosphatase activities in dental plaque" en *J Periodont Res* 27:161-166.
71. Macpherson LM, Dawes C., (1993) "An in vitro stimulation of the effects of chewing sugar-free and sugar-containing chewing gums on pH changes in dental plaque" en *J Dent Res*. Oct;72(10):1391-7.
72. Mallatt M.E., Beiswanger B.B., Stookey G.K., Swancar J.R., Hennon D.K., (1985) "Influence of soluble pyrophosphate on calculus formation in adults" en *J Dent Res* 64(9):1159-1162.
73. Mandel ID, Thompson RH Jr., (1967) "The chemistry of paratid and submaxillary saliva in heavy calculus formers and non-formers." en *J Periodontol*. Jul-Aug;38(4):310-5.
74. Mandel I.D., (1974) "Relation of saliva and plaque to caries" en *J Dent Res* 53 (Suppl):245-266.

-
75. Mandel I.D., (1974) "Biochemical aspects of calculus formation. II: Comparative studies of saliva in heavy and light calculus formers" en *J Periodontol Res* 9:211-221
76. Mandel I.D. and Gaffar A., (1986) "Calculus revisited: A review" en *J Clin Periodontol* 13:249-257.
77. Mandel I.D., (1992) "Rinses for the control of supragingival calculus formation" en *Int Dent J.* Aug;42(4 Suppl 1):270-5. Review.
78. Mann PH, Harper DS, Regnier S., (1990) "Reduction of calculus accumulation in domestic ferrets with two dentifrices containing pyrophosphate" en *J Dent Res.* Feb;69(2):451-33.
79. Marks RG, Magnusson I, Taylor M, Clouser B, Maruniak J, Clark WB., (1993) "Evaluation of reliability and reproducibility of dental indices." en *J Clin Periodontol* Jan;20(1):54-8.
80. Martínez-Canut P, Benlloch D, Izquiero R., (1999) "Factors related to the quantity of subgingival calculus in proximal root surfaces" en *J Clin Periodontol* 26:519-524.
81. Mellberg JR, Petrou ID, Fletcher R, Grote N., (1991) "Evaluation of the effects of a pyrophosphate-fluoride anticalculus dentifrice on remineralization and fluoride uptake in situ" en *Caries Res.* 25(1):65-9.
82. Moorer WR, Ten Cate JM, Buijs JF., (1993) "Calcification of a cariogenic Streptococcus and of Corynebacterium (*Bacterionema*) matruchotii." en *J Dent Res.* Jun;72(6):1021-6.
83. Muhlemann HR, Schoeder HE., (1964) "Dynamics of supragingival calculus formation" en *Adv Oral Biol.* 1:175-203.

-
84. Mühlemann HR, Villa PR., (1967) "The marginal line calculus index" en *Helv Odontol Acta*. Oct;11(2):175-9.
85. Muller E, Schroeder H.E, Muhlemann H.R. Influence of fluoride and phosphate lozenges on early calculus formation. *Helvetica Odontologica Acta*. 1973; 7, 12-16.
86. Nauntofte B, Tenevuo JO, Lagerlöf F., (2003) "Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O and Kidd E, eds. Dental Caries. The disease and its clinical management" en *Oxford. Blackwell Munksgard*. p. 7-29.
87. Netuveli GS, Sheiham A., (2004) "A systematic review of the effectiveness of anticalculus dentifrices" en *Oral Health Prev Dent*. 2(1):49-58.
88. Osuji C.I. and Rowles S.L., (1972) "Isolation and identification of acid glycosaminoglycans in oral calculus" en *Arch Oral Biol* 17:211-214.
89. Patters MR, Landesberg RL, Johansson LA, Trummel CL, Robertson PB., (1982) "Bacteroides gingivalis antigens and bone resorbing activity in root surface fractions of periodontally involved teeth" en *J Periodontal Res*. Mar;17(2):122-30.
90. Pellat BP, Grand M., (1986) "Inorganic pyrophosphatase activity in a plaque calcifying microorganism: *Bacterionema matruchotii*" en *J Biol Buccale*. Sep;14(3):223-228.
91. Poff AM, Pearce EL, Larsen MJ, Cutress TW., (1997) "Human supragingival in vivo calculus formation in relation to saturation of saliva with respect to calcium phosphates" en *Arch Oral Biol*. Feb;42(2):93-9.
92. Pradeep AR, Agarwal E, Raju A, Narayana MS, Faizuddin M., (2010) "Study of orthophosphate, pyrophosphate and pyrophosphatase in saliva with referente to calculus formation and inhibition" *Journal Periodontol*. Mar;82(3):445-51.

93. Ramón V. Tesis Doctoral. Cálculo dental supragingival. Identificación de factores asociados a su formación.
94. Riboo-García R., (1994) “Control de la placa bacteriana por agentes químicos. Higiene y prevención en odontoestomatología individual y comunitaria” en *Ed Avances* 199-219.
95. Roberts-Harry E.A. and Clerehugh V., (2000) “Subgingival calculus: where are we now? A comparative review” en *Journal of dentistry* 28:93-102.
96. Rokita JR, Hazen SP, Millen D, Volpe AR., (1975) “An in vivo study of an antimicrobial mouth rinse on supragingival and subgingival plaque and calculus formation” en *Pharmacol Ther Dent.* 2(1):1-11.
97. Santos SL, Putt MS, Feinberg CA, Fernandez PM., (1999) “Development and validation of a short-term clinical model for assessing calculus inhibitory agents” en *J Clin Periodontol.* Mar;26(3):169-76.
98. Saxton CA, Van der Ouderaa FJ., (1989) “The effect of a dentifrice containing zinc citrate and Triclosan on developing gingivitis.” en *J Periodontal Res* 24(1):75-80.
99. Schaecken MJ, Van der Hoeven JS., (1993) “Control of calculus formation by a dentifrice containing calcium lactate.” en *Caries Res* 27(4):277-9.
100. Schaffer E.M., Schindler C.W., McHugh R.B., (1964) “The effects of two ions exchange resins on the inhibition of calculus like deposits in vitro” en *J Periodontol.* 35,296-301.
101. Schroeder H.E., Marthaler T., Muhlerman H.R., (1961) “Effect of some potential inhibitors on early calculus formation” en *Helvetica Odontologica Acta.* 6,6.

102. Segreto VA, Collins EM, D'Agostino R, Cancro LP, Pfeifer HJ, Gilbert RJ. (1991) "Anticalculus effect of a dentifrice containing 0.5% zinc citrate trihydrate." en *Community Dent Oral Epidemiol.* Feb;19(1):29-31.
103. Sherman BS, Sobel AE. (1965) "Differentiating between nucleation and crystal growth in mineralizing tissues and macromolecules." en *Arch Oral Biol.* May-Jun;10(3):323-42.
104. Shanon IL, Carroll EC and Madsen KO. (1970) "Dietary influences on the formation of dental calculus in rats." en *J. Periodont. Res.* 5: 191-195.
105. Sidaway D.A. (1978) "A microbiological study of dental calculus: II The in vitro calcification of microorganisms from dental calculus." en *J Periodontal Res* 13:360-366.
106. Sidaway D.A. (1979) "A microbiological study of dental calculus: III A comparison of the in vitro calcification of viable and non-viable microorganisms" en *J Periodontal Res* 14:167-172.
107. Sidaway DA. (1978) "A microbiological study of dental calculus. I.- The microbial flora of mature calculus" en *J Periodont Res*,13:349-359.
108. Singh SM. (1988) "The anticalculus effect of a mouthrinse containing pyrophosphate salts and a copolymer." en *Am J Dent.* Feb;1(1):9-11.
109. Singh S, Rustogi K, Volpe AR, Petrone M, Petrone D. (1989) "Clinical comparison of the anticalculus effect of two mouthrinses." en *Am J Dent.* Jun;2(3):97-9.
110. Sissons CH, Wong L, Hancock EM, Cutress TW. (1994) "pH gradients induced by urea metabolism in 'artificial mouth' microcosm plaques." en *Arch Oral Biol.* Jun;39(6):507-11.
111. Sissons CH, Wong L, Hancock EM, Cutress TW. (1994) "The pH

- response to urea and the effect of liquid flow in 'artificial mouth' microcosm plaques.” en *Arch Oral Biol*. Jun;39(6):497-505.
112. Sissons CH, Wong L, Cutress TW. (1995) “Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms.” en *Oral Microbiol Immunol*. Jun;10(3):160-7.
113. Sissons CH, Wong L, Shu M. (1998) “Factors affecting the resting pH of in vitro human microcosm dental plaque and *Streptococcus mutans* biofilms.” *Arch Oral Biol* Feb;43(2):93-102.
114. Slomiany A., Slomiany B.L., Mandel I.D., (1981) “Lipid composition of human parotid saliva from light and heavy dental calculus-formers.” en *Arch. Oral Biol* 26:151-152.
115. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL., (1988) “Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites.” en *J Clin Periodontol*. Aug;15(7):440-4.
116. Stewart G.G., (1952) “Mucinase- a possible means of reducing calculus formation.” en *J Periodontol*. 23, 85-90.
117. Stookey GK, Jackson RJ, Baiswanger BB, Atookey KR. (1989) “Clinical efficacy of Chemicals for calculus prevention.” In: Ten Cate J editor. *Recent Advances in the Study of Dental Calculus*. Oxford: IRLPress, 235-238.
118. Suomi JD, Greene JC, Vermillion JR, Doyle J, Chang JJ, Leatherwood EC., (1971) “The effect of controlled oral hygiene procedures on the progression of peridontal disease in adults: results after third and final year.” *J Periodontol*. Mar;42(3):152-60.

