

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EFFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DEL DIÓXIDO DE CLORO Y SUS  
PREPARACIONES EN BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

Por

NATALIA SAAVEDRA ALCALÁ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Periodoncia con Implantología Oral

Diciembre, 2022

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Periodoncia con Implantología Oral

EFFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DEL DIÓXIDO DE CLORO Y SUS  
PREPARACIONES EN BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

---

Natalia Saavedra Alcalá  
TESISTA

**COMITÉ DE TESIS**

---

Dra. Gloria Martínez Sandoval  
DIRECTOR DE TESIS

---

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos  
CO-DIRECTOR DE TESIS

---

Dra. Brenda Ruth Garza Salinas  
ASESOR METODOLÓGICO

Aprobación de Tesis de Maestría por Comité Académico

EFFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DEL DIÓXIDO DE CLORO Y SUS  
PREPARACIONES EN BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

**COMITÉ ACADÉMICO**

---

Presidente

---

Secretario

---

Vocal

## **DEDICATORIA**

**A Dios y a todos aquellos que me apoyaron para hacer esto realidad, gracias.**

## AGRADECIMIENTOS

A **DIOS**, por permitirme llegar a este momento tan importante en mi vida y guiarme en el trayecto.

A **mis padres**, por darme la oportunidad de estudiar este posgrado y siempre creer en mí.

A **mi abuelo**, por haber sido tan brillante, nunca dejar la investigación y ser mi fuente de inspiración.

A **mi esposo**, por siempre estar presente en mis momentos más difíciles, ayudarme a superar cada obstáculo y siempre motivarme para dar lo mejor de mí.

A la **Dra. Gloria Martínez Sandoval**, por su interés, recomendaciones y apoyo en este estudio.

A la **Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos**, por haber hecho este estudio posible con su gran apoyo en la metodología.

A la **Dra. Brenda Ruth Garza Salinas**, por alegrarme el día con su buen sentido del humor y por su asesoramiento en esta tesis.

Al **Dr. Gustavo Martínez González**, por todo el apoyo y paciencia durante la elaboración de la fase estadística y la redacción de resultados.

Al **Dr. Jesús Rodríguez Pulido**, por guiarme en cada paso para la redacción de este escrito, por siempre resolver mis dudas y estar al pendiente.

Al **Dr. César Iván Romo Sáenz** por ayudarme y guiarme durante toda la elaboración y redacción de esta tesis.

A la **Dra. Jessica Maria Ramirez Villalobos** por el apoyo durante la elaboración de la fase estadística.

A **CONACYT**, por la beca y el apoyo otorgado, por ayudarme a cumplir una de mis metas.

A mis compañeros de generación: **Karen, Alejandra, Daniela, Sofía, Tabatha, Daniel y Fabián** por hacer tan buen equipo.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS .....	iv
LISTA DE TABLAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
NOMENCLATURA.....	x
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xii
INTRODUCCIÓN .....	1
1. HIPÓTESIS .....	3
2. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos específicos .....	4
3. ANTECEDENTES .....	5
4.1 Salud periodontal .....	6
4.2 Gingivitis .....	7
4.3 Periodontitis.....	8
4.4 Microbiota oral .....	11
4.4.1 Etapas de la formación de la biopelícula.....	12
4.4.2 Complejos de Socransky y las bacterias periodontopatógenas .....	13
4.5 Higiene oral .....	16
4.5.1 Coadyuvantes en la higiene oral .....	17
4.5.2 Control químico de placa bacteriana.....	18
4.5.2.1 Clorhexidina .....	19
4.5.2.2 Triclosán.....	19
4.6 Dióxido de cloro .....	20
4.6.1 Ventajas del dióxido de cloro.....	21

4.6.2 Limitaciones y precauciones .....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
5.1 Diseño del estudio .....	26
5.2 Universo de estudio.....	26
5.3 Tamaño de la muestra .....	26
5.4 Descripción de procedimientos .....	26
5.4.1 Obtención del dióxido de cloro a diferentes concentraciones .....	27
5.4.1.1 Preparación del CDS a 3,000 ppm (0,3%) .....	28
5.4.2 Experimento 1: Prueba de citotoxicidad.....	29
5.4.2.1 Citotoxicidad en fibroblastos.....	29
5.4.2.2 Citotoxicidad en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC).....	32
5.4.2.3 Recolección de datos .....	35
5.4.3 Experimento 2: Prueba de halo de inhibición.....	35
5.4.3.1 Activación de las bacterias .....	35
5.4.3.2 Inoculación de las bacterias.....	36
5.4.3.3 Recolección de datos .....	44
5.4.4 Experimento 3: Prueba germicida .....	44
5.4.4.1 Preparación de soluciones .....	45
5.4.4.2 Preparación de las bacterias.....	47
5.4.4.3 Determinación de la cuenta viable inicial .....	47
5.5 Análisis estadístico.....	50
6. RESULTADOS .....	51
6.1 Prueba de viabilidad del ClO <sub>2</sub> y CDS en células sanas.....	51
6.2 Actividad antimicrobiana del ClO <sub>2</sub> y CDS. ....	54
6.3 Prueba germicida por UFC del CDS.....	57
7. DISCUSIÓN.....	61
8. CONCLUSIONES.....	66
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla I: Efecto citotóxico del CDS y ClO <sub>2</sub> en células humanas.....	52
Tabla II: Efecto citotóxico del CDS y ClO <sub>2</sub> en FGH.....	53
Tabla III: Efecto antibacteriano de ClO <sub>2</sub> en bacterias periodontopatógenas. A) Evaluación 24 h. B) Evaluación 72 h. ....	55
Tabla IV: Efecto antimicrobiano del CDS en bacterias periodontopatógenas. ....	60

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1: Transición de gingivitis a periodontitis. Obtenido de Chapple, 2019. ....	9
Figura 2: Clasificación de periodontitis por estadios. Obtenido de Herrera et al., 2018. ....	10
Figura 3: Clasificación de periodontitis por grados, basada en evidencia directa, evidencia indirecta y factores modificadores. Obtenido de Herrera et al., 2018. ....	11
Figura 4: Representación esquemática de las relaciones de especies dentro de complejos microbianos y entre los complejos microbianos. Obtenido de Socransky y Haffajee, 2005. ....	15
Figura 5: Relaciones de coagregación con otras bacterias para los tres patógenos de asociación fuerte con la periodontitis. Obtenido de Iniesta et al., 2008. ....	16
Figura 6: Soluciones de clorito sódico (NaClO <sub>2</sub> al 25%) y ácido clorhídrico rebajado (HCl al 4%).....	27
Figura 7: Obtención del ClO <sub>2</sub> a diferentes concentraciones .....	27
Figura 8: CDS a 3,000 ppm .....	29
Figura 9: Subcultivo de fibroblastos gingivales .....	31
Figura 10: Tratamientos CDS y ClO <sub>2</sub> .....	31
Figura 11: Plaqueo de células con tratamientos.....	32
Figura 12: Medio en gradiente de densidad Ficoll-Paque para aislamiento de células mononucleares .....	33
Figura 13: Sangre centrifugada.....	33
Figura 14: Células mononucleares de sangre periférica .....	34
Figura 15: Espectrofotómetro iMark Microplate Reader.....	35
Figura 16: Activación de bacterias <i>P. gingivalis</i> , <i>F. nucleatum</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	36
Figura 17: Trypticaseína de soya.....	37
Figura 18: Preparación de placas de petri con tripticaseína de soya .....	37
Figura 19: Bacteria <i>F. nucleatum</i> activada .....	38

Figura 20: Método de difusión de agar.....	38
Figura 21: Bacteria <i>P. gingivalis</i> activada .....	39
Figura 22: Cámara de anaerobiosis.....	39
Figura 23: Método de difusión en agar de <i>A. actinomycetemcomitans</i> en la cámara de anaerobiosis .....	40
Figura 24: Concentraciones de ClO <sub>2</sub> al 100%, 50% y 0.10%.....	41
Figura 25: Imagen ilustrativa de prueba de halo de inhibición.....	42
Figura 26: División y marcaje de cajas petri .....	43
Figura 27: Cultivos de bacterias en las cajas petri con sus respectivos discos embebidos .....	43
Figura 28: Incubadora (Thermo scientific INC-UOIE-01).....	44
Figura 29: Solución amortiguadora de fosfatos.....	45
Figura 30: Solución neutralizante .....	46
Figura 31: Mezcla para incorporación del inóculo .....	49
Figura 32: Imagen ilustrativa del procedimiento de la prueba germicida .....	50
Figura 33: Placa de 96 pozos con tratamientos de ClO <sub>2</sub> de menor a mayor concentración en células PBMC. Filas 11 y 12 controles negativos.....	52
Figura 34: Placa de 96 pozos con tratamientos de ClO <sub>2</sub> (filas A – D) y CDS (filas E – H) de mayor a menor concentración en FGH. ....	54
Figura 35: Halos de inhibición de <i>P. gingivalis</i> a las 24 h.....	55
Figura 36: Halos de inhibición de <i>F. nucleatum</i> a las 24 h.....	55
Figura 37: Halos de inhibición de <i>A. actinomycetemcomitans</i> a las 24 h.....	56
Figura 38: Halos de co-cultivo a las 24 h .....	56
Figura 39: Halos de inhibición de co-cultivo a las 72 h .....	56
Figura 40: Halos de inhibición de <i>P. gingivalis</i> a las 72 h.....	56
Figura 41: Halos de inhibición de <i>A. actinomycetemcomitans</i> a las 72 h.....	57
Figura 42: Conteo de UFC de <i>P. gingivalis</i> .....	57
Figura 43: Conteo de UFC de <i>F. nucleatum</i> .....	58
Figura 44: Conteo de UFC de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	58
Figura 45: Conteo de UFC de co-cultivo.....	59

## NOMENCLATURA

AAP	Academia Americana de Periodontología
CAL	Pérdida de inserción clínica Por siglas en inglés: Clinical Attachment Loss
CDS	Solución de dióxido de cloro
CHX	Clorhexidina
ClO <sub>2</sub>	Dióxido de cloro
CVS	Compuestos Volátiles de Sulfuro
EPA	Agencia de Protección Ambiental Por sus siglas en inglés: Environmental Protection Agency
FDI	Federación Dental Internacional
FGH	Fibroblastos Gingivales Humanos
HeLa	Célula de cáncer de cervix
µm	Micrómetros
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MM	Milímetro
MTT	(- [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)
TSA	Trypticaseína de soya
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSHA	Administración de Salud y Seguridad Ocupacional Por sus siglas en inglés: Occupational Security Health Administration
PBMC	Célula Mononuclear de Sangre Periférica Por sus siglas en inglés: Peripheral Blood Mononuclear Cell
ppm	Partículas por millón
TCS	Triclosán
UFC	Unidades formadoras de colonia

**TESISTA: Natalia Saavedra Alcalá**  
**DIRECTOR DE TESIS: Gloria Martínez Sandoval**  
**CODIRECTOR DE TESIS: Myriam Angélica de la Garza Ramos**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

EFFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DEL DIÓXIDO DE CLORO Y SUS  
PREPARACIONES EN BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

**RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN:** Las bacterias periodontopatógenas son susceptibles a los agentes oxidantes por lo que se cree que el ClO<sub>2</sub> al ser un agente antimicrobiano selectivo podría ser de utilidad como coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal debido a sus propiedades biocidas, su baja toxicidad y su capacidad de no generar resistencia.

**OBJETIVO:** Evaluar el efecto bactericida del ClO<sub>2</sub> y sus preparaciones *in vitro* contra *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*.

**METODOLOGÍA:** Las soluciones de dióxido de cloro se prepararon en agua destilada y posteriormente fueron esterilizadas por filtración a 0.22 µm. Las bacterias *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* fueron activadas en medio TSA a 37°C en anaerobiosis o aerobiosis. Las bacterias fueron sembradas en placas de cultivo TSA y el ClO<sub>2</sub> y CDS a 100%, 50%, 0.10% empleando como control clorhexidina al 0.12% como control positivo y suero fisiológico como control negativo. El efecto citotóxico del ClO<sub>2</sub> y el CDS se determinó por la técnica colorimétrica MTT a 0.5 mg/mL en células PBMC y FGH empleando como control NaClO al 5% y como control negativo medio de cultivo.

**RESULTADOS:** El CDS demostró un porcentaje de viabilidad alto en FGH y PBMC en comparación con el ClO<sub>2</sub>, así como efecto bactericida *in vitro* en *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y co-cultivo en la prueba germicida.

**CONCLUSIÓN:** El ClO<sub>2</sub> y el CDS parece ser un agente antimicrobiano prometedor el cual podría ser utilizado como coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal y periimplantar así como el manejo de la halitosis.

**TESISTA: Natalia Saavedra Alcalá**  
**DIRECTOR DE TESIS: Gloria Martínez Sandoval**  
**CODIRECTOR DE TESIS: Myriam Angélica de la Garza Ramos**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

*IN VITRO* BACTERICIDE EFFECT OF CHLORINE DIOXIDE AND ITS  
PREPARATIONS ON PERIODONTOPATHOGENIC BACTERIA

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Periodontopathogenic bacteria are susceptible to oxidizing agents, so it is believed that ClO<sub>2</sub>, being a selective antimicrobial agent, could be useful as an adjuvant in the treatment of periodontal disease due to its biocidal properties, its low toxicity and its ability to generate resistance. **OBJECTIVE:** To evaluate the bactericidal effect of chlorine dioxide and its preparations against *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans*. **METHODOLOGY:** Chlorine dioxide solutions were prepared in distilled water and subsequently sterilized by filtration at 0.22 µm. Bacteria *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* were activated in TSA medium at 37 ° C in anaerobiosis or aerobiosis. Bacteria were seeded in TSA culture plates and ClO<sub>2</sub> and CDS at 100%, 50%, 0.10% using Chlorhexidine 0.12% as a positive control and physiological serum as a negative control. The cytotoxic effect of ClO<sub>2</sub> and CDS was determined by the MTT colorimetric technique at 0.5 mg / mL in PBMC and FGH cells, using 5% NaClO as control and culture medium as negative control. **RESULTS:** CDS showed a high percentage of viability in FGH and PBMC compared to ClO<sub>2</sub>, as well as *in vitro* bactericidal effect on *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* and co-culture in the germicidal test. **CONCLUSION:** ClO<sub>2</sub> and CDS seem to be a promising antimicrobial agent which could be used as an adjunct in the treatment of periodontal and peri-implant disease as well as the management of halitosis.

## INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad oral multifactorial que afecta los tejidos de soporte del diente y tiene una prevalencia de 78% en la población mayor de 60 años. La cavidad oral alberga una gran cantidad de especies bacterianas que producen varias sustancias fétidas como resultado de la degradación de las proteínas. La halitosis o mal aliento es causada el 87% de las veces por factores intraorales como la gingivitis, la periodontitis y el recubrimiento de la lengua y solamente el 5 al 8% es causada por factores extraorales.

La enfermedad periodontal es causada principalmente por la acumulación de placa bacteriana. La cual, al pasar el tiempo y no ser eliminada comienza a migrar subgingivalmente y crea un ambiente favorable para la coagregación de bacterias periodontopatógenas de los complejos rojo y naranja. Este acúmulo de bacterias estimula la respuesta inflamatoria de los tejidos periodontales y da como resultado inflamación gingival, sangrado, bolsas periodontales, pérdida ósea y movilidad dental, la cual se refleja como una pérdida de inserción clínica.

Las bacterias periodontopatógenas producen varios compuestos volátiles de sulfuro (CVS) que son responsables de halitosis y se asocian con patógenos periodontales como *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia* siendo de las bacterias más fuertemente asociadas con la periodontitis y también capaces de colonizar los nichos periodontales y permanecer en ellos.

Los controles químicos de placa se utilizan frecuentemente ya sea para la reducción de carga microbiana presente en la cavidad bucal o para controlar o reducir el mal aliento, según los ingredientes del enjuague bucal en particular. La clorhexidina es considerada como el antiséptico oral más eficaz. Sin embargo, su uso por tiempo prolongado se relaciona con efectos secundarios como: formación de manchas marrones extrínsecas en los dientes e inclusive en los tejidos bucales (particularmente en la lengua), acumulación de cálculo subgingival, lesiones mucosas, y percepción alterada del gusto.

Por lo cual diversos estudios se han enfocado en la búsqueda de nuevos tratamientos que reduzcan la carga bacteriana o contra la halitosis. El dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), ha demostrado resultados satisfactorios por su efecto bactericida, fungicida, antiviral, antiinflamatorio, así como la eliminación de esporas y biopelículas.

La capacidad oxidante del  $\text{ClO}_2$  y sus variaciones han demostrado presentar una capacidad reductora sobre CVS generando productos inoloros, que permiten incorporarse en diferentes preparaciones para el control de la halitosis, así como en la reducción de la placa dentobacteriana, aunado a que no se han presentado reportes a la fecha de microorganismos resistentes a este compuesto.

En base a lo anterior es que se llegó a la formulación de la siguiente pregunta: ¿Las concentraciones no citotóxicas de  $\text{ClO}_2$  en células humanas presentan un efecto bactericida *in vitro* sobre bacterias periodontopatógenas?.

Por lo tanto, el objetivo del trabajo es evaluar el efecto bactericida *in vitro* de la concentración no citotóxica de  $\text{ClO}_2$  sobre células humanas en bacterias periodontopatógenas.

## 1. HIPÓTESIS

Hi: El CDS tendrá menor citotoxicidad y un efecto bactericida *in vitro* en *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* homólogo al ClO<sub>2</sub> al 0.10%.

Ho: El CDS tendrá mayor citotoxicidad y un efecto bactericida *in vitro* en *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* homólogo al ClO<sub>2</sub> al 0.10%.

## 2. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto bactericida *in vitro* de la concentración no citotóxica de ClO<sub>2</sub> sobre células humanas en bacterias periodontopatógenas.

### 3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* del ClO<sub>2</sub> y CDS en células humanas.
2. Determinar el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro en *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*.
3. Determinar el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro en co-cultivos de *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*.

### 3. ANTECEDENTES

En el taller mundial realizado por la Academia Americana de Periodontología (AAP) en 2017 se propuso un nuevo esquema para la clasificación de enfermedades periodontales y peri-implantares y condiciones, necesaria para el correcto diagnóstico y tratamiento de los pacientes (Caton et al. 2018).

La nueva clasificación se divide principalmente en 2 apartados:

1. Enfermedades y condiciones periodontales
2. Enfermedades y condiciones peri-implantares

Así mismo, dentro de las enfermedades y condiciones periodontales se divide en 3 grupos con sus subgrupos:

1. Salud periodontal y enfermedades y condiciones gingivales
  - a) Salud periodontal y salud gingival
  - b) Gingivitis inducida por placa
  - c) Enfermedades gingivales no inducidas por placa
2. Periodontitis
  - a) Enfermedades periodontales necrotizantes
  - b) Periodontitis
  - c) Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas
3. Otras condiciones que afectan al periodonto
  - a) Enfermedades o condiciones sistémicas que afectan los tejidos de soporte
  - b) Abscesos y lesiones endo-periodontales
  - c) Condiciones y deformidades mucogingivales
  - d) Fuerzas oclusales traumáticas
  - e) Factores relacionados con los dientes o prótesis (Caton et al. 2018).

La principal diferencia con la clasificación de Armitage de 1999 es que se agregan las alteraciones y patologías peri-implantarias (no mencionadas por su irrelevancia en este estudio) en conjunto con las periodontales. Así mismo, debido a falta de pruebas patobiológicas que distinguían entre la periodontitis crónica y agresiva, se clasificaron ambas enfermedades como periodontitis. Se hicieron también cambios en algunas definiciones de condiciones y enfermedades periodontales, además se establecieron

lineamientos para la descripción de casos con la finalidad de estandarizar los criterios de inclusión en investigaciones científicas (Caton et al. 2018).

Las enfermedades gingivales y periodontales están catalogadas entre las más comunes del género humano. La gingivitis afecta alrededor de 80% de los de edad escolar y más de 70% de la población adulta ha padecido alguna enfermedad periodontal (Cruz et al. 2017).

#### **4.1 Salud periodontal**

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) define la salud bucal como “un estado de ausencia de dolor crónico en la boca y la cara, cáncer bucal y de garganta, infecciones y úlceras bucales, enfermedad periodontal (de las encías), caries, pérdida de dientes y otras enfermedades y trastornos que limitan la capacidad de una persona en morder, masticar, sonreír, hablar y el bienestar psicosocial”.

Definir la salud periodontal es de suma importancia para tener un punto de referencia para evaluar la enfermedad periodontal y determinar los posibles resultados del tratamiento. Puede ser evaluada a nivel clínicos e histológicos y debe ser considerada en el contexto de un punto de partida preventivo y un punto final terapéutico (Lang y Bartold 2018).

Se describen 4 niveles de salud periodontal dependiendo del estado del periodonto (íntacto o reducido) y los resultados relativos del tratamiento, los cuales son:

1. Salud prístina
2. Salud clínica
3. Estabilidad de enfermedad periodontal en un periodonto reducido
4. Control o remisión de la enfermedad periodontal en un periodonto reducido.

La salud gingival tanto en un periodonto íntacto como en un periodonto reducido se caracteriza por la ausencia de signos clínicos de inflamación: edema, enrojecimiento, sangrado al sondeo y sin presencia de síntomas. En aquellos pacientes con historia de

periodontitis, un sondaje de menos de 4 mm sin sangrado será considerado como sano, mientras que aquellos pacientes sin historia de periodontitis, será necesario que tengan sondajes menores a 3 mm. Por otra parte, al momento de establecer si alguno de estos dos tiene gingivitis, un sondaje de menos de 3 mm y presencia de sangrado es necesario en ambos casos (Herrera et al. 2018).

Salud prístina se define como una ausencia total de inflamación clínica. No existe pérdida de inserción, sangrado al sondeo, profundidad del sondeo no mayor a 3 mm, enrojecimiento, edema o pus. Sin embargo, este estado de salud no es común.

En la salud clínica los tejidos muestran ausencia o muy bajos de los indicadores clínicos de inflamación (sangrado al sondeo y marcadores inflamatorios del líquido crevicular). Los determinantes de la salud periodontal se dividen en 3 categorías: microbiológicos, huésped y medio ambiente. La relevancia de reconocer estos determinantes de la salud y la enfermedad periodontal como factores predisponentes y modificadores (controlables e incontrolables) es realmente importante y no debe subestimarse, ya que su evaluación es crucial para la evaluación de cada paciente y así lograr y mantener la salud periodontal clínica. Los factores predisponentes van a ser cualquier agente o condición que contribuya a la acumulación de placa, ya sea la anatomía dental, posición en la arcada o presencia de restauraciones y los factores modificantes son los que alteran la manera en la que responde un individuo a la acumulación de placa como fumar, condiciones sistémicas o medicamentos (Lang y Bartold 2018).

## **4.2 Gingivitis**

La gingivitis es una condición inflamatoria no específica que comienza cuando la placa dental se acumula por varios días o semanas y hay una pérdida de la simbiosis entre la biopelícula y el sistema inmune-inflamatorio del huésped, produciéndose así una disbiosis (cambios en la composición de la microbiota normal) (Murakami et al. 2018).

Existen dos categorías amplias de las enfermedades gingivales que incluyen: enfermedades gingivales no inducidas por biopelículas de placa dental y gingivitis inducida por placa dental. Las no inducidas por placa por lo general incluyen una variedad de afecciones que no son causadas por la placa y no se resuelven tras su eliminación profesional. Las lesiones de esta enfermedad pueden ser manifestaciones de una enfermedad sistémica o pueden estar localizadas en la cavidad oral (Chapple et al. 2018).

La gingivitis inducida por placa comienza en el margen gingival y puede extenderse por toda la unidad gingival restante. El paciente experimenta eritema, edema, sangrado y agrandamiento. Asimismo, el paciente puede presentar halitosis, dolor, sabor metálico por el sangrado. Los signos y síntomas de inflamación no van más allá de la línea mucogingival. Se considera un caso de gingivitis en los pacientes que presenten más del 10% de sitios con sangrado y un sondaje menor a 3 mm independientemente si es un paciente con periodonto intacto o reducido. Se definirá como localizada cuando el sangrado al sondeo sea en  $>10\%$  y  $<30\%$  de los sitios, mientras que será determinada como generalizada cuando haya más del 30% de los sitios con sangrado al sondeo (Chapple et al. 2018).

La distinción entre un paciente con periodonto reducido con historia o no de periodontitis es de gran importancia clínica debido a que muchas veces se presentan pacientes con pérdida de inserción causada por recesiones o intervenciones quirúrgicas (ej. alargamientos de corona) y esto no debe ser confundido con pérdida de inserción clínica causada por periodontitis, debido a que aquellos pacientes con periodontitis son más propensos a volver a padecer dicha enfermedad y por lo tanto deben realizarse mantenimientos periodontales continuamente (Herrera et al. 2018).

### **4.3 Periodontitis**

La transición de la gingivitis a la salud periodontal es reversible después de un tratamiento que resuelve la inflamación gingival (Figura 1). La transición a la periodontitis

se traduce en una pérdida de inserción que, en la actualidad, es irreversible (Chapple et al. 2018).

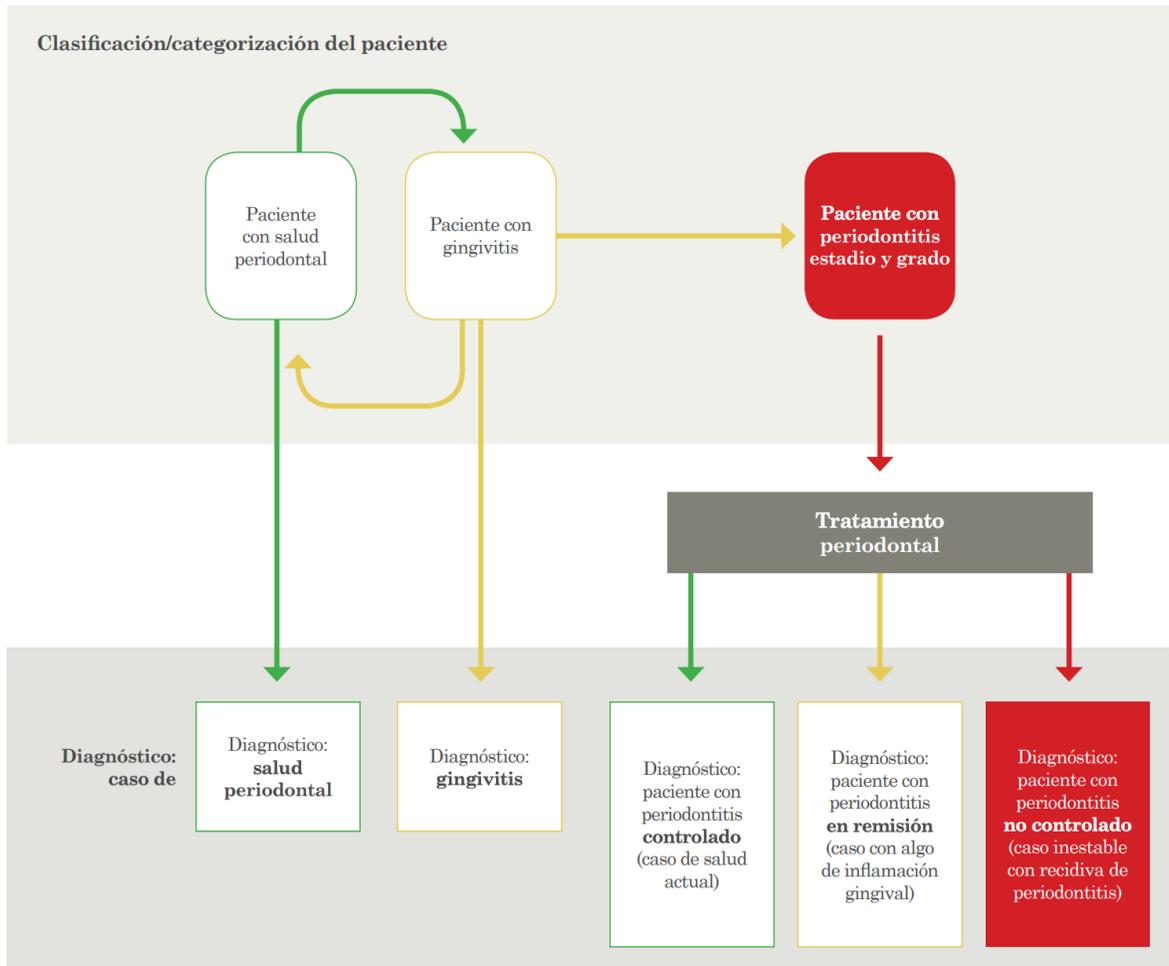


Figura 1: Transición de gingivitis a periodontitis. Obtenido de Chapple, 2019.

La gingivitis puede revertir a salud periodontal mientras que la periodontitis resulta en pérdida de inserción y es irreversible. Esto indica a los pacientes que tienen un alto riesgo de por vida de periodontitis recurrente. La terapia periodontal óptima puede restaurar la salud gingival en un periodonto reducido, o puede resultar en una inflamación gingival marginal leve en bolsas de sondaje poco profundas ( $\leq 3$  mm). Sin embargo, un historial de periodontitis coloca a los pacientes en alto riesgo de periodontitis recurrente y estos pacientes requieren un control cuidadoso específico del sitio durante los programas de mantenimiento periodontal (Chapple et al. 2018).

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial asociada con una disbiosis en la placa bacteriana, caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte dental debido a biomarcadores inflamatorios. Sus principales características son la pérdida de tejido de soporte manifestado como pérdida de inserción clínica (CAL) y pérdida radiográfica de hueso alveolar. Se define un caso de periodontitis al presentar CAL interdental en dos o más dientes no adyacentes, o bien pérdida de inserción clínica vestibular  $\geq 3$  mm con bolsas de  $\geq 3$  mm en dos o más dientes (Herrera et al. 2018).

La periodontitis se clasifica por estadios y grados. Los estadios (I, II, III y IV) van a depender de la gravedad de la enfermedad y la complejidad, sobre la base de factores locales. (Figura 2), tomando en cuenta qué tanta destrucción periodontal hay, basándonos en la pérdida ósea y pérdida de dientes causadas por periodontitis; la complejidad prevista de su tratamiento en cuanto a la presencia de bolsas, hipermovilidad dental y disfunción masticatoria y la extensión (localizada o generalizada) (Papapanou et al. 2018).

		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Gravedad	CAL interdental en zona con la mayor pérdida	1-2 mm	3-4 mm	$\geq 5$ mm	$\geq 5$ mm
	Pérdida ósea radiográfica	Tercio coronal (< 15 %)	Tercio coronal (15-33 %)	Extensión a tercio medio o apical de la raíz	Extensión a tercio medio o apical de la raíz
	Pérdida dentaria	Sin pérdida dentaria por razones periodontales		$\leq 4$ pérdidas dentarias por razones periodontales	$\geq 5$ pérdidas dentarias por razones periodontales
Complejidad	Local	Profundidad de sondaje máxima $\leq 4$ mm	Profundidad de sondaje máxima $\leq 5$ mm	Profundidad de sondaje $\geq 6$ mm	Profundidad de sondaje $\geq 6$ mm
		Pérdida ósea principalmente horizontal	Pérdida ósea principalmente horizontal	Además de complejidad Estadio II: Pérdida ósea vertical $\geq 3$ mm Afectación de furca grado II o III Defecto de cresta moderado	Además de complejidad Estadio III: Necesidad de rehabilitación compleja, debido a: Disfunción masticatoria Trauma oclusal secundario (movilidad dentaria $\geq 2$ ) Defecto alveolar avanzado Colapso de mordida, abanicamiento dental, migraciones dentarias Menos de 20 dientes residuales (10 parejas con contacto oclusal)
Extensión y distribución	Añadir a estadio como descriptor	En cada estadio, describir extensión como localizada (< 30 % de dientes implicados), generalizada, o patrón molar/incisivo			

Figura 2: Clasificación de periodontitis por estadios. Obtenido de Herrera et al., 2018.

Por otra parte, los grados informan sobre el riesgo que tiene la enfermedad a progresar, ya sea lenta (A), moderada (B) y rápida (C) así como también la posible obtención de

malos resultados en el tratamiento, junto con posibles efectos negativos sobre la salud sistémica (Figura 3) (Papapanou et al. 2018).

		Grado A	Grado B	Grado C
Evidencia directa	Radiografías o evaluación periodontal en los 5 años anteriores	No evidencia de pérdida de hueso/inserción	Pérdida < 2 mm	Pérdida ≥ 2 mm
	Pérdida ósea vs. edad	< 0,25	0,25-1,0	> 1,0
Evidencia indirecta	Fenotipo	Grandes depósitos de <i>biofilm</i> con niveles bajos de destrucción	Destrucción proporcional a los depósitos de <i>biofilm</i>	El grado de destrucción supera las expectativas teniendo en cuenta los depósitos de <i>biofilm</i> ; patrones clínicos específicos que sugieren periodos de progresión rápida y/o patología de aparición temprana... Por ejemplo, patrón molar-incisivo; falta de respuesta prevista a tratamientos de control bacteriano habituales
Factores modificadores	Tabaquismo	No fumador	< 10 cig./día	≥ 10 cig./día
	Diabetes	Normal con/sin diabetes	HbA1c < 7 con diabetes	HbA1c > 7 con diabetes

Figura 3: Clasificación de periodontitis por grados, basada en evidencia directa, evidencia indirecta y factores modificadores. Obtenido de Herrera et al., 2018.

Ahora se sabe que una biopelícula patógena es necesaria para que se pueda desarrollar la periodontitis, es decir es un requisito previo, pero sí sola no es suficiente para causar la enfermedad, sino que es el resultado de interacciones complejas entre la biopelícula y la respuesta inmune inflamatoria, siendo esta última la de mayor riesgo de daño a los tejidos. La periodontitis es una enfermedad compleja con múltiples causas como ya se mencionó; algunas con su base en genética, algunas causadas por influencias epigenéticas y otras modificables por relacionarse con comportamientos del paciente, medicamentos o factores ambientales, todos los cuales conspiran para establecer y propagar la lesión de periodontitis. Y además también existen características específicas del sitio, como los factores anatómicos que pueden favorecer el desarrollo de la lesión (Meyle y Chapple 2015).

#### 4.4 Microbiota oral

El ecosistema microbiano de la cavidad bucal es el hábitat de una gran cantidad de especies bacterianas y virales. Inclusive hay bacterias asociadas a la salud periodontal y existe una relación simbiótica entre los microorganismos residentes de la biopelícula,

incluidas las interacciones entre las diferentes especies bacterianas y la respuesta inmune inflamatoria de los huéspedes a esa biopelícula (Meyle y Chapple 2015).

La placa dental es una masa bacteriana densa (también llamada biopelícula) que se adhiere con fuerza a la superficie de los dientes, la cual es mediada por receptores en la delgada cubierta salival, llamada película adquirida. Esta adhesión bacteriana a tejidos del huésped puede ocurrir por fuerzas inespecíficas, como fuerzas iónicas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, e interacciones específicas o estereoquímicas (medidas por proteínas especializadas de la superficie bacteriana, o adhesinas, que se unen a receptores en la superficie del huésped) que al superponerse a las fuerzas inespecíficas, explican en parte la colonización selectiva de los tejidos del huésped (Lamont et al. 2015).

La placa bacteriana es una comunidad estructurada de células bacterianas incluidas en una matriz polimérica de producción propia (Costerton 1999). La composición de la placa supragingival con un desarrollo de 7 a 10 días es principalmente de *Streptococci* y *Actinomyces*. Cuando la placa madura, estos microorganismos aumentan y se añaden otros tales como *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Treponema* y especies de *Bacteroides* (Socransky et al. 1998).

Si la biopelícula no es eliminada con frecuencia y se acumula, sus condiciones favorecen a las especies bacterianas como *F. nucleatum*, los cuales mediante el empleo de señales químicas son capaces de detectar e influir en su entorno. Estos organismos emergen y provocan una respuesta más fuerte por parte del huésped y por consecuencia conduce al desarrollo de inflamación gingival y aumenta el suministro de ciertos nutrientes, como el hemo, los cuales favorecen la proliferación de patógenos tradicionales como *P. gingivalis* (Meyle y Chapple 2015).

#### **4.4.1 Etapas de la formación de la biopelícula**

En la primera etapa de la formación de la biopelícula ocurre a los 30 minutos después de la limpieza dental y se deposita una capa salival sobre la superficie del diente junto con las especies pioneras (adaptables nutricional y fisiológicamente y crean un ambiente que permite la adaptación de otros colonizadores secundarios) de *Streptococcus*: *S. sanguis*, *S. gordonii* y *S. oralis*. Éstas se adhieren firmemente por medio de interacciones adhesina/receptor (Marsh 1994).

En la segunda etapa, 2 días después de la limpieza dental, los colonizadores pioneros se multiplican y se extienden perpendicularmente de la superficie del diente en cadenas de especies conectadas formando filas paralelas de microorganismos con espacios abiertos entre ellos en donde se adhieren *Actinomyces* mediante coagregación o acoplamiento intergenérico (Marsh 1994).

En la fase 3 que ocurre de los 2 a 3 días después de la formación de la biopelícula, los espacios abiertos comienzan a llenarse de bacterias menos tolerantes al aire como *Veillonella*. 7 a 14 días después la flora se vuelve más gran-negativa y anaerobia (casi 40%). En esta fase comienza a observarse una inflamación gingival clínicamente y las bacterias comienzan a migrar hacia el área subgingival, que al ser prolongada puede llevar a una periodontitis (Marsh 1994).

En la fase 4, aproximadamente 11 a 14 días después de la limpieza dental, la placa en la región subgingival permite la colonización de *vibrios* y *espiroquetas* (*Treponema*), los cuales requieren condiciones anaerobias estrictas y proteína sérica. En este punto la placa subgingival se divide en placa adherente (interactúa con la superficie del diente) y placa poco adherente (interactúa con la superficie epitelial crevicular gingival) y va a ser nutrida por el líquido crevicular (Marsh 1994).

#### **4.4.2 Complejos de Socransky y las bacterias periodontopatógenas**

Las bacterias son los agentes etiológicos primarios de las enfermedades periodontales. Se concluyó basados en los criterios descritos por Socransky y mediante la valoración de

los estudios que han demostrado patogenicidad sobre diversos microorganismos, que había suficientes datos para poder catalogar a tres bacterias como las más fuertemente asociadas con la periodontitis, las cuales son: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*, ya que han demostrado tener la capacidad de colonizar los nichos periodontales y permanecer en ellos (Iniasta et al. 2008).

En los estudios de Socransky (1994) se estudiaron series de placa subgingival de individuos con diferentes formas de enfermedad periodontal y salud periodontal y reportaron un cambio en la microbiota subgingival al progresar de salud a gingivitis y periodontitis (Ximénez-Fyvie et al. 2000).