-
119. Swain LD, Renthall RD, Boyan BD., (1989) "Resolution of ion translocating proteolipid subclasses active in bacterial calcification." en *J Dent Res.* Jun;68(6):1094-7.
120. Tepe JH, Leonard GJ, Singer RE, Gray JA, Gibberman BP, Mulvihill JE., (1983) "The long-term effect of chlorhexidine on plaque, gingivitis, sulcus depth, gingival recession, and loss of attachment in beagle dogs" en *J Periodontal Res.* 18(4):452-8.
121. Thomas WC Jr. (1982) "Trace metal-citric acid complexes as inhibitors of calcification and crystal formation." en *Proc Soc Exp Biol Med.* 1982 Jul;170(3):321-7.
122. Van Dijk S, Dean DD, Liu Y, Zhao Y, Chirgwin JM, Schwartz Z, Boyan BD. (1998) "Purification, amino acid sequence, and cDNA sequence of a novel calcium-precipitating proteolipid involved in calcification of corynebacterium matruchotii" en *Calcif Tissue Int.* Apr;62(4):350-8.
123. Vogel JJ, Amdur BH. (1967) "Inorganic pyrophosphate in parotid saliva and its relation to calculus formation." en *Arch Oral Biol.* 12(1):159-63.
124. Volpe AR, Manhold JH y Hazen SP. (1965) "In Vivo Calculus Assessment: Part I. A method and its examiner reproducibility." en *J Periodontol.* 36:292-8.
125. Watanabe T, Toda K, Morishita M y Iwamoto Y. (1982) "Correlation between salivary protease and supragingival or subgingival calculus index." en *J Dent Res* 61(9):1048-1051.
126. Watt D.L., Rosenfelder C. and Sutton C.D. (1993) "The effect of oral irrigation with a magnetic water treatment device on plaque and calculus." en *J Clin. Periodontol.* 20:314-317.

127. White D.J. (1997) "Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits" en *Eur J Oral Sci.* 105:508-522.
128. Wong L., Sissons C.H., Pearce E.I.F. and Cutress T.W. (2002) "Calcium phosphate deposition in human dental plaque microcosm biofilms induced by a ureolytic pH-rinse procedure" en *Archives of Oral Biology* 47:779-790.
129. Zacherl WA, Pfeiffer HJ y Swancar JR. (1985) "The effect of soluble pyrophosphates on dental calculus in adults." *JADA* 110:737-738.

ANEXO 1

D. Fernando A. Verdú Pascual, Profesor Titular de Medicina Legal y Forense, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada en el día de hoy, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

“Determinación de los microorganismos de la placa bacteriana dental y de los factores bioquímicos de la saliva asociados a la formación del cálculo dental en pacientes con periodontitis crónica. Investigación in vivo para evaluar la capacidad de inhibir la formación de cálculo dental de un colutorio”,

cuyo investigador principal es Francisco M. Alpiste Illueca, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a dieciocho de febrero de dos mil nueve.

Fernando Verdú Pascual
 Profesor Titular de Medicina Legal y Forense



**Certifico la precisión e
 integridad de este
 documento**
 2009.02.18 17:00:16
 +01'00'



Carrer: Blasco Ibáñez, 13
 VALÈNCIA 46101

Telèfon: (96) 386 41 09
 Fax: (96) 386 32 21
 e-mail: vicerec.iv@investigacio.uv.es

ANEXO 2

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

**“DETERMINACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DE LA PLACA
BACTERIANA DENTAL Y DE LOS FACTORES BIOQUÍMICOS DE LA
SALIVA ASOCIADOS A LA FORMACIÓN DEL CÁLCULO DENTAL EN
PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA. INVESTIGACIÓN IN VIVO
PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE INHIBIR LA FORMACION DE
CALCULO DENTAL DE UN COLUTORIO.”**

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Prof. Dr. D. Francisco Manuel Alpiste Illueca.

Periodoncia. Departamento de Estomatología.

Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia

INVESTIGADORES 1, 2, 3:

Dra. Carla Fons Badal

Ana Martinez Montañana

Lourdes Garcia Serrano

OBJETIVOS:

Realizar un estudio cruzado y a doble ciego para valorar la efectividad de un colutorio (Dentaid ®) en inhibir la formación de sarro en dientes de pacientes con periodontitis.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Como usted ya sabe, la formación de sarro en sus dientes es un problema que conlleva a la inflamación de sus encías y a la activación de su periodontitis, cuyas consecuencias son la pérdida progresiva del hueso que sujeta los dientes, y a largo plazo la pérdida del propio diente por falta de fijación en sus raíces. Usted también sabe que, aunque tenga muy buena higiene oral, con el paso del tiempo las bacterias de la boca acaban calcificandose formando el sarro en los dientes, y que una vez formado el sarro, el cepillo dental es incapaz de eliminarlo, por lo tanto para eliminar esas bacterias que se han calcificado usted debe acudir al dentista para que las elimine con una limpieza profesional.

El objetivo de esta investigación es estudiar el efecto que tiene un colutorio (enjuague) sobre la formación del sarro.

Se tomarán muestras de su saliva, de bacterias de su boca (mediante el frotamiento de un algodón sobre los dientes) y del sarro que se haya formado (mediante un raspado suave de sus dientes).

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

Se le realizará revisiones a los 90 días (3 meses) y 180 días (6 meses) realizándole el mismo procedimiento de exploración y raspado. Durante la duración del estudio las visitas de mantenimiento serán gratuitas.

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 este colutorio inhibe la formación de sarro sobre los dientes.

Esta información podrá ser aprovechada en su propia salud, ya que si el efecto del colutorio es positivo, usted tendrá menos necesidad de visitar al dentista para que limpie sus dientes de sarro.

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 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 de la Universidad de Valencia* 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 el *Prof. Dr. D. Francisco M. Alpiste Illueca* con nº de teléfono 96 3801669, médico responsable de esta investigación, o con la *Dra. Carla Fons Badal* con nº de teléfono 963983136. Puede preguntar cualquier duda o problema que tenga relacionado con este estudio, o consulte con sus propios familiares y, finalmente, si está de acuerdo firme este consentimiento. Se le entregará una copia.

Fdo.:

Prof. Dr. D. Francisco Manuel Alpiste Illueca.	Dra. Carla Fons Badal
Investigador Principal del Proyecto	Periodoncia. Departamento de
Periodoncia. Departamento de	Estomatología.
Estomatología.	Facultad de Medicina y Odontología.
Facultad de Medicina y Odontología.	Universidad de Valencia
Universidad de Valencia	Tel: 963983136
Tel: 96 3983136	

CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE SUJETO DE ESTUDIO

“DETERMINACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DE LA PLACA BACTERIANA DENTAL Y DE LOS FACTORES BIOQUÍMICOS DE LA SALIVA ASOCIADOS A LA FORMACIÓN DEL CÁLCULO DENTAL EN PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA. INVESTIGACIÓN IN VIVO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE INHIBIR LA FORMACION DE CALCULO DENTAL DE UN COLUTORIO.”

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 el *Dr. D. Francisco M. Alpiste Illueca* 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.

“DETERMINACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DE LA PLACA BACTERIANA DENTAL Y DE LOS FACTORES BIOQUÍMICOS DE LA SALIVA ASOCIADOS A LA FORMACIÓN DEL CÁLCULO DENTAL EN PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA. INVESTIGACIÓN IN VIVO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE INHIBIR LA FORMACION DE CALCULO DENTAL DE UN COLUTORIO.”

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 el *Dr. D. Francisco M. Alpiste Illueca* 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.....

ANEXO 3

IMPRESO DE INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO:

“INVESTIGACIÓN IN VIVO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE UN COLUTORIO DE INHIBIR LA FORMACION DE CALCULO DENTAL.”

El estudio en el que va a participar consta de tres sesiones clínicas: una inicial, otra a los tres meses y otra a los seis meses. Serán visitas de mantenimiento en la que se tomarán una serie de registros: muestra de saliva, de placa bacteriana y de sarro.

Para tomar la muestra de saliva será necesario que las dos horas previas a la cita no ingiera alimentos, ni fume, ni masque chicle, ni se cepille.

Para la obtención de la muestra de placa bacteriana no deberá cepillarse los incisivos ni caninos inferiores los cuatro días previos a cada una de las sesiones clínicas que comprenden el estudio. Es muy importante cumplir con esta parte ya que la placa que debe recogerse es placa madura y necesita de estos cuatro días para obtenerse.

En la primera sesión se administrará un colutorio con el que usted deberá enjuagarse los próximos tres meses. En la segunda sesión se devolverá el sobrante del colutorio empleado y se le dará otro colutorio que deberá utilizarse los siguientes 3 meses. Al sexto mes se devolverá el sobrante del segundo colutorio y habrá finalizado el estudio.

Deberá enjuagarse con 10ml de colutorio 2 veces al día durante 1 minuto (controlarlo con reloj) después de cepillarse los dientes y de realizar su limpieza interproximal. En caso de no cumplir el protocolo de forma estricta será excluido del estudio. A su vez deberá utilizar la pasta dentífrica que se le proporcione para lavarse los dientes previa utilización del colutorio.

Durante la duración del estudio serán gratuitos tanto los mantenimientos como los colutorios administrados.

Gracias por su colaboración

ANEXO 4

CUESTIONARIO PACIENTES ESTUDIO ANTICÁLCULO**Nombre:****Fecha:**

¿Ha notado durante el tiempo de utilización del colutorio alguna de las siguientes sensaciones?

Escozor	Ardor
Picor	Irritación

¿Ha observado la aparición de alguna lesión en su boca durante la toma del colutorio?

¿Ha observado tinción de sus dientes, lengua o encías?

¿Le agrada el sabor del colutorio?