Las bacterias de los complejos amarillo (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *Streptococcus* sp, *S. gorodinii* y *S. intermedia*) y verde (*E. corrodens*, *C. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *C. concisus* y *A. actino.a*) están asociadas a la salud periodontal (Figura 4), son los colonizadores pioneros en la formación de la biopelícula y no están asociados con los complejos rojo y naranja.

Las bacterias del complejo rojo (*P. gingivalis*, *B. forsythia* y *T. denticola*) y naranja, (*F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micros*, *P. nigrescens*, y otros) son consideradas periodontopatógenas junto con *A. actinomycetemcomitans* (Figura 4) y están asociadas fuertemente al inicio y progresión de la enfermedad periodontal (Socransky et al. 1998).

La coagregación es una estrategia importante para la colonización de microorganismos y por consiguiente contribuir con el asentamiento de la biopelícula (Figura 5). Por ejemplo, *A. actinomycetemcomitans* es capaz de coagregarse con *F. nucleatum*. Un antígeno específico puede mediar la coagregación de *A. actinomycetemcomitans* serotipo c con *P. gingivalis* (Iniasta et al. 2008).

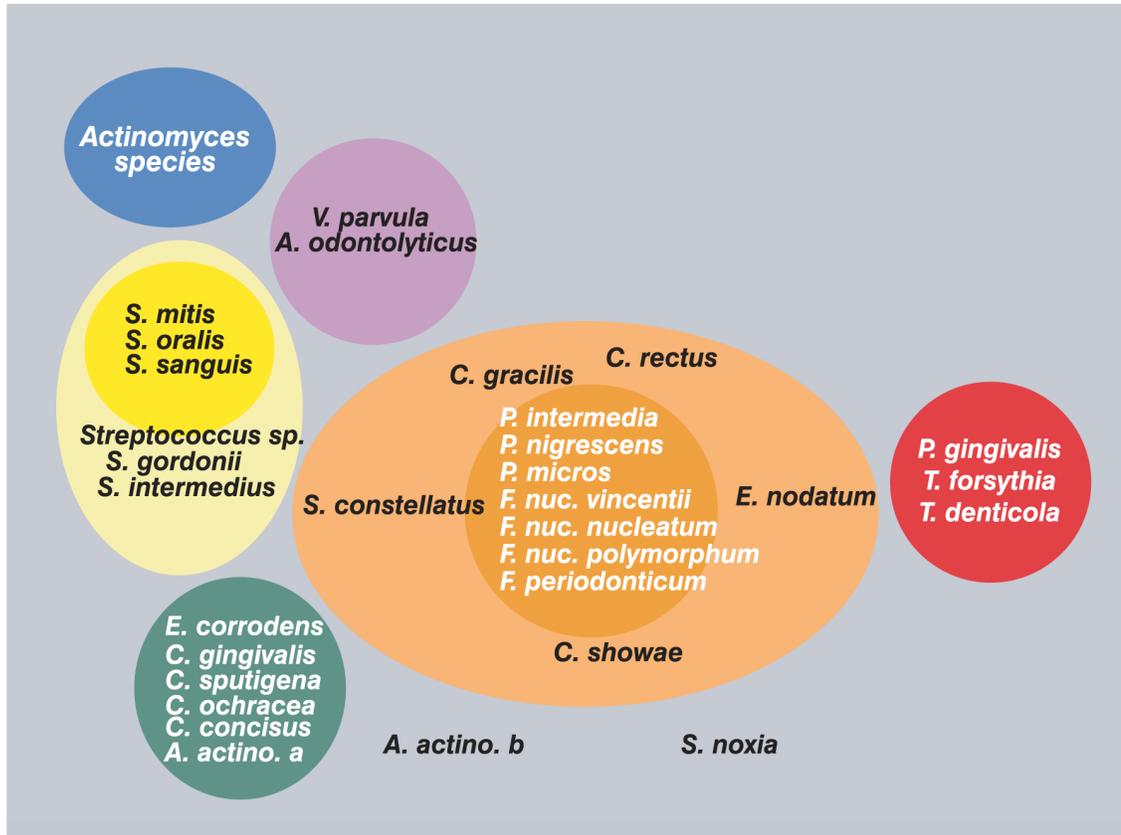


Figura 4: Representación esquemática de las relaciones de especies dentro de complejos microbianos y entre los complejos microbianos. Obtenido de Socransky y Haffajee, 2005.

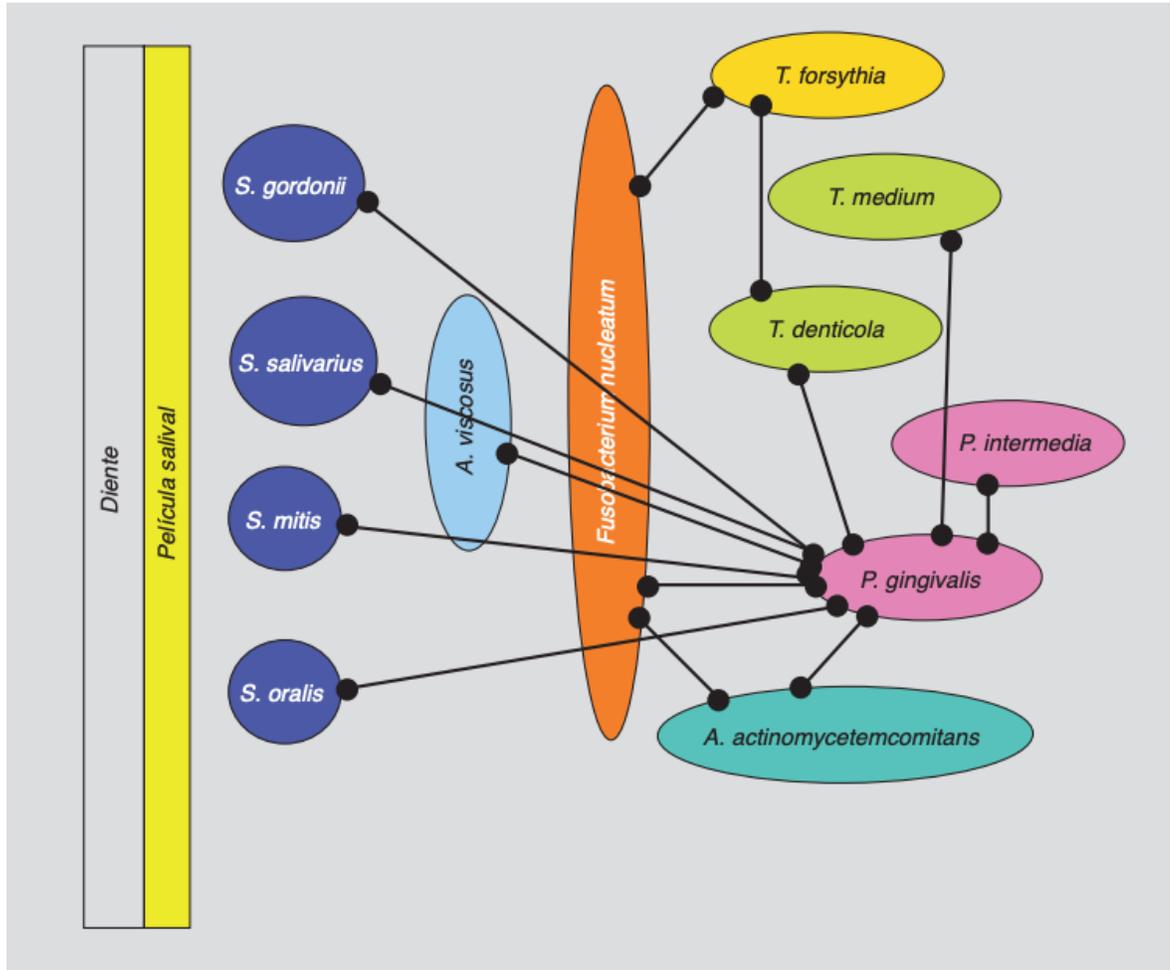


Figura 5: Relaciones de coagregación con otras bacterias para los tres patógenos de asociación fuerte con la periodontitis. Obtenido de Iniesta et al., 2008.

#### 4.5 Higiene oral

Se ha considerado que una buena higiene oral, controlando la biopelícula dental y utilizando los métodos adecuados, es el sostén principal para lograr mantener una salud periodontal (Lang y Bartold 2018; Costa et al. 2020).

La Federación Dental Internacional (FDI, 2015) menciona que "Una buena salud bucal nos permite hablar, sonreír, besar, respirar, silbar, oler, saborear, beber, comer, morder, masticar, tragar y expresar sentimientos. La cavidad bucal juega un papel central para la ingesta de nutrientes básicos y la protección contra las infecciones microbianas".

Una mala salud bucal puede ser provocada por los malos hábitos de higiene oral que pueden llevar a la infección dentro de la cavidad oral, afectando sin duda alguna la apariencia, el bienestar y la autoestima del individuo aunque también puede estar asociada con otro tipo de problemas como son: el sueño (apnea del sueño, respirador bucal, bruxismo), la masticación y habla, así como un deterioro cognitivo (Melo et al. 2017).

Mantener el control de placa es la base fundamental para prevenir y controlar la enfermedad periodontal, esto se logra mediante una limpieza bucal evitando que se acumule en los dientes y las encías. Aunque la placa supragingival está expuesta a la saliva y autoclisis (autolimpieza) y logran eliminar los restos de comida, no eliminan adecuadamente la placa dental. Por esta razón se requiere de métodos mecánicos y químicos para la eliminación adecuada de la placa supragingival. El medio más eficaz comprobado para la eliminación activa de la placa en el hogar es el cepillado, que al realizarlo de manera adecuada garantiza la higiene oral; sumado a este método se encuentra el uso de enjuagues bucales, la seda dental y los dentífricos como complemento para el mantenimiento de la salud bucal (Van Der Weijden y Slot 2011).

Se han demostrado en algunas revisiones sistemáticas recientes que el uso exclusivo de cepillado manual e hilo dental no cumplían la tarea de la eliminación de la biopelícula interproximal y recomendaron el uso de coadyuvantes como cepillos interdetales, irrigadores y controles químicos de placa para los individuos periodontalmente susceptibles (Costa et al. 2020).

#### **4.5.1 Coadyuvantes en la higiene oral**

El enfoque a la prevención de las enfermedades periodontales debe ser en fomentar un control adecuado de placa dentobacteriana y la correcta eliminación de la biopelícula. A muchos pacientes no les resulta una tarea fácil mantener el control de placa y requieren de coadyuvantes para prevenir la aparición o recurrencia de estas enfermedades. A este tipo de pacientes se les suele recomendar la utilización de métodos químicos, como los

enjuagues bucales antimicrobianos, hilo dental, cepillos interdentes, irrigadores, etc. como uso complementario para ayudar a eliminar la biopelícula (James et al. 2017; Costa et al. 2020).

Varios estudios sugieren que los dispositivos de irrigación mostraron una reducción del índice de placa y sangrado al sondeo que los cepillos interdentes, sin embargo, hay otros estudios que demuestran mejor resultados con los cepillos interdentes. Autores sugieren que el uso de hilo dental resulta un procedimiento difícil y no han demostrado ser muy útiles como se creía para la limpieza de áreas interproximales abiertas. No obstante, los cepillos interdentes no son indicados para espacios interproximales cerrados, ya que generan un trauma en los tejidos gingivales. Los irrigadores parecen ser una mejor opción ya que producen menos daño en los tejidos que los cepillos interproximales (Van Der Weijden y Slot 2011).

#### **4.5.2 Control químico de placa bacteriana**

Los controles químicos de placa se utilizan frecuentemente para la reducción de carga microbiana presente en la cavidad bucal, para control o reducción del mal aliento. Los compuestos con actividad antimicrobiana se utilizan para controlar la placa supragingival y gingivitis, y antes de la cirugía oral y periodontal, incluida la extracción dental y colocación de implantes. Los controles químicos de placa muchas veces no presentan efecto antimicrobiano y únicamente refrescan el aliento y reducen la halitosis (Müller et al. 2017).

Los CVS (sulfuro de hidrógeno y metil mercaptano) son gases subproducto de la putrefacción bacteriana, y se consideran los principales responsables de la halitosis. Por otro lado, también la producción de metil mercaptano se asocia con patógenos periodontales como *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* (Marder y Marder 2009; Shinada et al. 2010).

Informes epidemiológicos revelan que el 87% de los casos de mal aliento son causadas

por patógenos de la cavidad oral, mientras que solo el 5-8% de los casos se atribuyen a infecciones originadas de oído, nariz y garganta (Peruzzo et al., 2007).

#### **4.5.2.1 Clorhexidina**

La clorhexidina es el agente bactericida más utilizado en la mayoría de los productos antisépticos orales, baja irritación, efecto antimicrobiano de alto espectro y que no requiere prescripción médica. Sin embargo, se ha descrito que ocasiona irritabilidad de los tejidos y su actividad depende del pH y se reduce considerablemente en presencia de materia orgánica (McDonnell y Russell 1999; James et al. 2017).

Su uso se ha asociado a una serie de efectos adversos locales como la formación de manchas marrones extrínsecas en los dientes e inclusive en los tejidos bucales (particularmente en la lengua), acumulación de cálculo subgingival, lesiones mucosas, y percepción alterada del gusto. Por esta razón su uso es limitado, aunque estos efectos desaparecen una vez se suspenda su uso, a excepción de las manchas y el cálculo que deben ser retiradas profesionalmente (Addy 1986; James et al. 2017).

#### **4.5.2.2 Triclosán**

El triclosán (TCS), o 5-cloro-2- (2,4-diclorofenoxi) fenol, es un antimicrobiano fenólico clorado sintético de amplio espectro desarrollado en la década de 1960 y comúnmente utilizado en productos comerciales como jabones, desodorantes, champús, textiles y plásticos, así como también en la atención médica presente en suturas quirúrgicas y prótesis (Alfhili y Lee 2019).

Se ha hallado en concentraciones elevadas, en otros productos de cuidado personal como pasta de dientes, enjuague bucal, desinfectante de manos y jabones quirúrgicos. El TCS se absorbe fácilmente en la piel humana y la mucosa oral y se encuentra en varios tejidos y líquidos humanos según estudios que demostraron su absorción y retención, así como también su capacidad de interrumpir los procesos biológicos. Estudios

epidemiológicos demostraron que su uso puede tener efectos adversos para la salud al presentar correlaciones entre concentraciones elevadas de TCS en orina o sangre y efectos perjudiciales (Weatherly y Gosse 2017).

Se han utilizado antisépticos inorgánicos en odontología como el hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el ozono ( $\text{O}_3$ ), aunque su uso ha sido limitado a la desinfección debido a su toxicidad en bajas concentraciones, lo que limita su uso como antisépticos. El hipoclorito de sodio puede causar intoxicación, así como una grave destrucción de los tejidos periapicales principalmente por su oxidación de proteínas (Mehra et al. 2000; Noszticzius et al. 2013).

#### **4.6 Dióxido de cloro**

El dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ; CASRN 10049-04-4) es un agente oxidante en forma de gas sintetizado por primera vez en 1811, el cual puede variar en color de amarillo a amarillo rojizo al estar a temperatura ambiente y es estable en la oscuridad, pero inestable a la luz. Es un fuerte agente oxidante que se reduce fácilmente a clorito ( $\text{ClO}_2^-$ ; CASRN 7758-19-2), otro agente oxidante fuerte en condiciones de demanda de oxidantes (Zirwas & Fichtel, 2018; U.S. Environmental Protection Agency, 2000).

El dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) y el anión  $\text{ClO}_2^-$  son oxidantes químicamente reactivos con capacidades reductoras de los CVS responsables de la halitosis y a través de esta oxidación consume aminoácidos como la cisteína y la metionina que actúan como precursores de los CVS. El anión clorito es un potente bactericida para los microorganismos (Kandwal y Benzair 2014).

Comenzó a utilizarse como agente blanqueador de pulpa para la fabricación de papel y también como desinfectante, aunque por tener un precio excesivo no se utilizaba de manera industrial y fue hasta la década de 1940 cuando comenzó a utilizarse de rutina como desinfectante. Las concentraciones en las que se utiliza el dióxido de cloro desde entonces para el tratamiento del agua son del 5 al 10% y se utiliza también para la

desinfección de alimentos. Este gas al ser inhalado en altas concentraciones es tóxico, sin embargo, al ser aplicado en tejidos humanos de forma soluble en agua ha demostrado tener ausencia de toxicidad debido a la desactivación por las defensas intracelulares y su mecanismo de acción único (Noszticzus et al. 2013; Zirwas y Fichtel 2018).

#### **4.6.1 Ventajas del dióxido de cloro**

El ClO<sub>2</sub> ha demostrado ser el agente más eficaz contra organismos típicos como *Staphylococcus* y *Pseudomonas* resistentes al ser comparado con otros antisépticos como la lejía, el peróxido de hidrógeno, yodoforos y clorhexidina. Tiene además actividad antiviral, antifúngica y elimina las esporas bacterianas y las biopelículas. Además, es antiinflamatorio al neutralizar moléculas reactivas de oxígeno y citocinas y también tiene un rápido efecto eficaz contra la queratosis pilaris y otras afecciones (Zirwas y Fichtel 2018).

Comparando las concentraciones necesarias para obtener un efecto bactericida se ha demostrado que en el caso del dióxido de cloro a menudo 1 ppm es suficiente y se necesitan concentraciones más altas usando otros desinfectantes para obtener el mismo efecto (Csikány et al. 2009). No solo desinfecta la superficie de la piel o las membranas mucosas, puede hacer una desinfección más profunda penetrando a varias décimas de mm o incluso más profundamente en la piel dependiendo su concentración y tiempo de uso. Esto se debe a que se disuelve bien en la fase lipídica apolar de la membrana celular y por ello las membranas celulares no pueden evitar que el ClO<sub>2</sub> penetre en los tejidos (Csikány et al. 2009).

Al ser volátil, el ClO<sub>2</sub> no impide el proceso de cicatrización ya que solamente esta presente hasta que se evapora el agua y el dióxido de cloro, ya que el desinfectante es necesario solamente en lo que se eliminan los patógenos, por lo que también se puede considerar como un biocida ideal a este respecto. En cambio la incapacidad de la clorhexidina para permitir el cierre completo del tejido blando puede deberse en parte por su citotoxicidad ante los fibroblastos gingivales. De la misma manera inhibiendo

significativamente su unión posterior a la exposición de las superficies de las raíces dentales. (Csikány et al. 2009; Myneni Venkatasatya et al. 2017; Láng et al. 2021).

El ClO<sub>2</sub> puede ser un nuevo adyuvante preventivo así como terapéutico en el cuidado bucal tanto en la práctica de cirugía bucal o dental como en el hogar ya que su alta pureza tiene una eficacia desinfectante potente en microorganismos orales además de tener un efecto de disolución de la biopelícula superior a otros antisépticos. Al ser incorporado en enjuagues bucales ha demostrado una reducción en los niveles bacterianos de *S. mutans* y *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* grupo A, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* (Harakeh et al. 1988; Herczegh et al. 2013).

Los enjuagues de ClO<sub>2</sub> no contienen alcohol, no afectan el sabor, no causan reacciones alérgicas, no mancha los dientes o tejidos y no promueve la formación de cálculo. Además sus iones radicales no promueven el desarrollo de especies resistentes. Tienen la capacidad de alterar y penetrar las biopelículas permitiendo así una menor acumulación de placa dentobacteriana y al mismo tiempo mejorar la absorción de fluoruro en la superficie del esmalte. Al ser utilizado en conjunto con el surfactante Sarkosyl puede permitir una penetración más profunda del ClO<sub>2</sub> estabilizado y el fluoruro de sodio ((Marder y Marder 2009; Kerémi et al. 2020; Mynenivenkatasatya et al. 2020).

El ClO<sub>2</sub> se ha estudiado como descontaminante del agua, para el tratamiento tópico de la candidiasis atrófica crónica, para el tratamiento sintomático de la periodontitis, y para el tratamiento de la halitosis, que inclusive con un uso único de un enjuague bucal que contiene dióxido de cloro mejora significativamente el aliento y reduce la intensidad del mal olor al menos por 4 horas. Han demostrado disminuir la placa, la acumulación de recubrimiento de la lengua y los recuentos de *F. nucleatum* en la saliva. También, es más biocida y menos peligroso para la salud humana que las soluciones acuosas de cloro. Incluso es posible mantener limpio el operatorio dental utilizando 4 mg/L de gas de ClO<sub>2</sub> en conjunto con el uso de un aire acondicionado con un filtro de plasma y un filtro HEPA (Frascella et al. 1998; Marder y Marder 2009; Kuroyama et al. 2010; Shinada et al. 2010).

Ha demostrado que en una concentración de 0.02% en 10 minutos es capaz de eliminar por completo los microorganismos y el virus de la hepatitis C de instrumentos dentales en conjunto con el ultrasonido y puede ser una alternativa a desinfectantes tóxicos (Watamoto et al. 2013).

El uso de  $\text{ClO}_2$  ayuda a los mecanismos protectores naturales del cuerpo a contrarrestar agentes infecciosos que al no ser neutralizados adecuadamente pueden provocar la enfermedad. Sus mecanismos bioquímicos ayudan al sistema inmunológico a destruir organismos patógenos al poner a disposición una forma activa de oxígeno (Young 2016).

Su ingesta por humanos ha sido estudiada y no se han observado efectos tóxicos sistémicos dado que es agente antimicrobiano selectivo de tamaño que explica teóricamente por qué las soluciones de  $\text{ClO}_2$  letales para los microbios no son dañinas para los humanos. De modo que, la selectividad de éste entre humanos y bacterias no se basa en su diferente bioquímica, sino en sus diferentes tamaños. (Harakeh et al. 1988; Láng et al. 2021).

Su citotoxicidad ha sido evaluada en células madre del ligamento periodontal y se ha demostrado que no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad de éstas en concentraciones que son tóxicas para los microbios y se aplican en la práctica dental. Al tener una alta propiedad selectiva del tamaño, mata a los microbios pero sin dañar las células madre que son más grandes. El tiempo de muerte de una célula o una biopelícula es proporcional al cuadrado de su dimensión característica (Láng et al. 2021).

#### **4.6.2 Limitaciones y precauciones**

El  $\text{ClO}_2$  debe ser de calidad y no contener impurezas, de lo contrario puede representar un problema para su uso en los alimentos y en contacto con el cuerpo humano. Los reactivos impuros (10% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 15%  $\text{NaClO}_2$ ) y subproductos de la reacción ( $\text{Cl}_2$ ) son los principales en causar impurezas. El  $\text{Cl}_2$  puede reaccionar con materia orgánica para

formar trihalometano, un carcinógeno. El clorito y el clorato pueden ser perjudiciales para la salud (Ma et al. 2017).

En Estados Unidos el  $\text{ClO}_2$  es utilizado aproximadamente por el 5% de las grandes plantas para tratar el agua potable y se estima que 12 millones de personas pueden llegar a estar expuestas al  $\text{ClO}_2$  y a los iones de clorito.

Al entrar al cuerpo, el  $\text{ClO}_2$  actúa rápidamente y se transforma en iones de clorito, los cuales se convierten en iones de cloruro al momento de su descomposición. Normalmente el cuerpo utiliza estos iones en muchos procesos y después algunos son eliminados por la orina en cuestión de horas o días. Los iones de clorito que no se descomponen también son secretados en su mayoría por la orina al cabo de unos cuantos días.

La Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos regula la concentración máxima permitida como desinfectante del  $\text{ClO}_2$  a 0,8 mg/L. Asimismo, la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional definió los límites de exposición permisibles de concentraciones  $\text{ClO}_2$ :

- Industria general: 0,1 ppm y 0,3 mg/m<sup>3</sup>;
- Industria de la construcción: 0,1 ppm y 0,3 mg/m<sup>3</sup> promedio ponderado en el tiempo (TWA);
- Valor límite umbral de la Conferencia Estadounidense de Higienistas Industriales Gubernamentales: 0,1 ppm y 0,28 mg/m<sup>3</sup> TWA; 0,3 ppm y 0,83 mg/m<sup>3</sup> límite de exposición a corto plazo (STEL);
- Límite de exposición recomendado por el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional: 0,1 ppm TWA; 0,3 ppm STEL (Ma et al. 2017).

La Administración de Salud y Seguridad Ocupacional en el año 2004 (OSHA por sus siglas en inglés) establece el límite de exposición ocupacional al  $\text{ClO}_2$  de 0.1 ppm (0.28 mg por m<sup>3</sup>) para una jornada de 40 horas por semana que vienen siendo 8 horas diarias.

El  $\text{ClO}_2$  se volatiliza fácilmente estando en solución acuosa entre los  $10^\circ \text{C}$  y  $15^\circ \text{C}$  y es bastante estable al estar en solución fresca, en la oscuridad y en un recipiente cerrado herméticamente. La catalización de la descomposición se lleva a cabo incluso en la oscuridad. Al ser volatilizado se descompone en cloro y oxígeno. Los cloruros en solución al ser expuestos al ruido, calor, llamas y a presión, catalizan la descomposición, en concentraciones mínimas. Puede ser explosivo si se descompone a una presión parcial  $> 40 \text{ kPa}$  (Dobson y Cary 2002).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Diseño del estudio**

Es un estudio comparativo que estudió dos o más muestras, con conocimiento abierto, experimental, con una sucesión de eventos prospectivo y transversal.

### **5.2 Universo de estudio**

1. Cepas de *P. gingivalis* ATCC 53978 – Virulenta (W83).
2. Cepas de *F. nucleatum* ATCC 10953.
3. Cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC; 4318).
4. Fibroblastos Gingivales Humanos (FGH) (ATCC; PCS-201-018).
5. Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

### **5.3 Tamaño de la muestra**

Se realizaron 3 pruebas diferentes:

- a) En la prueba de halo de inhibición se realizaron 2 repeticiones utilizando 5 cajas Petri por cada una de las 3 bacterias y un co-cultivo de las 3 bacterias con 5 resultados por caja, siendo un total de 200.
- b) Se realizó una prueba germicida por cada bacteria y un co-cultivo obteniendo 4 resultados en total.
- c) Se realizaron pruebas de citotoxicidad en fibroblastos y células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

### **5.4 Descripción de procedimientos**

Todos los procedimientos fueron realizados en la Unidad de Odontología Integral y Especialidades en el laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 5.4.1 Obtención del dióxido de cloro a diferentes concentraciones

Se mezcló el clorito sódico ( $\text{NaClO}_2$  al 25%) y el ácido clorhídrico rebajado ( $\text{HCl}$  al 4%) en relación 1:1 (Figura 6). Se esperó de 30 segundos a 1 minuto para que ocurriera la reacción y se generara el gas  $\text{ClO}_2$  que tiene un color amarillo dorado.



Figura 6: Soluciones de clorito sódico ( $\text{NaClO}_2$  al 25%) y ácido clorhídrico rebajado ( $\text{HCl}$  al 4%)

Se realizaron concentraciones de  $\text{ClO}_2$  al 100%, 50% y 0.10% mezclando con agua destilada (Figura 7).

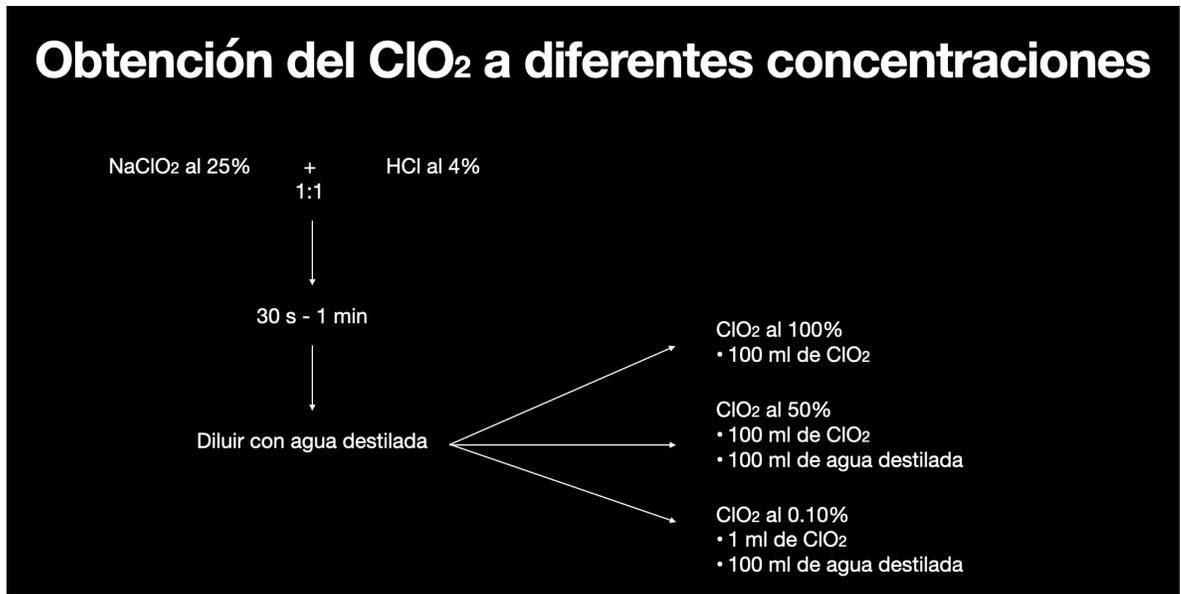


Figura 7: Obtención del  $\text{ClO}_2$  a diferentes concentraciones

#### **5.4.1.1 Preparación del CDS a 3,000 ppm (0,3%)**

1. En un tarro de cristal de 0,5 L con 250 ml de agua filtrada o destilada se colocó un vaso pequeño con 5 ml de clorito sódico al 25% activado con 5 ml de ácido clorhídrico al 4% sin que se mezclen con el agua.
2. Se cerró herméticamente con la tapa de cristal durante 12 horas y se guardó en la oscuridad.
3. Una vez terminado, se enfrió el líquido en el refrigerador y se llevó al exterior para sacar el vaso del concentrado sin derramar.
4. En el exterior se abrió y se sustituyó (con la misma agua del tarro) por otro vaso pequeño de 5 ml de clorito sódico al 25% y 5 ml de ácido clorhídrico al 4% en el mismo tarro.
5. Se cerró herméticamente con la tapa de cristal durante otras 12 horas y se guardó en la oscuridad.
6. El agua se volvió amarilla y se obtuvo el concentrado de CDS a 3,000 ppm que fue rectificado con tiras reactivas (Figura 8).
7. Este concentrado de CDS posteriormente se diluyó con agua: 10 ml de CDS en 1 litro de agua destilada.



Figura 8: CDS a 3,000 ppm

## 5.4.2 Experimento 1: Prueba de citotoxicidad

### 5.4.2.1 Citotoxicidad en fibroblastos

Información obtenida de la página de la ATCC:

Descongelación y cultivo celular:

1. El criotubo conteniendo un número de  $1 \times 10^6$  células/mL fibroblastos gingivales ATCC PCS-201-018 fue sumergido en un recipiente conteniendo agua precalentada.
2. Una vez descongelado y el criotubo, fue inmediatamente suplementado con medio de cultivo completo (DMEM, 5% Suero fetal bovino y antibiótico antimicótico 1x) a una relación de 1:4 (ej. 1mL de células más 3 mL de medio de cultivo completo).
3. Las células se centrifugaron a 100-200 rpm durante 10 min.
4. Una vez las células fueron centrifugadas se pudo observar un sedimento células que se le debe retirar el sobrenadante.

5. El sedimento celular fue resuspendido en 5 mL de medio de cultivo completo y se transfirió a un frasco de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>.
6. Luego este frasco conteniendo las células se incubó por 24-72 horas en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de oxígeno a 37°C.
7. El crecimiento células pudo ser observado bajo microscopia óptica a un aumento de 10X o 40X.
8. La confluencia fue del 90% de crecimiento celular, antes de la fase de plato.

Subcultivo de fibroblastos gingivales ATCC PCS-201-018 (Figura 9).

1. Se retiró y desechó el medio de cultivo.
2. Se enjuagó brevemente la capa celular con PBS 1X para eliminar todos los rastros de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Se agregaron de 2.0 a 3.0 mL de solución de tripsina-EDTA, se incubó 5-15 min a condiciones generales de crecimiento y observe las células bajo un microscopio invertido hasta que la capa de células se disperse.
4. Nota: Para evitar la formación de grumos, no se agitaron las células golpeando o agitando el matraz mientras se esperaba que las células se desprendan. Las células que son difíciles de separar se colocaron a 37° C para facilitar la dispersión.
5. Se agregaron de 6.0 a 8.0 mL de medio de crecimiento completo (para inactivar el efecto de la tripsina) y se aspiraron las células pipeteando suavemente.
6. Se agregaron alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos recipientes de cultivo.
7. Los subcultivos se establecieron entre 5 x 10<sup>3</sup> y 8 x 10<sup>3</sup> células viables / cm<sup>2</sup>.
8. Se incubaron cultivos a 37° C.
9. Intervalo: Se mantuvieron los cultivos a una concentración celular entre 5 X 10<sup>3</sup> y 8.0 X 10<sup>4</sup> células / cm<sup>2</sup>.

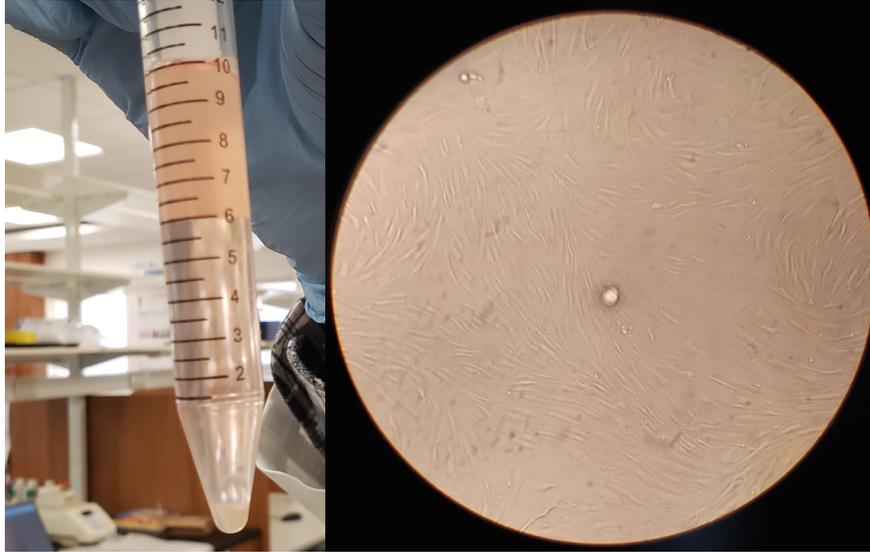


Figura 9: Subcultivo de fibroblastos gingivales

Plaqueo de células (Figuras 10 y 11)

En una caja de 96 pozos, se sembraron:

1. Control negativo: en la primera fila, se sembraron fibroblastos gingivales más medio de cultivo.
2. Control positivo: segunda fibroblastos gingivales con Tritón 5%.
3. En la tercera fila, fibroblastos gingivales con clorhexidina al 0.12%
4. En la cuarta fila, fibroblastos gingivales con dióxido de cloro al 0.10%

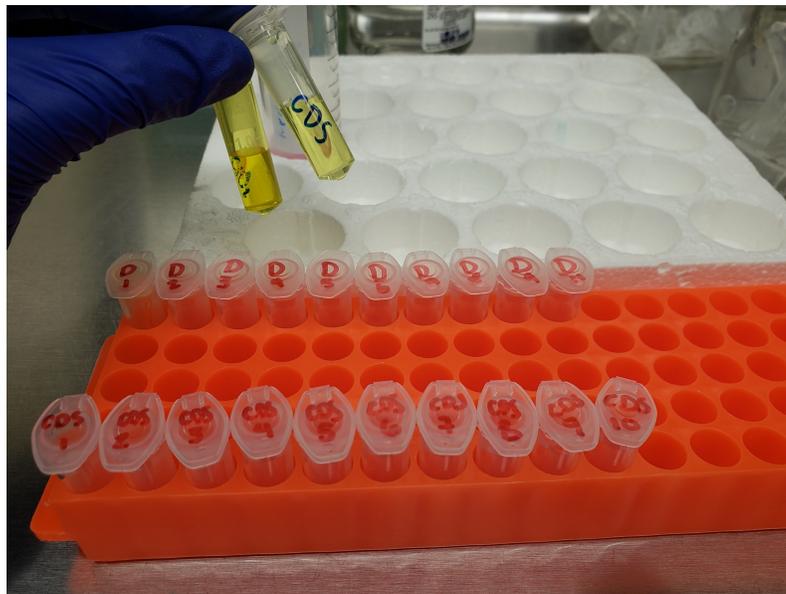


Figura 10: Tratamientos CDS y ClO<sub>2</sub>



Figura 11: Plaqueo de células con tratamientos

#### **5.4.2.2 Citotoxicidad en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC)**

##### Extracción de PBMC

La sangre colectada con anticoagulante se colocó en un tubo cónico de 50 mL y se diluyó en PBS estéril en una relación 1:1. En dos tubos cónicos de 15 mL se agregaron 6 mL de Ficoll-Hypaque. Después se añadieron 8 mL de sangre lentamente por las paredes en los tubos cónico de 15 mL con Ficoll-Hypaque (Figura 12) a una velocidad en que no se mezclaron las dos fases.

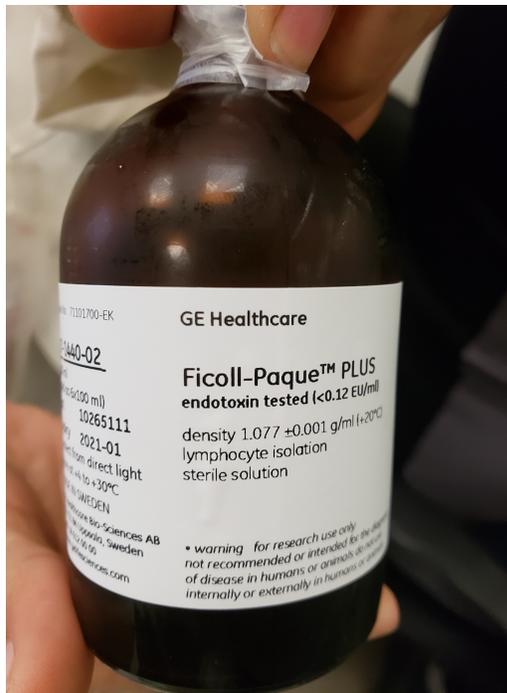


Figura 12: Medio en gradiente de densidad Ficoll-Paque para aislamiento de células mononucleares

Una vez en el tubo la sangre y el Ficoll-Hypaque, se centrifugaron a 3000 rpm por 30 min a temperatura ambiente (Figuras 13 y 14).