Observaciones:

Valoración odontólogo:

ANEXO 5

FICHA PACIENTE

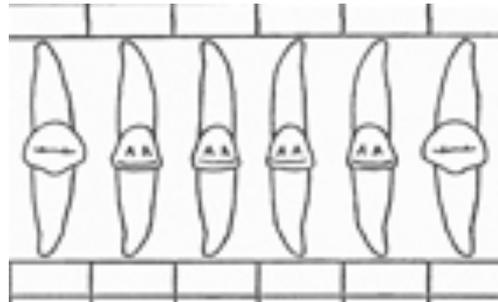
Nombre

Edad

Sexo

Hábitos tabáquicos (cig/día)

Diagnóstico periodontal



Profundidad de sondaje/Recesión/Movilidad

Troneras

Diastemas

Apiñamiento

EXAMEN 1 (Fecha:)

Flujo salival en reposo: 10 min ml/min

pH

Exploración mucosas

Índice de Volpe-Manhold

Peso cálculo

Volumen cálculo

EXAMEN 2 (Fecha:)

Flujo salival en reposo: 10 min ml/min

pH

Índice de Volpe-Manhold

Peso cálculo

Volumen cálculo

EXAMEN 3 (Fecha:)

Flujo salival en reposo: 10 min ml/min

pH

Índice de Volpe-Manhold

Peso cálculo

Volumen cálculo

ANEXO 6

ESTUDIO ESTADÍSTICO
Carla Fons

**RELACIÓN ENTRE EL PESO Y EL
VOLUMEN DE SARRO CON EL
ÍNDICE DE VOLPE-MANHOLD**

MAYO 2.010

1	ÍNDICE	
1	OBJETIVO	217
2	MATERIAL Y METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	217
3	RESULTADOS	219
▪	3.1 RELACIÓN ENTRE ÍNDICE V-M Y PESO Y VOLUMEN DE SARRO	219
4	CONCLUSIONES	222

OBJETIVO

Comprobar si el peso y el volumen de sarro se correlacionan con el índice de Volpe-Manhold

MATERIAL Y METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Se dispone de una muestra inicial de 30 pacientes para los que se dispone de mediciones de los siguientes parámetros:

- ▲ Sexo (13% hombres y 87% mujeres)
- ▲ Edad (49 años de media, mínimo 35 años y máximo 64)
- ▲ Fumador (sí 47% y no 53%)
- ▲ Índice VM (12,6 de media, 2 mínimo y 23 máximo)
- ▲ Peso del sarro (0,015 grs. de media, 0,0008 mínimo y 0,069 máximo)
- ▲ Volumen de sarro (0,013 c.c. de media, 0,001 mínimo y 0,030 máximo)

El **Análisis Bivariante** engloba todos los contrastes estadísticos necesarios para comprobar las correlaciones entre parámetros.

- **Prueba de Shapiro-Wilk:** Se ha utilizado para contrastar el ajuste a una distribución normal de las diferentes variables de tipo continuo (es más robusta que Kolmogorov-Smirnov cuando las muestras son menores de 30 casos). En función del resultado, la consecución de los objetivos de la investigación se aborda desde un enfoque paramétrico o no paramétrico.
- **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 índice VM difiere según el sexo.
- **Prueba de Kruskal-Wallis para varias muestras independientes:** Se utiliza para contrastar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en más de dos muestras independientes. Por ejemplo, para analizar si el volumen de sarro difiere según los distintos grupos de índice VM establecidos.

- **Prueba de la t de student:** Se ha utilizado para contrastar si algunas variables de tipo continuo (y con distribución normal) presentan la misma media en dos muestras distintas. Por ejemplo, ¿tienen los dientes pertenecientes a grupos de índices de VM distintos el mismo volumen de sarro?
- El **coeficiente de correlación de Pearson** se calcula para medir la relación lineal entre medidas continuas con distribución normal (si no es normal se utiliza la rho de Spearman).

El *nivel de significatividad* empleado en todos los análisis bivariantes ha sido el 5% ($\alpha=0.05$)².

² El p-valor es, suponiendo que no hay diferencias entre grupos, la probabilidad de que los resultados obtenidos puedan ser debidos al azar. Cuanto menor es el 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 contra, un p-valor mayor o igual a 0.05 indica ausencia de relación.

RESULTADOS

En este capítulo se realizarán los contrastes para comprobar la correlación entre el índice VM y el peso y volumen de sarro.

Para empezar, se detalla cómo se distribuye el índice VM según los parámetros referentes al perfil del paciente:

T1.- ÍNDICE VM según SEXO Y FUMADOR

		FUMADOR			SEXO		
		Total	no	si	Total	hombre	mujer
Índice V-M	N válido	30	16	14	30	4	26
	Media	12,63	11,44	14,00	12,63	18,63	11,71
	Desviación típica	6,00	4,96	6,94	6,00	4,42	5,73
	Máximo	23	19	23	23	23	23
	Mediana	12	12	15	12	20	11
	Mínimo	2	2	4	2	13	2

Los hombres poseen un índice V-M significativamente mayor que las mujeres (p-valor (prueba M-W) 0,026).

Tanto la edad como el índice V-M son normales según la prueba Shapiro-Wilk (p-valores > 0,05), por tanto, aplicaremos una correlación de Pearson para comprobar si el índice VM depende de la edad del paciente.

NORMALIDAD	p-valor (prueba)
Índice V-M	0,419 (S-W)
Edad	0,582 (S-W)

La correlación entre el índice y la edad es inexistente (p-valor 0,496 > 0,05), por tanto, la edad no influye para nada en el índice VM.

Correlaciones

		edad
Índice V-M	Correlación de Pearson	-,129
	Sig. (bilateral)	,496
	N	30

RELACIÓN ENTRE ÍNDICE V-M Y PESO Y VOLUMEN DE SARRO

Los tres parámetros a estudiar son continuos y, por tanto, son susceptibles de comprobar su normalidad mediante la prueba no paramétrica de Shapiro-Wilk (la del índice se comprobó en el apartado anterior).

NORMALIDAD	p-valor (prueba)
Índice V-M	0,419 (S-W)

Peso sarro	0,000 (S-W)
Volumen sarro	0,057 (S-W)

Los p-valores mayores que 0,05 indican normalidad, por tanto, excepto el peso, los otros dos parámetros siguen una distribución normal.

Como los tres parámetros son continuos, las correlaciones son la mejor forma de comprobar su relación: para variables normales se utiliza el coeficiente de correlación de Pearson y para no normales, la rho de Spearman.

Correlaciones

	Volumen cálculo (c.c.)	
Indice V-M	Correlación de Pearson	,661**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	30

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

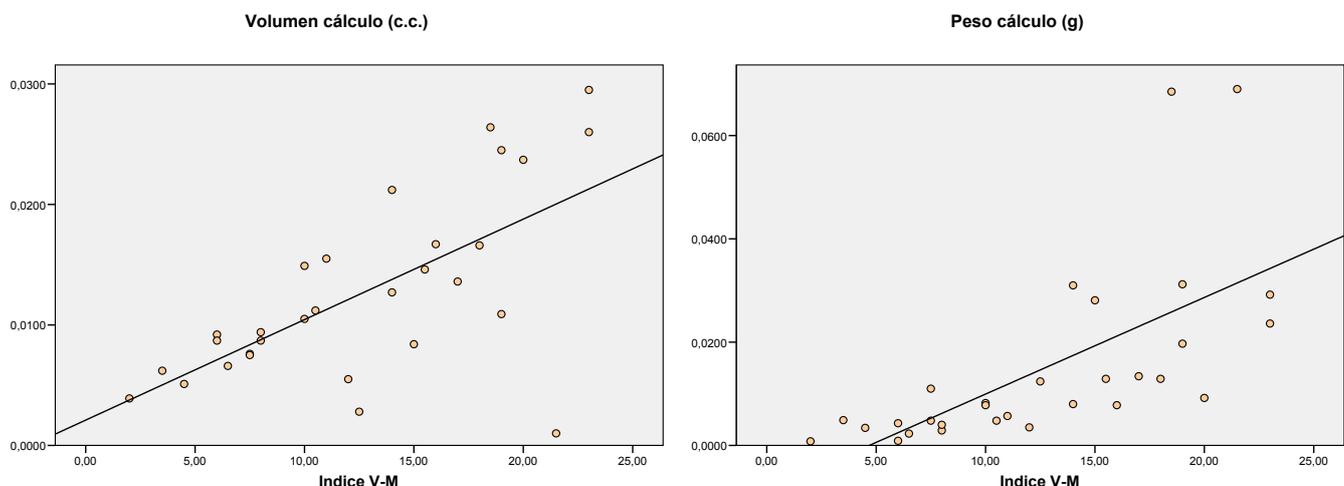
Correlaciones

		Peso cálculo (g)	
Rho de Spearman	Indice V-M	Coefficiente de correlación	,828**
		Sig. (bilateral)	,000
		N	30

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Como indica la significatividad (0,000), los coeficientes de correlación tanto para el peso como para el volumen con el índice son estadísticamente significativos, así pues, se puede considerar que **la correlación entre el índice VM y el peso y el volumen de sarro son positivas y fuertes**: a mayor índice V-M, mayor peso y volumen de sarro.

Los siguientes gráficos de dispersión muestran claramente esta relación:



Una puntualización importante para interpretar los gráficos: la Rho de Spearman no es un coeficiente que indique, al igual que el coeficiente de correlación de Pearson (r), la relación directa entre una variable y la otra – es decir, que establezca una regla ($y=r*x$) que relacione ambas variables-. Por ejemplo, si el coeficiente de Pearson es 0,56, la interpretación es que si una de las variables aumenta una unidad, la otra aumentará 0,56 unidades.

La interpretación de la Rho de Spearman - al trabajar con la posición (rango) de los datos y no con los valores originales - es más general: si la rho es 0,8 significa que valores altos de una variable se asocian con valores altos de la otra, pero no exactamente que una de ellas aumenta 0,8 al aumentar la otra en una unidad.