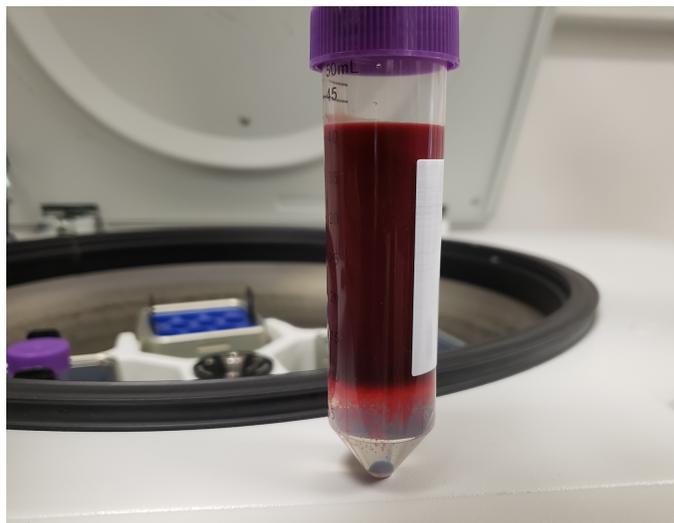


Figura 13: Sangre centrifugada

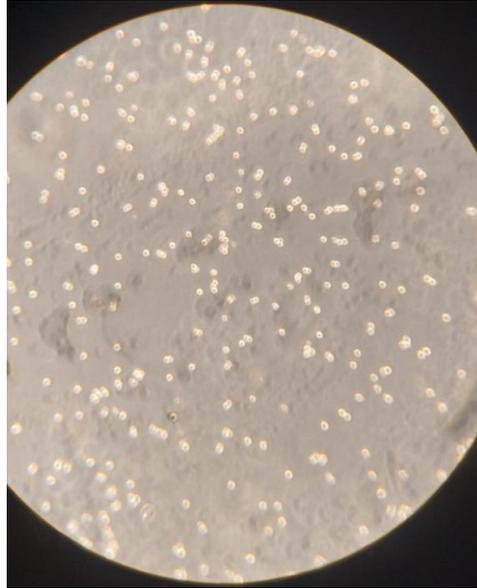


Figura 14: Células mononucleares de sangre periférica

Al formarse las capas en el tubo por diferencia de gradiente, se tomó la capa de color blanco, que es donde se encuentran las células mononucleares. Después se realizaron 3 lavados del pellet con PBS estéril para eliminar los restos del Ficoll-Hypaque. Las células fueron mantenidas en medio RPMI-1640 con L-glutamina y suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y antibiótico-antifúngico 1X. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> en frascos de 25 cm<sup>3</sup>. Se revisaron periódicamente (Gomez-Flores et al. 2019). Posteriormente se suspendieron las células en medio RPMI completo y se ajustaron a 5x10<sup>4</sup> células/mL. Se colocaron 100 µL del cultivo en placas de 96 pozos de fondo plano y se colocaron 100 µL de los tratamientos. Se utilizaron 100 µL del antineoplásico vincristina (100 µg/mL) como control positivo y 100 µL de medio de cultivo como control sin tratar. Posteriormente se incubaron los cultivos durante 48 h a 37 °C en una atmósfera húmeda con de 5% CO<sub>2</sub>. Al finalizar este período de tiempo, se colocaron 15 µL de MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL y se incubaron por 3 h. Después se añadieron 80 µL de DMSO a todos los pozos y se determinaron las densidades ópticas (DO) a 570 nm (Quintanilla-Licea et al. 2016). El porcentaje de citotoxicidad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 100 - \left( \frac{\text{DO}_{570} \text{ células tratadas}}{\text{DO}_{570} \text{ células no tratadas}} \times 100 \right)$$

### 5.4.2.3 Recolección de datos

Se procedió a colocar la caja de 96 pozos en el espectrofotómetro iMark Microplate Reader (Figura 15) con un filtro de 570 nanómetros para el conteo de las células en nanómetros. Contó la cantidad de masa que hay. Entre menor haya sido el número hay más muerte celular. Entre más células vivas haya, más se obstruyó el paso del láser y te dio un conteo menor. Si hubo muerte celular, no había que obstruyera el láser y el conteo era mayor. Entre mayor era el número había menos muerte celular.



Figura 15: Espectrofotómetro iMark Microplate Reader

## 5.4.3 Experimento 2: Prueba de halo de inhibición

### 5.4.3.1 Activación de las bacterias

En la campana de flujo, con una pipeta se tomaron cada una de las cepas y se inocularon por separado en nuevo medio de cultivo de tripticaseina de soya y se incubaron a 37° C por 24 horas hasta que llegaron a su curva de crecimiento exponencial.

Después de la activación de las bacterias (Figura 16), se tomaron bacterias del cultivo y se tomó una lectura inicial de la concentración de las bacterias por medio del espectrofotómetro en el SmartSpec Plus, Bio Rad con un filtro de 655 nanómetros. Se diluyó hasta obtener la concentración deseada. La concentración en nanómetros debe ser la misma para cada bacteria.

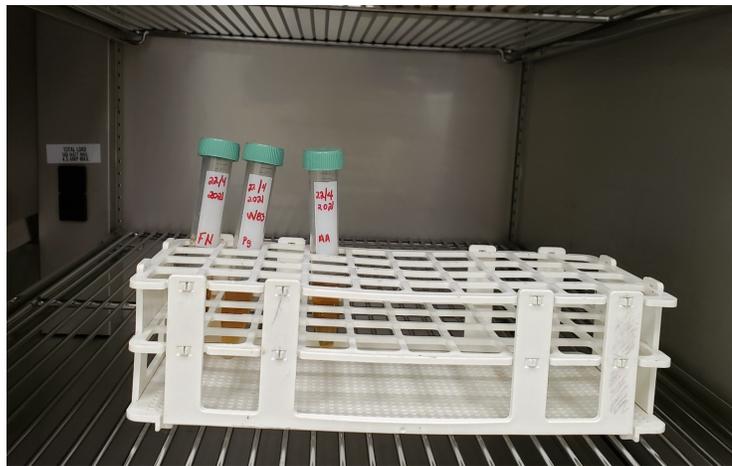


Figura 16: Activación de bacterias *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*

#### 5.4.3.2 Inoculación de las bacterias

Se sembraron placas de Petri en medio de tripticaseina de soya (Figura 17), con cultivos puros de las siguientes bacterias: *F.nucleatum*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, así como un co-cultivo de las 3 bacterias. Siendo un total de 5 cajas Petri por cultivo (Figuras 18 y 19).

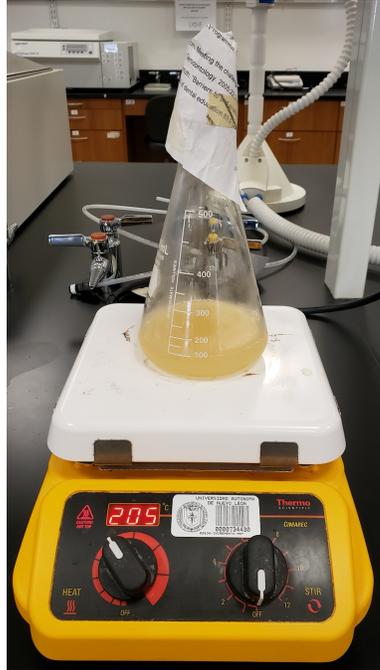


Figura 17: Trypticaseina de soya

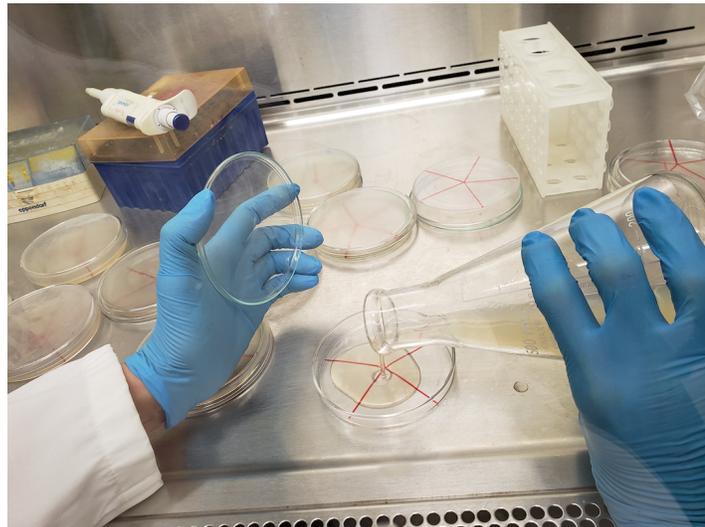


Figura 18: Preparación de placas de petri con tripticaseina de soya



Figura 19: Bacteria *F. nucleatum* activada

Utilizando un hisopo el cual se humedeció del nuevo medio de cultivo de la cepa de *F. nucleatum*, se llevó al medio de agar tripticaseína de soya, y se procedió a repartir mediante el método de difusión en Agar por toda la superficie (Figura 20). Se dejó de 3 a 5 minutos para el secado.

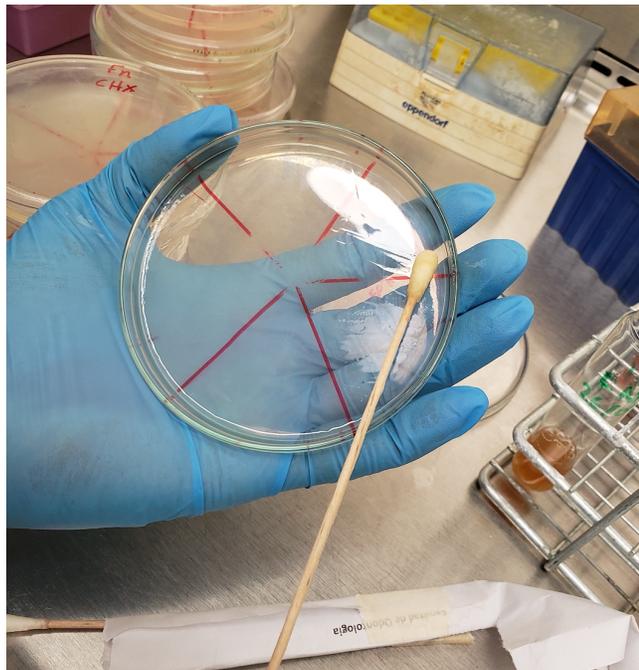


Figura 20: Método de difusión de agar

Se realizó el mismo procedimiento para la inoculación de *P. gingivalis* (Figura 21).



Figura 21: Bacteria *P. gingivalis* activada

La inoculación de *A. actinomycetemcomitans* se realizó de la misma manera, pero todo el procedimiento se llevó a cabo dentro de la cámara de anaerobios (Figuras 22 y 23) por ser una bacteria anaerobia facultativa que se desarrolla mejor en condiciones de anaerobiosis.



Figura 22: Cámara de anaerobiosis



Figura 23: Método de difusión en agar de *A. actinomycetemcomitans* en la cámara de anaerobiosis

En el caso del cultivo mixto se utilizó un hisopo estéril por cada cepa y se repartió de igual manera mediante el medio de difusión en Agar por toda la superficie dejando secar de 3 a 5 minutos.

Una vez realizados los cultivos, para cada cepa se procedió a colocar con pinzas estériles los discos embebidos con soluciones de  $\text{ClO}_2$ , siendo una de las siguientes concentraciones por caja Petri: 100%, 50% y 0.10% (experimental)(Figura 24). Por cada bacteria en una caja Petri se colocaron discos embebidos en suero (control negativo) y en otra caja Petri se colocaron los discos embebidos de clorhexidina al 0.12%

(Perioxidin) (control positivo) siendo un total de 5 discos en las respectivas cajas Petri (Figuras 25 y 26).

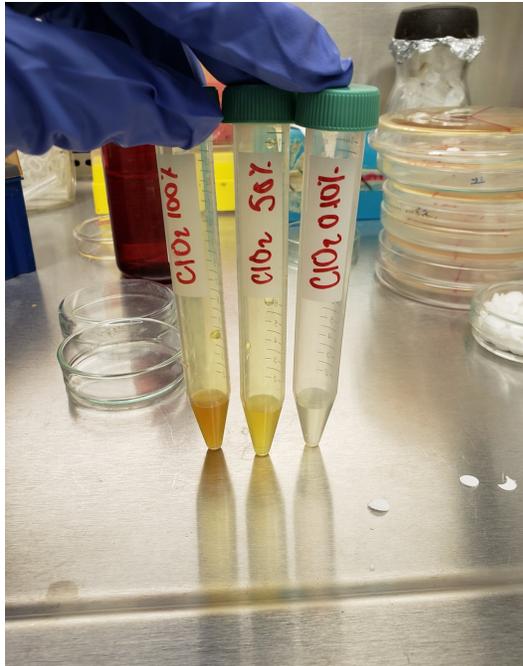


Figura 24: Concentraciones de ClO<sub>2</sub> al 100%, 50% y 0.10%

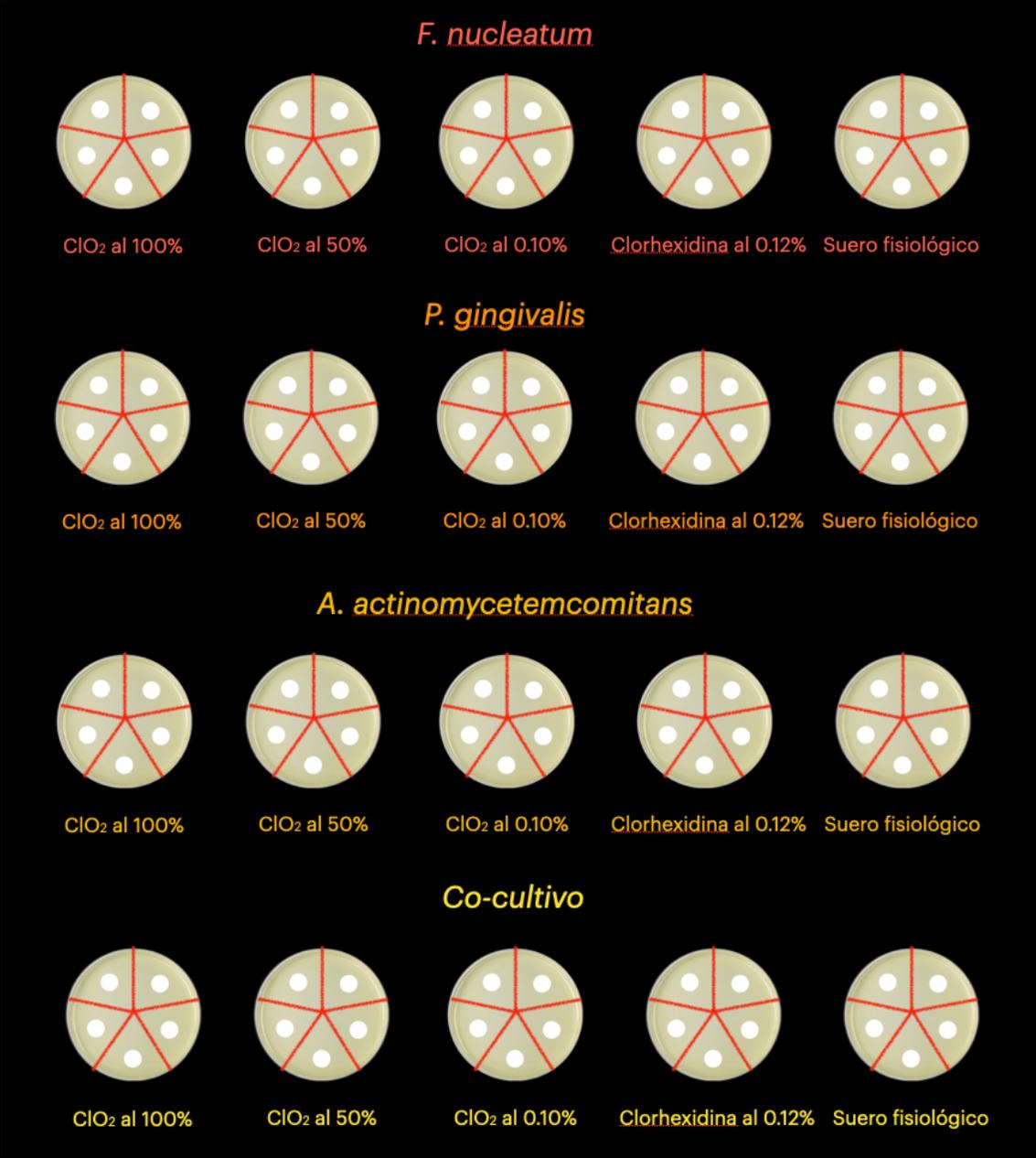


Figura 25: Imagen ilustrativa de prueba de halo de inhibición

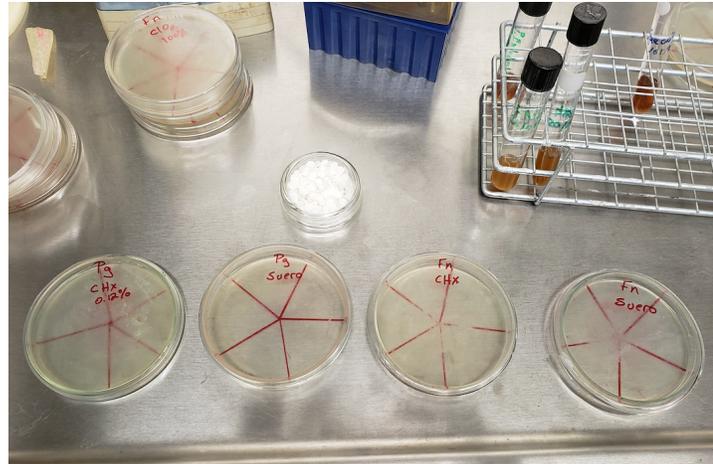


Figura 26: División y marcaje de cajas petri

Posteriormente se marcaron las cajas (Figura 27), se metieron en bolsas de plástico, se les añadió gas y se cerraron bien. Finalmente se introdujeron las placas Petri en la incubadora (Thermo scientific INC-UOIE-01) (Figura 28) invertidas (la tapa hacia abajo) para evitar la evaporación, a 37 °C por 24 horas para luego proceder con la lectura.

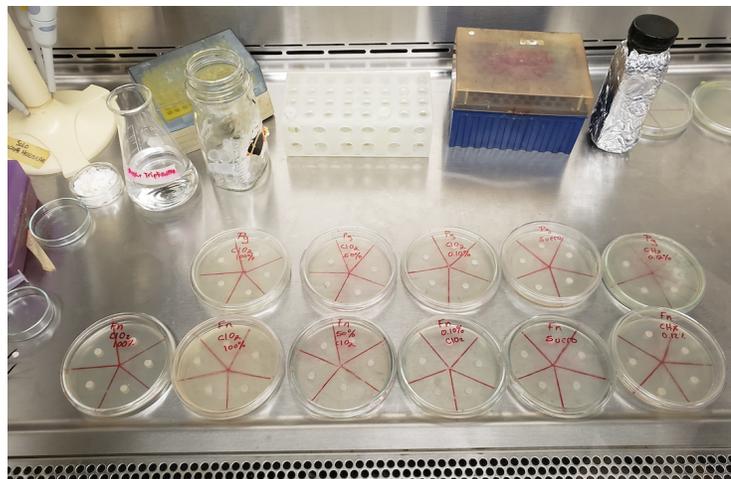


Figura 27: Cultivos de bacterias en las cajas petri con sus respectivos discos embebidos



Figura 28: Incubadora (Thermo scientific INC-UOIE-01)

#### 5.4.3.3 Recolección de datos

La medición de los halos de inhibición de los cultivos se realizó con calibrador vernier digital. Dichos datos fueron obtenidos con ayuda de la Doctora Myriam Angélica de la Garza Ramos jefa de la UNIDAD DE ODONTOLOGÍA INTEGRAL Y ESPECIALIDADES del CIDICS de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Basándose en las escalas establecidas por Duraffourd (1983) la cual determina que: “El diámetro del halo de inhibición es:

1. Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm
2. Sensible (Sensible =+) de 9 a 14 mm
3. Muy sensible (muy sensible =++) de 15 a 19 mm
4. Sumamente sensible (S.S.=+++)) si fue igual o superior a 20 mm

#### 5.4.4 Experimento 3: Prueba germicida

Esta prueba se realizó en base a la norma mexicana 040 Métodos generales de análisis – Determinación de la actividad antimicrobiana de productos germicidas (NMX-BB-040-SCFI-1999).

#### 5.4.4.1 Preparación de soluciones

##### 1. Solución amortiguadora de fosfatos 0,25 %

En un matraz volumétrico de 1,000 mL, se disolvieron 34 g de fosfato monobásico de potasio en 500 ml de agua, se ajustó el pH entre 7,1 y 7,3 con la solución de hidróxido de sodio, se aforó con agua, mezcló y distribuyó en porciones de 100 ml. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min, se dejó enfriar y se conservó en refrigeración.

Para preparar la solución amortiguadora de fosfatos (Figura 29) diluida se colocaron 1,25 ml de la solución amortiguadora de fosfatos 0,25 % en un matraz volumétrico de 1 litro.

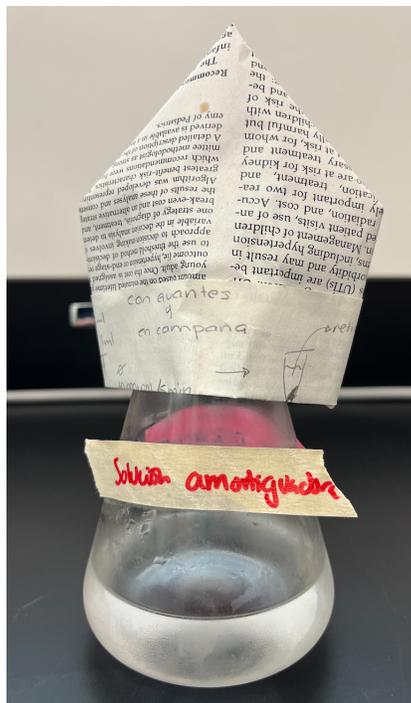


Figura 29: Solución amortiguadora de fosfatos

##### 2. Solución neutralizante concentrada

Se mezclaron 40 g de lecitina de soya, con 280 ml de polisorbato 80 ml y 1,25 ml de la solución amortiguadora de fosfatos, se diluyó con agua hasta obtener un volumen final de un 1 litro; se ajustó el pH a 7,2 con la solución volumétrica de hidróxido de

sodio o la solución volumétrica de ácido clorhídrico, se distribuyó en porciones de 100 ml. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

Para preparar la solución neutralizante (Figura 30) diluida se mezclaron 100 ml de la solución neutralizante concentrada con 25 ml de la solución amortiguadora de fosfatos 0,25 %, se adicionó 1,675 ml de agua, se mezcló y distribuyó en porciones de 9 ml en tubos con rosca de 20 mm x 150 mm. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

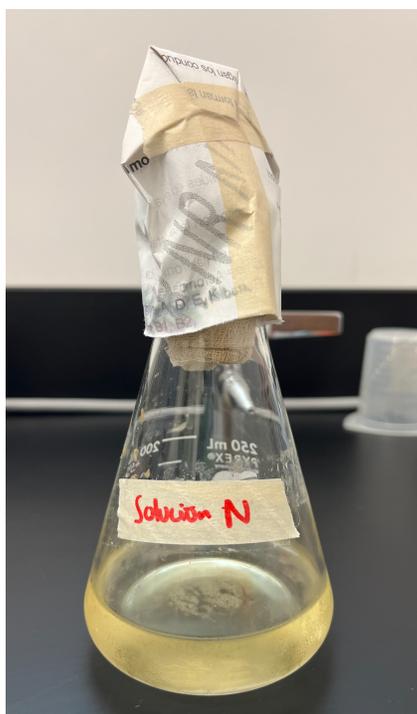


Figura 30: Solución neutralizante

### 3. Agar neutralizante

Se mezclaron 11.5 g de Agua neutralizante más 500 H<sub>2</sub>O D5) y 25 ml de la solución neutralizante concentrada.

### 4. Caldo neutralizante

Se mezclaron los siguientes componentes:

Triptona	2.5g
Dextrosa	5 g
Extracto de levadura	1.3g
Tioglicolato de sodio	0.5g
Tiosulfato	3 g
Polisorbato 80	2.5g
Bisulfato de sodio	1.3g
Lecitina de soya	3.5g
Purpura de Bromocresol	0.01g
Agua destilada	500 ml

Se calentó hasta la disolución, se ajustó el pH a 7,2 y se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 15 min.

#### **5.4.4.2 Preparación de las bacterias**

Se activaron las bacterias en el caldo que corresponden a 24 h. Se sembraron posteriormente en cajas de Agar Nutritivo por estrías o con hisopo en toda la caja Petri.

Una vez que crecieron las colonias se les derramó solución salina (suero fisiológico) (3 mL) para separarlas realizando movimientos circulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo de ensayo estéril y se continuó diluyendo con la misma solución hasta obtener una suspensión que leída a una longitud de onda de 580 nm.

De acuerdo con la absorbancia obtenida del cultivo celular se ajustó a 75 a 125 x 10<sup>8</sup> de acuerdo con la escala del nefelómetro de McFarland #10. Lo anterior se verificó de acuerdo a lo indicado en la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1 y se consideraron estos valores para análisis futuros.

#### **5.4.4.3 Determinación de la cuenta viable inicial**

A un matraz Erlenmeyer que contenía 99 ml de la solución amortiguadora de fosfatos

diluida estéril, se transfirió 1 mL de la suspensión de los microorganismos de prueba y se efectuaron las diluciones decimales necesarias para obtener placas que contuvieran cada una entre 25 y 250 colonias.

Se colocó en cajas de petri estériles, por duplicado 1 mL de cada dilución, se agregó a cada placa de 15 mL a 18 mL de agar para métodos estándar, se homogeneizó y dejó solidificar. Posteriormente se invirtieron las cajas de petri y se incubaron durante 48 h a 30°C - 35°C y se contaron las colonias contenidas en cada una de las cajas, en un cuenta colonias.

#### **5.4.4.4 Determinación de las células sobrevivientes**

a) Preparación de la muestra:

Se realizó la dilución del CDS al 0.3% tomando 10 ml de CDS diluido en 1L de agua destilada estéril obteniendo una concentración de .003%.

b) Inoculación de la muestra:

Para cada uno de los microorganismos de prueba (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y co-cultivo) se midió exactamente y por duplicado 99 mL de la dilución de CDS, y se transfirió a los tubos de 50 mL con tapón de rosca estériles. Se agitaron los tubos (Figura 31), se suspendió la agitación, justamente antes de la inoculación, para que en el momento de la misma, aún existiera movimiento residual del líquido y así facilitar la incorporación del inóculo.

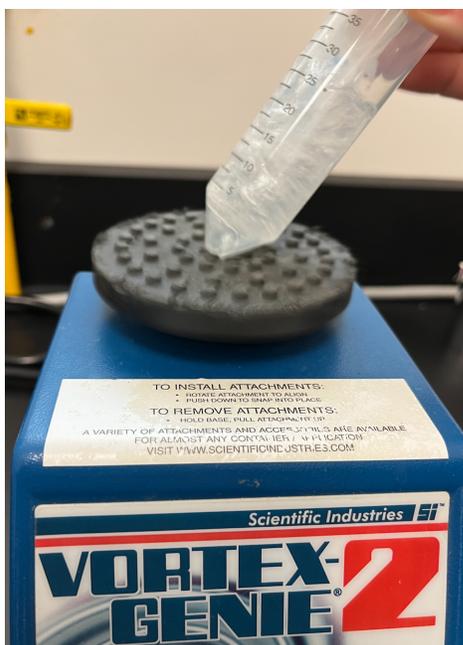


Figura 31: Mezcla para incorporación del inóculo

Se inoculó en forma individual cada tubo con cada uno de los microorganismos de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del tubo.

Se agitó el matraz con la muestra inoculada y exactamente 30 s después de la inoculación, se transfirió 1 mL de la misma, a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de la solución neutralizante diluida o del caldo neutralizante, se mezcló y transfirió por triplicado alícuotas de 1,0 mL a cajas de petri estériles y se continuó diluyendo hasta tener las diluciones necesarias para obtener placas que contengan de 25 a 250 colonias, y se agregó a cada placa de 15 mL a 18 mL del medio agar para métodos estándar con neutralizante, se homogeneizó, y se dejó que solidificara. Después se invirtieron las placas y se incubaron durante 48 h entre 35°C a 37°C. Después del período de incubación, se contaron el número de UFC en las placas (Figura 32).

Una vez que se obtuvo el resultado del conteo de las UFC y se multiplicó por el factor de dilución obtener la cuenta viable de bacterias en nuestra muestra (factor de dilución  $10 \times 10^4$ ).

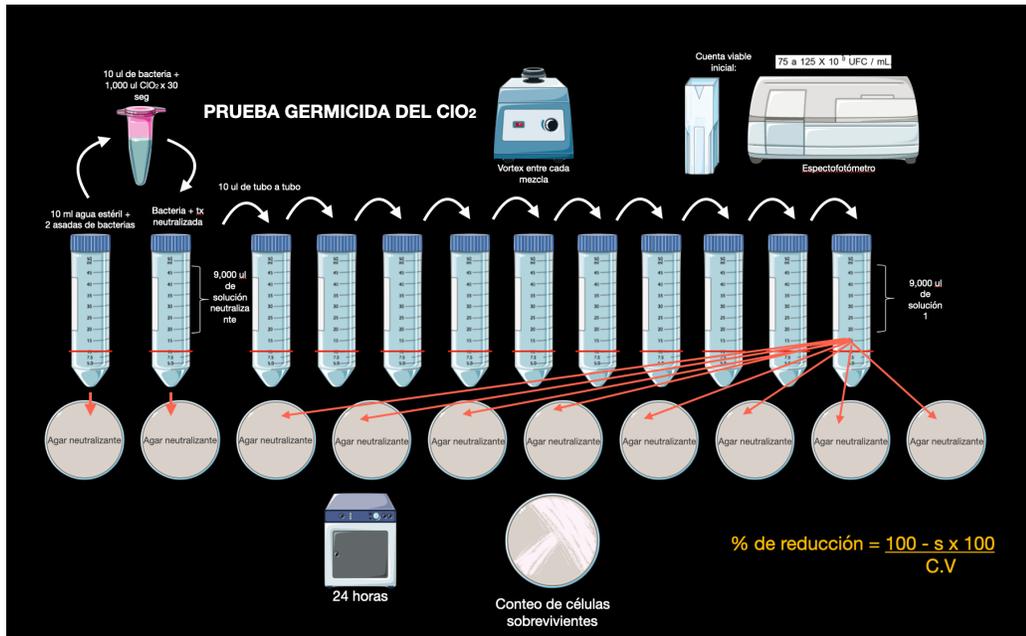


Figura 32: Imagen ilustrativa del procedimiento de la prueba germicida

### 5.5 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizará el programa Graph Pad Prism7. Expresando como media +-SD de determinaciones por triplicado de tres experimentos independientes para los resultados de citotoxicidad y actividad antimicrobiana. Los datos fueron analizados mediante pruebas de ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Dunnet. Los valores de IC50 se reportarán con intervalos de confianza del 95%.

## 6. RESULTADOS

La evaluación de los diferentes reactivos se realizó una vez preparados según los protocolos establecidos para su evaluación, determinando su compatibilidad (citotoxicidad) o seguridad para ser empleados en un futuro en cavidad oral.

### 6.1 Prueba de viabilidad del ClO<sub>2</sub> y CDS en células sanas.

Las diluciones de los tratamientos partieron de las concentraciones de ClO<sub>2</sub> (100%) y CDS (0.3%) en agua estéril para determinar su efecto sobre células PBMC y FGH (células sanas) para determinar su grado de citotoxicidad. Los resultados demuestran que las concentraciones de 12.5% de CDS muestra un porcentaje aproximadamente del 10% de citotoxicidad con diferencia estadística altamente significativa en comparación con el control no tratado en un tiempo de exposición de 48 horas en comparación con el ClO<sub>2</sub> que presentó altos porcentajes de citotoxicidad con un porcentaje aproximado del 60% desde la concentración más baja mediante con diferencia altamente significativa en comparación con el control no tratado en la línea celular PBMC (Tabla I) (Figura 33). En cuanto a la línea celular FGH, el CDS no presentó citotoxicidad en ninguna de las concentraciones utilizadas, mientras que el ClO<sub>2</sub> presentó un porcentaje de citotóxicidad del 40% a una concentración de 6.25% en comparación con el control (Tabla II) (Figura 34).

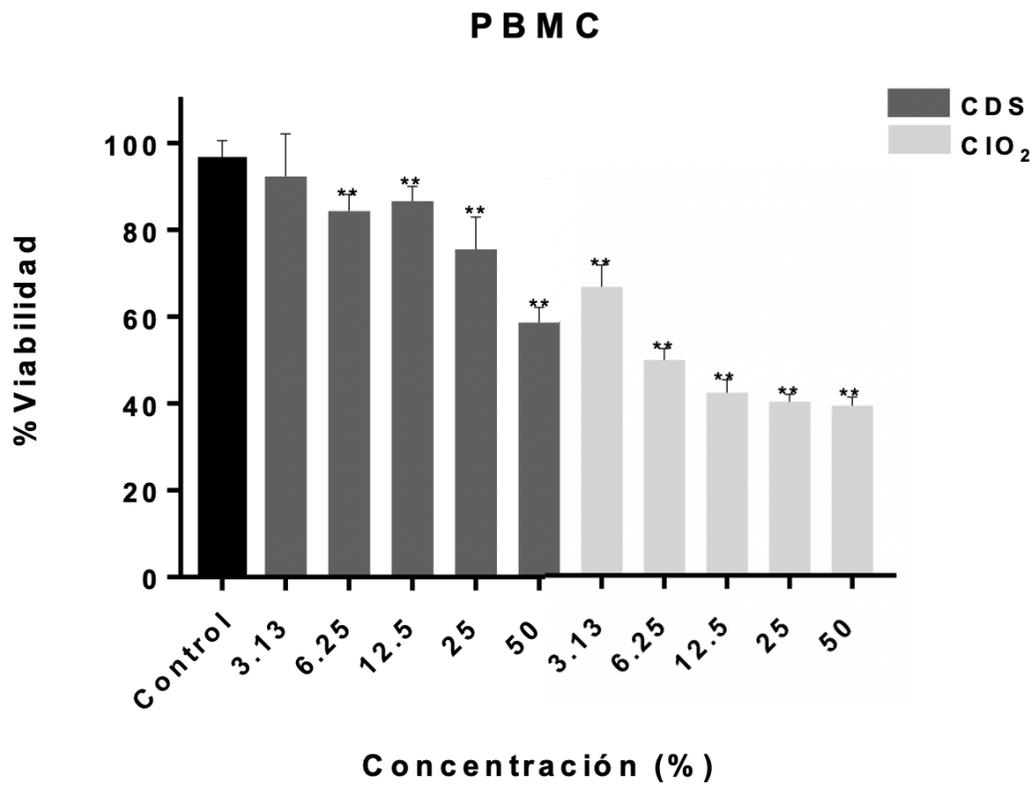


Tabla I: Efecto citotóxico del CDS y ClO<sub>2</sub> en células humanas



Figura 33: Placa de 96 pozos con tratamientos de ClO<sub>2</sub> de menor a mayor concentración en células PBMC. Filas 11 y 12 controles negativos.

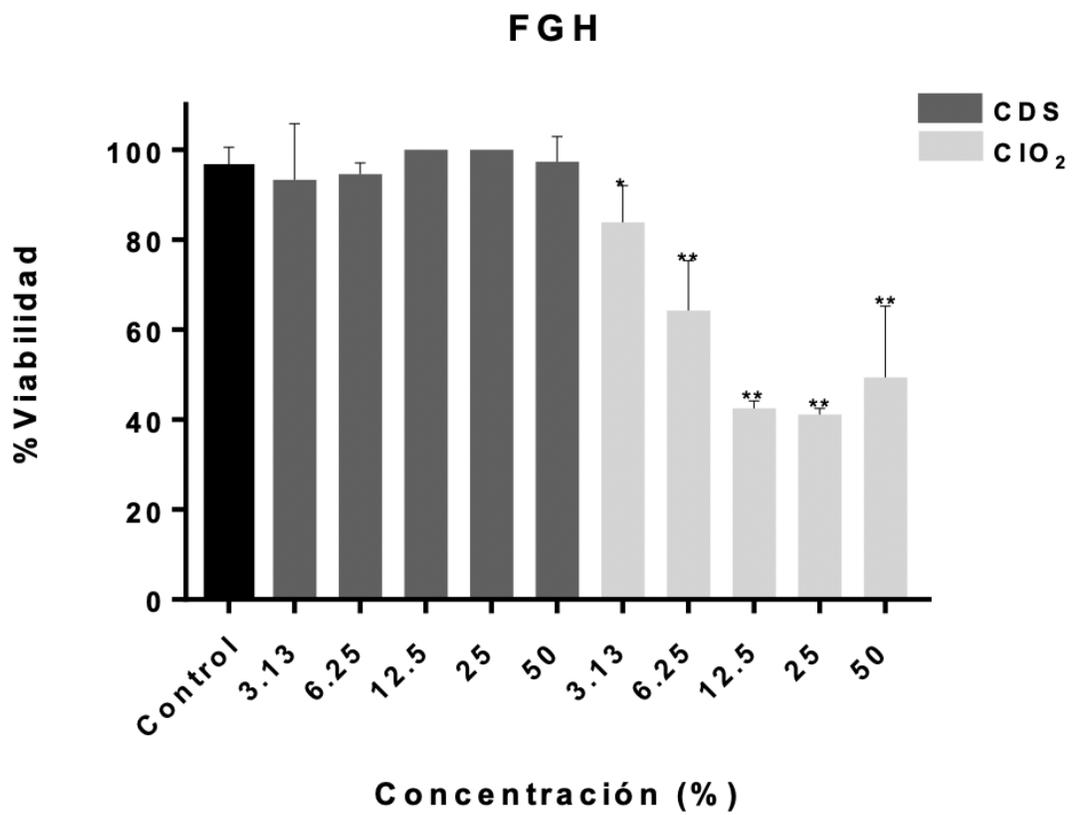


Tabla II: Efecto citotóxico del CDS y ClO<sub>2</sub> en FGH

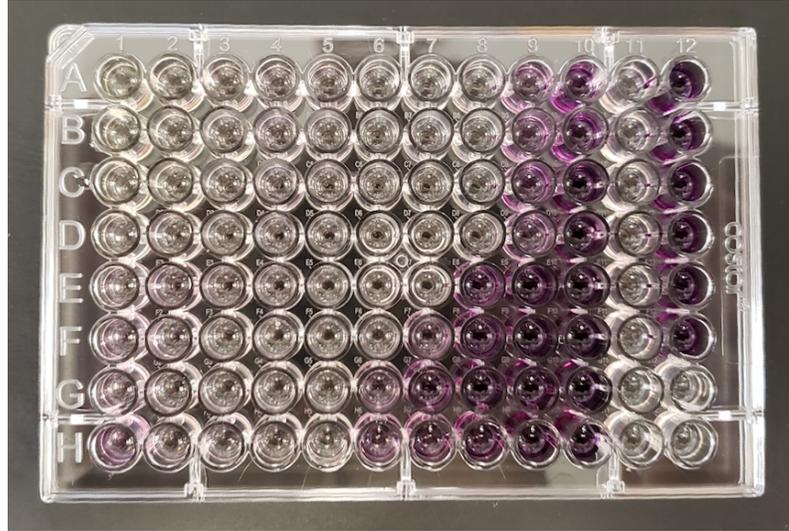


Figura 34: Placa de 96 pozos con tratamientos de  $\text{ClO}_2$  (filas A – D) y CDS (filas E – H) de mayor a menor concentración en FGH.