Aclarado este concepto, ambos gráficos muestran claramente –ayudados por la línea de tendencia que ajusta bastante bien - la fuerte relación existente entre el índice VM y el peso y volumen del sarro.

Para profundizar un poco más en estas relaciones, agrupemos el índice VM en tres categorías y veamos cómo evolucionan el peso y el volumen de sarro según el nivel de índice.

Esta es la escala del índice VM propuesta:

INDICE VM

	Frecuencia	Porcentaje
Menor de 10	10	33,3
De 10 a 15	9	30,0
Más de 15	11	36,7
Total	30	100,0

La siguiente tabla describe el comportamiento del sarro (volumen y peso) según el nivel de índice V-M:

T2.- PESO y VOLUMEN DE SARRO según ÍNDICE VM

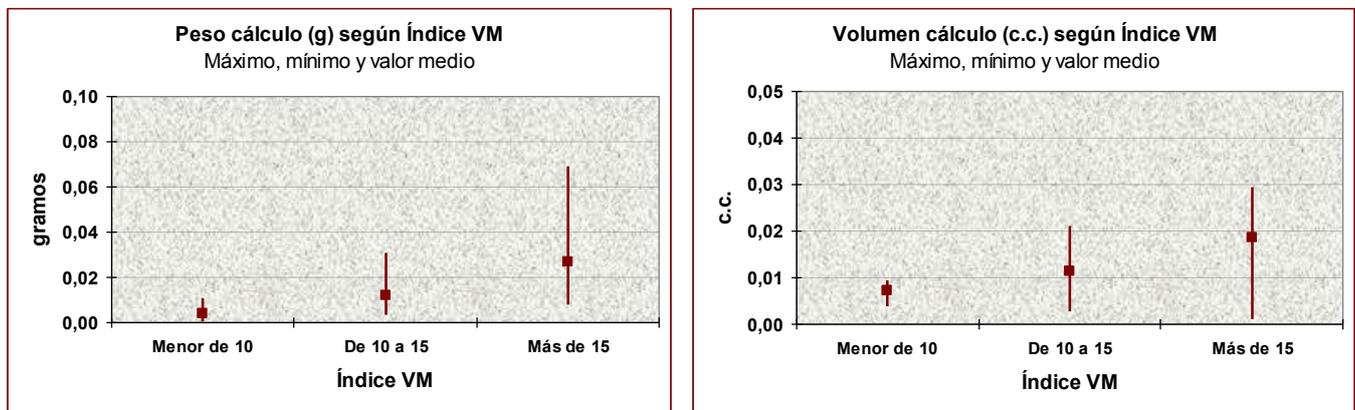
		INDICE VM			
		Total	Menor de 10	De 10 a 15	Más de 15
Peso cálculo (g)	N válido	30	10	9	11
	Media	,0149	,0039	,0122	,0270
	Desviación típica	,0173	,0029	,0102	,0220
	Máximo	,0690	,0110	,0310	,0690
	Mediana	,0081	,0037	,0080	,0197
	Mínimo	,0008	,0008	,0035	,0078
Volumen cálculo (c.c.)	N válido	30	10	9	11
	Media	,0126	,0073	,0114	,0185
	Desviación típica	,0076	,0018	,0055	,0084
	Máximo	,0295	,0094	,0212	,0295
	Mediana	,0107	,0076	,0112	,0167
	Mínimo	,0010	,0039	,0028	,0010

A priori, se aprecian diferencias en las cantidades promedio de peso y volumen de sarro según el índice. Contrastémoslo mediante pruebas estadísticas:

	p-valor (prueba)
Índice V-M vs. Peso sarro	0,000 (K-W)
Índice V-M vs. Volumen sarro	0,001 (t-student)

Ambos p-valores $<0,05$ indican diferencias en los pesos y volúmenes medios de sarro según índice: ambos aumentan según aumenta el nivel del índice V-M.

Estos gráficos son muy ilustrativos de estas diferencias; se muestran los valores mínimo, máximo y medio y se observa, claramente, cómo éstos aumentan en cada nivel superior de índice V-M:



CONCLUSIONES

- ▲ Tanto el volumen como el peso de sarro en diente están fuertemente correlacionados con el índice V-M: a mayor peso y volumen de sarro, mayor índice V-M.
- ▲ Por tanto, se puede concluir que el índice V-M propuesto es un indicador adecuado para medir la cantidad de sarro que se forma en una zona de la boca.

ANEXO 7

TABLAS ESTADÍSTICA

T1.- EDAD (AÑOS)

N	37
Media	51,1
Desviación típica	7,7
Mínimo	35,0
Máximo	64,0
Mediana	51,0

T2.- SEXO

	N	%
Total	37	100,0%
Hombre	11	29,7%
Mujer	26	70,3%

T3.- TABAQUISMO

	N	%
Total	37	100,0%
No fumador	22	59,5%
Fumador hasta 10 cig/día	7	18,9%
Fumador más de 10 cig/día	8	21,6%

T4.- DIAGNÓSTICO

	N	%
Total	37	100,0%
Crónica moderada generalizada	16	43,2%
Crónica avanzada generalizada	13	35,1%
Agresiva inicial generalizada	1	2,7%
Agresiva avanzada generalizada	6	16,2%
Crónica inicial localizada	1	2,7%

T5.- TRONERAS, DIASTEMAS Y APIÑAMIENTO

		N	%
troneras	Total	37	100,0%
	No	16	43,2%
	Sí	21	56,8%
diastemas	Total	37	100,0%
	No	31	83,8%
	Sí	6	16,2%
apiñamiento	Total	37	100,0%
	No	14	37,8%
	Sí	23	62,2%

T6.- UREA

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	45,79	16,38	25,00	100,00	44,00
COLUT. A	37	32,00	5,83	17,00	42,00	31,00
COLUT. B	37	35,38	9,75	18,00	72,00	35,00
Dif. A - inicial	37	-13,79	16,83	-65,00	10,00	-11,00
Dif. B - inicial	37	-10,41	19,37	-71,00	43,00	-7,00

T7.- ÁCIDO ÚRICO

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	3,49	2,00	,80	11,20	3,20
COLUT. A	37	2,51	,76	,75	4,10	2,20
COLUT. B	37	2,69	1,19	1,29	8,39	2,54
Dif. A - inicial	37	-,97	2,11	-8,40	2,10	-,70
Dif. B - inicial	37	-,80	1,47	-4,00	1,10	-,50

T8.- CALCIO

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	1,80	,59	,90	3,71	1,70
COLUT. A	37	2,18	1,11	,93	7,20	1,90
COLUT. B	37	2,50	1,59	1,00	8,98	2,18
Dif. A - inicial	37	,38	1,30	-1,81	6,10	,28
Dif. B - inicial	37	,70	1,71	-1,91	7,88	,30

T9.- FÓSFORO

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	20,57	8,49	8,90	43,30	18,30
COLUT. A	37	10,20	1,07	7,25	12,57	10,25
COLUT. B	37	10,19	,73	8,53	11,20	10,30
Dif. A - inicial	37	-10,37	8,37	-32,30	1,00	-8,30
Dif. B - inicial	37	-10,38	8,61	-33,80	1,48	-8,00

T10.- SODIO

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	9,57	4,86	5,00	30,27	9,00
COLUT. A	37	9,32	1,11	7,00	12,00	9,00
COLUT. B	37	9,03	1,26	5,00	11,00	9,00
Dif. A - inicial	37	-,25	4,99	-21,27	5,00	,00
Dif. B - inicial	37	-,55	5,15	-21,27	4,00	,00

T11.- POTASIO

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	31,36	6,68	18,00	51,66	30,99
COLUT. A	37	30,45	1,43	27,50	33,10	30,50
COLUT. B	37	30,83	1,78	27,00	37,00	30,50
Dif. A - inicial	37	-,91	6,97	-21,66	14,70	-1,43
Dif. B - inicial	37	-,53	7,13	-22,56	14,90	-,70

T12.- CLORO

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	18,54	7,83	2,00	37,00	19,00
COLUT. A	37	19,49	2,23	12,00	25,00	19,00
COLUT. B	37	19,89	1,65	17,00	25,00	20,00
Dif. A - inicial	37	,95	8,20	-18,00	17,00	,00
Dif. B - inicial	37	1,35	8,28	-19,00	19,00	1,00

T13.- FLUJO SALIVAR 1 m

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	,51	,32	,22	1,50	,42
COLUT. A	37	,61	,35	,16	1,68	,52
COLUT. B	37	,68	,38	,20	1,60	,56
Dif. A - inicial	37	,09	,25	-,48	1,16	,06
Dif. B - inicial	37	,16	,30	-,72	1,12	,12

T14.- PH

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	6,84	,59	5,38	7,85	6,85
COLUT. A	37	6,99	,44	6,12	7,79	7,06
COLUT. B	37	7,09	,48	5,71	7,86	7,15
Dif. A - inicial	37	,15	,57	-1,10	1,54	,09
Dif. B - inicial	37	,25	,51	-,47	1,61	,10

T15.- ÍNDICE VOLPE-MANHOLD

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	19,70	9,62	4,50	41,50	18,00
COLUT. A	37	13,72	7,10	1,00	29,00	12,50
COLUT. B	37	11,07	6,52	,50	30,50	10,00
Dif. A - inicial	37	-5,98	4,97	-16,50	2,50	-5,50
Dif. B - inicial	37	-8,63	6,92	-27,50	2,60	-6,50

T16.- PESO

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	21,90	13,19	1,30	56,70	19,10
COLUT. A	37	15,10	10,67	,20	42,40	11,70
COLUT. B	37	10,84	9,57	,10	38,50	8,10
Dif. A - inicial	37	-6,80	9,22	-35,60	12,30	-7,30
Dif. B - inicial	37	-11,06	10,35	-34,70	2,40	-8,10

T17.- VOLUMEN

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	21,86	12,26	2,30	49,00	20,60
COLUT. A	37	14,19	9,69	,40	40,20	12,30
COLUT. B	37	14,35	14,93	,10	86,00	9,90
Dif. A - inicial	37	-7,67	10,40	-47,95	9,20	-6,83
Dif. B - inicial	37	-7,51	17,52	-41,40	73,80	-7,10

T19.- RESULTADO PCR C.MATRUCHOTTI

		N	%
INICIAL	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	Negativo	2	5,4%
	Positivo	35	94,6%

**T19A.- VARIACIÓN RESULTADO PCR C.MATRUCHOTTI
COLUT. A RESPECTO INICIAL**

		INICIAL			
		Total		Positivo	
		N	%	N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%	37	100,0%

**T19B.- VARIACIÓN RESULTADO PCR C.MATRUCHOTTI
COLUT. B RESPECTO INICIAL**

		INICIAL			
		Total		Positivo	
		N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	37	100,0%
	Negativo	2	5,4%	2	5,4%
	Positivo	35	94,6%	35	94,6%

T20.- RESULTADO PCR VEILLONELLA PARVULA

		N	%
INICIAL	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%

**T20A.- VARIACIÓN RESULTADO PCR VEILLONELLA PARVULA
COLUT. A RESPECTO INICIAL**

		INICIAL			
		Total		Positivo	
		N	%	N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%	37	100,0%

**T20B.- VARIACIÓN RESULTADO PCR VEILLONELLA PARVULA
COLUT. B RESPECTO INICIAL**

		INICIAL			
		Total		Positivo	
		N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%	37	100,0%

**T21.- RESULTADO PCR
STREPTOCOCCUS SALIVARIUS**

		N	%
INICIAL	Total	37	100,0%
	Negativo	27	73,0%
	Positivo	10	27,0%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	Negativo	25	67,6%
	Positivo	12	32,4%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	Negativo	21	56,8%
	Positivo	16	43,2%

**T21A.- VARIACIÓN RESULTADO PCR STREPTOCOCCUS SALIVARIS COLUT. A
RESPECTO INICIAL**

		INICIAL					
		Total		Negativo		Positivo	
		N	%	N	%	N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%	27	73,0%	10	27,0%
	Negativo	25	67,6%	21	56,8%	4	10,8%
	Positivo	12	32,4%	6	16,2%	6	16,2%

**T21B.- VARIACIÓN RESULTADO PCR STREPTOCOCCUS SALIVARIS COLUT. B
RESPECTO INICIAL**

		INICIAL					
		Total		Negativo		Positivo	
		N	%	N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	27	73,0%	10	27,0%
	Negativo	21	56,8%	20	54,1%	1	2,7%
	Positivo	16	43,2%	7	18,9%	9	24,3%

T22.- RESULTADO PCR STREPTOCOCCUS SANGUIS

		N	%
INICIAL	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%

T21A.- VARIACIÓN RESULTADO PCR STREPTOCOCCUS SANGUIS COLUT. A RESPECTO INICIAL

		INICIAL			
		Total		Positivo	
		N	%	N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%	37	100,0%

T21B.- VARIACIÓN RESULTADO PCR STREPTOCOCCUS SANGUIS COLUT. B RESPECTO INICIAL

		INICIAL			
		Total		Positivo	
		N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%	37	100,0%

T23.- RESULTADO PCR STREPTOCOCCUS MUTANS

		N	%
INICIAL	Total	37	100,0%
	Negativo	33	89,2%
	Positivo	4	10,8%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	Negativo	31	83,8%
	Positivo	6	16,2%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	Negativo	29	78,4%
	Positivo	8	21,6%

T23A.- VARIACIÓN RESULTADO PCR STREPTOCOCCUS MUTANS COLUT. A RESPECTO INICIAL

		INICIAL					
		Total		Negativo		Positivo	
		N	%	N	%	N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%	33	89,2%	4	10,8%
	Negativo	31	83,8%	30	81,1%	1	2,7%
	Positivo	6	16,2%	3	8,1%	3	8,1%

T23B.- VARIACIÓN RESULTADO PCR STREPTOCOCCUS MUTANS COLUT. B RESPECTO INICIAL

		INICIAL					
		Total		Negativo		Positivo	
		N	%	N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	33	89,2%	4	10,8%
	Negativo	29	78,4%	28	75,7%	1	2,7%
	Positivo	8	21,6%	5	13,5%	3	8,1%

T24.- RESULTADO PCR EUBACTERIUM SABORREUM

		N	%
INICIAL	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	Negativo	1	2,7%
	Positivo	36	97,3%

T24A.- VARIACIÓN RESULTADO PCR EUBACTERIUM SABORREUM COLUT. A RESPECTO INICIAL

		INICIAL			
		Total		Positivo	
		N	%	N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%	37	100,0%
	Positivo	37	100,0%	37	100,0%

T24B.- VARIACIÓN RESULTADO PCR EUBACTERIUM SABORREUM COLUT. B RESPECTO INICIAL

		INICIAL			
		Total		Positivo	
		N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	37	100,0%
	Negativo	1	2,7%	1	2,7%
	Positivo	36	97,3%	36	97,3%

T24C.- MEDIA EUBACTERIUM (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	18	5723023,1	22401973,3	5683,3	95400000,0	72300,0
COLUT. A	17	1471481,4	3801940,1	5450,0	15733333,3	93150,0
COLUT. B	17	1778792,5	3471629,7	4640,0	12300000,0	141000,0
Dif. A - inicial	15	-5244192,2	25232449,1	-95258000	14999000,0	3700,0
Dif. B - inicial	15	-4851300,0	21785841,1	-83100000	7997000,0	37000,0

T24D.- MEDIA LG EUBACTERIUM (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
LGEUBAC_ME_1	18	5,10	1,07	3,75	7,98	4,81
LGEUBAC_ME_A	17	5,18	,99	3,74	7,20	4,97
LGEUBAC_ME_B	17	5,29	1,11	3,67	7,09	5,15
Dif. A - inicial	15	-,06	1,09	-2,83	1,54	,04
Dif. B - inicial	15	,14	,83	-1,15	1,33	,28

T25.- MEDIA CFU C.MATRUCHOTTI (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	8319343,2	19565026,9	17100,0	106000000	2930000,0
COLUT. A	37	12722846,5	19952109,5	1120,0	99500000,0	6210000,0
COLUT. B	35	17232171,4	33825097,7	11000,0	161000000	3210000,0
Dif. A - inicial	37	4403503,2	28735258,1	-100080000	93460000,0	747000,0
Dif. B - inicial	35	8447548,6	39187361,4	-102160000	149000000	92000,0

T25D.- MEDIA LG MATRUCHOTTI (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
LGMATRU_ME_1	37	6,34	,79	4,23	8,03	6,47
LGMATRU_ME_A	37	6,46	1,08	3,05	8,00	6,79
LGMATRU_ME_B	35	6,56	,86	4,04	8,21	6,51
Dif. A - inicial	37	,12	,97	-1,70	2,23	,27
Dif. B - inicial	35	,14	,77	-1,44	1,96	,05

T26.- MEDIA CFU VEILLONELLA PARVULA (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	20692459,5	29207971,6	347000,0	155000000	12300000,0
COLUT. A	37	24507302,7	43438579,4	81200,0	207000000	12100000,0
COLUT. B	37	22858189,2	25652880,1	244000,0	93700000,0	14100000,0
Dif. A - inicial	37	3814843,2	29236800,1	-59220000,0	132700000	-570000,0
Dif. B - inicial	37	2165729,7	27738466,0	-106200000	80100000,0	621000,0

T26D.- MEDIA LG VEILLONELLA PARVULA (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
LGVEILLO_ME_1	37	7,00	,59	5,54	8,19	7,09
LGVEILLO_ME_A	37	6,95	,69	4,91	8,32	7,08
LGVEILLO_ME_B	37	6,99	,67	5,39	7,97	7,15
Dif. A - inicial	37	-,05	,51	-1,17	,92	-,02
Dif. B - inicial	37	-,01	,63	-1,34	1,39	,03

T27.- MEDIA CFU STREPTOCOCCUS SALIVARIUS (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	9	8940155,6	20085068,1	19500,0	62100000,0	2130000,0
COLUT. A	8	5022462,5	4798093,3	15500,0	9990000,0	4940000,0
COLUT. B	13	4243461,5	4065386,9	129000,0	11600000,0	4400000,0
Dif. A - inicial	3	2460100,0	5323386,7	-1174500,0	8570500,0	-15700,0
Dif. B - inicial	7	-6479642,9	20705548,5	-53110000	4380500,0	175000,0

T27D.- MEDIA LG S. SALIVARIUS (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
LGSSALV_ME_1	9	6,04	1,13	4,29	7,79	6,33
LGSSALV_ME_A	8	6,06	1,20	4,19	7,00	6,52
LGSSALV_ME_B	13	6,21	,78	5,11	7,06	6,64
Dif. A - inicial	3	,17	2,29	-1,89	2,64	-,26
Dif. B - inicial	7	,05	1,20	-1,07	2,35	,21

T28.- MEDIA CFU STREPTOCOCCUS SANGUIS (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	1,1E+009	1559396656	12100000,0	6150000000,0	476000000
COLUT. A	37	1,4E+009	2392259868	25300000,0	9950000000,0	530000000
COLUT. B	37	1,1E+009	2138984307	29100000,0	11900000000,0	515000000
Dif. A - inicial	37	285424324	2693552738	-5020000000	9174000000,0	35000000,0
Dif. B - inicial	37	49486486,5	2318340189	-4830000000	10570000000,0	3800000,0