## 6.2 Actividad antimicrobiana del $\text{ClO}_2$ y CDS.

### 6.2.1 Prueba de halos de inhibición del $\text{ClO}_2$

Como se puede observar en la Tabla IIIA, a las 24 h de incubación, el efecto antimicrobiano del  $\text{ClO}_2$  fue mayor al porcentaje del 100% mostrando un diámetro de inhibición sumamente sensible en *F. nucleatum* con un halo de inhibición de 37 mm y un porcentaje de inhibición del 100% (Tabla IIIA). Al disminuir el porcentaje de  $\text{ClO}_2$  al 50% se mostró un decremento significativo de inhibición, sin embargo *P. gingivalis* fue muy sensible al tratamiento. Al porcentaje del 0.10% de  $\text{ClO}_2$  el diámetro de halo de inhibición fue nula con halos menores de 9 mm. A las 72 horas (Tabla IIIB) la mayoría de los valores disminuyeron independientemente del tratamiento utilizado. La clorhexidina mostró los valores uniformes en ambos tiempos.

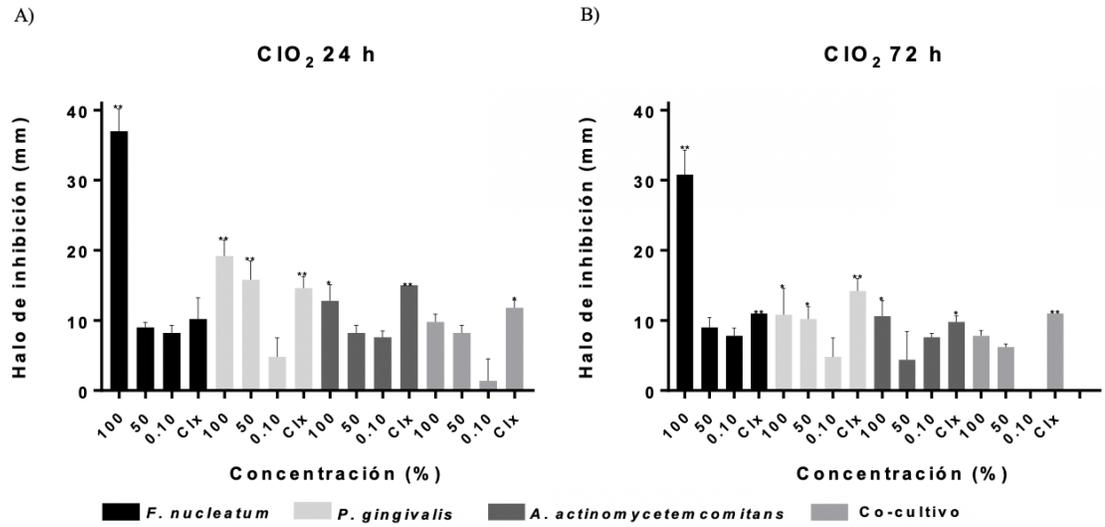


Tabla III: Efecto antibacteriano de ClO<sub>2</sub> en bacterias periodontopatógenas. A) Evaluación 24 h. B) Evaluación 72 h.



Figura 35: Halos de inhibición de *P. gingivalis* a las 24 h



Figura 36: Halos de inhibición de *F. nucleatum* a las 24 h

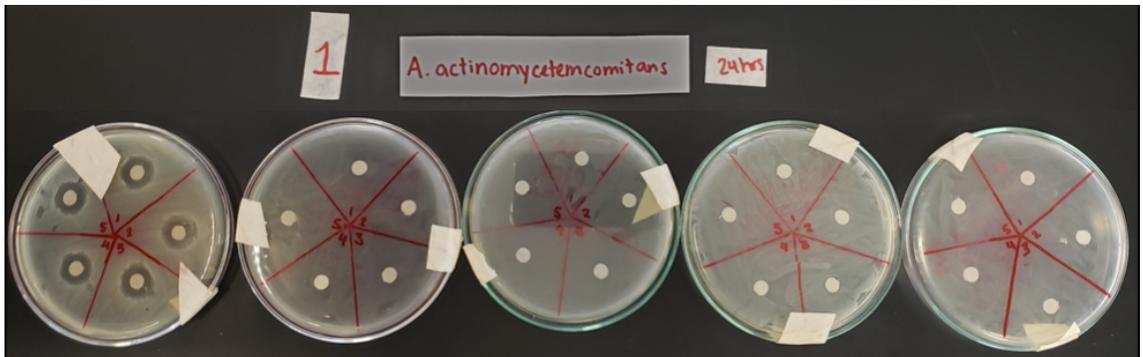


Figura 37: Halos de inhibición de *A. actinomycetemcomitans* a las 24 h

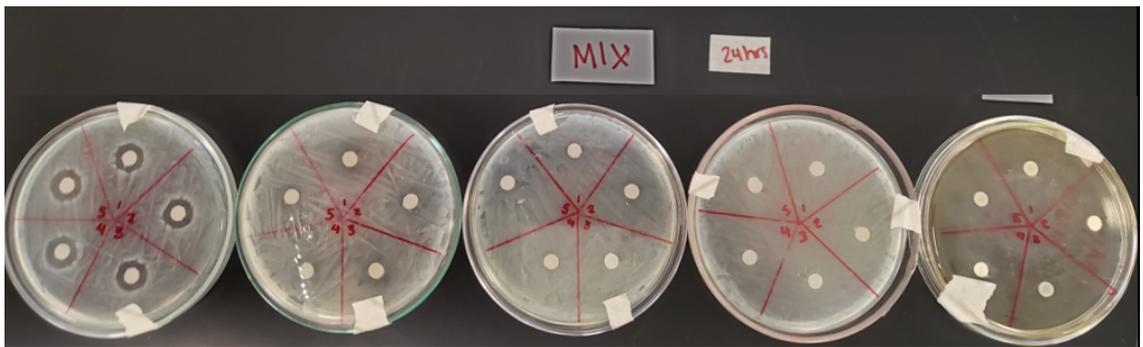


Figura 38: Halos de co-cultivo a las 24 h

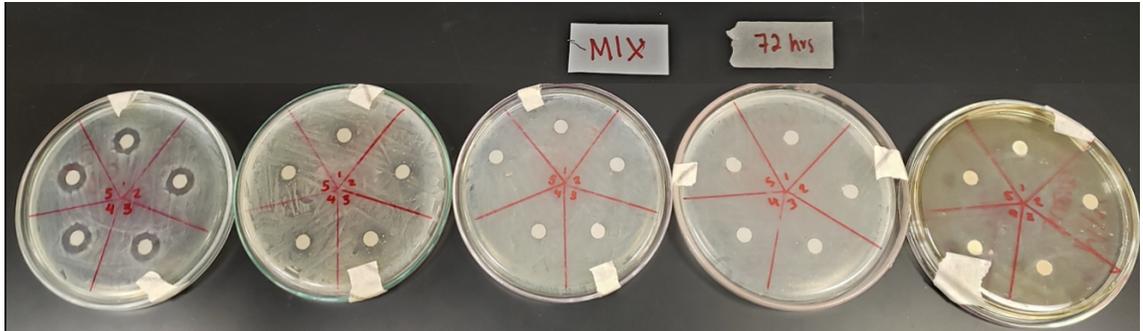


Figura 39: Halos de inhibición de co-cultivo a las 72 h



Figura 40: Halos de inhibición de *P. gingivalis* a las 72 h



Figura 41: Halos de inhibición de *A. actinomycetemcomitans* a las 72 h

### 6.3 Prueba germicida por UFC del CDS

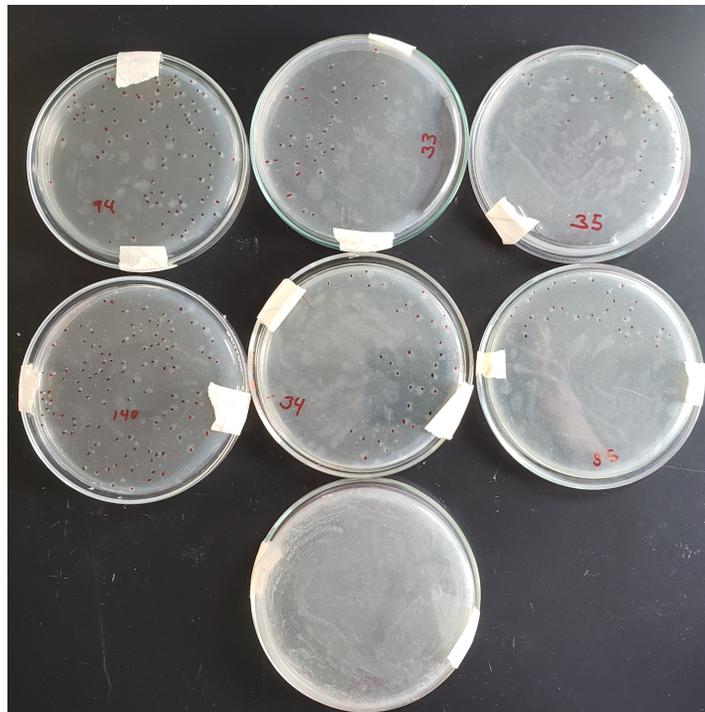


Figura 42: Conteo de UFC de *P. gingivalis*

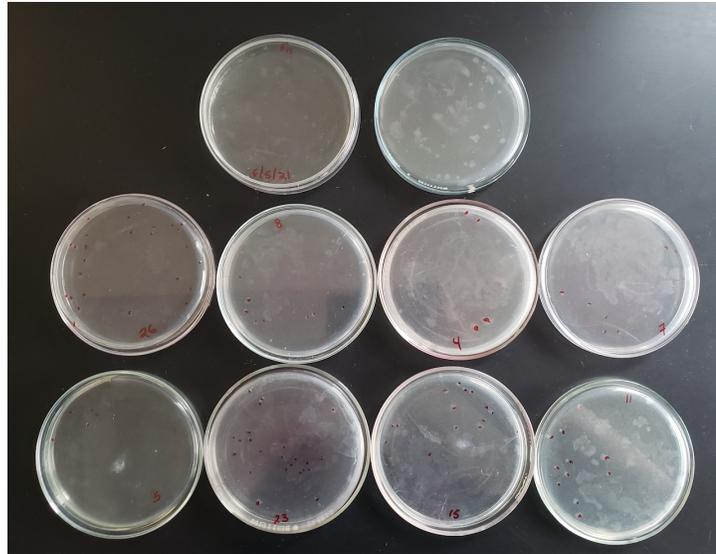


Figura 43: Conteo de UFC de *F. nucleatum*

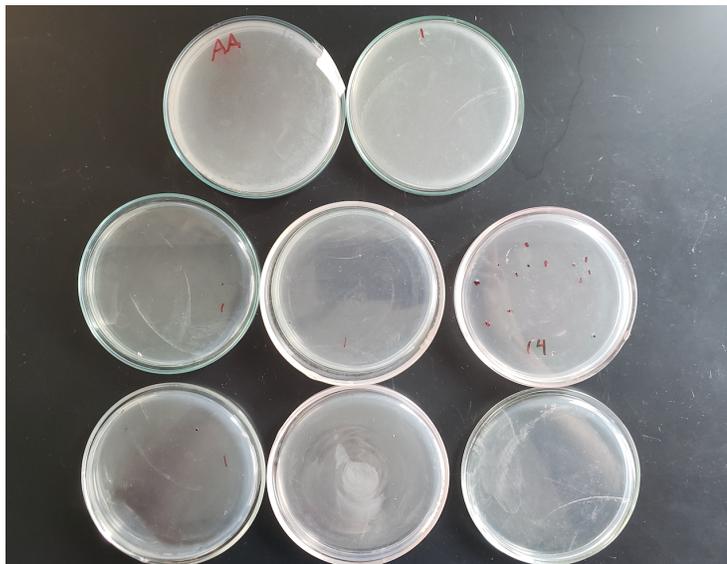


Figura 44: Conteo de UFC de *A. actinomycetemcomitans*

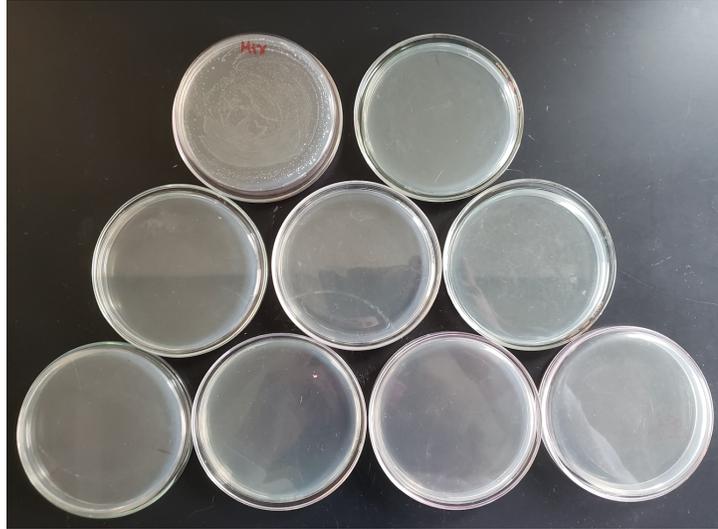


Figura 45: Conteo de UFC de co-cultivo

La tabla IV muestra los resultados para la prueba germicida con CDS al 0.003%. Los valores muestran una declinación estadísticamente significativa de las UFC al someterse al tratamiento con CDS. *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* fueron muy sensibles al CDS con porcentajes de inhibición mayores al 90%. El co-cultivo tuvo un porcentaje de inhibición del 100%. Por el contrario *F. nucleatum* no fue tan sensible al tratamiento y tuvo un porcentaje inhibitorio menor al 60%.

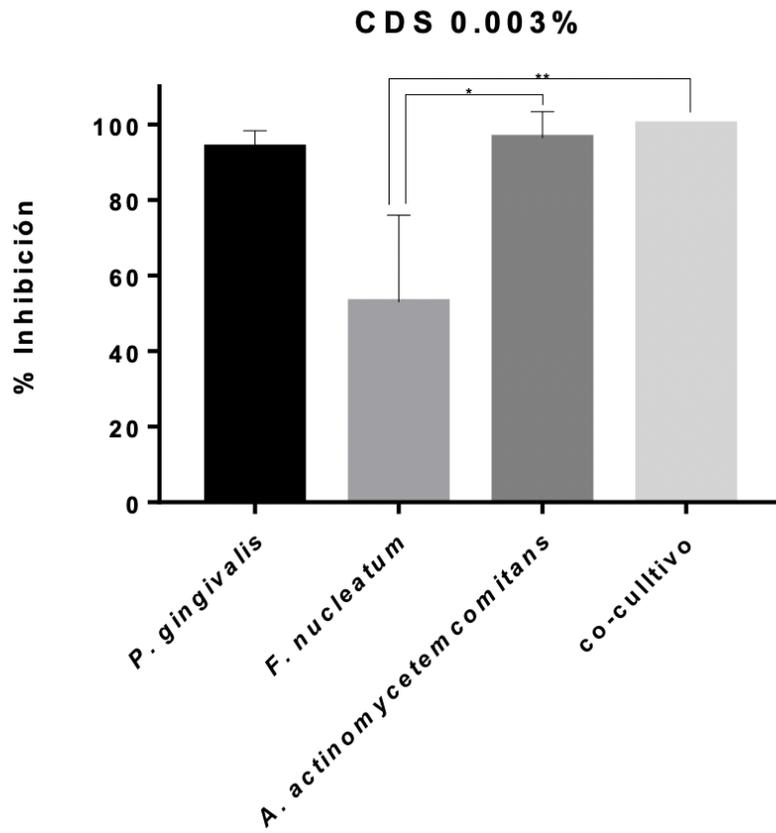


Tabla IV: Efecto antimicrobiano del CDS en bacterias periodontopatógenas.

## 7. DISCUSIÓN

Lang et al. en el 2021, evaluaron el efecto citotóxico en un análisis impedimétrico que mide la densidad celular en un sistema en tiempo real del ClO<sub>2</sub> comparado con otros 2 agentes antimicrobianos convencionales (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y CHX) en células del ligamento periodontal. En un lapso de 0 a 2 horas después de la aplicación de los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3 %, CHX al 0,02 %, ClO<sub>2</sub> al 0,0025 % o ClO<sub>2</sub> al 0,00025 %, las células tratadas con los tratamientos convencionales mostraron un aumento drástico en la muerte celular. Por el contrario, el ClO<sub>2</sub> mostró menor toxicidad que los tratamientos convencionales y no provocó cambios morfológicos en comparación con el grupo control (Láng et al. 2021). En este estudio el porcentaje de muerte celular del ClO<sub>2</sub> en FGH en dilución del 6.25% fue del 40%. En cambio el CDS al 0.3% en dilución al 50% y 3.13% (CDS al 0.15% y 0.009%) obtuvo un porcentaje de muerte celular del 30% y 15% respectivamente.

*F. nucleatum* ha sido propuesta como una bacteria "puente", que ayuda a facilitar condiciones favorables para otras bacterias que causan halitosis. En contraste con nuestros resultados, Shinada y colaboradores evaluaron los efectos del enjuague con dióxido de cloro en la halitosis y las bacterias salivales en un ensayo de 7 días controlado con placebo en 15 voluntarios masculinos sanos. A un grupo se le dio el enjuague con ClO<sub>2</sub> y al otro se le dio el placebo y se les pidió que hicieran enjuagues 2 veces al día por 7 días. El mal olor bucal se evaluó con medición organoléptica para evaluar los CVS y realizaron índices de placa y gingivales e índice de recubrimiento lingual. Los resultados mostraron una reducción significativa en el mal aliento matutino, reducción de placa, acumulación de recubrimiento lingual y el número de *F. nucleatum* en la saliva (Shinada et al. 2010). Asimismo, Pham y Nguyen reportaron que el uso de un enjuague bucal con 0,1% de ClO<sub>2</sub> redujo significativamente las cuentas de *F. nucleatum* al ser utilizado por 2 semanas en individuos con halitosis (Pham y Nguyen 2018). Por el contrario en este estudio, *F. nucleatum* fue la bacteria que mostró más resistencia, sin embargo si mostró actividad bactericida de más del 50%.

Asimismo el ClO<sub>2</sub> ha sido evaluado para demostrar su eficacia ante los CVS causantes de la halitosis. Algunos estudios probaron el tratamiento en las mismas bacterias utilizadas en este estudio. Downs, Banas, y Zhu demostraron la eficacia *in vitro* del enjuague Oracare para la reducción de la halitosis oral y para tratar y mantener la salud periodontal al comparar un enjuague bucal a base de dióxido de cloro (Oracare) con clorhexidina para la actividad antimicrobiana y la capacidad de eliminar los CVS generados por patógenos periodontales como *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. El enjuague que contenía ClO<sub>2</sub> demostró ser más eficaz contra *A. actinomycetemcomitans* que la CHX (Downs et al. 2015). En nuestro estudio se obtuvieron resultados favorables en cuanto a la inhibición de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, lo que sugiere que el ClO<sub>2</sub> es efectivo contra las bacterias periodontopatógenas y puede ser utilizado para tratar la halitosis. Por otra parte Pham y Nguyen no pudieron encontrar una reducción significativa en la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis* después de usar el enjuague bucal con ClO<sub>2</sub> al 0,1%, sin embargo provocó una disminución estadísticamente significativa en la acumulación de placa, mientras que los índices de gingivitis y sangrado también tendieron a reducirse, pero no en una cantidad estadísticamente significativa. (Pham y Nguyen 2018).

Ma y colaboradores realizaron una evaluación de la eficacia y seguridad de una solución de ClO<sub>2</sub> a 2,000 ppm (0.2%) en agua con menos impurezas preparado utilizando un diseño de proceso ecológico patentado. La solución demostró una actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral satisfactoria. Se demostró baja toxicidad mediante una prueba de citotoxicidad *in vitro*. La viabilidad celular de las células de fibroblastos de pulmón de ratón fue del 93,7% a 200 ppm (0.02%) 50 ppm de ClO<sub>2</sub> no causaron irritación ocular en una prueba de irritación ocular, los ratones no mostraron anomalías ni mortalidad en una prueba de toxicidad por inhalación de 20 ppm de ClO<sub>2</sub>, y concentraciones de ClO<sub>2</sub> de hasta 40 ppm no fueron tóxicas para los ratones durante 90 días en la prueba de toxicidad oral subcrónica. Por lo tanto, se demostró un perfil de seguridad más alto para ClO<sub>2</sub> que los obtenidos en estudios anteriores (Ma et al. 2017). De manera similar los resultados de citotoxicidad del presente estudio confirman la baja

citotoxicidad del CDS ante los fibroblastos gingivales con un porcentaje de viabilidad mayor al 90 % a una concentración de 0.09%.

Varios estudios evaluando el efecto del ClO<sub>2</sub> se encuentran en la literatura, que aunque no sean comparables con los resultados de este estudio, su mención puede ser relevante para confirmar su efectividad.

Evaluando la actividad bactericida *in vitro* del dióxido de cloro, Drake y Villhauer obtuvieron una inhibición del 100% de destrucción de las bacterias periodontopatógenas, entre ellas *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* utilizando un enjuague bucal con dióxido de cloro estabilizado (CloSYS). Este tratamiento demostró ser igual de efectivo que la CHX a los 5 min. En algunos casos CloSYS tuvo mayor efectividad en el marcador de 1 minuto (Drake y Villhauer 2011). Sin embargo este estudio no describe el porcentaje de ClO<sub>2</sub> utilizado por lo que no se puede comparar directamente con los resultados de este estudio.

Soares et. al en el 2022 evaluaron el efecto clínico de un enjuague bucal que contiene 0,3% de dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) en la reducción de los CVS. encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la solución de prueba y las soluciones que contenían cloruro de cetilpiridinio al 0,05 % y placebo, lo que demuestra el efecto oxidante de los CVS directamente para crear productos sin olor, así como el consumo de los aminoácidos que conducen a los CVS. Se encontraron resultados equiparables entre la solución con ClO<sub>2</sub> y la CHX lo que sugiere el uso del ClO<sub>2</sub> como un enjuague efectivo sin los efectos adversos de la CHX (Soares et al. 2013). No obstante, a pesar de que utilizaron la misma concentración de ClO<sub>2</sub>, sus bacterias de prueba no fueron las mismas utilizadas en el presenta estudio. Las soluciones fueron probadas en *S. mitis* and *S. salivarius* por lo cual no puede haber una comparativa de resultados.

Kandwal y Ghani compararon en un estudio clínico el efecto del enjuague de dióxido de cloro en la gingivitis inducida por placa y la halitosis en 30 pacientes. Los pacientes se dividieron en 3 grupos: Grupo 1 (10 pacientes con enjuague de dióxido de cloro), grupo 2

(10 pacientes con enjuague de ClO<sub>2</sub> y raspado y alisado radicular) y grupo 3 (raspado y alisado radicular). Se realizaron índices de placa e índice gingival al inicio del estudio, 7 y 14 días. Se encontró que el enjuague bucal de dióxido de cloro con raspado y alisado de raíces era más efectivo que el raspado y alisado de raíces solo, que nuevamente se encontró que era más efectivo que el enjuague de dióxido de cloro solo (Kandwal y Benzair 2014).

Frascella, Gilbert y Fernández compararon la eficacia de un enjuague bucal que contiene dióxido de cloro para reducir el mal olor bucal se comparó con la de un control de agua en un estudio cruzado, doble ciego, aleatorizado en 12 sujetos masculinos y femeninos. Los análisis de varianza mostraron que la mejora en el agrado del olor bucal en comparación con la línea de base para el enjuague bucal que contiene dióxido de cloro versus el control de agua fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en todas las evaluaciones posteriores al enjuague. Demostró que un único uso del enjuague con dióxido de cloro reduce el mal aliento por lo menos por 4 horas (Frascella et al. 1998).

Peruzzo, Castelo y Nogueira evaluaron el efecto inhibitor de CVS de un enjuague bucal disponible comercialmente (dióxido de cloro al 0,1%) en comparación con su placebo en estudio doble ciego de 2 pasos, cruzado, aleatorizado en estudiantes de odontología con un periodonto sano. Sus resultados sugieren que un enjuague bucal que contiene dióxido de cloro puede mantener los CVS en niveles más bajos en el aliento matutino (Peruzzo et al. 2007).

En el 2017, Bestari, Sunarto y Kemal realizaron un estudio para determinar la efectividad del uso de enjuague bucal con dióxido de cloro (Oxyfresh® “Oxygene®) para abordar la halitosis y obtuvieron una diferencia significativa en cuanto a los CVS en el grupo de prueba y en el grupo control después de hacer gárgaras concluyendo que el enjuague bucal con dióxido de cloro es efectivo para tratar la halitosis (Bestari et al. 2017).

Zirwas y Fitchel reportaron una serie de casos en los que aplicaron un limpiador con complejo de dióxido de cloro en pacientes con queratosis pilaris y concluyeron que el lavado con complejo de dióxido de cloro condujo a una resolución rápida y casi completa

de la queratosis pilar en los pacientes informados. Presenta varios beneficios sobre los tratamientos existentes, incluido el bajo costo y la facilidad de uso (Zirwas y Fichtel 2018).

En el 2020 Venkei et al. crearon un modelo básico *in vitro* para evaluar el efecto antibacteriano de tres antisépticos ampliamente utilizados (CHX, yodo povidona y ClO<sub>2</sub> al 0.12% (Solumium dental)) durante 5 minutos en biopelículas y encontraron que los más efectivos en la eliminación de las dos bacterias de prueba en ambas superficies de titanio fueron el ClO<sub>2</sub> y la yodo povidona por lo que concluyen que ambos pueden ser agentes antibacterianos prometedores para desinfectar el sitio periimplantario en la práctica dental (Venkei et al. 2020).

Karakeh, Illescas y Matin examinaron la eficacia bactericida de “Purogene” una solución estable de dióxido de cloro utilizando bacterias de interés para el público (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A), *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis*). Los resultados mostraron que Purogene era más eficaz en su pH más bajo (3.5), e indicó que al ser reducidas las soluciones de dióxido de cloro a clorito, su eficacia era reducida, sugiriendo el dióxido de cloro libre como la especie desinfectante activa .

## 8. CONCLUSIONES

Al ser un gas, El ClO<sub>2</sub> mostró una acción transitoria ya que se gasifica en aproximadamente 1 hora. Las pruebas de halo de inhibición no mostraron resultados satisfactorios. Esto se pudo deber a la exposición del ClO<sub>2</sub> al ambiente y a la luz por tiempos prolongados en lo que se preparaba el experimento. Por este motivo se optó por realizar la prueba germicida, la cual mostró resultados prometedores en cuanto al poder bactericida de esta solución.

En cuanto a las pruebas de citotoxicidad en células PBMC y fibroblastos gingivales, el CDS (3,000ppm) demostró ser menos citotóxico que las diluciones de ClO<sub>2</sub>. En concentraciones mínimas de estas soluciones hubo un incremento en el número de células que pudiera deberse al poder oxidativo del ClO<sub>2</sub>.

El ClO<sub>2</sub> posee un alto poder bactericida y baja toxicidad. Se ha demostrado su eficacia en el tratamiento contra la halitosis, la reducción de placa dentobacteriana y la ausencia de efectos adversos en su uso prolongado. Con esto se concluye que el ClO<sub>2</sub> y el CDS parece ser un agente antimicrobiano prometedor el cual podría ser utilizado como coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal y periimplantar así como el manejo de la halitosis.

Debido a lo anterior se pudo comprobar o se llegó a la comprobación de la hipótesis... la cual tenía como premisa que el CDS tendría menor citotoxicidad y un efecto bactericida *in vitro* en *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* homólogo al ClO<sub>2</sub> al 0.10%.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addy M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *J Clin Periodontol.* 1986;13(10):957–64.
- Alfhili MA, Lee MH. Triclosan: An Update on Biochemical and Molecular Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;1–28.
- Bestari MD, Sunarto H, Kemal Y. Efficacy of chlorine dioxide mouthwash against halitosis. *J Phys Conf Ser.* 2017;884:1–8.
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45:1–8.
- Chapple I. Salud periodontal y gingivitis. *Eur Fed Periodontol.* 2019;1–11.
- Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* junio de 2018;89:74–84.
- Costa FO, Costa AA, Cota LOM. The use of interdental brushes or oral irrigators as adjuvants to conventional oral hygiene associated with recurrence of periodontitis in periodontal maintenance therapy: A 6-year prospective study. *J Periodontol.* enero de 2020;91(1):26–36.
- Costerton JW. Bacterial Biofilms: A common Cause of Persistent Infections. *Am Assoc Adv Sci AAAS.* 1999;284(54180):1318–22.
- Cruz RS, Balier CRA, Fernández NES, Matos NJB, Ferrer FT. Acciones educativas para salud periodontal en embarazadas. *Rev Inf Científica.* 2017;96(1):1–11.
- Csikány C, Várnai G, Noszticzius Z. SOLUMIUM DENTAL: the hyper-pure chlorine dioxide solution and its applications in dentistry I. *Dent Hirek.* 2009;5.
- Dobson S, Cary R. Chlorine Dioxide (Gas). evaluación química. *World*

Health Organ. 2002;

- Downs R, Banas J, Zhu M. An in vitro study comparing a two-part activated chlorine dioxide oral rinse to chlorhexidine. *Perio Implant Advisory*. 2015;
- Drake D, Villhauer AL. An in vitro comparative study determining bactericidal activity of stabilized chlorine dioxide and other oral rinses. *J Clin Dent*. 2011;22(1):1–5.
- El Desafío de las Enfermedades Bucodentales - Una llamada a la acción global. *Atlas de Salud Bucodental*. . 2a ed. Ginebra: Federación Dental Internacional (FDI); 2015.
- Frascella J, Gilbert R, Fernandez P. Odor reduction potential of a chlorine dioxide mouthrinse. *J Clin Dent*. 1998;9(2):39–42.
- Gomez-Flores R, Quintanilla-Licea R, Hernández-Martínez HC, Samaniego-Escamilla M, Tamez-Guerra P, Monreal-Cuevas E, et al. Survival of Lymphoma-Bearing Mice by *Pachycereus marginatus* Cactus Extracts and Elucidation of Bioactive Compounds. *Nat Prod Commun*. 2019;14(5):1–6.
- Harakeh S, Illescas A, Matin A. Inactivation of bacteria by Purogene. *J Appl Bacteriol*. 1988;64(5):459–63.
- Herczegh A, Gyurkovics M, Agababyan H, Ghidán Á, Lohinai Z. Comparing the efficacy of hyper-pure chlorine-dioxide with other oral antiseptics on oral pathogen microorganisms and biofilm in vitro. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2013;60(3):359–73.
- Herrera D, Figuero E, Shapira L, Jin L, Sanz M. La Nueva Clasificación de las Enfermedades Periodontales y Periimplantarias. *Soc Esp Periodoncia Osteointegración*. 2018;18.
- Iniesta M, Herrera D, Serrano J, Sanz M. Análisis de los factores de virulencia de los patógenos de asociación fuerte con la periodontitis: *Quintessence J*. 2008;18(2):7.
- James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Oral Health Group, editor. Cochrane Database Syst Rev*.

2017;

- Kandwal A, Benzair G. A Comparative Evaluation of Effect of Chlorine Dioxide Mouthrinse in Plaque Induced Gingivitis and Oral Malodor: A Clinical Study. *Int J Dent Health Sci.* 2014;1(1):24–33.
- Kerémi B, Márta K, Farkas K, Czumbel LM, Tóth B, Szakács Z, et al. Effects of Chlorine Dioxide on Oral Hygiene - A Systematic Review and Meta-analysis. *Curr Pharm Des.* julio de 2020;26(25):3015–25.
- Kuroyama I, Osato S, Nakajima S, Kubota R, Ogawa T. Environmental Monitoring and Bactericidal Efficacy of Chlorine Dioxide Gas in a Dental Office. *Biocontrol Sci.* 2010;15(3):103–9.
- Lamont RJ, De la Garza Ramos MA, Hajishengallis GN, Jenkinson HF, Morales JL, Palacios JR. *Microbiología e Inmunología Oral.* 1a ed. Ciudad de México: El manual moderno; 2015.
- Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Clin Periodontol.* junio de 2018;45:S9–16.
- Láng O, Nagy KS, Láng J, Perczel-Kovács K, Herczegh A, Lohinai Z, et al. Comparative study of hyperpure chlorine dioxide with two other irrigants regarding the viability of periodontal ligament stem cells. *Clin Oral Investig.* 2021;25(5):2981–92.
- Ma JW, Huang BS, Hsu CW, Peng CW, Cheng ML, Kao JY, et al. Efficacy and Safety Evaluation of a Chlorine Dioxide Solution. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(3).
- Marder AMZ, Marder RW. Bisphosphonate- Associated Osteonecrosis: *Dent Today.* 2009;9.
- Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):263–71.
- McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147–79.
- Mehra P, Clancy C, Wu J. Formation of a Facial Hematoma During Endodontic Therapy. *J Am Dent Assoc.* 2000;131(1):67–71.
- Melo P, Marques S, Silva OM. Portuguese self-reported oral-hygiene

habits and oral status. *Int Dent J.* 2017;67(3):139–47.

- Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2015;69(1):7–17.
- Müller HD, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. *BioMed Res Int.* 2017;2017:1–9.
- Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol.* 2018;89:17–27.
- Myneni Venkatasatya SR, Wang HH, Alluri S, Ciancio SG. Phosphate buffer-stabilized 0.1% chlorine dioxide oral rinse for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. *Am J Dent.* diciembre de 2017;30(6):350–2.
- Mynenivenkatasatya SR, Wang H, Cooley W, Garcia-Smith E, Shewale J, Ratcliff J. Effectiveness of a Novel Dentifrice Containing Stabilized Chlorine Dioxide, Sarkosyl, and Sodium Fluoride. *Dent J.* el 27 de octubre de 2020;8(4):122.
- Noszticzius Z, Wittmann M, Kály-Kullai K, Beregvári Z, Kiss I, Rosivall L, et al. Chlorine Dioxide Is a Size-Selective Antimicrobial Agent. *PLOS ONE.* 2013;8(11).
- Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions: Classification and case definitions for periodontitis. *J Clin Periodontol.* junio de 2018;45:S162–70.
- Peruzzo D, Castello Branco P, Nogueira G. Use of 0.1% chlorine dioxide to inhibit the formation of morning volatile sulphur compounds (VSC). *Braz Oral Res.* 2007;21(1):70–4.
- Pham TAV, Nguyen NTX. Efficacy of chlorine dioxide mouthwash in reducing oral malodor: A 2-week randomized, double-blind, crossover study. *Clin Exp Dent Res.* 2018;4(5):206–15.
- Quintanilla-Licea R, Gomez-Flores R, Samaniego-Escamilla MÁ,

Hernández-Martínez HC, Tamez-Guerra P, Morado-Castillo R. Cytotoxic Effect of Methanol Extracts and Partitions of Two Mexican Desert Plants against the Murine Lymphoma L5178Y-R. *Am J Plant Sci.* 2016;07(11):1521–30.

- Resumen de Salud Pública Dióxido de Cloro y Clorito. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades; 2004.
- Shinada K, Ueno M, Konishi C, Takehara S, Yokoyama S, Zaitso T, et al. Effects of a mouthwash with chlorine dioxide on oral malodor and salivary bacteria: a randomized placebo-controlled 7-day trial. *Trials.* 2010;11(1):14.
- Soares L, Guitolini R, Weyne S, Falabella M, Tinoco E, Silva D. The effect of a mouthrinse containing chlorine dioxide in the clinical reduction of volatile sulfur compounds. *Gen Dent.* 2013;61:46–9.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38(1):135–87.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* febrero de 1998;25(2):134–44.
- Van Der Weijden F, Slot DE. Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence: Evidence-based oral hygiene methods. *Periodontol 2000.* 2011;55(1):104–23.
- Venkei A, Eördegh G, Turzó K, Urbán E, Ungvári K. A simplified in vitro model for investigation of the antimicrobial efficacy of various antiseptic agents to prevent peri-implantitis. *Acta Microbiol Immunol Hung.* junio de 2020;67(2):127–32.
- Watamoto T, Egusa H, Sawase T, Yatani H. Clinical Evaluation of Chlorine Dioxide for Disinfection of Dental Instruments. *Int J Prosthodont.* 2013;26(6):541–4.
- Weatherly LM, Gosse JA. Triclosan Exposure, Transformation, and Human Health Effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2017;20(8):447–69.
- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the

microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis: Microbiota in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27(9):648–57.

- Young R. Chlorine Dioxide (ClO<sub>2</sub>) As a Non-Toxic Antimicrobial Agent for Virus, Bacteria and Yeast (*Candida Albicans*). *Int J Vaccines Vaccin*. el 8 de octubre de 2016;2(6).
- Zirwas MJ, Fichtel J. Chlorine Dioxide Complex Cleanser: A New Agent With Rapid Efficacy for Keratosis Pilaris. *J Drugs Dermatol JDD*. 2018;17(5):554–6.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

C.D. Natalia Saavedra Alcalá

Candidata para el Grado de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE PERIODONCIA  
CON IMPLANTOLOGÍA ORAL**

**TESIS:** EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DEL DIÓXIDO DE CLORO Y SUS  
PREPARACIONES EN BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

**Campo de estudio:** Ciencias de la Salud

**Datos personales:** Nacida en Monterrey, Nuevo León, México, el 28 de febrero de 1995.

**Educación:** Egresada de la Licenciatura de Cirujano Dentista en la Facultad de  
Odontología, de la Universidad Autónoma de Nuevo León