T28D.- MEDIA LG S.SANGUIS (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
LGSSANG_ME_1	37	8,67	,60	7,08	9,79	8,68
LGSSANG_ME_A	37	8,67	,66	7,40	10,00	8,72
LGSSANG_ME_B	37	8,65	,61	7,46	10,08	8,71
Dif. A - inicial	37	,00	,69	-1,17	1,75	,07
Dif. B - inicial	37	-,03	,64	-1,12	1,65	,02

T29.- MEDIA CFU STREPTOCOCCUS MUTANS (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	4	30927,5	20548,2	1610,0	46600,0	37750,0
COLUT. A	3	34426,7	38921,5	6580,0	78900,0	17800,0
COLUT. B	4	174047,5	283694,7	4290,0	597000,0	47450,0
Dif. A - inicial	2	3250,0	41082,9	-25800,0	32300,0	3250,0
Dif. B - inicial	2	255545,0	421230,6	-42310,0	553400,0	255545,0

T29D.- MEDIA LG S.MUTANS (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
LGSMUTA_ME_1	4	4,25	,70	3,21	4,67	4,57
LGSMUTA_ME_A	3	4,32	,54	3,82	4,90	4,25
LGSMUTA_ME_B	4	4,64	,91	3,63	5,78	4,57
Dif. A - inicial	2	-,08	,44	-,39	,23	-,08
Dif. B - inicial	2	,05	1,54	-1,04	1,14	,05

T29B.- DESV.EST. CFU EUBACTERIUM (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	18	357520,9	1249806,4	3040,0	5320000,0	13830,0
COLUT. A	17	215724,2	410322,6	501,0	1514375,6	20011,1
COLUT. B	17	219411,5	346774,6	810,0	1100000,0	47700,0

T30.- DESV.EST. CFU C.MATRUCHOTTI (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	2659051,1	10018586,2	1740,0	60900000,0	296000,0
COLUT. A	37	1783490,2	2508038,4	379,0	7670000,0	551000,0
COLUT. B	35	2560029,7	6363817,8	1340,0	35300000,0	481000,0

T31.- DESV.EST. CFU VEILLONELLA PARVULA (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	3551267,6	6540802,5	22000,0	38800000,0	1530000,0
COLUT. A	37	4380188,4	12034945,1	9470,0	73600000,0	1450000,0
COLUT. B	37	2492121,6	2619251,0	26900,0	8760000,0	1400000,0

T32.- DESV.EST. CFU STREPTOCOCCUS SALIVARIUS (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	9	844825,6	1416714,0	4090,0	4540000,0	457000,0
COLUT. A	8	382796,3	282646,0	7400,0	852000,0	435000,0
COLUT. B	13	497238,5	869255,8	24300,0	3280000,0	248000,0

T33.- DESV.EST. CFU STREPTOCOCCUS SANGUIS (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	37	124089459	219166220,4	1130000,0	920000000,0	44000000,0
COLUT. A	37	147089189	240582540,8	1100000,0	892000000,0	62800000,0
COLUT. B	37	123669189	225325597,3	1240000,0	1100000000,0	43600000,0

T34.- DESV.EST. CFU STREPTOCOCCUS MUTANS (Base: Casos con positividad qPCR)

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Mediana
INICIAL	4	4801,8	3033,6	357,0	7180,0	5835,0
COLUT. A	3	5185,0	4532,6	635,0	9700,0	5220,0
COLUT. B	4	19075,3	28927,1	711,0	62200,0	6695,0

T35.- PICOR

		N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	No	37	100,0%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	No	36	97,3%
	Sí	1	2,7%

T35B.- PICOR B según PICOR A

		COLUT. A			
		Total		No	
		N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	37	100,0%
	No	36	97,3%	36	97,3%
	Sí	1	2,7%	1	2,7%

T36.- ESCOZOR

		N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	No	37	100,0%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	No	35	94,6%
	Sí	2	5,4%

T36B.- ESCOZOR B según ESCOZOR A

		COLUT. A			
		Total		No	
		N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	37	100,0%
	No	35	94,6%	35	94,6%
	Sí	2	5,4%	2	5,4%

T37.- ARDOR

		N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	No	35	94,6%
	Sí	2	5,4%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	No	36	97,3%
	Sí	1	2,7%

T37B.- ARDOR B según ARDOR A

		COLUT. A					
		Total		No		Sí	
		N	%	N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	35	94,6%	2	5,4%
	No	36	97,3%	35	94,6%	1	2,7%
	Sí	1	2,7%	0	,0%	1	2,7%

T38.- IRRITACIÓN

		N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	No	36	97,3%
	Sí	1	2,7%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	No	37	100,0%

T38B.- IRRITACIÓN B según IRRITACIÓN A

		COLUT. A					
		Total		No		Sí	
		N	%	N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	36	97,3%	1	2,7%
	No	37	100,0%	36	97,3%	1	2,7%

T39.- LESIÓN

		N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	No	36	97,3%
	Sí	1	2,7%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	No	33	89,2%
	Sí	4	10,8%

T39B.- LESIÓN B según LESIÓN A

		COLUT. A					
		Total		No		Sí	
		N	%	N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	36	97,3%	1	2,7%
	No	33	89,2%	32	86,5%	1	2,7%
	Sí	4	10,8%	4	10,8%	0	,0%

T40.- TINCIÓN

		N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	No	35	94,6%
	Sí	2	5,4%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	No	37	100,0%

T40B.- TINCIÓN B según TINCIÓN A

		COLUT. A					
		Total		No		Sí	
		N	%	N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	35	94,6%	2	5,4%
	No	37	100,0%	35	94,6%	2	5,4%

T41.- SABOR AGRADABLE

		N	%
COLUT. A	Total	37	100,0%
	No	6	16,2%
	Sí	31	83,8%
COLUT. B	Total	37	100,0%
	No	5	13,5%
	Sí	32	86,5%

T41B.- SABOR B según SABOR A

		COLUT. A					
		Total		No		Sí	
		N	%	N	%	N	%
COLUT. B	Total	37	100,0%	6	16,2%	31	83,8%
	No	5	13,5%	3	8,1%	2	5,4%
	Sí	32	86,5%	3	8,1%	29	78,4%

TABLAS ADICIONALES DE PARÁMETROS DE CÁLCULO SEGÚN TRONERAS, DIASTEMAS, APIÑAMIENTO Y TABAQUISMO

T15B.- ÍNDICE VOLPE-MANHOLD según TRONERAS

		troneras		
		Total	No	Sí
INICIAL	N	37	16	21
	Media	19,70	18,43	20,67
	Desviación típica	9,62	10,41	9,12
	Mínimo	4,50	4,50	10,00
	Máximo	41,50	33,00	41,50
	Mediana	18,00	18,50	18,00
COLUT. A	N	37	16	21
	Media	13,72	13,25	14,07
	Desviación típica	7,10	7,81	6,69
	Mínimo	1,00	1,00	3,50
	Máximo	29,00	28,00	29,00
	Mediana	12,50	13,00	12,50
COLUT. B	N	37	16	21
	Media	11,07	9,69	12,12
	Desviación típica	6,52	6,37	6,59
	Mínimo	,50	,50	3,00
	Máximo	30,50	20,00	30,50
	Mediana	10,00	8,75	10,50
Dif. A - inicial	N	37	16	21
	Media	-5,98	-5,18	-6,60
	Desviación típica	4,97	4,15	5,53
	Mínimo	-16,50	-14,00	-16,50
	Máximo	2,50	2,50	2,00
	Mediana	-5,50	-4,75	-7,50
Dif. B - inicial	N	37	16	21
	Media	-8,63	-8,74	-8,55
	Desviación típica	6,92	7,75	6,41
	Mínimo	-27,50	-22,00	-27,50
	Máximo	2,60	2,60	-,50
	Mediana	-6,50	-6,50	-7,00

T15C.- ÍNDICE VOLPE-MANHOLD según DIASTEMAS

		diastemas		
		Total	No	Sí
INICIAL	N	37	31	6
	Media	19,70	19,95	18,42
	Desviación típica	9,62	9,60	10,58
	Mínimo	4,50	4,50	4,50
	Máximo	41,50	41,50	31,50
	Mediana	18,00	18,00	16,75
COLUT. A	N	37	31	6
	Media	13,72	14,42	10,08
	Desviación típica	7,10	7,14	6,20
	Mínimo	1,00	2,50	1,00
	Máximo	29,00	29,00	18,50
	Mediana	12,50	14,00	9,50
COLUT. B	N	37	31	6
	Media	11,07	11,39	9,42
	Desviación típica	6,52	6,55	6,70
	Mínimo	,50	1,00	,50
	Máximo	30,50	30,50	19,00
	Mediana	10,00	10,00	7,50
Dif. A - inicial	N	37	31	6
	Media	-5,98	-5,53	-8,33
	Desviación típica	4,97	4,91	4,99
	Mínimo	-16,50	-15,50	-16,50
	Máximo	2,50	2,50	-3,50
	Mediana	-5,50	-5,50	-7,75
Dif. B - inicial	N	37	31	6
	Media	-8,63	-8,56	-9,00
	Desviación típica	6,92	7,01	7,09
	Mínimo	-27,50	-27,50	-22,00
	Máximo	2,60	2,60	-4,00
	Mediana	-6,50	-7,00	-5,50

T15D.- ÍNDICE VOLPE-MANHOLD según APIÑAMIENTO

		apiñamiento		
		Total	No	Sí
INICIAL	N	37	14	23
	Media	19,70	18,14	20,65
	Desviación típica	9,62	10,35	9,26
	Mínimo	4,50	4,50	7,50
	Máximo	41,50	33,00	41,50
	Mediana	18,00	17,25	20,00
COLUT. A	N	37	14	23
	Media	13,72	11,50	15,07
	Desviación típica	7,10	6,42	7,30
	Mínimo	1,00	1,00	3,50
	Máximo	29,00	24,50	29,00
	Mediana	12,50	10,75	14,00
COLUT. B	N	37	14	23
	Media	11,07	11,36	10,89
	Desviación típica	6,52	8,24	5,42
	Mínimo	,50	,50	1,00
	Máximo	30,50	30,50	20,00
	Mediana	10,00	8,75	10,00
Dif. A - inicial	N	37	14	23
	Media	-5,98	-6,64	-5,58
	Desviación típica	4,97	5,04	4,99
	Mínimo	-16,50	-16,50	-15,50
	Máximo	2,50	2,50	2,00
	Mediana	-5,50	-6,50	-5,50
Dif. B - inicial	N	37	14	23
	Media	-8,63	-6,79	-9,76
	Desviación típica	6,92	6,12	7,26
	Mínimo	-27,50	-22,00	-27,50
	Máximo	2,60	-,50	2,60
	Mediana	-6,50	-5,00	-8,00

T15E.- ÍNDICE VOLPE-MANHOLD según FUMADOR

		TABAQUISMO		
		Total	No fumador	Fumador
INICIAL	N	37	22	15
	Media	19,70	17,93	22,30
	Desviación típica	9,62	9,04	10,17
	Mínimo	4,50	4,50	10,00
	Máximo	41,50	33,00	41,50
	Mediana	18,00	17,75	21,50
COLUT. A	N	37	22	15
	Media	13,72	12,18	15,97
	Desviación típica	7,10	6,03	8,13
	Mínimo	1,00	1,00	3,50
	Máximo	29,00	28,00	29,00
	Mediana	12,50	11,75	17,50
COLUT. B	N	37	22	15
	Media	11,07	10,86	11,37
	Desviación típica	6,52	7,37	5,27
	Mínimo	,50	,50	3,00
	Máximo	30,50	30,50	20,00
	Mediana	10,00	9,25	10,00
Dif. A - inicial	N	37	22	15
	Media	-5,98	-5,75	-6,33
	Desviación típica	4,97	5,16	4,82
	Mínimo	-16,50	-16,50	-15,50
	Máximo	2,50	2,50	1,50
	Mediana	-5,50	-4,75	-7,50
Dif. B - inicial	N	37	22	15
	Media	-8,63	-7,06	-10,93
	Desviación típica	6,92	6,05	7,67
	Mínimo	-27,50	-21,00	-27,50
	Máximo	2,60	2,60	-,50
	Mediana	-6,50	-5,50	-8,00

T15F.- ÍNDICE VOLPE-MANHOLD según FUMADOR

		FUMA			
		Total	No fumador	Fumador hasta 10 cig/día	Fumador más de 10 cig/día
INICIAL	N	37	22	7	8
	Media	19,70	17,93	19,50	24,75
	Desviación típica	9,62	9,04	8,84	11,18
	Mínimo	4,50	4,50	10,00	11,00
	Máximo	41,50	33,00	32,50	41,50
	Mediana	18,00	17,75	16,00	24,00
COLUT. A	N	37	22	7	8
	Media	13,72	12,18	15,43	16,44
	Desviación típica	7,10	6,03	7,75	8,95
	Mínimo	1,00	1,00	4,50	3,50
	Máximo	29,00	28,00	24,50	29,00
	Mediana	12,50	11,75	17,50	17,75
COLUT. B	N	37	22	7	8
	Media	11,07	10,86	8,71	13,69
	Desviación típica	6,52	7,37	4,39	5,08
	Mínimo	,50	,50	3,00	7,00
	Máximo	30,50	30,50	16,00	20,00
	Mediana	10,00	9,25	8,00	12,25
Dif. A - inicial	N	37	22	7	8
	Media	-5,98	-5,75	-4,07	-8,31
	Desviación típica	4,97	5,16	4,49	4,42
	Mínimo	-16,50	-16,50	-10,50	-15,50
	Máximo	2,50	2,50	1,50	-2,00
	Mediana	-5,50	-4,75	-5,50	-7,75
Dif. B - inicial	N	37	22	7	8
	Media	-8,63	-7,06	-10,79	-11,06
	Desviación típica	6,92	6,05	6,25	9,17
	Mínimo	-27,50	-21,00	-22,00	-27,50
	Máximo	2,60	2,60	-4,50	-,50
	Mediana	-6,50	-5,50	-8,00	-9,75

T16B.- PESO según TRONERAS

		troneras		
		Total	No	Sí
INICIAL	N	37	16	21
	Media	21,90	20,43	23,02
	Desviación típica	13,19	12,81	13,67
	Mínimo	1,30	1,30	2,50
	Máximo	56,70	38,60	56,70
	Mediana	19,10	19,85	19,10
COLUT. A	N	37	16	21
	Media	15,10	14,12	15,85
	Desviación típica	10,67	12,02	9,76
	Mínimo	,20	,20	3,40
	Máximo	42,40	42,40	35,10
	Mediana	11,70	10,50	13,90
COLUT. B	N	37	16	21
	Media	10,84	8,24	12,81
	Desviación típica	9,57	7,12	10,83
	Mínimo	,10	,10	,90
	Máximo	38,50	26,10	38,50
	Mediana	8,10	7,75	8,20
Dif. A - inicial	N	37	16	21
	Media	-6,80	-6,31	-7,18
	Desviación típica	9,22	8,71	9,78
	Mínimo	-35,60	-25,20	-35,60
	Máximo	12,30	11,00	12,30
	Mediana	-7,30	-4,95	-7,40
Dif. B - inicial	N	37	16	21
	Media	-11,06	-12,18	-10,21
	Desviación típica	10,35	9,93	10,82
	Mínimo	-34,70	-31,00	-34,70
	Máximo	2,40	-,50	2,40
	Mediana	-8,10	-8,05	-8,10

T16C.- PESO según DIASTEMAS

		diastemas		
		Total	No	Sí
INICIAL	N	37	31	6
	Media	21,90	21,65	23,22
	Desviación típica	13,19	11,75	20,51
	Mínimo	1,30	1,30	2,50
	Máximo	56,70	43,00	56,70
	Mediana	19,10	19,10	21,80
COLUT. A	N	37	31	6
	Media	15,10	15,71	11,93
	Desviación típica	10,67	10,73	10,72
	Mínimo	,20	1,60	,20
	Máximo	42,40	42,40	28,50
	Mediana	11,70	13,10	8,55
COLUT. B	N	37	31	6
	Media	10,84	11,43	7,78
	Desviación típica	9,57	9,90	7,59
	Mínimo	,10	,20	,10
	Máximo	38,50	38,50	22,00
	Mediana	8,10	8,20	6,20
Dif. A - inicial	N	37	31	6
	Media	-6,80	-5,93	-11,28
	Desviación típica	9,22	8,19	13,45
	Mínimo	-35,60	-25,20	-35,60
	Máximo	12,30	12,30	2,20
	Mediana	-7,30	-7,30	-7,95
Dif. B - inicial	N	37	31	6
	Media	-11,06	-10,22	-15,43
	Desviación típica	10,35	9,63	13,66
	Mínimo	-34,70	-31,30	-34,70
	Máximo	2,40	2,40	1,80
	Mediana	-8,10	-7,90	-15,75

T16D.- PESO según APIÑAMIENTO

		apiñamiento		
		Total	No	Sí
INICIAL	N	37	14	23
	Media	21,90	21,07	22,40
	Desviación típica	13,19	16,89	10,73
	Mínimo	1,30	1,30	8,10
	Máximo	56,70	56,70	43,00
	Mediana	19,10	18,60	21,60
COLUT. A	N	37	14	23
	Media	15,10	12,89	16,44
	Desviación típica	10,67	10,17	10,97
	Mínimo	,20	,20	3,20
	Máximo	42,40	31,20	42,40
	Mediana	11,70	10,45	13,90
COLUT. B	N	37	14	23
	Media	10,84	10,21	11,22
	Desviación típica	9,57	10,33	9,29
	Mínimo	,10	,10	,20
	Máximo	38,50	38,50	29,40
	Mediana	8,10	8,05	8,20
Dif. A - inicial	N	37	14	23
	Media	-6,80	-8,18	-5,96
	Desviación típica	9,22	10,08	8,78
	Mínimo	-35,60	-35,60	-25,20
	Máximo	12,30	2,20	12,30
	Mediana	-7,30	-6,25	-7,30
Dif. B - inicial	N	37	14	23
	Media	-11,06	-10,86	-11,18
	Desviación típica	10,35	11,45	9,88
	Mínimo	-34,70	-34,70	-31,30
	Máximo	2,40	1,80	2,40
	Mediana	-8,10	-7,20	-8,10

T16E.- PESO según FUMADOR

		TABAQUISMO		
		Total	No fumador	Fumador
INICIAL	N	37	22	15
	Media	21,90	20,06	24,60
	Desviación típica	13,19	13,84	12,12
	Mínimo	1,30	1,30	9,50
	Máximo	56,70	56,70	43,00
	Mediana	19,10	17,25	27,00
COLUT. A	N	37	22	15
	Media	15,10	13,25	17,81
	Desviación típica	10,67	10,36	10,88
	Mínimo	,20	,20	3,40
	Máximo	42,40	42,40	35,10
	Mediana	11,70	10,65	16,90
COLUT. B	N	37	22	15
	Media	10,84	10,05	11,99
	Desviación típica	9,57	10,17	8,83
	Mínimo	,10	,10	,90
	Máximo	38,50	38,50	29,40
	Mediana	8,10	7,75	9,20
Dif. A - inicial	N	37	22	15
	Media	-6,80	-6,80	-6,79
	Desviación típica	9,22	10,95	6,21
	Mínimo	-35,60	-35,60	-17,40
	Máximo	12,30	12,30	4,70
	Mediana	-7,30	-6,10	-7,30
Dif. B - inicial	N	37	22	15
	Media	-11,06	-10,01	-12,61
	Desviación típica	10,35	10,67	10,01
	Mínimo	-34,70	-34,70	-31,30
	Máximo	2,40	2,00	2,40
	Mediana	-8,10	-7,60	-10,80

T16F.- PESO según FUMADOR

		FUMA			
		Total	No fumador	Fumador hasta 10 cig/día	Fumador más de 10 cig/día
INICIAL	N	37	22	7	8
	Media	21,90	20,06	22,00	26,88
	Desviación típica	13,19	13,84	11,09	13,26
	Mínimo	1,30	1,30	11,70	9,50
	Máximo	56,70	56,70	38,60	43,00
	Mediana	19,10	17,25	18,10	29,55
COLUT. A	N	37	22	7	8
	Media	15,10	13,25	17,60	17,99
	Desviación típica	10,67	10,36	9,62	12,55
	Mínimo	,20	,20	3,40	4,90
	Máximo	42,40	42,40	28,50	35,10
	Mediana	11,70	10,65	16,90	17,35
COLUT. B	N	37	22	7	8
	Media	10,84	10,05	9,41	14,25
	Desviación típica	9,57	10,17	9,37	8,27
	Mínimo	,10	,10	,90	6,20
	Máximo	38,50	38,50	29,40	28,80
	Mediana	8,10	7,75	7,40	9,75
Dif. A - inicial	N	37	22	7	8
	Media	-6,80	-6,80	-4,40	-8,89
	Desviación típica	9,22	10,95	6,59	5,40
	Mínimo	-35,60	-35,60	-11,40	-17,40
	Máximo	12,30	12,30	4,70	-1,40
	Mediana	-7,30	-6,10	-5,10	-8,35
Dif. B - inicial	N	37	22	7	8
	Media	-11,06	-10,01	-12,59	-12,63
	Desviación típica	10,35	10,67	10,86	9,96
	Mínimo	-34,70	-34,70	-27,80	-31,30
	Máximo	2,40	2,00	2,40	,10
	Mediana	-8,10	-7,60	-10,80	-11,00

T17B.- VOLUMEN según TRONERAS

		troneras		
		Total	No	Sí
INICIAL	N	37	16	21
	Media	21,86	19,37	23,76
	Desviación típica	12,26	12,34	12,16
	Mínimo	2,30	2,30	9,30
	Máximo	49,00	36,30	49,00
	Mediana	20,60	17,55	22,60
COLUT. A	N	37	16	21
	Media	14,19	13,56	14,67
	Desviación típica	9,69	11,39	8,44
	Mínimo	,40	,40	1,05
	Máximo	40,20	40,20	30,90
	Mediana	12,30	10,95	14,20
COLUT. B	N	37	16	21
	Media	14,35	9,89	17,75
	Desviación típica	14,93	7,99	18,03
	Mínimo	,10	,10	1,80
	Máximo	86,00	27,10	86,00
	Mediana	9,90	8,95	11,40
Dif. A - inicial	N	37	16	21
	Media	-7,67	-5,81	-9,09
	Desviación típica	10,40	7,83	11,99
	Mínimo	-47,95	-22,10	-47,95
	Máximo	9,20	8,90	9,20
	Mediana	-6,83	-4,70	-8,10
Dif. B - inicial	N	37	16	21
	Media	-7,51	-9,48	-6,01
	Desviación típica	17,52	10,47	21,56
	Mínimo	-41,40	-28,70	-41,40
	Máximo	73,80	1,70	73,80
	Mediana	-7,10	-5,65	-8,50

T17C.- VOLUMEN según DIASTEMAS

		diastemas		
		Total	No	Sí
INICIAL	N	37	31	6
	Media	21,86	20,95	26,58
	Desviación típica	12,26	11,36	16,65
	Mínimo	2,30	2,30	2,70
	Máximo	49,00	42,30	49,00
	Mediana	20,60	20,50	28,00
COLUT. A	N	37	31	6
	Media	14,19	15,15	9,21
	Desviación típica	9,69	9,87	7,52
	Mínimo	,40	,47	,40
	Máximo	40,20	40,20	18,40
	Mediana	12,30	12,70	9,50
COLUT. B	N	37	31	6
	Media	14,35	15,29	9,50
	Desviación típica	14,93	15,72	9,40
	Mínimo	,10	,20	,10
	Máximo	86,00	86,00	25,80
	Mediana	9,90	11,20	7,25
Dif. A - inicial	N	37	31	6
	Media	-7,67	-5,79	-17,38
	Desviación típica	10,40	7,96	16,23
	Mínimo	-47,95	-22,10	-47,95
	Máximo	9,20	9,20	-2,30
	Mediana	-6,83	-6,80	-14,55
Dif. B - inicial	N	37	31	6
	Media	-7,51	-5,66	-17,08
	Desviación típica	17,52	17,69	14,18
	Mínimo	-41,40	-28,70	-41,40
	Máximo	73,80	73,80	-2,60
	Mediana	-7,10	-4,20	-11,90

T17D.- VOLUMEN según APIÑAMIENTO

		apiñamiento		
		Total	No	Sí
INICIAL	N	37	14	23
	Media	21,86	21,94	21,81
	Desviación típica	12,26	15,16	10,50
	Mínimo	2,30	2,30	7,30
	Máximo	49,00	49,00	42,30
	Mediana	20,60	20,65	20,60
COLUT. A	N	37	14	23
	Media	14,19	11,81	15,64
	Desviación típica	9,69	8,98	10,01
	Mínimo	,40	,40	,47
	Máximo	40,20	30,90	40,20
	Mediana	12,30	9,95	14,20
COLUT. B	N	37	14	23
	Media	14,35	12,56	15,44
	Desviación típica	14,93	10,61	17,17
	Mínimo	,10	,10	,20
	Máximo	86,00	36,60	86,00
	Mediana	9,90	9,35	11,20
Dif. A - inicial	N	37	14	23
	Media	-7,67	-10,13	-6,17
	Desviación típica	10,40	12,79	8,61
	Mínimo	-47,95	-47,95	-22,10
	Máximo	9,20	2,90	9,20
	Mediana	-6,83	-8,45	-6,80
Dif. B - inicial	N	37	14	23
	Media	-7,51	-9,39	-6,37
	Desviación típica	17,52	12,90	20,01
	Mínimo	-41,40	-41,40	-28,70
	Máximo	73,80	3,00	73,80
	Mediana	-7,10	-2,95	-8,50

T17E.- VOLUMEN según FUMADOR

		TABAQUISMO		
		Total	No fumador	Fumador
INICIAL	N	37	22	15
	Media	21,86	20,86	23,33
	Desviación típica	12,26	12,65	11,95
	Mínimo	2,30	2,30	9,30
	Máximo	49,00	49,00	42,30
	Mediana	20,60	20,55	24,90
COLUT. A	N	37	22	15
	Media	14,19	13,42	15,31
	Desviación típica	9,69	10,70	8,22
	Mínimo	,40	,40	4,10
	Máximo	40,20	40,20	28,70
	Mediana	12,30	10,15	15,60
COLUT. B	N	37	22	15
	Media	14,35	12,23	17,46
	Desviación típica	14,93	10,10	20,06
	Mínimo	,10	,10	2,20
	Máximo	86,00	36,60	86,00
	Mediana	9,90	9,10	11,40
Dif. A - inicial	N	37	22	15
	Media	-7,67	-7,44	-8,01
	Desviación típica	10,40	12,11	7,61
	Mínimo	-47,95	-47,95	-21,20
	Máximo	9,20	9,20	3,50
	Mediana	-6,83	-7,47	-6,80
Dif. B - inicial	N	37	22	15
	Media	-7,51	-8,63	-5,87
	Desviación típica	17,52	11,81	23,98
	Mínimo	-41,40	-41,40	-28,00
	Máximo	73,80	8,80	73,80
	Mediana	-7,10	-5,65	-10,60

T17F.- VOLUMEN según FUMADOR

		FUMA			
		Total	No fumador	Fumador hasta 10 cig/día	Fumador más de 10 cig/día
INICIAL	N	37	22	7	8
	Media	21,86	20,86	20,79	25,55
	Desviación típica	12,26	12,65	10,77	13,19
	Mínimo	2,30	2,30	11,30	9,30
	Máximo	49,00	49,00	36,30	42,30
	Mediana	20,60	20,55	14,50	26,95
COLUT. A	N	37	22	7	8
	Media	14,19	13,42	15,93	14,78
	Desviación típica	9,69	10,70	8,86	8,20
	Mínimo	,40	,40	4,10	6,10
	Máximo	40,20	40,20	28,70	26,00
	Mediana	12,30	10,15	15,60	14,95
COLUT. B	N	37	22	7	8
	Media	14,35	12,23	18,86	16,24
	Desviación típica	14,93	10,10	29,81	6,31
	Mínimo	,10	,10	2,20	8,80
	Máximo	86,00	36,60	86,00	23,70
	Mediana	9,90	9,10	9,20	15,45
Dif. A - inicial	N	37	22	7	8
	Media	-7,67	-7,44	-4,86	-10,78
	Desviación típica	10,40	12,11	7,32	7,15
	Mínimo	-47,95	-47,95	-16,50	-21,20
	Máximo	9,20	9,20	3,50	-3,00
	Mediana	-6,83	-7,47	-6,00	-9,80
Dif. B - inicial	N	37	22	7	8
	Media	-7,51	-8,63	-1,93	-9,31
	Desviación típica	17,52	11,81	34,46	10,17
	Mínimo	-41,40	-41,40	-26,00	-28,00
	Máximo	73,80	8,80	73,80	-,50
	Mediana	-7,10	-5,65	-12,30	-6,20